

Protutumorski učinci novih derivata kumarina na stanice tumora debelog crijeva in vitro

Živković, Zorislava

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:554904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Zorislava Živković

**PROTUTUMORSKI UČINCI NOVIH
DERIVATA KUMARINA NA STANICE
TUMORA DEBELOG CRIJEVA *IN*
*VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2018.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Zorislava Živković

**PROTUTUMORSKI UČINCI NOVIH
DERIVATA KUMARINA NA STANICE
TUMORA DEBELOG CRIJEVA *IN*
*VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2018.

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

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

Rad ima 45 listova i 19 slika.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na pruženoj prilici, predloženoj temi i stručnom vodstvu. Najveća hvala na svim oblicima podrške, razumijevanju, savjetima koje ste mi udijelili i vremenu koje ste uložili prilikom izrade diplomskog rada.

Srdačno se zahvaljujem, dr.sc. Marijani Jukić na znanju koje je podijelila sa mnom, nesebičnoj pomoći i izdvojenom vremenu tijekom izrade rada. Hvala Vam za sve savjete i prijedloge koje ste mi udijelili u svrhu poboljšanja ovog rada.

Veliko hvala doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi na konstruktivnim savjetima, izdvojenom vremenu i osvrtu na rad.

Zahvaljujem se svim profesorima pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na prenesenom znanju, vještinama i ugodnim predavanjima tijekom petogodišnjeg studiranja.

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su studentske dane učinili ljepšim, predavanja ugodnijima, a studiranje lakšim.

Posebnu zahvalnost želim iskazati mojoj cijeloj obitelji. Hvala Vam na svakom obliku podrške i upućivanju na pravi put.

Na kraju, najveću zahvalnost pripisujem svojim roditeljima koju su uvijek bili uz mene i bez kojih ovo što sam do sada postigla ne bi bilo moguće. Hvala Vam na pruženoj ljubavi, svim odricanjima i razumijevanju.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Kumarinski spojevi	1
1.1.1. Kumarini.....	1
1.1.2. Derivati kumarina.....	3
1.2. Karcinom debelog crijeva	4
1.2.1. Kolorektalni karcinom	4
1.2.2. Djelovanje derivata kumarina na stanice karcinoma debelog crijeva.....	5
1.3. Stanični ciklus	7
1.3.1. Faze staničnog ciklusa.....	7
1.3.2. Kontrolne točke staničnog ciklusa.....	8
1.3.3. Regulacija staničnog ciklusa	9
1.4. Povezanost apoptoze i mitohondrijskog membranskog potencijala	10
1.4.1. Značajke apoptoze	10
1.4.2. Intrinzični put apoptoze	11
1.4.3. Narušavanje mitohondrijskog membranskog potencijala.....	13
2. CILJ	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1.MATERIJALI	16
3.1.1. Ispitivani spojevi	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Stanične linije.....	17
3.2. METODE	17
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	17
3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi	18
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	19
3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH)	20
3.2.5. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom.....	22
3.2.6. Određivanje promjene mitohondrijskog potencijala ($\Delta\Psi_m$)	23
3.2.7. Statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI	24
4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata kumarina MTT testom	24
4.2. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH)	27
4.3. Utjecaj derivata kumarina na stanični ciklus	29
4.4. Učinak novosintetiziranih derivata kumarina na mitohondrijski potencijal	32

5. RASPRAVA	35
6. ZAKLJUČAK	38
7. SAŽETAK	39
8. SUMMARY	40
9. LITERATURA	41
10. ŽIVOTOPIS	45

POPIS KRATICA

AIF (eng. *apoptosis inducing factor*) inducirajući faktor apoptoze

APAF-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze

APC (eng. *adenomatous polyposis coli*) adenomatozna polipoza debelog crijeva

ATP adenzin trifosfat

BAX (eng. *BCL-2-associated X protein*) proapoptotski protein

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

dATP deoksiadenozin-trifosfat

DMAC 5,7-dihidroksi-4-metil-6- (3-metilbutanoil) -kumarin

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

DMSO dimetil sulfoksid

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

ER endoplazmatski retikulum

FAP (eng. *familial adenomatous polyposis*) obiteljska adenomatozna polipoza

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

Hep 2 stanice humanog epitela tip 2

K-Ras - Kristen Ras onkogen

LDH - laktat dehidrogenaza

M mol/dm³

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

NADH nikotinamid adenin dinukleotid

PARP poli ADP-riboza polimeraza

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

PI propidij jodid

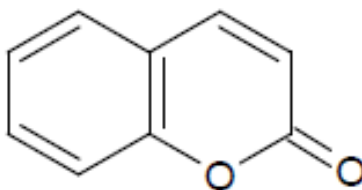
1. UVOD

1.1. Kumarinski spojevi

1.1.1. Kumarini

Heterociklički spojevi imaju važnu ulogu u sintezi različitih biološki aktivnih derivata. Do sada je otkriven veliki broj heterocikličkih spojeva sa zamjetnom biološkom aktivnošću, a njihov broj se još povećava. Dušik, sumpor i kisik najčešće su zastupljeni heteroatomi.

Fuzijom benzenskog prstena vezanog s α -pironskim prstenom nastaje benzopiron. Jedan od derivata benzopirona je benzo- α -piron, poznatiji kao kumarin (1) (slika 1). Kumarini (1,2-benzopironi ili o-hidoksicinaminska kiselina-8-lakton) velika su i važna klasa kisikovih heterocikličkih spojeva (2).



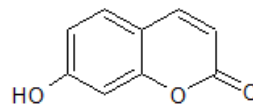
Slika 1. Kemijska struktura kumarina

Prvi puta kumarin je izoliran iz biljke *Coumarouna odorata Aube* (Dipteryx odorata) prema kojoj je i dobio ime (3). Poznat je po svom mirisu na vaniliju, dok neki autori njegov miris karakteriziraju kao miris svježe pokošene trave. Kumarinski prsten sadrži 6 ugljikovih atoma na koje se može vršiti supstitucija što omogućava širok spektar prirodnih ili sintetskih derivata (4). Osim toga, poznato je mnogo drugih kompleksnih spojeva s biološkim i farmakološkim svojstvima kumarina, a koji u svojoj strukturi sadrže kumarinsku jezgu (2). Upravo je ovakva strukturalna raznolikost osnova za podjelu obitelji kumarina u nekoliko skupina – od jednostavnih do izrazito složenih, policikličkih kumarina (furokumarina i piranokumarina) (3).

Prva skupina su jednostavni kumarini, koji su hidroksilirani, alkilarni i alkoksilirani na benzenskom prstenu poput umbeliferona (5). Drugu skupinu čine furanokumarini kao što su linearni ili angularni furanokumarini koji u svojoj strukturi imaju peteročlani furanski prsten

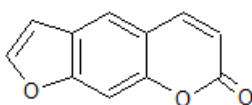
vezan na kumarinsku skupinu. Piranokumarini, analozi furanokumarina sadrže šesteročlani furanski prsten vezan za kumarinsku strukturu i čine treću skupinu kumarina (1). Varfarin, predstavnik četvrte skupine na kumarinsku jezgru ima vezan pironski prsten (5) (slika 2).

Jednostavni kumarini

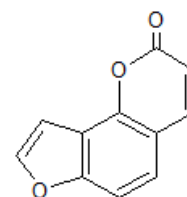


Umbeliferon

Furanokumarini

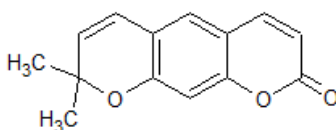


Psoralen

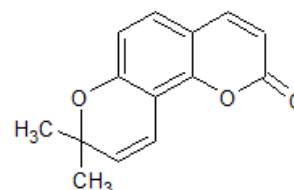


Angelicin

Piranokumarini

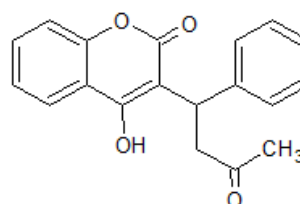


Seselin



Ksentiletin

Pirano-supstituirani kumarini



Varfarin

Slika 2. Klasifikacija derivata kumarina

Kumarini su u prirodi prisutni kao sekundarni biljni metaboliti i pokazuju brojna zanimljiva biološka svojstva. Poznato je više od 1800 različitih prirodnih kumarina čija struktura uključuje jedan ili dva atoma kisika vezana za aromatski prsten (1).

Spojevi kumarina mogu se izolirati i iz mikroorganizama kao što su novobiocin iz *Streptomyces spp.* i aflatoksin iz *Aspergillus spp.* Zbog svojeg karakterističnog mirisa česti su sastojci kozmetičkih proizvoda – parfema, sapuna, pastila za zube, deterdženata i alkoholnih pića. U velikoj količini rabe se kao dodaci gumama i plastici, a zbog svojeg svojstva neutralizacije mirisa glavni su sastojak boja i sprejeva (6).

Iako je kumarinska struktura poznata duže od stoljeća stalno se sintetiziraju novi kumarini i njihovi derivati i istražuje njihov biološki potencijal (7).

1.1.2. Derivati kumarina

Veliki dio istraživača usmjerio je svoje zanimanje ne samo na izolaciju i pročišćavanje prirodnih bioloških kumarina iz različitih biljaka, životinja i mikroorganizama već i prema razvoju nosintetiziranih kumarinskih spojeva s novim svojstvima. Posebno se ističu na kumarinskoj jezgri zasnovane bioaktivne molekule i novi lijekovi koje se intenzivno istražuju. Neki od njih, poput antikoagulansa varfarina, već se ustaljeno koriste u kliničkoj praksi (8). Kako navode Medina i suradnici, dokazano je kako primjena varfarina u pacijenata s karcinomom produljuje njihov život (9).

Derivati kumarina pokazali su se kao ključni elementi različitih farmaceutskih pripravaka (9). Derivati kumarina mogu regulirati različite stanične putove pa su dobri kandidati za istraživanje selektivnog antitumorskog djelovanja kumarina (10). Mehanizam njihova djelovanja uključuje inhibiciju telomeraza i inhibiciju aktivnosti proteinske kinaze. Inhibicija regulacije ekspresije onkogenih i indukcija kaspaze 9 odgovorne za apoptozu još su neki od načina na koje derivati kumarina utječu na sudbinu malignih stanica (11).

Kako navode Salem i suradnici, derivati kumarina posjeduju citostatske i citotoksične osobine i inhibiraju rast ljudskih tumorskih stanica poput stanica A 549 (adenokarcinom pluća), HL 60 (mijeloidna leukemija) i MCF (adenokarcinom dojke). Istraživanja su provedena *in vitro* na panelima stanica karcinoma prostate, malignog melanoma i karcinoma bubrega. Ispitivani spojevi kumarina pokazali su snažnu antiproliferativnu aktivnost na ovim staničnim linijama (12). Kumarinski derivati pokazali su citotoksičan učinak i na stanice Hep 2 karcinoma grkljana. Ovisno o dozi, derivati su uzrokovali gubitak membranskih mikrovila, hipervakualiziranu citoplazmu i fragmentaciju jezgre i time Hep 2 stanice karcinoma grkljana usmjerili prema apoptozi (13).

Osim što su korisni u liječenju karcinoma, pokazali su i značajan doprinos u liječenju nuspojava uzrokovanih radioterapijom (12).

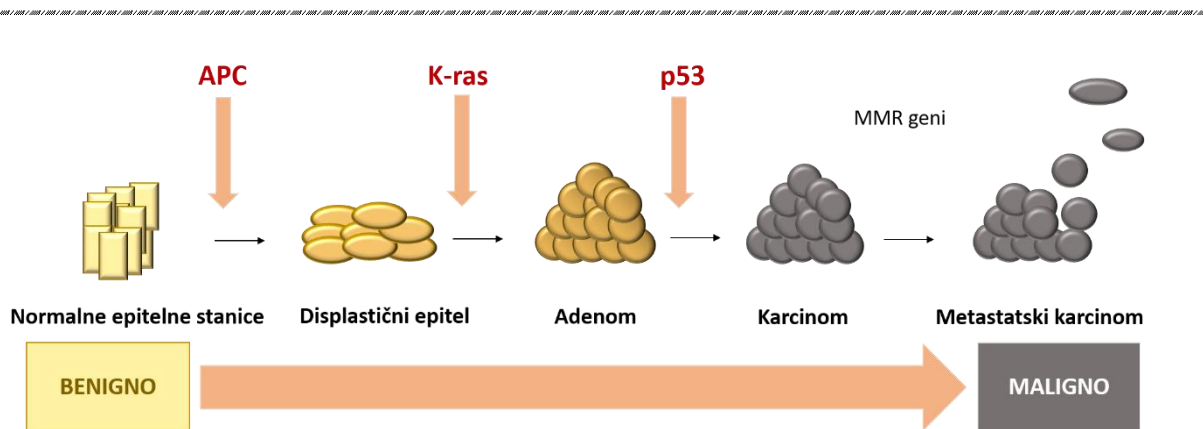
1.2. Karcinom debelog crijeva

1.2.1. Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom je treći najčešći oblik karcinoma u onkološkoj patologiji. Najčešći je maligni karcinom gastrointestinalnog trakta, a podjednako se javlja u žena i u muškaraca (14). Incidencija ovog karcinoma viša je u razvijenim zemljama, a niža u zemljama u razvoju (15). Učestalost kolorektalnog karcinoma izražena je u pacijenata između 65 - 74 godine, no pojavnost ovog karcinoma sve je veća u mlađih pacijenata. Pretilost, sjedilački način života, loše prehrambene navike (visok udio masti i proteina u hrani), pušenje i ubrzano starenje populacije neki su od čimbenika koji se vežu uz sve raniju karcinogenezu u ljudi (14). Najveći dio (oko 95%) kolorektalnih karcinoma čine adenokarcinomi, porijeklom iz epitelnih stanica (16).

U etiologiji karcinoma debelog crijeva i genetski i ekološki čimbenici imaju važnu ulogu. Navedeni karcinom većinom je sporadičan, oko tri četvrtine bolesnika ima negativnu obiteljsku anamnezu. Rizik za nastanak karcinoma se udvostručava ako je jednom od uži članova obitelji ovaj karcinom otkriven između 50 i 70 godine života. Rizik se utrostručuje ako je uži član obitelji imao manje od 50 godina pri postavljanju dijagnoze. Snažna pozitivna obiteljska anamneza jedan je od rizičnih čimbenika u bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Manji broj pacijenata ima genetsku formu karcinoma – obiteljsku adenomatoznu polipozu (FAP) ili nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (Lynchov sindrom). U najvećem broju slučajeva, uzrok nastanka kolorektalnog karcinoma ostaje nepoznat (17).

Na genetskoj razini, karcinom debelog crijeva proizlazi iz jedne ili kombinacije kromosomskih nestabilnosti, promjene fenotipa metilacije CpG otoka i nestabilnosti mikrosatelita. Mutacije tumorsupresora ili promjene gena staničnog ciklusa mogu rezultirati malignom promjenom stanice. Kako navode Tariq i suradnici, jedan od putova karcinogeneze uključuje mutaciju proteina APC nakon čega slijedi mutacijska aktivacija onkogenog K-ras i inaktivacija tumorsupresorskog gena TP53. Razumijevanje mehanizama tumorigeneze kao i temeljnih genetskih i epigenetskih promjena ključno je za shvaćanje fenotipa bolesti (18) (slika 3).



Slika 3. Genske promjene odgovorne za postupan prijelaz normalnih epitelnih stanica u stanice karcinoma

Klinička slika uključuje simptome poput abdominalne boli, promjene navika pražnjenja crijeva (izmjene razdoblja dijareje i zatvora), mučnine, povraćanja, krvi i sluzi u stolici (14). Proksimalno smješteni tumori češće su asimptomatski i praćeni znakovima opstrukcije i anemije. Tumori distalnog dijela crijeva uzrokuju vidljivo krvarenje.

Metode probira uključuju test na okultno krvarenje u fecesu i kolonoskopiju. Na probir se upućuju osobe sve starije od 50 godina i osobe s visokim rizikom od nastanka karcinoma. Osobe s visokim rizikom s testiranjem bi trebale početi s 40 godina te ih je potrebno češće testirati (15).

Dijagnostika kolorektalnog karcinoma temelji se na uzimanju anamneze, kliničkom pregledu (uz digitorektalni pregled), kolonoskopiji i biopsiji sumnjivih promjena. Nekoliko je različitih klasifikacija navedenog karcinoma – Dukesova, Asler-Collerova i TNM klasifikacija (15, 19).

Liječenje kolorektalnog karcinoma podrazumijeva kirurški zahvat, kemoterapiju, radioterapiju i nove molekularne metode (ciljana ili biološka) terapija. Pacijent se uobičajeno liječi kombiniranjem prve tri tehnike liječenja. Za karcinom koji je metastazirao u druge organe upotrebljava se i ciljana ili biološka terapija. U ranim stadijima bolesti primjenjuje se kirurška terapija, kao primarni tretman. Kemoterapija i radioterapija preporučena je kao predoperativna ili postoperativna terapija kod uznapredovale bolesti (20).

1.2.2. Djelovanje derivata kumarina na stanice karcinoma debelog crijeva

Otpornost stanica karcinoma debelog crijeva na trenutne terapijske protokole ozbiljan su problem u njegovom liječenju (21). Induciranje apoptoze u stanicama karcinoma jedna je od najvažnijih strategija u borbi protiv karcinoma. Izazivanje stresa endoplazmatskog

retikulumu i disfunkcija mitohondrija pokazali su se ključnim faktorima pokretanja apoptoze. Endoplazmatski retikulum (ER), organela odgovorna za sintezu i smatanje proteina, održava homeostazu kalcija. Endoplazmatski stres uzrokuje izlazak kalcijevih iona iz ER lumena u matriks mitohondrija dok visoke koncentracije kalcija uzrokuju povećanje permeabilnosti membrane i stvaraju okoliš pogodan za aktivaciju apoptoze. Ovom spoznajom pozabavili su se Kim i suradnici istražujući utjecaj eskuletina (6,7-dihidrokskumarin) na stanice karcinoma debelog crijeva (HT-29). Znanstvenici su protočnom citometrijom otkrili da eskuletin potiče mobilizaciju kalcija iz ER-a stanicama HT-29 i izaziva ekspresiju ER stres proteina. Eskuletin je u prethodnim istraživanjima pokazao jak apoptotički utjecaj na stanice karcinoma debelog crijeva. Utjecaj mu se očituje u smanjivanju razine Bcl-2, povećanjem BAX proteina i narušavanju mitohondrijskog potencijala (22).

Jedan od derivata kumarina, furo(3,2-c)kumarin pokazao je vrlo dobar protutumorski učinak inhibicijom staničnog rasta HCT-15 stanične linije karcinoma debelog crijeva (13). Djelovanje ovog derivata kumarina temelji se na povezanosti kemijske strukture derivata kumarina i njegovog protutumorskog djelovanja. Istraživanja su usmjerena na interakcije DNA s malim bioaktivnim molekulama u *in vivo* i *in vitro* uvjetima kako bi se otkrili novi spojevi koji se mogu nekonvalentno vezati na molekule DNA (23).

Kako bi pronašli nove lijekove za liječenje adenokarcinoma debelog crijeva, Saidu i suradnici kombinirali su kumarine s polisulfidima stvarajući dikumarinske polisulfide. Derivati su testirani na staničnoj liniji HCT116 (stanična linija karcinoma debelog crijeva). Nađeno je da su testirani spojevi smanjili vijabilnost tumorskih stanica ovisno o vremenu djelovanja i koncentraciji spojeva. Stanice koje su bile testirane ovim spojevima akumulirale su se u G2/M fazi staničnog ciklusa. Kumarinski polisulfidi potaknuli su intrinzični put apoptoze što je dokazano sniženom ekspresijom antiapoptotičkog proteina Bcl-2, povećanjem ekspresije apoptotičkog regulatora BAX-a, aktivacijom kaspaze 3/7 i PARP i oslobađanjem citokroma C u citosol (24).

Rezultati istraživanja Lina i suradnika pokazali su kako se alkilacijom na položaju 6 kumarina dobiva biološki aktivan kumarinski derivat DMAC, koji je inducirao apoptozu u dvije stanične linije karcinoma debelog crijeva - HCT-116 i LoVo. Djelovanje DMAC kumarinskog derivata uzrokovalo je pokretanje JNK ovisne, ROS neovisne apoptoze i induciralo staničnu smrt u HCT-116 i LoVo staničnim linijama. Navedeni derivat može se koristiti za poboljšanje terapijske učinkovitosti lijekova i za stvaranje novog pristupa u dizajniranju antitumorskih lijekova(25).

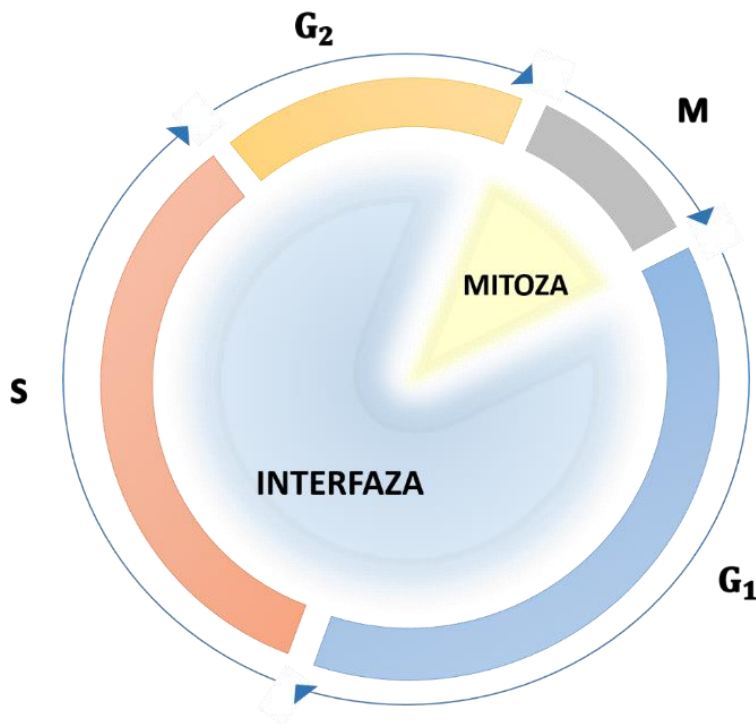
1.3. Stanični ciklus

Prolazak stanice kroz stanični ciklus uključuje četiri međusobno povezana procesa – stanični rast, replikaciju DNA, raspodjelu udvostručenih kromosoma stanica kćeri i podjelu stanice. U eukariota DNA se sintetizira samo tijekom jedne faze ciklusa dok su replicirani kromosomi smješteni u jezgre stanica kćeri (26). Eukariotske stanice sadrže kompleksnu mrežu regulatornih proteina, poznatih kao sustav kontrole staničnog ciklusa koji upravljaju progresijom ciklusa. Srž ovog sustava je niz biokemijskih okidača koji iniciraju glavne događaje ciklusa, uključujući duplikaciju i razdvajanje kromosoma. Ovakav kontrolni sustav prati događaje izvan i unutar stanice. Kada sustav kontrole ne radi ispravno, to može uzrokovati prekomjernu diobu stanica, a potom i razvoj tumorskih stanica (27).

1.3.1. Faze staničnog ciklusa

Osnovna funkcija staničnog ciklusa je duplicirati DNA u kromosomima i odvojiti kopije u dvije genetski identične stanice kćeri. Navedeni procesi definiraju dva glavne faze staničnog ciklusa - interfazu i mitozu (27). Dio staničnog ciklusa u kojem stanica raste i replicira svoju DNA naziva se interfaza. Tijekom staničnog ciklusa stanica 95% vremena provede u interfazi (26). M faza obuhvaća dva glavna događaja: podjelu jezgre (kariokinezu) i podjelu citoplazme (citokinezu). Pod mikroskopom lako vidljivi procesi mitoze i citokineze uobičajeno zauzimaju mali dio staničnog ciklusa (27).

Interfaza uključuje tri dijela: G1 (eng. *gap*), S i G2 fazu. G1 faza predstavlja najdužu i najvarijabilniju fazu staničnog ciklusa. Navedena faza obuhvaća interval između mitoze i početka DNA replikacije. Stanice kćeri prethodno nastale citokinezom upola su manje od stanice roditeljske stanice. Tijekom G1 ove stanice rastu do njihove optimalne veličine. Slijedi faza sinteze, S faza ciklusa u kojoj se DNA replicira. G2 faza predstavlja interval između završetka replikacije i početka mitoze (28) (slika 4). Ako su izvanstanični uvjeti nepovoljni, stanica ulazi u G0 fazu ciklusa u kojoj može ostati danima, tjednima ili godinama. G0 faza nije nužno trajna te se stanice kao odgovor na specifične podražaje i povoljne uvjete mogu vratiti u ciklus. (27).

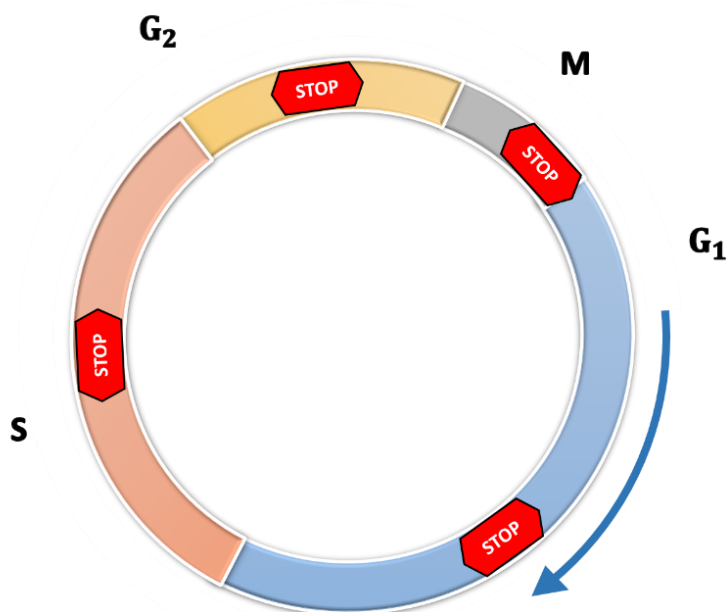


Slika 4. Prikaz faza staničnog ciklusa

1.3.2. Kontrolne točke staničnog ciklusa

Vrijeme i redoslijed događaja koji se odvijaju tijekom staničnog ciklusa regulirani su kontrolnim točkama. Kontrolne točke u G₁, S i G₂ fazi staničnog ciklusa otkrivaju neudvostručenu ili oštećenu DNA, usmjeravaju daljnje napredovanje kroz stanični ciklus i osiguravaju da se oštećena DNA ne udvostručuje i ne prenosi u stanice kćeri. Takva oštećena DNA putem signalnih puteva zaustavlja stanični ciklus. Nastavak diobe i prelazak iz G₂ u M fazu staničnog ciklusa moguć je tek kada je genom potpuno repliciran ili oštećenje DNA popravljeno. Kontrolna točka za popravak DNA u G₁ fazi osigurava da se oštećena DNA ne replicira i ne prenese na stanice kćeri u S fazi. S faza sadrži kontrolnu točku koja je ključna za provjeru kvalitete DNA. Pred kraj mitoze pod kontrolom je pravilno vezanje kromosoma za niti diobenog vretena, čije razdvajanje započinje tek nakon pravilnog smještanja svih kromosoma u ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena (26) (slika 6).

Navedene kontrolne točke staničnog ciklusa onemogućavaju početak nove faze prije dovršetka prethodne i sprječavaju razvoj genetski promijenjenih stanica (29).



Slika 5. Kontrolne točke ciklusa. Glavni dijelovi ciklusa – replikacija DNA, mitozu i citokinezu pod nadzorom su kontrolnih mehanizama

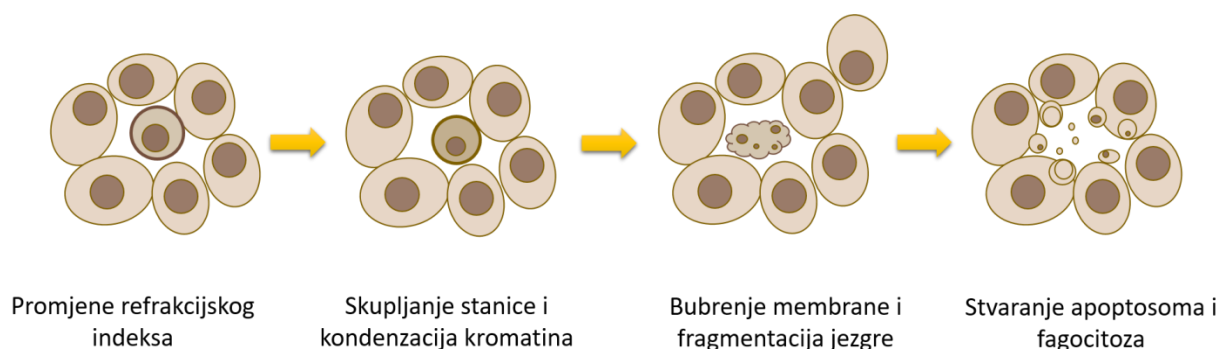
1.3.3. Regulacija staničnog ciklusa

U regulaciji staničnog ciklusa sudjeluju grupe proteina poznatih kao ciklini i o ciklinima ovisne protein kinaze (Cdks). Kako im i naziv implicira, riječ je o enzimima koji fosforiliraju proteine, ali samo u prisutnosti ciklina. Dodavanje fosfatne skupine djeluje kao prekidač, što ciljani protein čini više ili manje aktivnim. Dodavanjem ciklina na Cdk postižu se dva učinka: aktivira se Cdk kao kinaza i usmjerava se Cdk na skupinu ciljanih proteina. Na primjer, prijelaz iz G₁ u S fazu kontrolira aktivacija Cdk2 ciklina E, dok prijelaz iz G₂ u M fazu zahtijeva vezanje ciklina B na Cdk1. Svaka faza staničnog ciklusa regulirana je različitim skupom ciklina i Cdk proteina (30). Ovisno o funkciji i vremenu njihove ekspresije ciklini su podijeljeni u četiri razreda. Tri razreda u eukariota izravno su uključena u kontrolu događaja staničnog ciklusa. Četvrti razred, G₁ ciklini kontroliraju ulazak u stanični ciklus kao odgovor na izvanstanične čimbenike rasta ili mitogene (31). Nakon što je stanica uspješno ušla u sljedeću fazu staničnog ciklusa, Cdk se inaktivira uništavanjem ciklina. Cdk ostaje neaktivan sve dok ciklin ne postane ponovno dostupan u citoplazmi. Transkripcija i translacija ciklinamora se odviti prije nego što stanica ponovi ciklus (30).

1.4. Povezanost apoptoze i mitohondrijskog membranskog potencijala

1.4.1. Značajke apoptoze

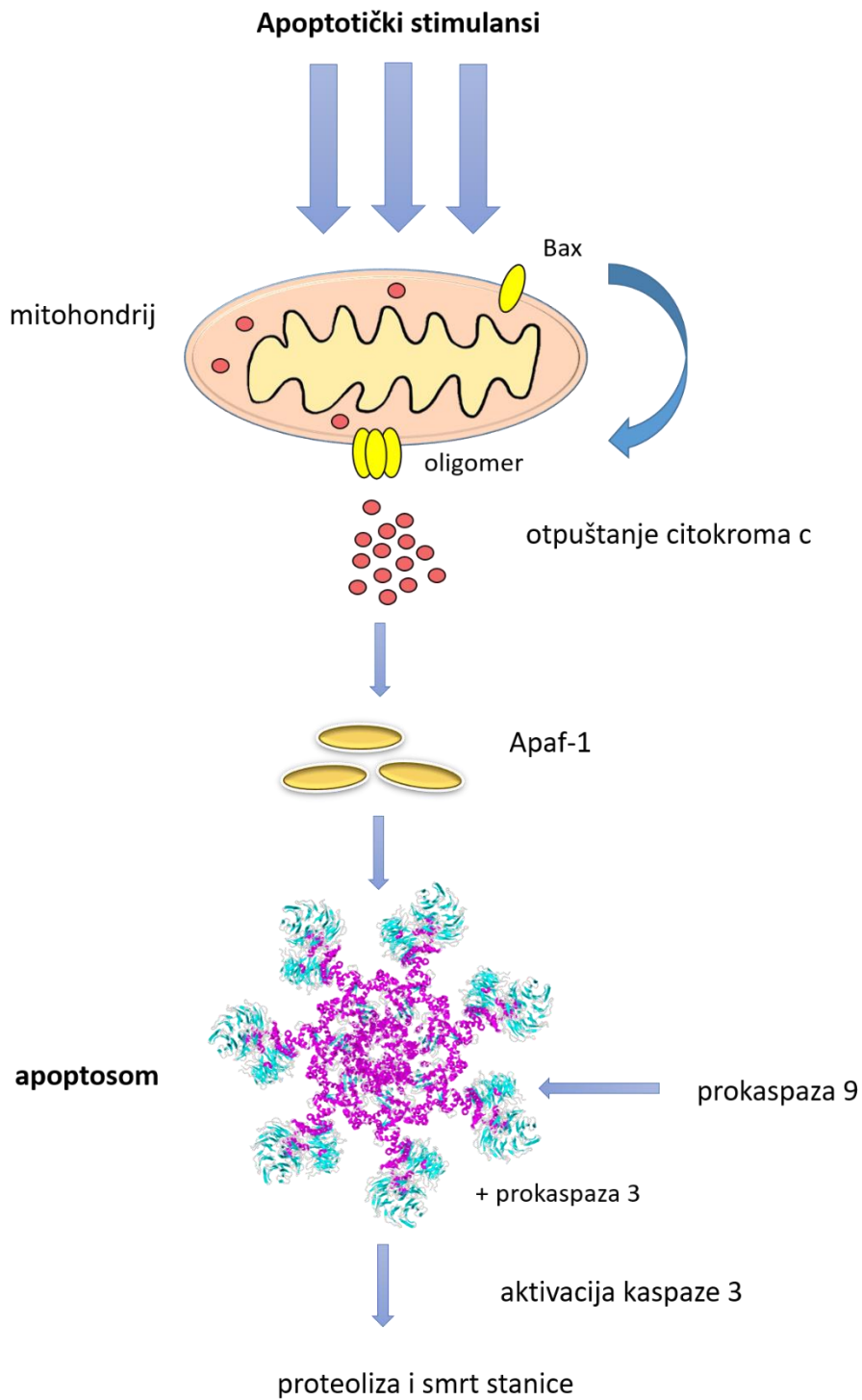
Apoptotski način smrti stanica je aktivan i definirani proces koji igra važnu ulogu u razvoju višestaničnih organizama, te u regulaciji i održavanju populacije stanica u tkivima kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima. Apoptoza igra bitnu ulogu u reguliranju rasta, razvoja i imunološkog odgovora te čišćenju redundantnih ili abnormalnih stanica u organizmu. Također je važan način kojim organizmi mogu održavati konstantnu količinu stanica. Indukcija i izvođenje apoptoze zahtijevaju suradnju niza molekula uključujući signalne molekule, receptore, enzime i genetski regulirane proteine (32). Apoptoza se može aktivirati preko cisteinskih proteaza poznatijih kao kaspaze koje cijepaju stanične proteine i pokreću biokemijske reakcije koje dovode do smrti stanice (33). Apoptotički proces povezan je s karakterističnim morfološkim i biokemijski promjenama kao što su bubrenje stanične membrane, smanjenje veličine stanice, fragmentacija stanice, kondenzacija kromatina i cijepanje DNA (34) (slika 6). U stanicama sisavaca, poznata su dva apoptotska puta. Intrinzični ili mitohondrijski put aktiviran je unutarstaničnim događajima i ovisi o oslobađanju proapoptotičkih i antiapoptotičkih proteina iz mitohondrija poput obitelji proteina Bcl-2, citokroma c i APAF-1. Ekstrinzični put apoptoze potiče se vezanjem izvanstaničnog liganda smrti na svoj receptor na površini stanice (35). Navedeni putevi regulirani su kroz nekoliko osnovnih signalnih puteva uključujući četiri glavna puta za posredovanje apoptoze: c-Jun N-terminalni kinazni (JNK) put, nuklearni faktor kappa B (NF κ B) put, put tumorskog proteina p53 i put faktora nekroze tumora (TNF) (36).



Slika 6. Morfološke promjene stanice tijekom apoptoze

1.4.2. Intrinzični put apoptoze

Kao što mu i naziv implicira intrinzični put apoptoze započinje unutar stanice. Čimbenici poput genetskih oštećenja, visoke koncentracije citosolnih kalcijevih iona, oksidativni stres i hipoksija mogući su okidači inicijacije mitohondrijskog puta apoptoze koji rezultira povećanjem permeabilnosti mitohondrijske membrane (32). Različiti podražaji mitohondrijskog puta apoptoze iniciraju transkripcijske ili posttranslacijske promjene Bcl-2 proteina koji imaju izravan učinak na mitohondrijsku membranu i njezinu permeabilnost (37). Razlikuju se dvije glavne skupine Bcl-2 proteina, proapoptotički proteini (npr. Bax, Bak, Bad) i antiapoptotički proteini (npr. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). Dok antiapoptotički proteini reguliraju apoptozu blokiranjem mitohondrijskog otpuštanja citokroma c, proapoptotički proteini djeluju tako da potiču njegovo otpuštanje. Iniciranje apoptoze ovisi upravo o ravnoteži između pro i antiapoptotičkih proteina (32). Permeabilizacija omogućava otpuštanje ostalih apoptotičkih proteina iz intermembranskog prostora u citoplazmu poput citokroma c, SMAC i Omi proteina (37). Citokrom c inicira intrinzični put apoptoze vezanjem na adaptersku molekulu APAF-1 i aktivira njegovu oligomerizaciju (32). Nastaje apoptosom kojeg čini citokrom c, APAF-1, dATP i prokaspaza 9. Unutar apoptosoma prokaspaza 9 pretvara se u kaspazu 9 koja zatim aktivira izvršne kaspaze 3 i 7. Izvršne kaspaze potom započinju cijepati proteine (37) (slika 7).



Slika 7. Prikaz intrinzičnog puta apoptoze

1.4.3. Narušavanje mitohondrijskog membranskog potencijala

Mitohondriji kao glavni izvor energije u stanicama igraju važnu ulogu u staničnoj fiziologiji. Većina stanične energije (ATP) u eukariotskim stanicama generira se u mitohondrijima putem oksidativne fosforilacije tijekom koje se elektroni prenose od donora elektrona do akceptora poput kisika. Mitohondrijski lanac transporta elektrona stvara elektrokemijski gradijent kroz niz redoks reakcija. Ovakav elektrokemijski gradijent pokreće sintezu ATP-a i uzrokuje mitohondrijski membranski potencijal. Na ovaj način mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$) postaje ključni parametar za procjenu mitohondrijske funkcije (38).

Osim izvora energije koji omogućuje život u aerobnim uvjetima mitohondriji mogu biti i izvor signala koji iniciraju apoptotičku smrt stanice (39). Mitohondrijska kontrola apoptoze obuhvaća nekoliko razina: održavanje proizvodnje ATP-a i održavanje mitohondrijskog potencijala i propusnosti mitohondrijske membrane za oslobađanje apoptotičkih čimbenika iz intermembranskog prostora u citosol (40). Stanična smrt uzrokovana apoptozom može započeti aktivacijom kaspaza, ključnih enzima unutar stanice tijekom apoptotskog procesa. Glavni put kaspazne aktivacije uključuje permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija koja potom oslobađa nekoliko proteina uključujući proteine citokrom c, SMAC i AIF. U mitohondrijima, citokrom c ima bitnu ulogu u stvaranju transmembranskog potencijala. Povećana vanjska permeabilnost membrane rezultira otpuštanjem citokroma c koji aktivira Apaf-1 i kaspazu 9 te stanica napreduje prema smrti (41). Proapoptotski i antiapoptotski proteini Bcl-2 obitelji reguliraju permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija što uzrokuje oslobađanje čimbenika ključnih za staničnu razgradnju. Njihov mehanizam i uloga u regulaciji apoptoze i dalje predstavlja izazov za znanstvenike (42). Citokrom c može proći kroz pore ili kanale vanjske membrane sastavljene upravo od proapoptotičkih Bcl-2 proteina. Također, može doći do poremećaja vanjske membrane nakon bubrenja matriksa mitohondrija zbog otvaranja permeabilnih tranzicijskih pora ili kao posljedica zatvaranje kanala aniona ovisnih o naponu u mitohondrijskoj vanjskoj membrani. Svi navedeni događaji znatno utječu na funkciju mitohondrija i uzrokuju poremećaj protonskog gradijenta izazvanog oštećenjem elektronskog transportnog lanca. Rasipanje unutarnjeg mitohondrijskog transmembranskog mitohondrijskog potencijala označava točku s koje nema povratka, takozvani „point of no return“, tijekom apoptoze i javlja se prije fragmentacije DNA. Depolarizacija mitohondrija povezana je s fiziološkim utjecajima na mitohondrijsku membranu. Fiziološki utjecaj koji uzrokuju depolarizaciju uključuju reaktivne

kisikove vrste (ROS) i blokiranje respiracijskog lanca (43). Mitohondrijska funkcija može stoga utjecati na smrt stanica na nekoliko načina. Promijenjeni $\Delta\Psi_m$ može dovesti do oslobađanja citokroma c i aktivacije kaspaza ili, s druge strane, otpuštanje citokroma c može mijenjati funkciju mitohondrija, što u odsutnosti aktivnosti kaspaze isto tako dovodi do smrti stanice (41).

2. CILJ

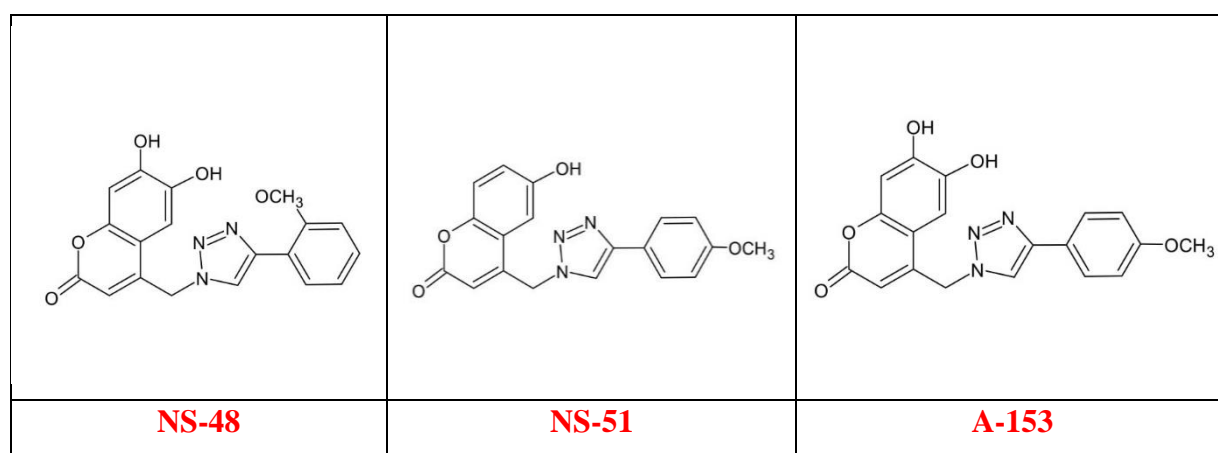
1. Ispitati utjecaj derivata kumarina na rast normalnih epitelnih stanica i stanica karcinoma debelog crijeva u uvjetima *in vitro*.
2. Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta.
3. Definirati derivat koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica.
4. Odrediti promjene u staničnom ciklusu i način umiranja tretiranih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitivani spojevi

Derivati kumarina pripremljeni su na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu (slika 8). Za potrebe *in vitro* pokusa derivati kumarina otopljeni su u DMSO-u kao koncentrirane 10^{-2} M otopine. Prije primjene pripremljene su radne otopine derivata čija su završna razrjeđenja bila: 10^{-3} i 10^{-4} M u mediju za uzgoj stanica.



Slika 8. Strukturne formule derivata kumarina

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)

- Kit za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima LDH (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO. INC.)
- Kit za određivanje promjene mitohondrijskog membranskog potencijala (Mitochondria Staining Kit for mitochondrial potential changes detection, Sigma-Aldrich, Inc.)
- Tripan 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)

3.1.3. Stanične linije

Protutumorski učinak derivata kumarina ispitan je na humanim i jednoj normalnoj psećoj staničnoj liniji.

Humane stanične linije adenokarcinoma debelog crijeva:

- HT29 (ATCC® HTB-38™)
- CaCo-2 (ATCC® HTB-37™)
- SW620 (ATCC® CCL-227™)

Normalne stanice:

- MDCK-1 (ATCC® CCL-34™) normalna epitelna stanica bubrega psa između 26 i 31 pasaže

3.2. METODE

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

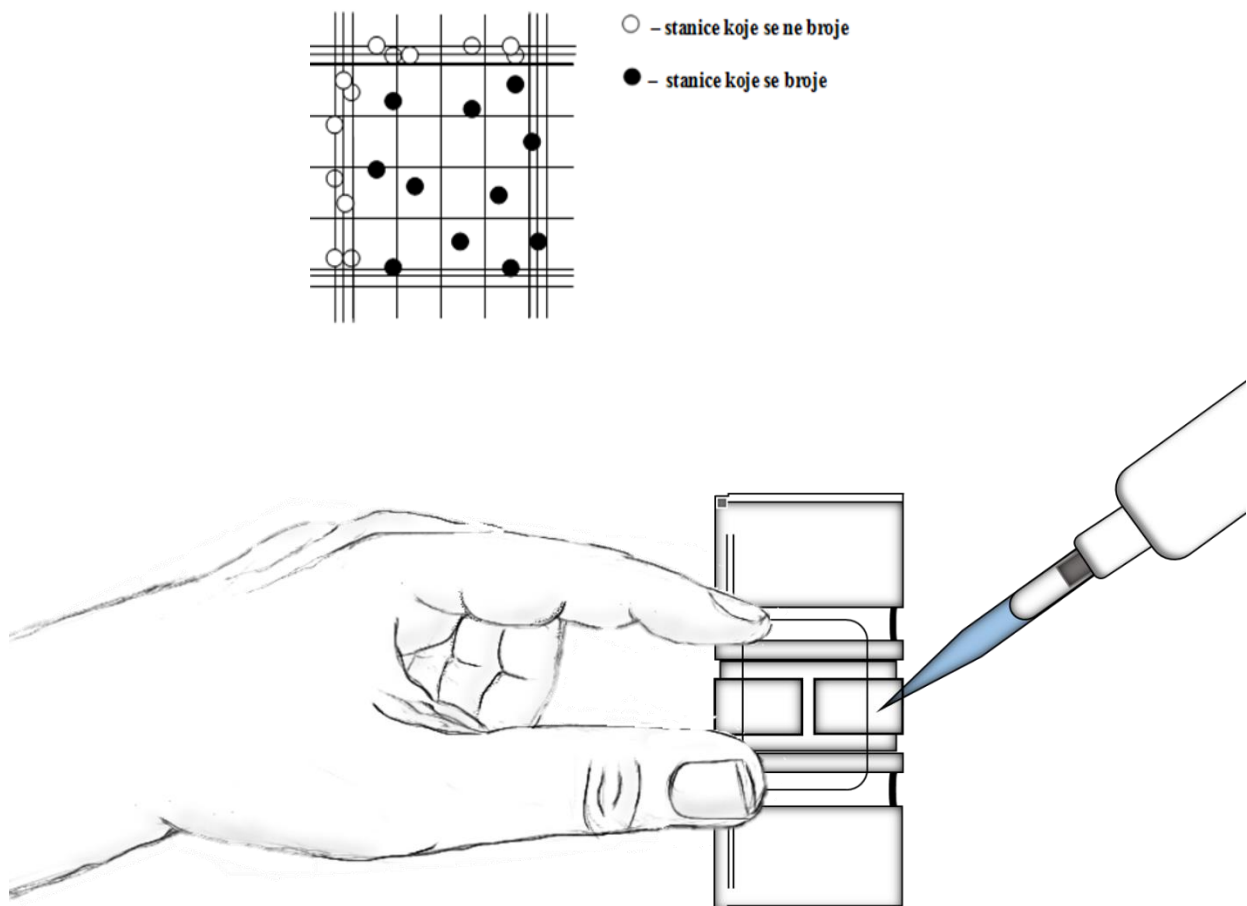
Adherentne stanice kultivirane su u inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom uz 5 % CO₂ i temperaturu od 37 °C u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm² i 75 cm².

Za održavanje staničnih linija (HT29, CaCo-2 i SW620) upotrebljava se DMEM medij koji sadrži dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Svi navedeni sastojci osim penicilin/streptomycin antibiotika sastavni su dio DMEM medija za pokus.

Kultiviranje adherentnih stanica u kulturi postiže se enzimskim odvajanjem stanica od podloge uz prethodno ispiranje PBS-om. Odvajanje stanica od površine postiže se dodavanjem tripsina i inkubaciji u CO₂ inkubatoru. Nakon odvajanja stanica od podloge, stanice su pokupljene svježim medijem za održavanje.

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Za određivanje broja stanica korišten je test tripan plavilom. Iz prethodno ponovno suspendiranih stanica uzeto je 50 µL suspenzije i prenijeto je u jažicu. Na stanice je dodano tripan plavilo. Stanična suspenzija s bojom nanescena je na Bürker-Türkovu komoricu (slika 9). Pomoću invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) određen je broj živih stanica. Mrtve stanice su se obojale zbog prolaska boje kroz membranu narušenog integriteta i kao takve nisu uzete u obračun.



Slika 9. a) Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice, b) nanošenje tripan plavila na Bürker-Türk komoricu

Broj živućih stanica određen je formulom:

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

Gdje je:

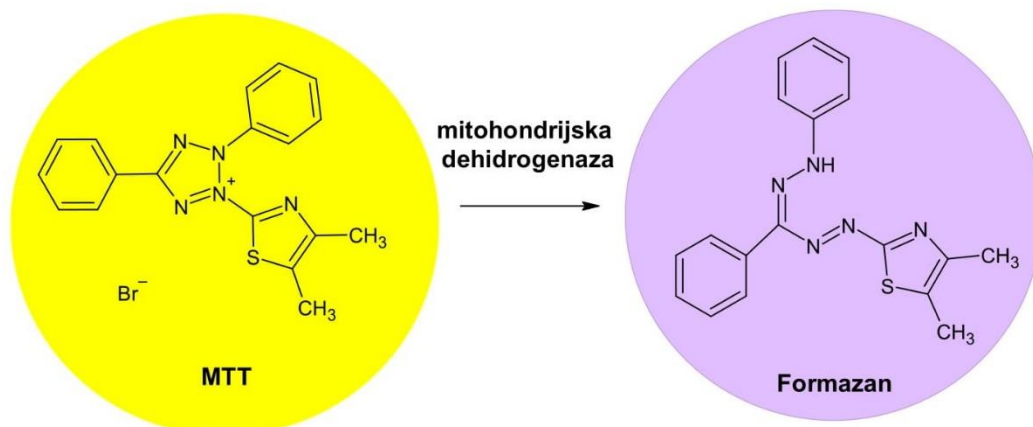
N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT test rabi se za ispitivanje citotoksičnog učinka određenih tvari i proliferacije stanica u *in vitro* uvjetima. Mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica reducira tetrazolijevu soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) što rezultira stvaranjem tamnoljubičastih kristala formazana koji se nakuplja u stanicama (slika 10). Količina nastalog formazana proporcionalna je broju vijabilnih stanica. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).



Slika 10. Prikaz principa MTT metode

Postupak: Adherentna stanična linija nasadena je na mikrotitarske pločice (96 jažica) u koncentraciji od 2×10^4 st/mL u volumenu od 200 μ L u svaku jažicu. Stanice su inkubirane u CO₂ inkubatoru preko noći kako bi se prihvatile za podlogu te tretirane s 20 μ L derivata kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) u finalnim koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} M. Poslije inkubacije od 72 h, medij je uklonjen sa stanica, a stanice su tretirane 1X MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/mL. Stanice pod tretmanom inkubirane su u CO₂ inkubatoru 4 h. Nastali formazanski kristali otopljeni su u DMSO-u uz laganu trešnju na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia). Rezultati su očitani na mikročitaču pločica pri valnoj duljini od 595 nm.

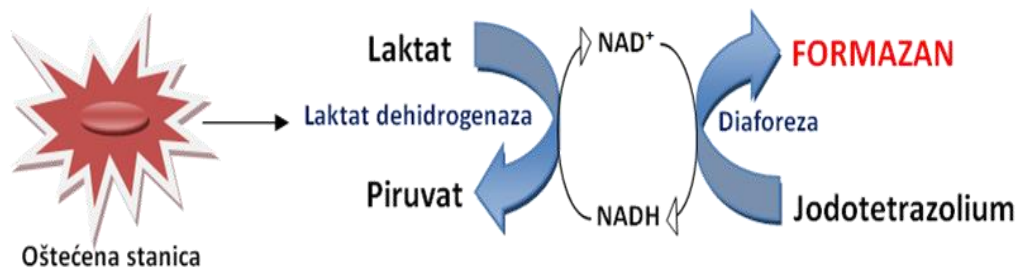
Na temelju očitanih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (eng. *background*) određen je postotak preživljenja prema formuli:

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

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

3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH)

Mjerenjem aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju za uzgoj stanica određuje se broj stanica s oštećenom membranom. Povećanje aktivnosti LDH proporcionalno je povećanju broja stanica s oštećenom membranom. Aktivnost LDH enzima određuje se kolorimetrijskom analizom. U prvom koraku, LDH prisutan u staničnom supernatantu katalizira pretvorbu laktata u piruvat, pri čemu se koenzim NAD⁺ reducira u NADH^{+/H+}. Drugi korak uključuje pretvorbu tetrazolijeve soli INT (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolij) u ljubičasti formazan dok se NADH^{+/H+} oksidira u NAD⁺. Količina nastalog formazana proporcionalna je aktivnosti LDH u mediju za održavanje stanica (slika 11).



Slika 11. Prikaz principa metode određivanja aktivnosti LDH

Postupak: Citotoksičnost derivata kumarina utvrđena je na staničnoj liniji CaCo-2 pomoću komercijalno dostupnog *LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC.* za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima LDH. CaCo-2 stanice nasadene su u koncentraciji od 10^5 st/mL na ploče za uzgoj adherentnih stanica s 96 jažica u DMEM mediju obogaćenom s 1%-tnim FBS-om. Kako bi se stanice prihvatile za podlogu, ostavljene su u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂ do sljedećeg dana. Na stanice su aplicirani kumarinski derivati NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji od 10^{-5} M. Po isteku 3, 6, 12 i 24 sata inkubacije sa stanica je prikupljen supernatant u sterilne tubice koji se čuvao na +4 °C do trenutka analize. Na dan analize 100 µl supernatanta preneseno je na ploču i inkubirano 4 sata u CO₂ inkubatoru sa 100 µl otopine C dobivene miješanjem otopine A (katalizator diaforeze/NAD⁺) i otopine B (INT boje). Ploča s uzorcima zaštićena od svjetla inkubirana je kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi. Optičkim čitačem mikroploča (*Victor3, Wallac, Perkin Elmer, SAD*) izmjerena je apsorbancija na 450 nm.

Postotak citotoksičnosti određen je na temelju očitanih apsorbancija za tretirane, kontrolne stanice i pozadinu (eng. *background*). Kontrolne stanice koje su bez tretmana otpustile LDH označavaju niske kontrole. Visoke kontrole obuhvaćaju stanice tretirane Tritonom X koje su otpustile maksimalnu količinu LDH.

$$\text{citotoksičnost(\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica} - \text{apsorbancija niske kontrole}}{\text{apsorbancija visoke kontrole} - \text{apsorbancija niske kontrole}}$$

3.2.5. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom

Fluorescentnom propidijevim jodidom (PI) stanice su obilježene i analizirane protočnim citometrom. Metoda je zasnovana na sposobnosti vezanja PI na molekulu DNA. Razlikovanje faza staničnog ciklusa omogućeno je upravo mjerenjem intenziteta fluorescencije koja je izravno proporcionalna količini DNA u stanici. Kako se količina DNA udvostručava tijekom staničnog ciklusa između G1 (2n kromosoma) i G2 (4 n kromosoma) faze, tako se i jačina fluorescencije stanične populacije udvostručava. Prvi pik na histogramu prikazuje stanice u G0/G1 fazi s normalnom količinom DNA (2n kromosoma). Drugi pik označava udvostručenu količinu DNA u G2 i M fazi ciklusa i stanice u S fazi ciklusa čija količina DNA varira ovisno o stupnju replikacije.

Postupak: CaCo-2 stanice nasadene su u koncentraciji od 3×10^5 st/mL u ukupnom volumenu od 3mL po jažici uz kontrole na ploče sa šest jažica s ravnim dnom. Kako se u radu upotrebljava adherentna stanična linija, stanice su ostavljene u inkubatoru i sljedećeg dana tretirane ispitivanim derivatima (NS-48, NS-51 i A-153) u finalnoj koncentraciji od 10^{-5} M. Uslijedila je inkubacija u trajanju od 24 sata u CO₂ inkubatoru. Po isteku tretmana, medij u kojem su uzgajane stanice prikupljen je u 15mL epruvete. Kako bi se stanice odvojile od površine jažica korišten je tripsin. Odvojene stanice ispiranjem su prikupljene u odgovarajuće epruvete i centrifugiranjem spuštene na dno epruvete. Po završetku centrifugiranja medij je dekantiranjem uklonjen sa stanica. Stanice su resuspendirane u PBS-u i fiksirane sa 3 mL 70%-tnog hladnog etanola uz polaganu i stalno miješanje. Do dana analize, stanice su čuvane na -20 °C. Na dan analize stanice su centrifugirane (6 min na 1000 rpm) (Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), isprane s 1 mL PBS-a te zatim ponovno centrifugirane. Na sedimentirane stanice dodano je 350μL PBS i stanice su prebačene u epruvete namijenjene za protočni citometar. Kako bi se razgradile sve molekule RNA i u suspenziji ostale molekule DNA, korištena je RNaza. U svaku epruvetu dodano je 30 μL 10 mg/mL RNaze koja je ostavljena da djeluje 5 minuta. Posljednji korak prije same analize bilo je dodavanje 150μL PI. Epruveta su nekoliko minuta ostavljene na hladnom u mraku a zatim analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka).

3.2.6. Određivanje promjene mitohondrijskog potencijala ($\Delta\Psi_m$)

Kolaps mitohondrijskog elektrokemijskog potencijala jedan je od ranih intracelularnih događaja koji se javljaju u induciranoj apoptozi. Mitohondrijski potencijal procijenjen je JC-1 fluorescentnom bojom (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetil-benzamid azolokarbocinin jodid). U zdravim stanicama negativni naboj koji je uspostavljen očuvanom mitohondrijskom membranom omogućava ulazak lipofilnoj, kationskoj boji JC-1 u matriks mitohondrija. Boja JC-1 nakuplja se matriksu mitohondrija i fluorescira crveno. Narušavanje mitohondrijskog potencijala u apoptotičkim stanicama uzrokuje agregaciju monomera boje JC-1 u citoplazmi. Ovako dispergirana boja fluorescira zelenom bojom.

Postupak: Analiza je provedena pomoću komercijalno dostupnog kita za otkrivanje promjene mitohondrijskog potencijala *Mitochondria Staining Kit for mitochondrial potential changes detection (Sigma-Aldrich, Inc.)* Stanice su nasadene na ploču sa 6 jažica u koncentraciji od 3×10^5 stanica u 3 mL medija po jažici. Narednog dana stanice su tretirane derivatima NS-48, NS-51 i A-153 i inkubacija se nastavila sljedeća 24 sata. Po isteku vremena inkubacije stanice su tripsinom odvojene od podloge i sakupljene. Stanična suspenzija centrifugirana je na 600 g, 4 min pri 4 °C. Sa stanica je uklonjen supernatant i na stanice je dodano 1 ml kompletiranog medija. Na resuspendirane stanice u mediju dodaje se 1 ml JC-1 boje koja je prethodno otopljena u destiliranoj vodi. Kao pozitivna kontrola su stanice tretirane valinomycinom. Uslijedilo je ponovno centrifugiranje i odlijevanje supernatanta. Stanice su resuspendirane u 1mL pufera i očitane na *BD FACScanto II, BD Biosciences, New Jersey, SAD* protočnom citometru.

3.2.7. Statistička obrada podataka

Biološki eksperimenti citotoksičnosti obavljani su u triplikatu. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti određena je Kolmogorov-Smirnovim testom i Mann-Whitneyjevim testom. Statistička analiza podataka obavila se pomoću statističkog programa STATISTICA 13.0 za Windows operativne sustave. Analiza podataka protočne citometrije je napravljena pomoću FlowJo programskog paketa (v10).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata kumarina MTT testom

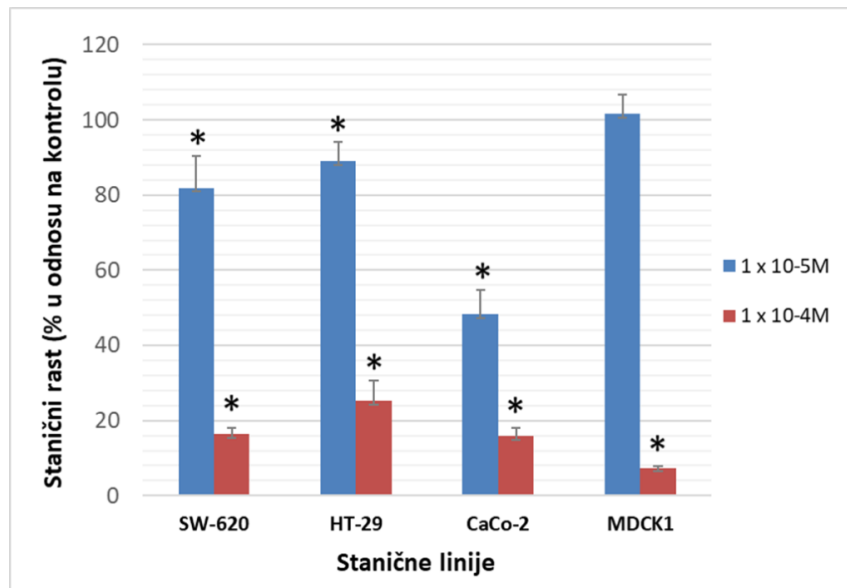
Protutumorski učinak derivata kumarina ispitan je na tri stanične linije adenokarcinoma debelog crijeva (SW-620, HT-29 i CaCo-2) i na normalnoj staničnoj liniji (MDCK1). Stanice su tretirane NS-48, NS-52 i A-153 derivatima u koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} M. Rezultati prikazuju postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.

Derivat NS-48 pokazuje statistički značajnu inhibiciju staničnog rasta veću od 60% na sve stanične linije pri koncentraciji 10^{-4} M. Stanična linija MDCK1 pokazala se kao najotpornija na djelovanje derivata NS-48 pri koncentraciji od 10^{-5} M. Pri koncentraciji od 10^{-5} M derivat NS-48 inhibirao je stanični rast CaCo-2 za oko 50% (slika 12).

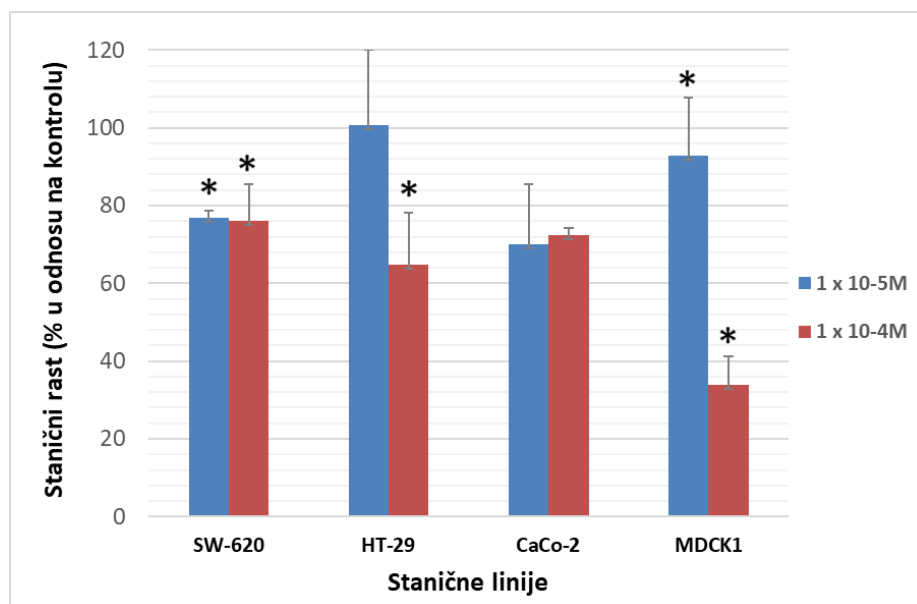
Najveći učinak nakon 72 h djelovanja derivat NS-51 pokazao je na normalnoj staničnoj liniji MDCK1. Pri koncentraciji od 10^{-4} M derivat NS-51 smanjio je stanični rast MDCK1 stanica za oko 70%. Derivat NS-51 imao je slab inhibicijski učinak na stanični rast stanica adenokarcinoma debelog crijeva (slika 13).

Stanični rast svih staničnih linija inhibiran je više od 60% djelovanjem derivata A-153 pri koncentraciji od 10^{-4} M dok pri koncentraciji od 10^{-5} M derivat nije pokazao značajno djelovanje na inhibiciju rasta testiranih stanica (slika 14).

Rezultati

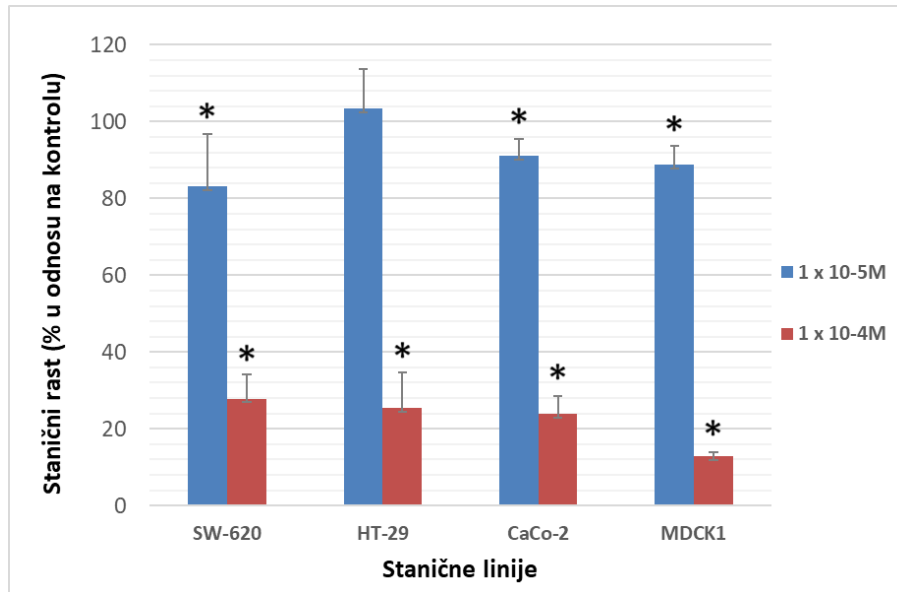


Slika 12. Citotoksičan učinak NS-48 kumarinskog derivata na SW-620, HT-29, CaCo-2 i MDCK1 stanične linije. Testirane stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.



Slika 13. Citotoksičan učinak NS-51 kumarinskog derivata na SW-620, HT-29, CaCo-2 i MDCK1 stanične linije. Testirane stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Rezultati



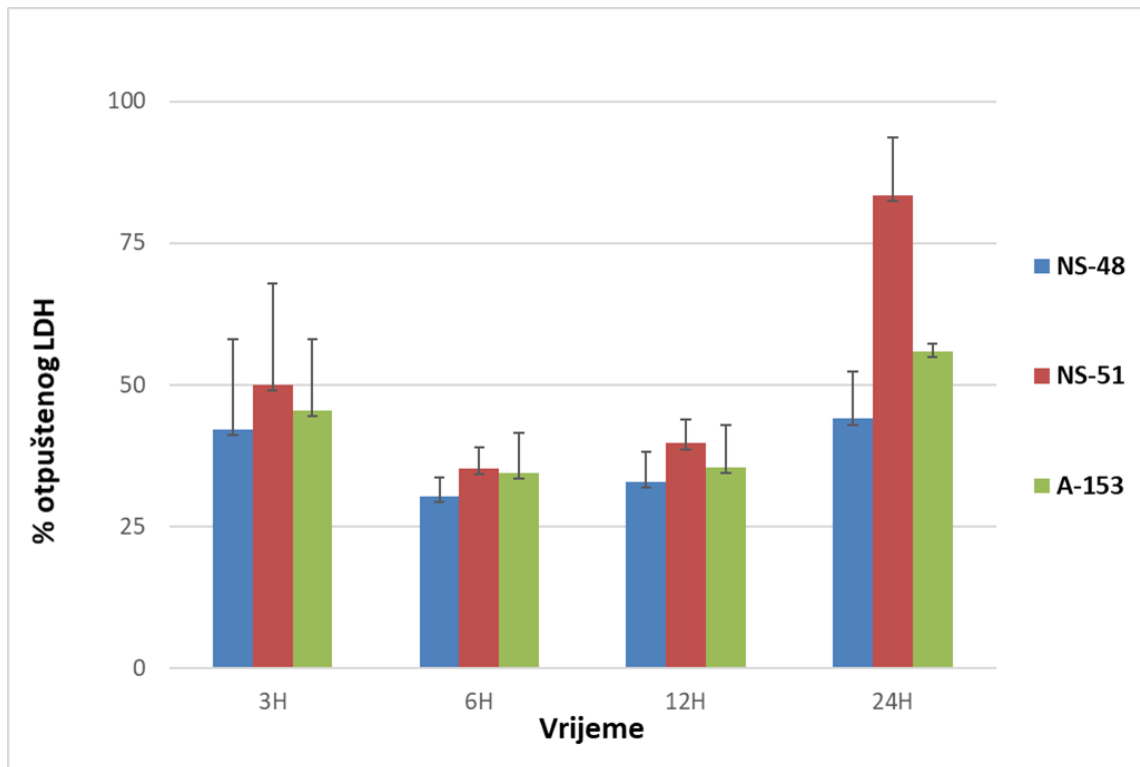
Slika 14. Citotoksičan učinak A-153 kumarinskog derivata na SW-620, HT-29, CaCo-2 i MDCK1 stanične linije. Testirane stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 10⁻⁴ i 10⁻⁵ M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je p < 0,05(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

4.2. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH)

Citotoksičan učinak tri derivata kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) proučavan je na staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva (CaCo-2). Na stanice su aplicirani derivati NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji od 10^{-5} M. i ostavljeni da djeluju na stanice kroz 3, 6, 12 i 24 sata. Rezultati prikazuju postotak otpuštenog LDH iz tumorskih stanica u odnosu na vrijeme pri kojem su stanice bile izložene djelovanju derivata (slika 15). Postotak otpuštenog LDH označava broj umirućih stanica čija je stanična membrana oštećena.

Izloženost CaCo-2 stanica kumarinskim derivatima nakon 3, 6 i 12 sata oštećena stanična membrana je u 30 – 50% stanica. NS-48, NS-51 i A-153 derivat u razdoblju do 24 h pokazuju međusobno podjednako djelovanje na postotak otpuštenog LDH u medij. Produljenom inkubacijom od 24 sati kumarinski derivati NS-48 i A-153 pokazuju blagi porast u otpuštanju LDH, sa zamjetnim djelovanjem NS-51 derivata koji je uzrokovao otpuštanje LDH za 80% iz stanica.

Rezultati



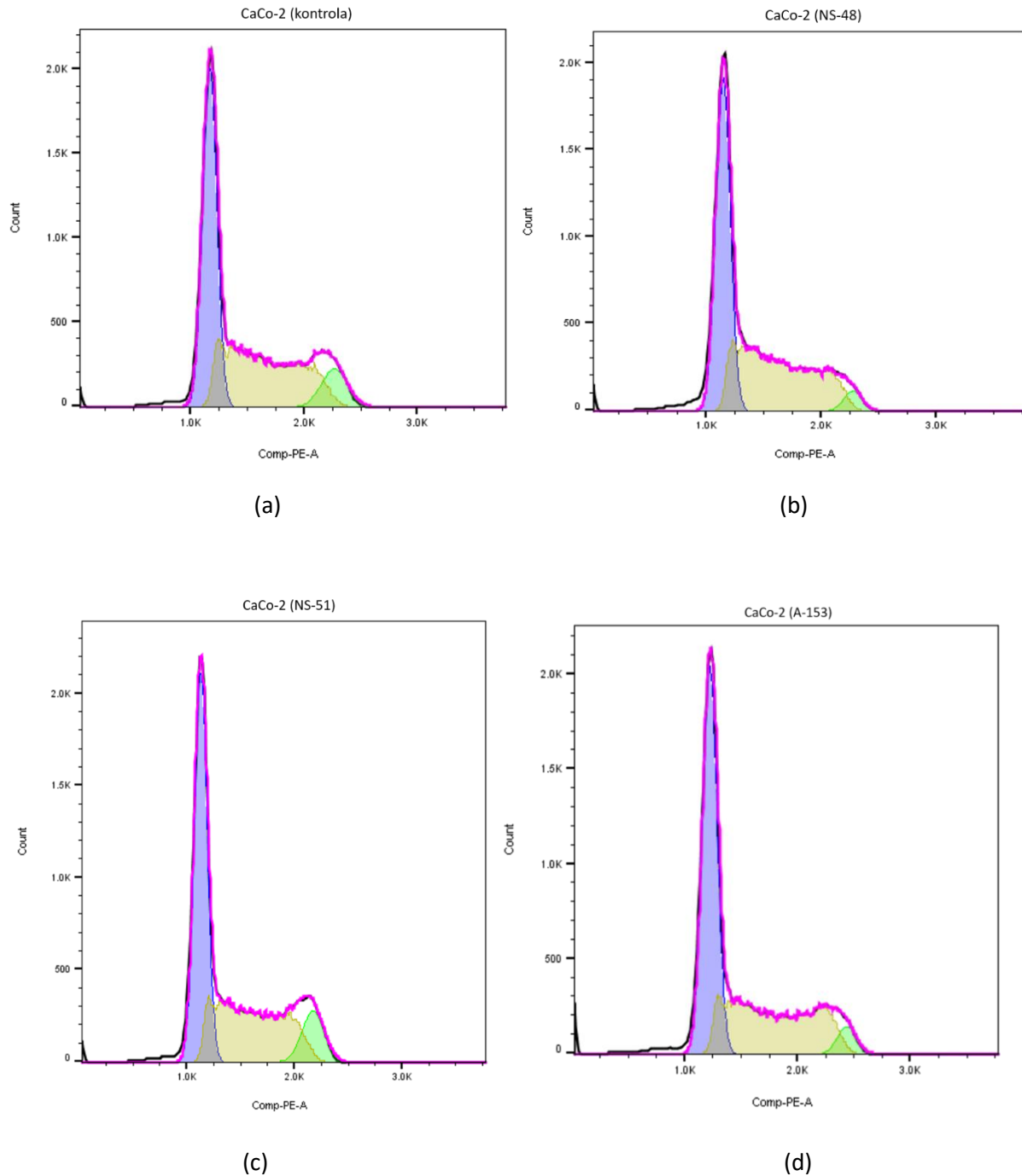
Slika 15. Učinak derivata kumarina na otpuštanje LDH u stanični medij. CaCo-2 stanice tretirane su kroz 24 sata derivatima kumarina NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji od 10^{-5} M. Aktivnost LDH u mediju mjerena je nakon 3, 6, 12 i 24 sata. Graf prikazuje postotak otpuštenog LDH u medij ovisno o vremenu inkubacije stanica s derivatima. Postotak otpuštenog LDH prikazan je kao srednja vrijednost otpuštenog LDH u stanicama tretiranim derivatima i u stanicama tretiranim Tritonom X. Mjerenja su rađena u triplikatu.

4.3. Utjecaj derivata kumarina na stanični ciklus

Učinak derivata kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) na stanični ciklus ispitan je na staničnoj liniji CaCo-2. Stanice su bile izložene derivatima NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji od 10^{-5} M. Analizirane stanice obojene su PI bojom koja fluorescira kada se veže za DNA, tako da je količina fluorescencije proporcionalna količini DNA. Na osnovi fluorescentnog signala stanice su podijeljene u 3 faze: G1, S i G2/M. Prvi pik na histogramu označava G1 fazu ciklusa, u kojoj je količina DNA normalna (2n). Dvostruki sadržaj DNA (4n) imaju stanice u G2/M fazi koju označava drugi pik. U S fazi staničnog ciklusa količina DNA varira. Histogrami prikazuju udio CaCo-2 stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Rezultati ispitivanja učinka derivata na stanični ciklus prikazani su na slici 16 i 17.

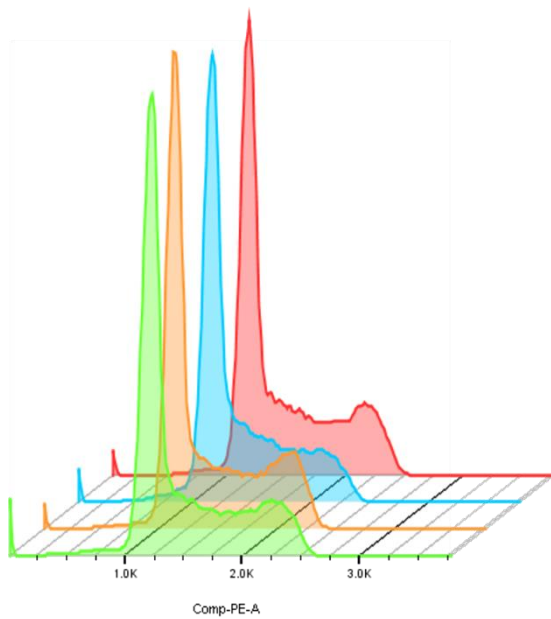
Analizom staničnog ciklusa pomoću modela Watson, FlowJo programskog paketa, CaCo-2 kontrolne stanice najvećim su udjelom u G1/S fazi s 44,9% stanica. Izloženost CaCo-2 stanica derivatu A-153 uzrokovao je smanjenje broja stanica u G2/M fazi (4,6%) i S fazi (40,6%) u odnosu na kontrolne stanice, s porastom stanica u G1 fazi (51,1%). Derivat NS-51 na CaCo-2 stanice uzrokuje neznatne promjene u fazama staničnog ciklusa s porastom stanica u G1 i G2/M fazama, i smanjenjem u S fazi staničnog ciklusa. Blago povećanje stanica u S i G1 fazi pod djelovanjem derivata NS-48 praćeno je smanjenjem broja stanica u G2/M fazi za više od 5% u odnosu na ne tretirane stanice. Zajednička značajka derivata na CaCo-2 stanice vidljiva je u blagom porastu stanica u G1 fazi staničnog ciklusa.

Rezultati



Slika 16. Učinak derivata kumarina na stanice u staničnom ciklusu. Ispitivana stanična linija CaCo-2 izložena je djelovanju derivata NS-48 (b), NS-51 (c) i A-153 (d) u koncentraciji 10^{-5} M. Histogrami prikazuju učinak derivata kumarina na G1, S i G2/M faze ciklusa u odnosu na kontrolu (a).

Rezultati



	Ime derivata	Broj stanica
	A-153	47159
	NS-51	48759
	NS-48	47554
	Kontrola	49100

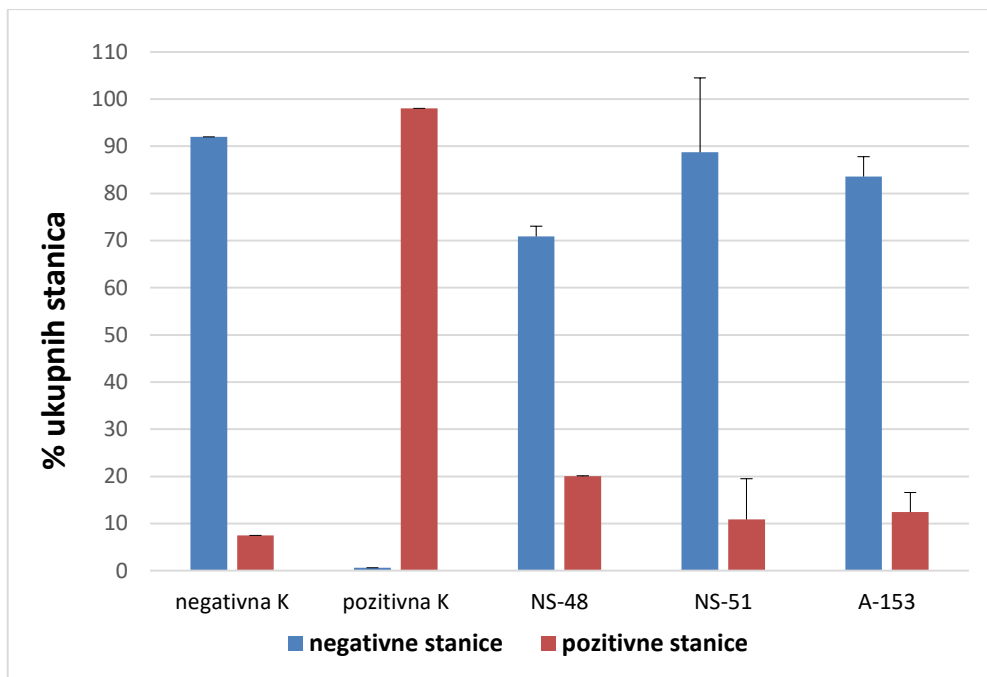
Ime derivata	G1 % st.	S % st.	G2/M % st.
A-153	51,1	40,6	4,6
NS-51	46,4	40,1	10,9
NS-48	46,4	45,6	3,54
Kontrola	44,9	42,9	9,52

Slika 17. Histogramski prikaz usporedbe djelovanja derivata kumarina na staničnu liniju CaCo-2

4.4. Učinak novosintetiziranih derivata kumarina na mitohondrijski potencijal

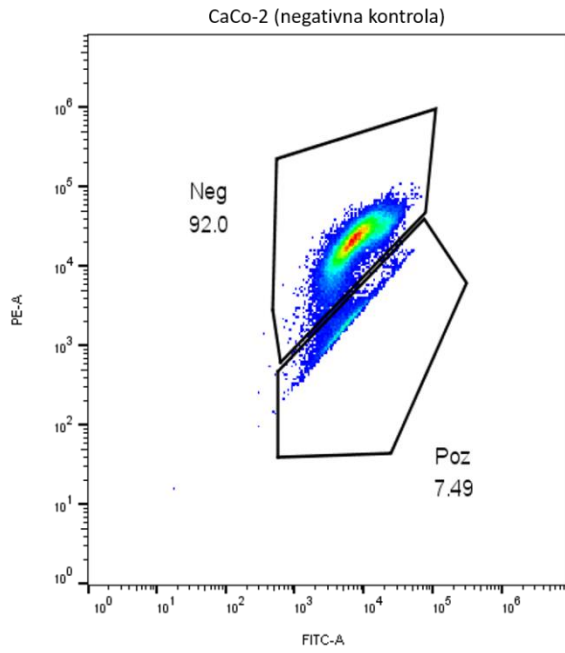
Rezultati su prikazani kao postotak pozitivnih i negativnih stanica. Analiza je izvršena na 50 000 stanica. Stanice sa smanjenim membranskim potencijalom i depolariziranom membranom čine pozitivne stanice, čiji je mitohondrijski potencijal narušen. Mitohondrijski membranski potencijal je očuvan u negativnih stanica (slika 19).

U 20,1 % stanica izloženih derivatu NS-48 došlo je do narušavanja mitohondrijskog potencijala. Djelovanje derivata NS-51 na promjenu u mitohondrijskom potencijalu vidljivo je na oko 10% stanica. Derivat A-153 uzrokovao je depolarizaciju mitohondrijske membrane u 12,5% stanica (slika 18).

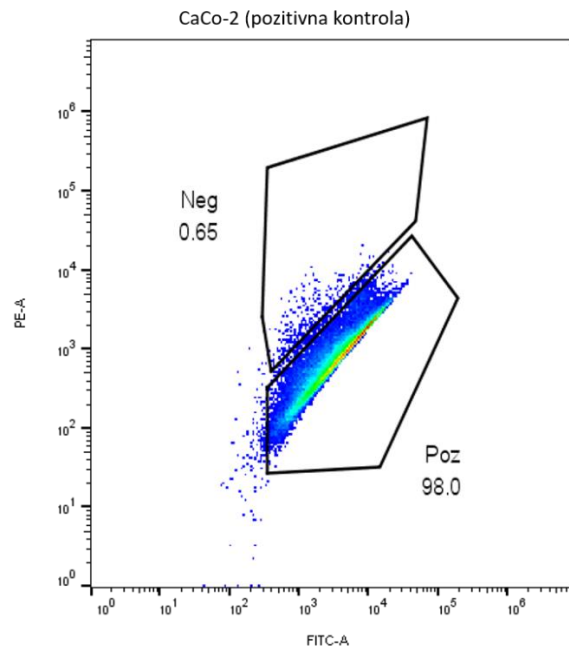


Slika 18. Grafički prikaz djelovanja derivata kumarina na narušavanje mitohondrijskog potencijala u stanicama karcinoma debelog crijeva (CaCo-2). CaCo-2 stanice izložene su djelovanju tri derivata kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) u koncentraciji od 10^{-5} M. Mjerenja su rađena u duplikatu i izražena kao srednje vrijednosti sa standardnom derivacijom.

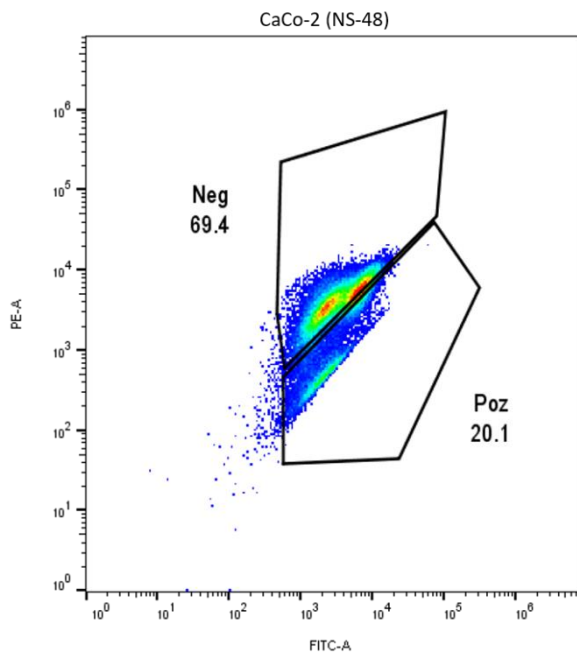
Rezultati



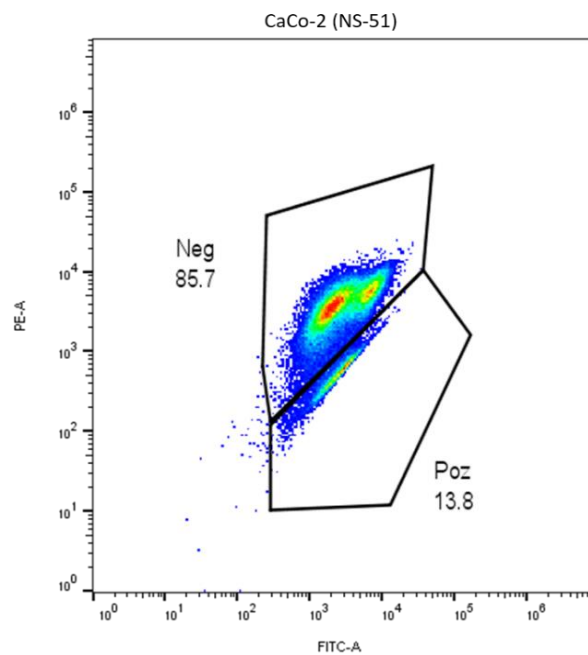
(a)



(b)

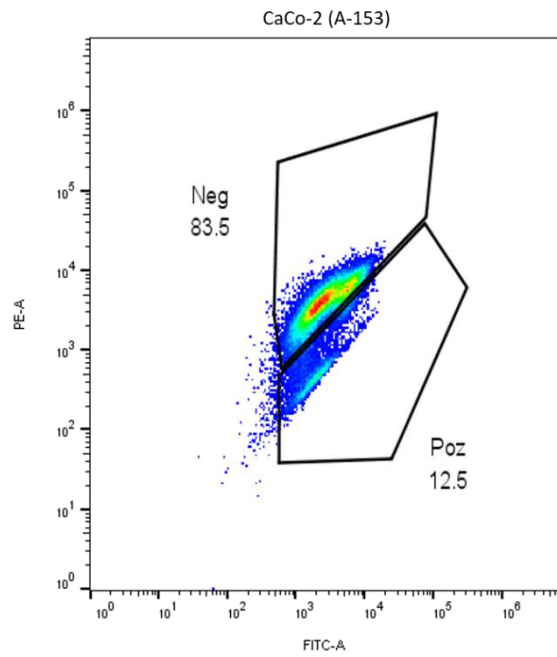


(c)



(d)

Rezultati



(e)

Slika 19. Stanična linija CaCo-2 izložena je djelovanju derivata NS-48 (c), NS-51 (d) i A-153 (e) u koncentraciji od $10^{-5}M$). Pozitivna kontrola izložena je djelovanju Valinomicina. Stanice su obojene JC-1 bojom i analizirane protočnim citometrom.

5. RASPRAVA

Karcinom debelog crijeva vodeći je uzrok smrtnosti u svijetu, a njegova se stopa pojavnosti sve više povećava. Kirurško odstranjivanje tumora i kemoterapija primarne su metode koje se koriste za liječenje svih faza karcinoma debelog crijeva (25). Ipak pacijenti s kasno postavljenom dijagnozom imaju loše preživljenje i veliku vjerojatnost recidiva koji uglavnom nastaje zbog stjecanja otpornosti malignih stanica na dotadašnju terapiju (21). Zbog svoje biološke aktivnosti kumarini izolirani iz prirodnih izvora predmet su istraživanja mnogih znanstvenika. Utvrđeno je kako je njihova biološka aktivnost uobičajeno povezana s niskom toksičnošću. Istraživanja su dokazala kako kumarini imaju snažan inhibicijski učinak na različite tumorske stanice te je njihov skelet, kao farmakofor, od iznimne važnosti za razvoj protutumorskih lijekova (44). Mehanizam njihovog djelovanja uključuje inhibiranje enzima telomeraze, inhibiranje aktivnosti protein kinaze, smanjenje regulacije onkogene ekspresije i indukciju kaspaze 9 (45).

U svrhu otkrivanja spojeva s mogućim učincima na smanjenje staničnog rasta 4 stanične linije tretirane su derivatima kumarina tijekom 72 sata. Na temelju dobivenih rezultata, moguće je utvrditi kako derivati kumarina pokazuju značajnu inhibiciju rasta na svim staničnim linijama pri većim koncentracijama. Vrsta stanične linije i koncentracija derivata igraju ključnu ulogu u učinkovitosti derivata. Najveći učinak imali su derivati NS-48 i A-153 na sve stanične linije pri koncentraciji 10^{-4} M. Citotoksičnost derivata kumarina provjerena je i LDH testom. Stanična linija karcinoma debelog crijeva CaCo-2 podvrgnuta je djelovanju derivata kumarina u vremenu od 3, 6, 12 i 24 sata. Testom je utvrđeno kako produljena inkubacija od 24 sati uzrokuje značajno otpuštanje enzima LDH iz stanica tretiranih derivatom NS-51. Derivati kumarina, osthol i imperatorin su jedni od glavnih biološki aktivnih kumarina u različitim biljkama. Stoga su Eken i suradnici odlučili ispitati citotoksične učinke njihova djelovanja odvojeno i u kombinaciji s 5-fluorouracilom na staničnoj liniji adenokarcinoma debelog crijeva Colo205. Osthol je pokazao značajnu antiproliferativnu aktivnost na Colo205 stanicama i povećao učinkovitost 5-fluorouracila ubrzavanjem citotoksičnog učinka i smanjenjem p38 mitogen aktivirane proteinske kinaze. Derivat osthol može postati obećavajući protutumorski agens u borbi s karcinomom debelog crijeva (46).

Proučavani derivati kumarina uzrokovali su blagi porast broja stanica u G1 fazi staničnog ciklusa na CaCo-2 stanicama što odgovara istraživanju Patila i suradnika. Kako bi ispitali

utjecaj geraniloksi-7-MOC, derivata kumarina na stanični ciklus na SW480 stanice adenokarcinoma debelog crijeva, stanice su obojili PI i analizirali raspodjelu stanica u različitim fazama ciklusa pomoću protočnog citometra. Znanstvenici su uočili kako je geraniloksi-7-MOC u koncentraciji 50 μ M tijekom 24 i 48 sati izmijenio raspodjelu stanica u ciklusu. Naime, derivat je uzrokovao povećan postotak stanica u G1/G0 fazi ciklusa nakon 48 sati djelovanja. Ovaj kumarin pokazao je potencijal za indukciju apoptoze putem staničnog ciklusa (47).

Park i suradnici pozabavili su se istraživanjem utjecaja eskuletina, kumarinskog derivata na HCT116 stanice kolorektalnog karcinoma. Utvrdili su kako tretiranje stanica eskuletinom dovodi do povećanja inhibicije staničnog rasta ovisno o dozi i trajanju tretmana ali i uzrokuje znatne promjene staničnog ciklusa. Eskuletin je tako zaustavio stanice u G1 fazi ciklusa što je dovelo do smanjenja cikličke i CDK ekspresije aktivacijom p27KIP, regulatora staničnog ciklusa. Zaustavljanje staničnog ciklusa G1 povezano je s povećanjem regulacije p27KIP ekspresije. Eskuletin je potom aktivirao vanjski reguliranu mitogen aktiviranu protein kinazu, ERK1/2. Stanice su prethodno obrađene MEK1/2 specifičnim inhibitorom koji blokira ekspresiju p27KIP induciranu eskuletinom. Blokiranje ERK1/2 funkcije spriječilo je inhibiciju stanične proliferacije i smanjenje razine proteina G1 faze. Aktivnost Ras (RasN17) mutiranog gena inhibirala je aktivnost ERK1/2 i ekspresiju p27KIP induciranu eskuletinom. Prekomjerna ekspresija RasN17 potisnula je smanjenje proliferacije stanica i proteina staničnog ciklusa. Signalni put Ras/ERK1/2 povezan je s indukcijom p27KIP što što dovodi do smanjenja kompleksa ciklin/CDK u inhibiciji rasta stanica karcinoma debelog crijeva (48).

Kako bi ispitali utjecaj derivata kumarina na membranski mitohondrijski potencijal, derivati kumarina aplicirani su na staničnu liniju CaCo-2. Derivat NS-48 uzrokovao je narušavanje integriteta membrane a time i omogućio ulazak stanica u apoptozu. Apoptotičke promjene na staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva (HT-29) uočili su Waziri i suradnici. Znanstvenici su proučavajući primijetili bubrenje mitohondrijske membrane i kondenzaciju kromatina koji predstavljaju početne znakove apoptoze. Opažene apoptotičke promjene uključuju i fragmentaciju jezgre te nakupljanje kapljica lipida kao posljedice oštećenja stanične membrane. Klausenidin je prouzročio cijepanje jezgrine DNA i stvaranje DNA fragmenata. Stvaranje ovakvih fragmenata povećavalo se tijekom vremena što ukazuje na sposobnost klausenidina da održi proces apoptoze aktivnim. Poznato je kako je apoptoza izazvana nekim

kemoterapeutskim agensom kontrolirana omjerom bax/bcl-2 ekspresije u mitohondrijima. Povećana ekspresija Bax proteina stimulira depolarizaciju mitohondrijske membrane. Također, ekspresija kaspaza 3 i 9 povećana je nakon tretiranja stanica HT-29 kausenidinom što implicira uključivanje intrinzičnog puta apoptoze u stanicama karcinoma debelog crijeva (49).

Djelovanje kumarinskih derivata pokazalo je značajan utjecaj na stanične linije karcinoma debelog crijeva putem inhibicije staničnog rasta, promjena u raspodjeli stanica tijekom staničnog ciklusa i uzrokovalo depolarizaciju mitohondrijske membrane. Unatoč brojnim pokušajima u potrazi za učinkovitijim antitumorskim agensima, kumarini i dalje ostaju jedan od najsvestranijih klasa spoja u borbi protiv karcinoma i važna su komponenta među aktivnim molekulama u otkrivanju lijekova (50). Kumarini i njegovi derivati tako postaju obećavajući agensi u borbi protiv karcinoma debelog crijeva (24).

6. ZAKLJUČAK

- Uočljiv je citotoksičan učinak svih testiranih derivata na stanične linije, gdje je veća citotoksičnost evidentirana pri većim koncentracijama ispitivanih kemijskih spojeva.
- Najveću citotoksičnost pokazuju derivati NS-48 i A-153 u koncentraciji od 10^{-4} M na svim staničnim linijama.
- Produljenje inkubacije uzrokuje značajno otpuštanje enzima LDH iz stanica tretiranih derivatom NS-51.
- Izloženost CaCo-2 stanica derivatima NS-48 i A-153 uzrokovala je blagi porast stanica u G1 fazi i smanjenje broja stanica u G2/M fazi.
- Derivati NS-48 i A-153 uzrokovali su smanjenje mitohondrijskog potencijala i depolarizaciju membrane CaCo-2 stanica.

7. SAŽETAK

Uvod: Karcinom debelog crijeva vodeći je uzrok smrtnosti u svijetu, a njegova se stopa pojavnosti sve više povećava. Kumarini imaju snažan inhibicijski učinak na različite tumorske stanice te je njihov skelet, kao farmakofor od iznimne važnosti za razvoj protutumorskih lijekova.

Ciljevi istraživanja: Ispitati utjecaj derivata kumarina na rast normalnih epitelnih stanica i stanica karcinoma debelog crijeva u uvjetima *in vitro*. Odrediti promjene u staničnom ciklusu i način umiranja tretiranih stanica.

Materijali i metode: Inhibitorski učinak derivata određen je MTT testom na tri stanične linije karcinoma debelog crijeva (SW-60, HT-29 i CaCo-2) i normalnoj staničnoj liniji (MDCK1). Citotoksičan učinak utvrđen je mjerenjem enzima LDH u staničnom mediju. Promjene staničnog ciklusa praćene su na staničnoj liniji CaCo-2 protočnim citometrom. Put apoptoze utvrđen je mjerenjem narušenog mitohondrijskog membranskog potencijala na stanicama CaCo-2.

Rezultati: Najveću citotoksičnost pokazuju derivati NS-48 i A-153 u koncentraciji od 10^{-4} M na svim staničnim linijama. Izloženost CaCo-2 stanica derivatima NS-48 i A-153 uzrokovala je blagi porast stanica u G1 fazi i smanjenje broja stanica u G2/M fazi. Derivati NS-48 i A-153 uzrokovali su smanjenje mitohondrijskog potencijala i depolarizaciju membrane CaCo-2 stanica.

Zaključak: Derivati kumarina smanjuju stanični rast tumorskih stanica u ovisnosti o koncentraciji i tipu stanica. Uočene su promjene staničnog ciklusa i smanjenje mitohondrijskog potencijala u stanicama tretiranih derivatima kumarina.

Ključne riječi: karcinom debelog crijeva; kumarini; mitohondrijski membranski potencijal; stanični ciklus; tehnike kulture stanica

8. SUMMARY

Antitumor effects of new coumarin derivatives on colon tumor cells in vitro

Introduction: Colorectal cancer is the leading cause of death in the world, and its frequency has been increasing. Coumarins have a strong inhibitory effect on different tumor cells, therefore their skeleton, as pharmacophore, is extremely important for the development of anti-tumor drugs.

Research objectives: Test the effect of coumarin derivatives on the growth of normal epithelial cells and colorectal cancer cells *in vitro*. Determine the cell cycle change and the apoptotic path of treated cells.

Materials and methods: The inhibitory effect of the derivatives has been determined by the MTT assay, performed on the three colorectal cancer cell lines (SW-60, HT-29 and CaCo-2) and the normal cell line (MDCK1). The cytotoxicity effect has been determined by measuring the LDH enzyme released in the cell medium. The alterations of the cell cycle have been monitored on the CaCo-2 cell line by the flow cytometry. The apoptosis pathway has been determined by measuring the membrane potential of the damaged mitochondria on the CaCo-2 cells.

Results: The greatest cytotoxicity has been induced by the NS-48 and A-153 derivatives at the 10^{-4} M on all cell lines. The exposure of the CaCo-2 cells to NS-48 and A-153 derivatives has caused a mild increase of the cells in the G1 phase and the reduction of the cell number in the G2/M phase. The NS-48 and A-153 derivatives have caused a decrease of the mitochondrial potential and the depolarization of the membrane of the CaCo-2 cells.

Conclusion: The coumarin derivatives reduce the cell growth of the tumor cells in a concentration depending manner and depending on the cell type. The alterations of the cell cycle and the reduction of mitochondrial potential in the cells treated by the coumarin derivatives have been observed.

Keywords: colonic neoplasms; coumarins; mitochondrial membrane potential; cell cycle; cell culture techniques

9. LITERATURA

1. 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.
2. Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Curr Med Chem.* 2009;16(32):4236–60.
3. Katsori A-M, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2014;24(12):1323–47.
4. Molnar M, Čačić M. Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. *Croat J Food Sci Technol.* 2011;3:55–64.
5. Vekariya RH, Patel HD. Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via Knoevenagel condensation: A review. *Synth Commun.* 2014;44(19):2756–88.
6. Rohini K, Srikumar PS. Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. *J Biofertilizers Biopestic.* 2014;05(01):5–7.
7. Srikrishna D, Godugu C, Dubey PK. A Review on Pharmacological Properties of Coumarins. *Mini-Reviews Med Chem.* 2018;18(2).
8. Peng X-M, L.V. Damu G, He Zhou C. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry. *Curr Pharm Des.* 2013;19(21):3884–930.
9. Medina FG, Marrero JG, Macías-Alonso M, González MC, Córdova-Guerrero I, Teissier García AG, i sur. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. *Nat Prod Rep.* 2015;32(10):1472–507.
10. Anees A. Pangal, Javed A. Shaikh EMK. Current Developments of C3-Substituted Coumarin Hybrids as Anti-Cancer Agents. 2017;42(28):161–8.
11. Nasr T, Bondock S, Youns M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014;76:539–48.
12. Salem M, Marzouk M, El-Kazak A. Synthesis and Characterization of Some New Coumarins with in Vitro Antitumor and Antioxidant Activity and High Protective Effects against DNA Damage. *Molecules.* 2016;21(2):249.
13. Klenkar J, Molnar M. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(7):1223–38.
14. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B,

- Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruíz K, i sur. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci.* 2017;5(11):4667.
15. Vrdoljak E, Krajina Z, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D. *Klinička onkologija*. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
 16. Sundling K.E., Zhang R. MKA. Pathologic Features of Primary Colon, Rectal, and Anal Malignancies. In: Bentrem D, Benson AB, editors. *Gastrointestinal Malignancies*. Chicago, IL: Springer; 2016.
 17. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, i sur. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1–51.
 18. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):120–35.
 19. Leroy R. *Colon Cancer : Diagnosis , treatment and colon cancer : diagnosis, treatment and follow-up*. 2014;(September 2015).
 20. Bešlija S, Vrbanc D. *Medicinska/internistička onkologija*. 1. izdanje. Sarajevo: Medicinska naklada; 2014.
 21. Moussavi M, Haddad F, Matin MM, Iranshahi M, Rassouli FB. Efficacy of hyperthermia in human colon adenocarcinoma cells is improved by auraptene. *Biochem Cell Biol.* 2018;96(1):32–7.
 22. Kim AD, Madduma Hewage SR, Piao MJ, Kang KA, Cho SJ, Hyun JW. Esculetin induces apoptosis in human colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Biochem Funct.* 2015;33(7):487–94.
 23. Rajabi M, Hossaini Z, Khalilzadeh MA, Datta S, Halder M, Mousa SA. Synthesis of a new class of furo[3,2-c]coumarins and its anticancer activity. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2015;148:66–72.
 24. Saidu NEB, Valente S, Bana E, Kirsch G, Bagrel D, Montenarh M. Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Bioorganic Med Chem.* 2012;20(4):1584–93.
 25. Lin MH, Cheng CH, Chen KC, Lee WT, Wang YF, Xiao CQ, i sur. Induction of ROS-independent JNK-activation-mediated apoptosis by a novel coumarin-derivative, DMAC, in human colon cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2014;218(May):42–9.
 26. Cooper GM, Hausman RE. *Stanica- molekularni pristup*. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada;2010.
 27. Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. *Molecular Biology of the*

- cell. 5. izdanje. New York: Garland Science; 2008.
28. Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz JGJ. Cell biology. 3. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2017.
 29. Bybee A, Thomas NS. Cell cycle regulation. Blood Rev. 1991;5(3):177–92.
 30. Casem ML. Case Studies in Cell Biology. Case Studies in Cell Biology. 2016. 1-385 p.
 31. Said HM. Physiology of the Gastrointestinal Tract. 6. izdanje. London, UK: Academic Press; 2018.
 32. Anita P, Sharma HP, Jain P, Amit P. Apoptosis (programmed cell death) – A review. World J Pharm Res. 2014;3(4):1854–72.
 33. Rager JE. The Role of Apoptosis-Associated Pathways as Responders to Contaminants and in Disease Progression. In: Systems Biology in Toxicology and Environmental Health. London, UK: Elsevier Inc. 2015;187–205.
 34. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. Int J Mol Sci. 2015;16(2):2942–55.
 35. Winter E, Chiaradia LD, Silva AH, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB. Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. Toxicol Vitro. 2014;28(5):769–77.
 36. Yosim AE, Fry RC. Systems Biology in Toxicology and Environmental Health. In: Systems Biology in Toxicology and Environmental Health. 1. izdanje. Boston: Academic Press; 2015. p. 1–10.
 37. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. Int J Mol Sci. 2018;19(2):448.
 38. Sakamuru S, S. A-RM, Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. 2016;1473(5):17–22.
 39. Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. Cell Death Differ. 2003;10(6):709–17.
 40. LyD. JD, Grubb R, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. Apoptosis. 2003;8(2):115–128.
 41. Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahlsen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR. Cytochrome C Maintains Mitochondrial Transmembrane Potential and Atp Generation after Outer Mitochondrial Membrane Permeabilization during the Apoptotic Process. J

- Cell Biol. 2001 Apr 16;153(2):319–28.
42. Gahl RF, Dwivedi P, Tjandra N. Bcl-2 proteins bid and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis. *Nat Publ Gr.* 2016;7(10):e2424-11.
 43. Jayaraman S. Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: Comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580. *J Immunol Methods.* 2005;306(1–2):68–79.
 44. Sharma A, Gupta M. Underlying mechanisms of Anticancer Coumarins : An overview. 2018;6(3):361–70.
 45. 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.
 46. Eken A, Arslan AKK, Öztürk E, Ökçesiz A YM. Cytotoxic Effects of Coumarin Compounds Imperatorin and Osthole, Alone and in Combination with 5-Fluorouracil in Colon Carcinoma Cells. *MDPI AG.* 2017;1(10):1003.
 47. Patil JR, Jayaprakasha GK, Kim J, Murthy KNC, Chetti MB, Nam SY, i sur. 5-Geranyloxy-7-methoxycoumarin inhibits colon cancer (SW480) cells growth by inducing apoptosis. *Planta Med.* 2013;79(3–4):219–26.
 48. Park S, Park S, Lim J, Choi YH, Kim W, Moon S. Esculetin inhibits cell proliferation through the Ras / ERK1 / 2 pathway in human colon cancer cells. 2011;223–30.
 49. Waziri PM, Abdullah R, Yeap SK, Omar AR, Kassim NK, Malami I, i sur. Clausenidin induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(256):1–12.
 50. Paul K, Bindal S, Luxami V. Synthesis of new conjugated coumarin-benzimidazole hybrids and their anticancer activity. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2013;23(12):3667–72.

10. ŽIVOTOPIS

Zorislava Živković

Datum i mjesto rođenja: 11.1. 1995. Našice

Adresa stanovanja: Trg Isidora Kršnjavog 6, 31500 Našice

Broj telefona: 091/540-5233

E-mail: zorislavazivkovic@hotmail.com

OBRAZOVANJE

2009. – 2013. – Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2013. – 2016. – Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet, Osijek