

Farmakološko djelovanje i primjena izatina i izatinskih derivata

Bulat, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:359861>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Petra Bulat

**FARMAKOLOŠKO DJELOVANJE I
PRIMJENA IZATINA I IZATINSKIH
DERIVATA**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Petra Turčić, spec. klin. farm.

Zahvaljujem mentorici izv. prof.dr.sc. Petri Turčić, spec. klin. farm. na stručnoj pomoći, strpljenju i susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na nesebičnoj podršci, strpljivosti i razumijevanju tijekom svih godina studija.

Posebno hvala Filipu koji me ohrabrivao i vjerovao u mene kada mi je bilo najpotrebnije i koji je bio moj najveći oslonac tijekom svih mojih studentskih dana.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima, Nadi i Zdravku kojima ću biti beskrajno zahvalna na svemu što su učinili za mene i što su mi omogućili da danas budem ono što jesam.

Sadržaj:

1. UVOD	4
1.1. IZATIN.....	4
1.2. PODRUČJA FARMAKOLOŠKOG DJELOVANJA IZATINSKIH DERIVATA.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. PROTUTUMORSKO DJELOVANJE	12
4.1.1. Strukturalne karakteristike izatinskih derivata.....	12
4.1.2. Indikacija Sunitiniba	13
4.1.3. Angiogeneza.....	14
4.1.4. MRCC	16
4.1.5. GIST	17
4.1.6. pNET	18
4.2. SUNITINIB	19
4.2.1. Mehanizam djelovanja	19
4.2.2. Nuspojave.....	21
4.2.3. Doziranje i način primjene	22
4.2.4. Farmakokinetika.....	23
4.3. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE.....	26
4.4. OSTALA FARMAKOLOŠKA DJELOVANJA	28
4.4.1. Indirubin.....	28
4.5. KOMUNIKACIJA IZMEĐU CRIJEVNE MIKROBIOTE I MOZGA.....	31
4.5.1. Povišene koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama kao odgovor na stres	31
4.5.2. Učinak izatina na neurotransmitore.....	32
4.5.3. Učinak bakterija na sintezu izatina.....	32
5. ZAKLJUČCI	34
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	37
7. LITERATURA	39
8. SAŽETAK/SUMMARY	42
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /	43
BASIC DOCUMENTATION CARD	43

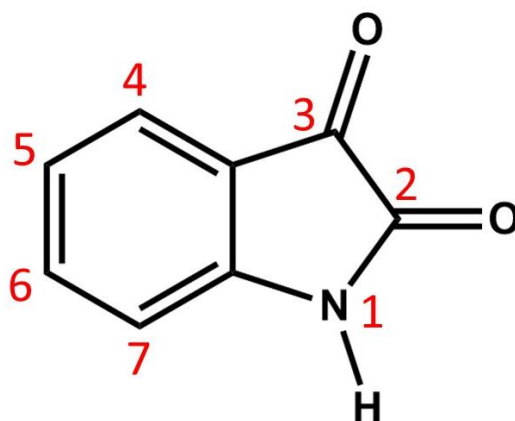
1. UVOD

1.1. IZATIN

Izatin je prirodni alkaloid narančaste boje izoliran iz biljaka roda *Isatis* prisutnih po cijelom svijetu. Ovaj spoj, poznat i kao tribulin, najviše je prisutan u Europi i Kini u vrsti *Isatis tinctoria* (L.), središnjoj Americi i Amazoni u vrsti *Couropita guianensis* (Aubl.), Sjedinjenim Američkim Državama i Meksiku u vrsti *Melochia tomentosa* (L.) te u Novoj Kaledoniji u vrsti *Boronia koniamboensis* (Däniker). Izoliran je iz izlučevina žabe *Bufo* i australskog školjkaša *Dicathais orbita* (Gmelin) te je pronađen kao endogeni metabolit triptofana unutar CNS-a čovjeka (R.E. Ferraz de Paiva i sur., 2021). Danas se izatin više ne izolira iz prirodnih izvora već se dobiva sintetskim putem. O.L. Erdman i A. Laurent prvi su puta 1841. godine sintetizirali izatin oksidacijom indiga smjesom dušične i kromne kiseline. Iako je to prvi sintetski postupak, danas se za dobivanje izatina i njegovih derivata najčešće koristi Sandmeyerov postupak kojim je ujedno dobiven i prvi derivat s antibakterijskim djelovanjem 7-prenilinizatin (Vandana i sur., 2017). Ovim postupkom, ali i brojnim drugim otkriveni su i sintetizirani mnogi derivati izatina koji su pokazali različita djelovanja zadržavajući osnovnu strukturu izatina. Neka od farmakoloških djelovanja tako dobivenih derivata su antibakterijska, antitumorska, protuupalna, antikonvulzivna i mnoga druga o kojima će kasnije biti više riječi (P. Pakravan i sur., 2013). Strukturni motiv izatina predstavlja pogodan početni spoj u sintezi brojnih derivata od kojih su neki registrirani kao lijekovi. U ovom će radu biti prikazana samo osnovna svojstva strukture izatina kako bi se pobliže objasnila pozadina širokog spektra djelovanja njegovih derivata.

Molekula izatina sastoji se od indolskog prstena koji na položaju C2 i C3 ima dvije karbonilne skupine (slika 1.). Funkcionalizacijom karbonilne skupine na položaju C3, dobivaju se derivati poput imina, hidrazona, tiosemikarbazida i oksima, čiji su metalni kompleksi pokazali antitumorsko djelovanje s najvećim učinkom na inhibiciju receptorskih kinaza. Alkiliranjem ili ariliranjem amidnog dušikovog atoma dobivaju se derivati koji pokazuju destabilizirajući učinak na mikrotubule. Dimerizacijom preko C2 ugljikovog atoma pojačava se inhibitorski učinak na kinaze, a halogeniranjem položaja C5, C6 ili C7 pojačava se antitumorsko djelovanje.

Derivati izatina s atomom broma na navedenim položajima pokazali su značajno inhibitorno djelovanje prema ciklin-ovisnim kinazama koje imaju važnu ulogu u staničnom ciklusu. (R.E. Ferraz de Paiva i sur., 2021)

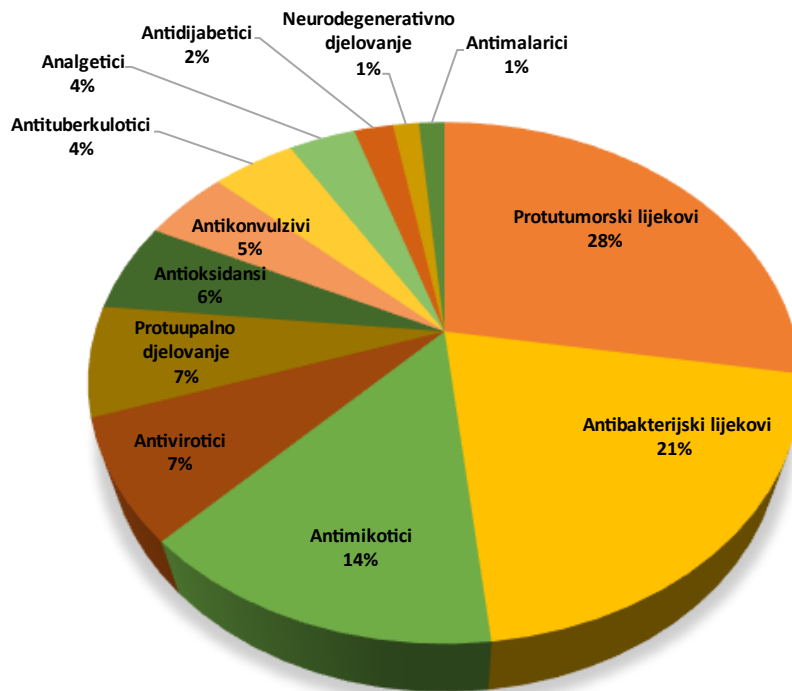


Slika 1. Shematski prikaz molekule izatina

1.2. PODRUČJA FARMAKOLOŠKOG DJELOVANJA IZATINSKIH DERIVATA

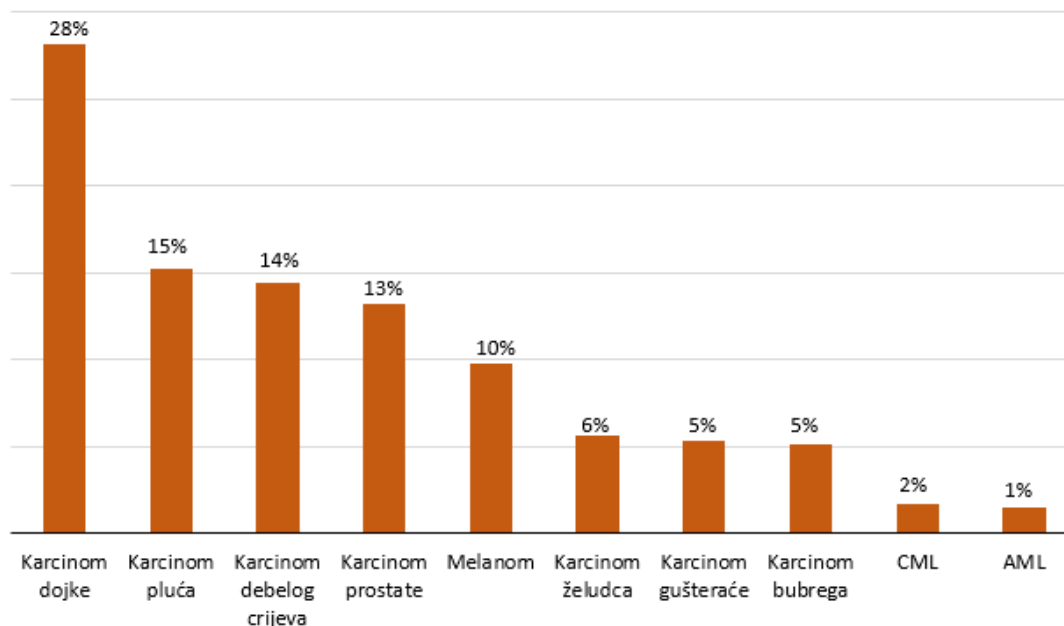
Tijekom pretraživanja baze podataka SciFinder pod ključnom riječi „isatin*“ od 1900. godine napisano je preko 19 000 radova, a samo u posljednjih 20 godina objavljeno je preko 13 000 radova. Ovo znanstveno područje doseglo je vrhunac 2018. godine kada je objavljeno ukupno 927 radova. Tijekom 2020. i 2021. godine smanjen je broj objavljenih znanstvenih radova na temu izatinskih derivata i njihovih farmakoloških djelovanja što se može pripisati pojačanom objavljivanju radova na području istraživanja infekcije COVID-19. Tijekom 2022. godine objavljeno je 928 radova koji sadrže ključnu riječ „isatin*“ te je iz toga vidljivo da interes u ovom području ponovno raste.

Danas je poznato nekoliko tisuća različitih derivata izatina s raznolikim djelovanjima te se svakodnevno objavljuje niz novih saznanja čime ovo područje postaje izrazito dinamično. Kako bi prikazali koje je područje istraživanja najviše istraženo u razdoblju od 1936. godine do danas, napravljen je tortni dijagram koji prikazuje udio napisanih radova u bazi podataka SciFinder s ključnom riječi „isatin“ uz koju je napisano farmakološko djelovanje npr. „isatin and anticancer“. Na Slici 2. prikazano je da je najveći udio znanstvenih radova objavljen na temu antitumorskog i antibakterijskog djelovanja izatina i njegovih derivata. Taj podatak nije neobičan s obzirom da danas postoje lijekovi s izatinskom jezgrom koji su registrirani kao lijekovi ili se nalaze u kliničkim ispitivanjima za liječenje pojedinih tumora, a o čemu će kasnije biti više riječi.



Slika 2. Prikaz farmakoloških aktivnosti izatinskih derivata i zastupljenost objavljenih znanstvenih radova u postocima pretraživanjem baze podataka SciFinder u razdoblju od 1936. godine do 3. veljače 2023. godine pod ključnom riječi „isatin and (farmakološko djelovanje)“.

Od ostalih djelovanja, do sada je ispitana potencijalna aktivnost izatinskih derivata u liječenju gljivični i virusnih bolesti te protuupalna, antioksidativna, antikonvulzivna i brojna druga djelovanja iskazana na slici 2., a rezultati se odnose na ukupno 5574 znanstvena rada. Protutumorsko djelovanje pokazalo se kao dominantno djelovanje izatinskih derivata, stoga se postavlja pitanje na kojim se sve vrstama tumora do sada provodilo ispitivanje navedenih derivata. Na temelju pretraživanja baze podataka SciFinder dobiveni su slijedeći podaci opisani na Grafu 1. Iz navedenog vidljivo je da su do sada najviše istraženi izatinski derivati s protutumorskim djelovanjima na tumore dojke i pluća.



Graf 1. Histogram zastupljenosti znanstvenih radova u udjelima od 1936.godine do 25.veljače 2023.godine pretraživanjem pod ključnom riječi „isatin and (tip karcinoma)“ na temelju 1162 pronađena znanstvena rada

Prema posljednjim podacima hrvatskog Registra za rak iz 2020. godine najveći broj oboljelih žena svih dobi oboljelo je od karcinoma dojke, a zatim slijedi karcinom debelog crijeva, pluća i vrata maternice. Kod muškaraca svih dobi najviše njih oboljelo je od karcinoma prostate, a zatim slijede karcinom pluća i debelog crijeva (www.hzjz.hr). Najveći broj istraživanja izatinskih derivata proveden je na tumorima čija je incidencija u populaciji i najveća kako bi se stvorile dodatne mogućnosti liječenja, ali isto tako pronašla i učinkovitija terapija.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji u 2020. godini 2,26 milijuna ljudi godišnje oboli od karcinoma dojke, 2,21 milijun od karcinoma pluća, a na trećem mjestu nalazi se karcinom debelog crijeva. U 2020. godini broj umrlih od karcinoma pluća u svijetu iznosio je 1,80 milijuna. Na drugom mjestu prema smrtnosti nalazi se karcinom debelog crijeva, a na trećem hepatocelularni karcinom. Pokazano je da incidencija oboljenja od neke vrste tumora značajno raste s dobi što se pripisuje slabljenju aktivnosti mehanizama zaduženih za popravak stanica kod starijih osoba. Isto tako, povećana je i konzumacija duhana, alkoholnih pića, brzih i nezdravih dijeta, sjedilačkog načina života te postoji sve veća izloženost velikim količinama

zagađenog zraka. Takva vrsta života predstavlja velik rizik za oboljenje od tumora. Ranim otkrivanjem tumora, izbjegavanjem nezdravog načina života te pronalaskom novih mogućnosti liječenja, znatno bi se smanjila godišnja incidencija oboljenja te poboljšala kvaliteta života. (www.who.int)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pretraživanjem literature pronađeno je niz različitih izatinskih derivata koji su već registrirani kao lijekovi ili se nalaze u nekim od stupnjeva kliničkih istraživanja. Cilj ovog rada je predstaviti mehanizme djelovanja izatinskih derivata i prikazati njihovu biološku aktivnost te potencijalna djelovanja u liječenju različitih bolesti. U ovom radu ponajviše će biti riječ o antitumorskom djelovanju jer je upravo to djelovanje i najviše do sada istraženo. Prema podacima hrvatskog Registra za rak, koji su opisani u prošlom poglavlju, i dalje postoji veliki interes u području istraživanja lijekova u liječenju zloćudnih bolesti jer su upravo te bolesti drugi najznačajniji uzrok smrti u Hrvatskoj od kojih umire svaki peti stanovnik (www.hzjz.hr).

Osim antitumorskog djelovanja, u ovom radu bit će prikazana i svojstva izatinskih derivata s antibakterijskim učinkom. Poznato je da potrošnja antibiotika svake godine sve više raste što postaje sve veći javnozdravstveni problem. Povećanjem potrošnje antibiotika dolazi do rasta otpornosti bakterija i pojavi bakterijskih infekcija za koje ne postoje učinkoviti antibiotici. Iz tog razloga danas se sve više na tržište vraćaju stari antibiotici, a povećava se i zanimanje za istraživanje i otkrivanje novih antibiotika.

Na slici 2. prikazana su različita farmakološka djelovanja izatinskih derivata, no jedna od novijih tema, čija popularnost sve više raste je i odnos između crijevne mikrobiote i mozga. Utvrđeno je da je izatin jedan od metabolita crijevnih bakterija te da ima veliku ulogu u regulaciji i radu mozga. Na tu temu prikazani su radovi s izatinskim derivatima i njihovoj ulozi u razvoju neurodegenerativnih bolesti.

Cilj istraživanja:

1. Prikazati i opisati antitumorsko i antibakterijsko djelovanje izatinskih derivata
2. Osvrnuti se na ostala potencijalna farmakološka djelovanja
3. Razjasniti kako izatinski derivati sudjeluju u komunikaciji između crijevne mikrobiote i mozga

3. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade ovog diplomskog rada korišteni su znanstveni radovi i bibliografske baze podataka kao što su *SciFinder*, *Pub Med*, *Cochrane* i slično. S ciljem pronalaska potrebnih informacija, navedene bibliografske baze podataka pretražene su pod ključnim pojmovima *isatin derivatives*, *antitumor agents and isatin derivatives*, *antibacterial activity and isatin derivativs*, *Microbiota-Gut-Brain communication and isatin...* Pretraživanjem pod ključnim riječima pronađene su najpotrebnije informacije koje su bile neophodne za izradu ovog diplomskog rada. Osim navedenih izvora, korištene su i internetske stranice kao što su stranice Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Svjetske zdravstvene organizacije i brojne druge. Sve slike i grafovi izrađeni su u programu Microsoft Excel 2010, a crtanje strukture provedeno je uz pomoć programa ChemDraw JS dostupnog u slobodnoj verziji na internetu. Za crtanje strukture mehanizma djelovanja sunitiniba korišten je besplatan program crtanja bioloških struktura BioRender (www.BioRender.com). Ovaj diplomski rad napisan je u programu Microsoft Office Word 2010.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PROTUTUMORSKO DJELOVANJE

4.1.1. Strukturalne karakteristike izatinskih derivata

Molekula izatina predstavlja početni spoj u sintezi brojnih derivata koji zadržavaju strukturni motiv izatina. Neki su izatinski derivati već registrirani kao lijekovi u liječenju određenih tumora, dok neki još prolaze kroz klinička istraživanja. Nedavno su otkriveni derivati izatina koji su pokazali potencijalno inhibirajuće djelovanje na kolinesteraze i nakupljanje amiloid- β peptida. Ovo otkriće moglo bi doprinijeti razvoju lijekova u liječenju Alzheimerove bolesti. Velik broj farmaceutskih tvrtki i istraživačkih skupina posvetilo je pažnju sintezi izatinskih derivata. U literaturi se najčešće spominju imini, oksimi, hidrazini, hidrazoni, tiosemikarbazoni i spiro-spojevi. Nedavna istraživanja u *in vitro* uvjetima pokazala su da izatinski derivati s imidazolom imaju inhibitorni učinak na COX-2 enzim, koji sudjeluje u upalnom procesu, i PI3K čija aktivnost je povezana s rakom dojke. Imini dobiveni reakcijom na položaju C3 (slika 1.) pokazali su se izvrsnima u koordinaciji metalnih iona, a dobiveni kompleksni spojevi imaju jače antiproliferativno i proapoptotičko djelovanje na različite tumorske stanice. Tijekom dugogodišnjeg istraživanja korišteni su različiti ligandi s izatinskom jezgrom i različiti metalni ioni koji su pokazali jače citotoksično djelovanje u odnosu na 5-fluorouracil i slabije u odnosu na doksorubicin. 5-fluorouracil je lijek koji se koristi kao monoterapija u liječenju karcinoma debelog crijeva i dojke ili u kombinaciji s ostalim citostaticima, a doksorubicin se koristi u terapiji karcinoma dojke i pluća. Hidrazini su vrlo često korišteni za sintezu diizatina koji je u jednom istraživanju u *in vitro* uvjetima pokazao značajnu antitumorsku aktivnost protiv staničnih linija raka kao što su *Hela*-stanice, epitelne stanice adenokarcinoma, hepatocelularne stanice jetre... Kasnije su istraživanja provedena u *in vivo* uvjetima u kojima se potvrdilo značajno antitumorsko djelovanje. Do danas su sintetizirani brojni hidrazinski derivati koji djeluju na brojne signalne molekule. Neki od njih aktiviraju kaspazu 3 i kaspazu 9, utišavaju ekspresiju protu-apoptotičkog proteina Bcl-2 i pojačavaju ekspresiju pro-apoptotičkog proteina BAX te na taj način potiču apoptozu tumorskih stanica. Za razliku od hidrazina, hidrazoni su pokazali potencijalni inhibitorni učinak na Shp2 i Shp1. Izatin- β -tiosemikarbazon pokazao je značajnu inhibitornu aktivnost prema P-glikoproteinu, koji je pojačano ekprimiran u stanicama cervikalnog adenokarcinoma.

Iako je ispitan velik broj izatinskih derivata, jedan od važnijih predstavnika ove skupine je sunitinib koji je registriran kao lijek. Osim njega, lijekovi koji se nalaze u trećem stupnju kliničkih ispitivanja su nintedanib, orantinib i semaksinib. Nintedanib se trenutno ispituje za liječenje kolorektalnog karcinoma, karcinoma jajnika u kombinaciji s paklitakselom i karboplatinom te karcinoma pluća u kombinaciji s docetakselom. Orantinib prolazi kroz treći stupanj ispitivanja za liječenje pacijenata s neoperabilnim hepatocelularnim karcinomom, a semaksinib se u kombinaciji s 5-fluorouracilom ispituje za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma. Od izatinski derivata, toceranib je jedini lijek specifičan za pse koji je 2009. godine dobio odobrenje u liječenju tumora mastocita pasa. (R.E. Ferraz de Paiva i sur., 2021.)

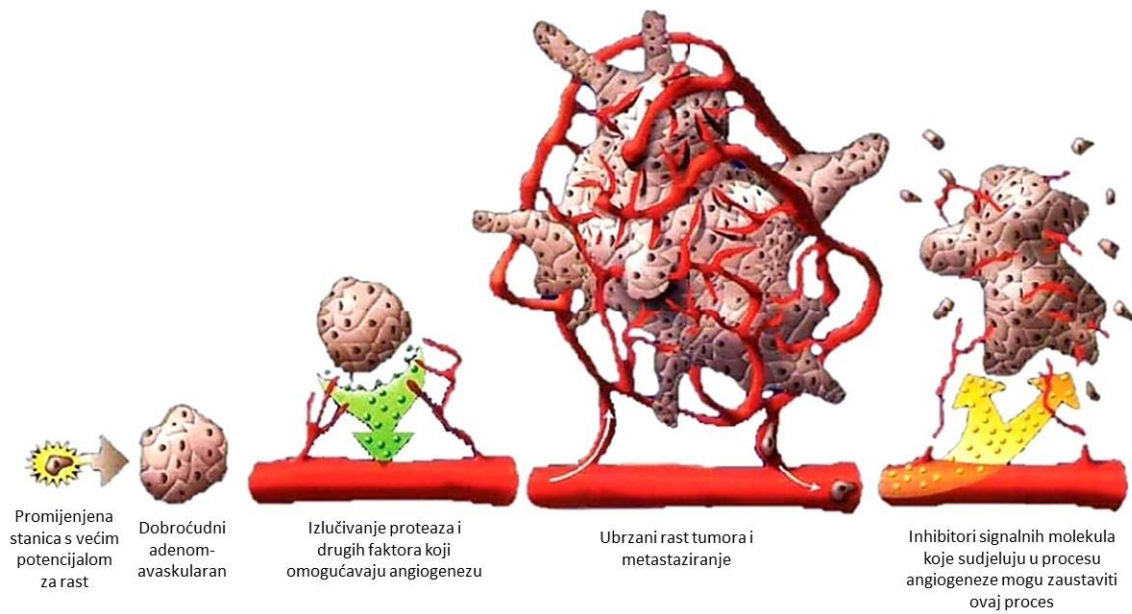
4.1.2. Indikacija Sunitiniba

Da bi neki lijek dobio odobrenje za upotrebu u liječenju određene bolesti mora proći strogo i dugotrajno ispitivanje kroz 4 stupnja kliničkih ispitivanja. Osim što je taj put izuzetno dugotrajan, on zahtjeva i velika financijska ulaganja. Sunitinib je jedan od lijekova koji je EMA registrirala 2006. godine za liječenje neoperabilnog i/ili metastatskog malignog gastrointestinalnog stromalnog tumora (GIST) nakon što se terapija imatinibom pokaže neuspješnom zbog prebrzog uznapredovanja bolesti ili ne podnošenja navedenog lijeka. Godinu dana kasnije, 2007., Sunitinib je dobio odobrenje za liječenje metastatskog karcinoma bubrežnih stanica (MRCC) za one pacijente koji su prethodno bili na terapiji citokinima. Kasnije, 2009. godine ovaj lijek postao je prva linija liječenja GIST-a, a 2010. indikacija je proširena za liječenje neoperabilnih ili metastatskih dobro diferenciranih tumora gušterače (pNET) u odraslih bolesnika kod kojih je došlo do progresije bolesti. (G. Tridente, Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors, 2017). Osim što je registriran u liječenju navedenih tumora, Sunitinib prolazi i kroz niz kliničkih istraživanja kao dvojna terapija s novim imunoterapeutima kao što su docetaksel, kapecitabin i paklitaksel (R.E. Ferraz de Paiva i sur., 2021).

4.1.3. Angiogeneza

Krajem 20. stoljeća J. Folkman po prvi je puta postavio hipotezu angiogeneze, procesa tijekom kojeg dolazi do stvaranja novih krvnih žila. Prema njegovoj hipotezi do angiogeneze dolazi kada tumori narastu više od 2 mm. Taj proces ima važnu ulogu u razvoju metastaza te u njemu sudjeluju stanice kao što su fibroblasti, endotelne stanice, periciti i brojne druge. Nakon što se ova hipoteza pokazala točnom, mnogi su lijekovi usmjereni na zaustavljanju nepravilnog stvaranja krvnih žila i sprječavanju rasta tumora. Ovo otkriće predstavlja dobar početak za povećanje kvalitete života i liječenja pacijenata s različitim vrstama tumora. (A. Cerrato Mena i sur., 2010.)

Stvaranje krvnih žila visoko je regulirani proces u kojem sudjeluje više od 30 različitih posrednika. Promatrajući i s terapijske i fiziološke strane najveću ulogu u ovom procesu imaju VEGF i PDGF. Vezanjem navedenih molekula na njihove pripadajuće receptore, koji pripadaju skupini receptorskih tirozin-kinaza, dolazi do aktivacije mnogobrojnih signalnih molekula unutar stanice. Rezultat takve aktivacije je proliferacija pericita i endotelnih stanica što dovodi do stvaranja kapilara. Iz razloga što u procesu angiogeneze sudjeluje toliko velik broj različitih signalnih molekula, molekule koje inhibiraju više receptora istovremeno imat će bolji terapijski učinak od molekula koje inhibiraju samo jedno signalno mjesto. Dakle, lijek kao što je sunitinib imat će jači učinak od monoklonskih protutijela koje ciljaju samo jedan ligand. Za nastanak tumora potrebno je više od jednog koraka tijekom kojih stanice zbog niza progresivnih promjena postaju zloćudne (slika 3.). Proces razvoja tumora uključuje mutaciju i selekciju stanica sa sve izraženijim mogućnostima proliferacije, preživljavanja, širenja i metastaziranja. Uslijed genetičke promjene jedna stanica počinje nepravilno proliferirati što dovodi do prekomjernog rasta monoklonske populacije tumorskih stanica. Daljnjom proliferacijom unutar te populacije stanica dolazi do nakupljanja sve više mutacija i progresije tumora. U početku takva nakupina diferenciranih stanica naziva se dobroćudni adenom. Kada takve promijenjene stanice postanu dominantna populacija u tumoru, počinju izlučivati proteaze i druge faktore kojima razgrađuju vezivno tkivo, krvne i limfne žile. Migrirajuće endotelne stanice formiraju ogranke novih krvnih žila koje se zatim spajaju s postojećim krvnim žilama formirajući petlje. Novonastale krvne žile propusnije su od ostalih krvnih žila te tako omogućuju olakšano metastaziranje. U posljednjem koraku endotelne stanice izlučuju faktore rasta koji privlače potporne stanice i formiraju bazalnu membranu. Angiogeneza se tumor opskrbljuje kisikom i hranjivim tvarima koje su mu neophodne za daljnji rast. (A. Cerrato Mena i sur., 2010.)



Slika 3. Prikaz procesa angiogeneze (preuzeto i prilagođeno prema A. Cerrato Mena i sur., 2010.)

4.1.4. MRCC

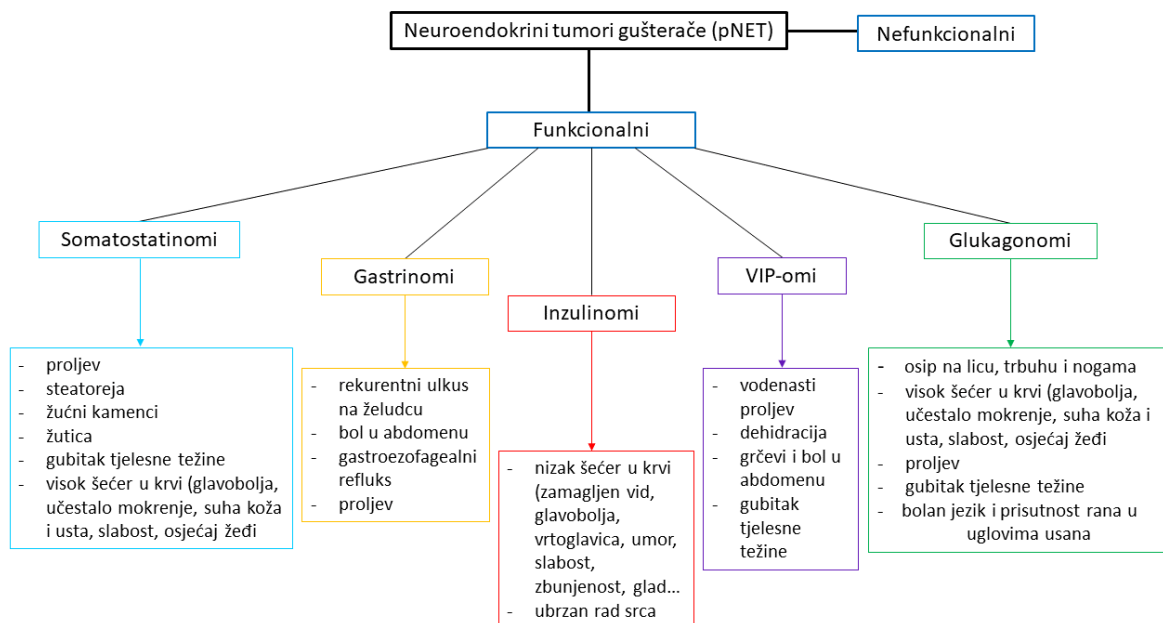
Metastatski karcinom bubrežnih stanica (MRCC) je vaskularan tumor u kojem je pojačana aktivnost VEGF, VEGFR i PDGFR (A. Cerrato Mena i sur., 2010.). Čimbenici koji povećavaju rizik od razvoja ovog oblika tumora bubrega su pušenje, debljina, povišen krvni tlak i prisutnost nasljednog von Hippel-Lindauovog sindroma (www.onkologija.net). U gotovo svim nasljednim tumorima bubrežnih stanica i 60-80 % nenasljednih javlja se mutacija unutar VHL gena (A. Cerrato Mena i sur., 2010.). Do sada je otkriveno više od 370 nasljednih mutacija u VHL genu kod ljudi s von Hippel-Lindauovim sindromom kod kojeg dolazi do stvaranja karakterističnih cisti i tumora po cijelome tijelu. Na molekularnoj razini ovaj gen odgovoran je za stvaranje proteina koji tvori kompleks pod nazivom VCB-CUL2. Navedeni kompleks zadužen je za razgradnju proteina što predstavlja normalan proces kako bi se uklonili nepotrebni ili oštećeni proteini unutar stanice. Jedna od važnijih meta VCB-CUL2 kompleksa je protein HIF-2 α koji predstavlja podjedinicu velikog kompleksa HIF koji ima uloge u prilagodbi stanica promjenjivim razinama kisika, kontrolira nekoliko gena uključenih u diobu stanica, stvaranju novih krvnih žila i proizvodnji eritrocita. Uslijed mutacije u VHL genu, ne dolazi do stvaranja VCB-CUL2 kompleksa i razgradnje HIF-2 α proteina što dovodi do nakupljanja HIF kompleksa unutar stanice. Pojačana aktivnost HIF kompleksa dovodi do brze i nekontrolirane diobe stanica i stvaranja novih krvnih žila kada one nisu potrebne što u konačnici dovodi do stvaranja tumora i angiogeneze. (www.medlineplus.gov)

4.1.5. GIST

Gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) je vrsta tumora koji se često javlja kod odraslih ljudi između 40 i 70 godine života, a najčešće zahvaća želudac i tanko crijevo. Iako još nije utvrđeno, pretpostavlja se da se ovaj oblik tumora razvija iz specijaliziranih stanica u gastrointestinalnom traktu poznatih kao Cajalove intersticijske stanice (ICC). Osobe oboljele od GIST-a mogu, ali ne moraju imati u obiteljskoj anamnezi ovaj oblik tumora. Vrlo često oboljeli koji nemaju genetsku predispoziciju imaju samo jedan tumor koji je u medicinskom rječniku poznat i pod nazivom sporadični GIST. Pacijenti s nasljednim, obiteljskim GIST-om vrlo često imaju višestruke tumore te su kod njih vidljivi i dodatni simptomi kao što su nekancerozna hiperplazija drugih stanica u gastrointestinalnom traktu i hiperpigmentirana područja na koži. Kod nekih oboljelih mogu se javiti uzdignute smečkaste makule koje svrbe ili peckaju pri dodiru, a takvo stanje poznato je kao *Urticaria pigmentosa*. U djetinjstvu i mlađoj dobi može se pojaviti rijedak oblik GIST-a s nedostatkom sukcinat dehidrogenaze koji zahvaća isključivo želudac. Pojedinci koji oboljevaju od ove rijetke vrste tumora imaju veliku predispoziciju za razvoj nekanceroznih tumora u živčanom sustavu poznatih kao paragangliomi i nekanceroznih tumora pluća poznatih kao plućni hondromi. Promatrajući s molekularne strane, uzrok nastanka GIST-a povezan je s mutacijom KIT i PDGFRA gena. Ova vrsta gena daje upute za sintezu membranskih receptora. Vezanjem liganda za KIT ili PDGFR-A receptor dolazi do aktivacije niza unutarstaničnih signalnih molekula koje zatim potiču rast, proliferaciju i preživljavanje stanica. Mutacije koje se javaju unutar KIT i PDGFRA gena potiču sintezu membranskih receptora koji više ne zahtijevaju vezanje liganda kako bi se pokrenula aktivacija unutarstaničnih signalnih puteva, već oni ostaju konstitutivno aktivirani što dovodi do pojačane proliferacije i diobe stanica što pogoduje nastanku tumora. (www.medlineplus.gov)

4.1.6. pNET

Neuroendokrini tumori gušterače (pNET) javljaju se rjeđe od egzokrinih tumor te bolje odgovaraju na terapiju citostaticima. Endokrine stanice unutar gušterače formiraju male skupine koje nazivamo još i „otočići“ gušterače, stoga je ovaj oblik tumora poznat i pod nazivom tumori stanica otočića. Navedeni tip stanica zadužen je za sintezu inzulina, glukagona, gastrina i drugih hormona. Iz tog razloga neuroendokrine tumore gušterače možemo podijeliti na gastrinome, inzulinome, glukagonome te druge vrste tumora kao što su VIP-omi i somatostatinomi. Ovi oblici tumora pripadaju funkcionalnim pNET-ovima u kojima dolazi do pojačane proizvodnje pripadajućeg hormona što za posljedicu ima pojavu različitih simptoma prikazanih na slici 4. Osim funkcionalnih pNET-ova postoje i nefunkcionalni koji se razvijaju sporije bez pojave vidljivih simptoma. Nefunkcionalni pNET-ovi se mogu proširiti i na druge dijelove tijela prije nego što se pojave bilo kakvi znakovi bolesti zbog čega ih je teže liječiti. Postoje različiti načini liječenja funkcionalnog oblika pNET-a. Neki od načina su kirurško uklanjanje dijela gušterače, kemoterapija, hormonska terapija i ciljana terapija kojoj pripada i liječenje sunitinibom. (www.cancer.gov)



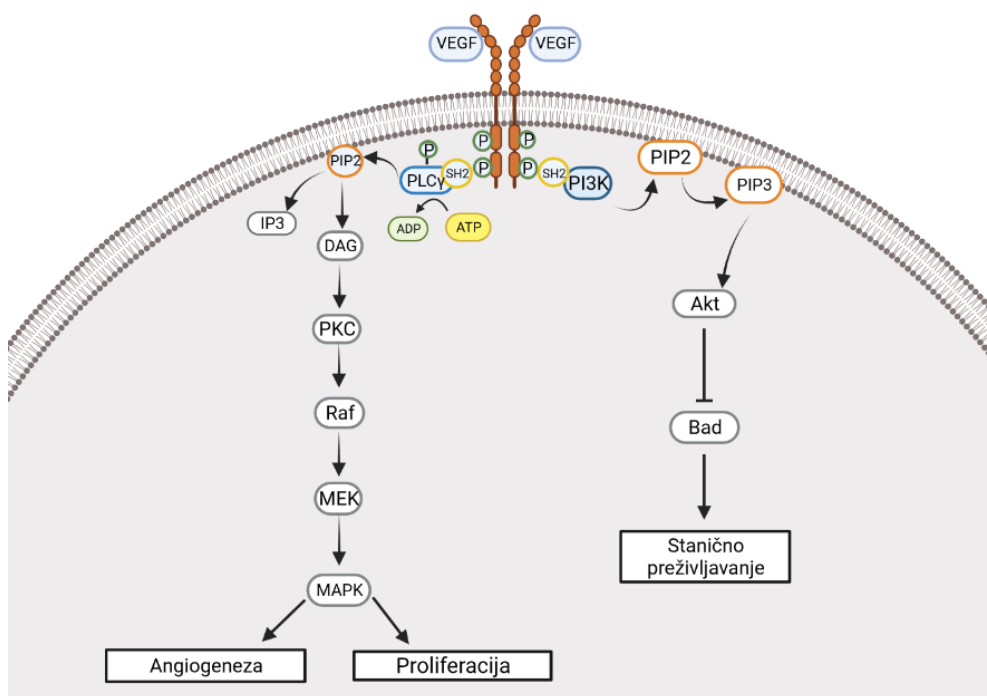
Slika 4. Simptomi funkcionalnog neuroendokrinog tumora gušterače

4.2 SUNITINIB

4.2.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja sunitiniba na staničnoj razini istražen je na više od 80 različitih kinaza, a najveći afinitet kao inhibitor pokazao je prema receptorskim tirozin kinazama (RTK) koje imaju važnu ulogu u rastu tumora, neoangiogenezi i metastatskoj progresiji karcinoma. Dokazano je da je sunitinib inhibitor receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGFR) i to tri najvažnija podtipa VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3 (G. Tridente, 2017.). Vaskularni endotelni faktor rasta i njegov pripadajući receptor predstavljaju glavnu ulogu u razvoju tumora. VEGFA, kojeg nalazimo u gotovo svim organima, uključen je u proces angiogeneze vežući se za receptore VEGFR1 i VEGFR2. VEGFB se veže isključivo na VEGFR1, a pronađen je srcu, skeletnim mišićima, vaskularnim glatkim mišićnim stanicama te doprinosi razvoju krvožilnog sustava embrija. Ligandi VEGFC i VEGFD vežu se za pripadajući receptor VEGFR3. VEGFC pronađen je u neuroendokrinim organima, plućima, srcu, bubrezima i glatkim mišićnim stanicama te predstavlja važnu ulogu u limfoangiogenezi. Za razliku od VEGFC, VEGFD je prisutan u endotelu limfnih žila te je uključen u razvoj limfne vaskulature. VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3 su transmembranski Ig-slični receptori. Nakon vezanja signalne molekule za ekstracelularnu domenu navedenih receptora, aktivira se unutarstanična autofosforilacija i fosforilacija signalnih molekula sa SH2 domenom. Sunitinib inhibira i izoforme receptora trombocitnog faktora rasta PDGFR α i PDGFR β koji zajedno s VEGF pripadaju istoj velikoj porodici PDGF-a. Nakon aktivacije PDGFR, unutar stanice se aktiviraju signalni putevi koji omogućavaju i zdravim i maligno promijenjenim stanicama rast, preživljavanje, diferencijaciju, proliferaciju i angiogenezu. Osim što sunitinib djeluje kao inhibitor navedenih receptora, također je otkriveno da djeluje kao inhibitor receptora KIT, FLT3, CSF-1R te receptora RET. Iz navedenog vidljivo je da sunitinib pripada inhibitorima više tirozin-kinaza (mTRKI) povezanih s nastankom tumora. Glavna prednost inhibicije više tirozin-kinaza je mala vjerojatnost za razvoj rezistencije na terapiju, daljnjeg rasta i razvoja tumora. (Tridente, 2017.). Sunitinib inhibira prethodno navedene RTK vežući se na vezno mjesto ATP-a. Tako se sprječava unutastanična autofosforilacija i fosforilacija ostalih signalnih molekula sa SH2 domenom i daljnja aktivacija signalnih puteva koji pogoduju razvoju tumora. (F. Gao i sur.,

2012). Vežanjem VEGF-a za VEGFR dolazi do dimerizacije receptora i autofosforilacije unutarstanične domene. Fosforilirana unutarstanična domena predstavlja vezno mjesto za SH2 domenu PLC γ proteina koji hidrolizira PIP2 na IP3 i DAG. U sljedećem koraku DAG aktivira PKC koja u svom fosforiliranom obliku aktivira brojne druge tirozin kinaze kao što su Raf, MEK i MAPK. Aktivacijom navedenih protein-kinaza dolazi do proliferacije stanica i aktivacije angiogeneze. S druge strane, PI3K se preko svoje SH2 domene veže za unutarstaničnu fosforiliranu domenu VEGFR. Tako se potiče daljnja fosforilacija PIP2 u PIP3 što dovodi do aktivacije Akt proteina. Fosforilirani Akt protein inhibira aktivaciju proapoptotičkog BAD proteina čime se sprječava aktivacija apoptoze. Prema tome vežanje VEGF na VEGFR posljedično dovodi do angiogeneze, proliferacije stanica i očuvanja staničnog preživljavanja koji su neophodni u rastu tumorskih stanica (Tridente, 2017.). Ovakav prikaz signalnog puta unutar stanice je pojednostavljen. Iako se u više literaturnih izvora navode različiti signalni putevi, u ovom radu prikazan je jedan od njih kojim se pobliže pokazuje mehanizam djelovanja sunitiniba (slika 5.).



Slika 5. Signalni put unutar stanice nakon vežanja VEGF na VEGFR (napravljeno u programu www.BioRender.com)

4.2.2. Nuspojave

Iz prošlog poglavlja u kojem je opisan mehanizam djelovanja vidljivo je da sunitinib pripada porodici mTRKI čija meta su receptorske tirozin-kinaze povezane s angiogenezom i rastom tumora. Glavni nedostatak ovog lijeka je taj što nije selektivan prema kinazama u zdravim stanicama pa se uz njega vežu i brojne nuspojave. Najčešće nuspojave koje se javljaju nakon primjene sunitiniba u terapijskoj dozi za liječenje MRCC-a opisani se u tri glavne studije. (Tridente i sur.,2017.).

U lipnju 2006. godine, Gore i sur. započeli su istraživanje proširenog pristupa u 52 države diljem svijeta, a u prosincu 2007. godine istraživanje je bilo završeno. Tijekom njihovog ispitivanja pacijenti su uzimali sunitinib tijekom 4 tjedna u početnoj dozi od 50 mg dnevno *per os* nakon čega je uslijedila stanka od 2 tjedna. U idućem ciklusu doza je smanjena na 37.5 mg dnevno, a u posljednjem ciklusu na 25 mg dnevno. U istraživanju je sudjelovao 4371 pacijent od kojih je najviše njih sudjelovalo u prvom ciklusu ispitivanja gdje je korištena najviša početna doza sunitiniba. Nuspojave nakon primjene sunitiniba podijeljene su u 5 stupnjeva. Prvi stupanj opisuje najslabije izražene nuspojave, a peti stupanj označava smrt pacijenta koja je nastala uslijed javljanje neke od nuspojava. Tijekom ispitivanja najviše pacijenata razvilo je dijareju (44 %), umor (37 %), mučninu (34 %), anoreksiju (26 %), krvarenja (25 %), sindrom šaka-stopalo (24 %) i hipertenziju (16 %). Ovi podaci odnose se na prva četiri stupnja težine nuspojava. Osim prethodno navedenih, jedne od ozbiljnijih nuspojava su hipotireodizam koji se pojavio u 6 % slučajeva i smanjenje LVEF koji se pojavljuje u 1 % slučajeva. Od hipotireodizma i smanjenja LVEF je preminulo najviše pacijenata. Ukupno je tijekom ovog istraživanja preminulo 63 pacijenta što čini 1 % svih slučajeva (Gore i sur.,2009).

Motzer i sur. 2009. i 2013. godine proučavali su nuspojave koje se mogu pojaviti nakon primjene sunitiniba. U prvom nasumičnom istraživanju uspoređivali su sigurnost sunitiniba i interferona- α na populaciji od 750 pacijenata podijeljenih u 2 skupine. Jedna skupina od 375 pacijenata uzimala je sunitinib *per os* u dozi od 50 mg dnevno tijekom 4 tjedna, nakon čega je uslijedila stanka u trajanju od 2 tjedna. Druga skupina uzimala je INF- α subkutano. Prateći prvu skupinu koja je uzimala sunitinib 61 % pacijenata razvilo je dijareju, 54 % umor, 52 % mučninu, 34 % anoreksiju, 31 % krvarenja, 29 % sindrom šaka-stopalo i 30 % hipertenziju. Osim navedenih nuspojava, tijekom ovog istraživanja uočeno je da je čak 78 % pacijenata tijekom liječenja sunitinibom razvilo leukopeniju, 77 % neutropeniju i 79 % anemiju. Osim toga 70 % pacijenata imalo je povišene razine kreatinina u serumu što povećava rizik od oštećenja

bubrega. U ovoj studiji 23 pacijenta (6 %) preminula su nakon javljanja neke od nuspojava sunitiniba. (Motzer i sur., 2009.)

Kasnije, 2013. godine Motzer i sur. uspoređivali su sigurnost pazopaniba, lijeka koji se koristi u liječenju RCC-a i STS-a, i sunitiniba u nasumičnom istraživanju na populaciji od 548 pacijenata koji su uzimali sunitinib u jednakim dozama i intervalima kao i u prošle dvije studije. Rezultati istraživanja pokazali su vrlo slične rezultate. Najzastupljenije nuspojave ponovno su bile dijareja (57 %), umor (63 %), mučnina (46 %), krvarenja (27 %), anoreksija (37 %), sindrom šaka-stopalo (50 %) i hipertenzija (41 %). Velik broj pacijenata u ovoj studiji razvio je trombocitopeniju (78 %) i neutropeniju (68 %) (Motzer i sur.,2013.).

4.2.3. Doziranje i način primjene

U liječenju MRCC-a i GIST-a, sunitinib se uzima u početnoj dozi od 50 mg dnevno tijekom četiri tjedna nakon čega slijedi dvotjedna stanka. Ovaj ciklus od šest tjedana ponavlja se sve dok je lijek siguran i podnošljiv. U terapiji pNET-a preporučena doza sunitiniba je 37,5 mg *per os*, a ona se može postepeno povećavati i smanjivati za 12,5 mg po ciklusu pri čemu dnevna doza ne smije biti veća od 70 mg ili manja od 25 mg. Ovaj lijek danas postoji u obliku tvrdih kapsula u dozama od 12,5 mg , 25 mg, 37,5 mg i 50 mg te pripada skupini posebno skupih lijekova (www.halmed.hr). U 2021. godini sunitinib se pronašao na 50. mjestu najprodavanijih lijekova prema financijskoj potrošnji. Primjenjuje se na populaciji starijoj od 18 godina, a zbog nedovoljno podataka nije preporučen trudnicama i dojiljama te se savjetuje da žene reproduktivne dobi koriste učinkovitu kontracepciju tijekom njegove primjene (www.halmed.hr).

4.2.4. Farmakokinetika

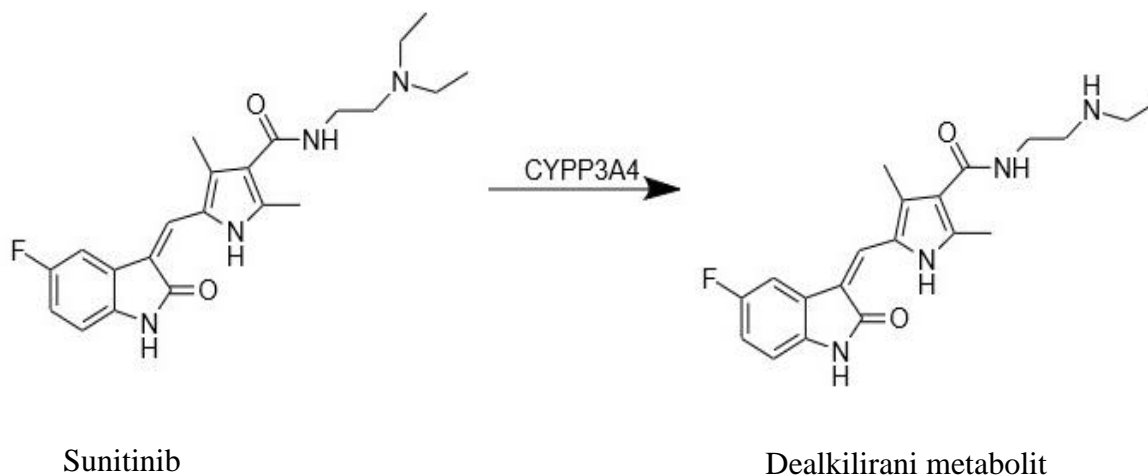
Kao što je ranije opisano, sunitinib je lijek koji se uzima *per os* neovisno o obroku, u bilo koje doba dana, s vrlo visokim postotkom apsorpcije. Tijekom nasumičnog, dvostrukog istraživanja na 16 zdravih dobrovoljaca ispitivao se utjecaj hrane na apsorpciju sunitiniba. Nakon 10 sati gladovanja, zdravi dobrovoljci su uzimali sunitinib u dozi od 50 mg *per os*, a nakon toga 50 mg sunitiniba poslije doručka. Nakon provedenog istraživanja pokazalo se da hrana nema utjecaj na apsorpciju sunitiniba jer nisu uočene bitne razlike u apsorpciji sunitiniba nakon doručka ili desetsatnog gladovanja (V.R. Adams i sur., 2007). Maksimalna koncentracija lijeka (C_{max}) u tijelu postiže se 6 do 12 sati nakon primjene (t_{max}). Prema istraživanju koje se provodilo na 135 zdravih dobrovoljaca te 266 pacijenata oboljelih od neke vrste tumora (MRCC, pNET ili GIST) farmakokinetika sunitiniba je bila podjednaka te nije ovisila o bolesti. Tijekom ispitivanja pratile su se vrijednosti $t_{1/2}$ sunitiniba i njegovog aktivnog metabolita. Vrijednosti $t_{1/2}$ sunitiniba nakon jednokratne doze kretale su se u rasponu od 40 do 60 sati, a $t_{1/2}$ njegovog aktivnog metabolita od 80 do 110 sati. Nakon što se doza sunitiniba svakodnevno uzimala *per os* u rasponu od 25 mg do 100 mg površina ispod krivulje (AUC) ovisnosti koncentracije sunitiniba u plazmi i vremena rasla je proporcionalno s dozom. (www.pfizermecalinformation)

Osim što se pratila bioraspoloživost, uočeno je i trostruko do četverostruko nakupljanje sunitiniba te sedmerostruko do deseterostruko nakupljanje njegovog aktivnog metabolita u tijelu. Između 10. i 14. dana postiže se stanje dinamičke ravnoteže, a do 14. dana nakon primjene postižu se koncentracije sunitiniba i njegovog aktivnog metabolita u vrijednostima od 62,9 do 101 ng/mL koje su prema nekliničkim istraživanjima potrebne za inhibiciju RTK-a u *in vitro* uvjetima i smanjenje rasta tumora u *in vivo* uvjetima. (www.pfizermecalinformation)

Prividni volumen raspodjele (V_D) sunitiniba iznosi 2230 L. V_D predstavlja konstantu proporcionalnosti između količine lijeka u tijelu i koncentracije lijeka u plazmi te predstavlja mjeru za opseg raspodjele lijeka u tijelu neovisno o tome gdje se lijek raspodijelio. Vrijednost za sunitinib je velika te ona ukazuje da se lijek jako dobro raspodjeljuje u tkiva. Praćenjem distribucije lijeka, osim V_D - a vrlo važan parametar je i vezanje lijeka za proteine plazme. Sunitinib i njegov aktivni metabolit su u *in vitro* uvjetima pokazali veliki afinitet prema proteinima plazme u vrijednostima od 95 % za sunitinib i 90 % za njegov aktivni metabolit. (www.pfizermecalinformation).

Sunitinib se primarno metabolizira preko CYP3A4 enzima pri čemu nastaje njegov aktivni metabolit N-desetilsunitinib prikazan na slici 6. što ujedno predstavlja i glavni metabolički put

sunitiniba. Osim toga, sunitinib se metabolizira i reakcijama kao što su aromatska i alifatska hidrosilacija, N-oksidacija i oksidativna defluorizacija. Nekim metaboličkim putevima mogu nastati i toksični, kemijski vrlo reaktivni spojevi koji ulaze u brojne neželjene interakcije i uzrokuju hepatotoksičnost (Amaya i sur.,2020.). Prema jednom nasumičnom istraživanju 2007. godine koje je pratilo interakciju sunitiniba s inhibitorom i induktorom CYP3A4 enzima uočene su velike promjene u koncentraciji sunitiniba. U istraživanju se kao inhibitor CYP3A4 enzima koristio ketokonazol koji se uzimao istovremeno sa sunitinibom. Rezultati su pokazali porast AUC vrijednosti za približno 50 %. Prema njihovom istraživanju poželjno je tijekom uzimanja sunitiniba izbjegavati inhibitore CYP3A4 enzima ili ukoliko ih je neophodno uzimati, potrebno je smanjenje doze sunitiniba na 66 % od preporučene doze. Tijekom uzimanja rifampicina, snažnog induktora CYP3A4 enzima, uočeno je smanjenje plazmatske koncentracije sunitiniba za 50 %. Kako bi se kompenziralo navedeno smanjenje, potrebno je dozu sunitiniba povećati na 175 % preporučene dnevne doze čime dolazi do povećanja vjerojatnosti od pojave neke od nuspojava. Iz tog razloga preporučeno je tijekom liječenja sunitinibom izbjegavati istovremenu primjenu inhibitora ili induktora CYP3A4 enzima sa sunitinibom. (V.R. Adams i sur., 2020.)



Slika 6. Strukturni prikaz glavne metaboličke reakcije nastanka aktivnog metabolita sunitiniba

Glavni put eliminacije sunitiniba je fecesom. U jednom istraživanju kojim se pratila eliminacija, molekule sunitiniba bile su radioaktivno obilježene. Istraživanje je trajalo 21 dan, a uočeno je da se 61 % sunitiniba i njegovih pripadajućih metabolita eliminira putem fecesa. Ostatak od 16 % eliminira se nepromijenjeno putem urina. U najvećoj koncentraciji i u urinu i u fecesu pronađen je nepromijenjen sunitinib, a zatim njegov primarni dealkilirani metabolit. (V.R. Adams i sur., 2020.)

4.3. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE

Bakterijske bolesti predstavljaju veliki svjetski problem. Sve više ljudi svakodnevno obolijeva od različitih bakterijskih bolesti koje nerijetko završavaju hospitalizacijom. Učestala upotreba antibiotika dovela je do pojave rezistencija bakterija na brojne antibiotike koji se nalaze u širokoj primjeni. Poražavajuće je da u današnje vrijeme oko 700 000 ljudi godišnje izgubi život zbog infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama. Pretpostavka je da će do 2050. godine taj broj porasti na 10 milijuna ljudi godišnje ukoliko se ne sintetiziraju novi antibiotici i smanji prekomjerna potrošnja trenutnih. (Z. Xu i sur.,2018.)

Od ranije je poznato kako se iz strukture izatina mogu sintetizirati derivati s različitim farmakološkim aktivnostima. Strukturalne modifikacije uvode se na N1, C3 i C5 atome izatinskog prstena jer su to mjesta koja su se pokazala najreaktivnijima. U pojedinim istraživanjima antibakterijskog djelovanja sintetiziraju se hibridi izatinskog prstena i farmakofora pojedinih, već poznatih, antibiotika kao što su fluorokinoloni. Hibridizacija takva dva farmakofora u jednu molekulu dovodi do stvaranja novih antibiotika s većom učinkovitosti, širim spektrom djelovanja na rezistentne bakterije, nižom toksičnošću i drugačijim mehanizmom djelovanja. Fluorokinoloni pripadaju u skupinu antimikrobnih lijekova čiji se mehanizam djelovanja temelji na inhibiciji DNA giraze i topoizomeraze, zaustavljajući na taj način daljnje umnažanje bakterija. Osim što se koriste u liječenju bakterijskih infekcija, pokazali su i antivirusno, antimalarijsko i antitumorsko djelovanje (Z. Xu i sur.,2018.). Možemo ih podijeliti u dvije generacije, prvu, kojoj pripadaju ciprofloksacin, norfloksacin i ofloksacin i drugu, kojoj pripadaju levofloksacin, moksifloksacin i gemifloksacin. Fluorokinoloni se upotrebljavaju u liječenju različitih respiratornih infekcija gornjeg i donjeg dišnog sustava uzrokovanih *Haemophilus influenzae*, ali i drugih bolesti uzrokovanih bakterijama *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria*, *Chlamydia*, *Legionella* i *Enterobacteriaceae*. U liječenju infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* poseban značaj ima ciprofloksacin. Zbog sve učestalije upotrebe prve generacije, dolazi do rezistencije bakterija prema navedenim lijekovima pa se iz tog razloga sve češće koristi novija generacija, pogotovo u liječenju infekcija uzrokovanih *Streptococcus pneumoniae* koji slabije reagiraju na peniciline. (www.msd-prirucnici.placebo.hr)

Tijekom 1998. godine Pandeya i suradnici objavili su istraživanje provedeno s 4 hibrida ciprofloksacina i lomefloksacina s izatinskom strukturom u *in vitro* uvjetima. Istraživanje je provedeno na različitim bakterijskim sojevima kao što su *Haemophilus influenzae*, *K.*

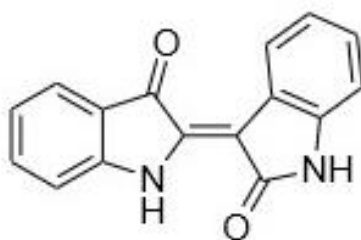
pneumonia, *P.aeruginosa*, *Shigella flexnari* i *Citrobactor ferundi*. Rezultati su pokazali znatno jaču aktivnost hibridnih oblika od samog ciprofloksacina i lomefloksacina, odnosno bila je potrebna puno niža koncentracija hibridnih oblika od pojedinačnih antibiotika da bi se inhibirao rast bakterija. U istom istraživanju hibridi izatina i ciprofloksacina pokazali su potentniji učinak od hibrida izatina i lomefloksacina.

Daljne istraživanje bilo je usmjereno prema hibridima izatina i norfloksacina čija se potentnost ispitivala na 28 različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Derivati koji su na izatinskom prstenu na položaju C3 imali supstituente kao što su tiosemikarbazon, trimetoprim, sulfadiazin i sulfadoksin pokazali su se reaktivnijima od hibrida koji su na toj poziciji imali karbonilnu skupinu. Uvođenje halogenog atoma u strukturu izatina pojačana je aktivnost, a ovim modifikacijama dobivena su 3 hibrida, od kojih su u *in vivo* uvjetima na modelu miša, 2 hibrida pokazala značajno jaču aktivnost i manju toksičnost od samog norfloksacina. Pretpostavlja se da je uvođenjem trimetoprima u strukturu dovelo do inhibicije dihidrofolat reduktaze, enzima potrebnog za pretvorbu dihidrofolne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu. Dok je uvođenje fluorokinolona dovelo do inhibicije bakterijske DNA giraze. (Xu i sur. 2018.)

4.4 OSTALA FARMAKOLOŠKA DJELOVANJA

4.4.1. Indirubin

Indirubin je izatinski derivat koji se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini. Glavni je sastojak azijskog dodatka prehrani „Danggui Longhui Wan“ u kojem čini sastavnicu s aktivnim djelovanjem. Pretpostavlja se da indirubin ima antiproliferativno, protuupalno i hepatoprotektivno djelovanje te da djeluje protulekemijski (J. Lai i sur., 2016). Kao dio složenijih pripravaka s više sastavnica, koristi se za pomoć u liječenju kroničnih upalnih procesa, tumora i raznih gastrointestinalnih bolesti. Provođenje kliničkih ispitivanja indirubina na ljudima je ograničeno zbog nedovoljno podataka o sigurnosti i učinkovitosti do sada sintetiziranih oblika indirubina (www.mskcc.org). Indirubin se sastoji od dva izatinska prstena međusobno povezana preko C2 i C3 atoma (slika 7.). Tijekom bakterijske infekcije mokraćnog sustava, bakterije proizvode sulfataze i fosfataze pomoću koji stvaraju pigmente indirubin i indigo. Njihova prisutnost vidljiva je promjenom boje plastične vrećice i cijevi urinarnog katetera koji postaju ljubičasti. Takvo stanje naziva se sindrom ljubičaste urinarne vrećice te je vrlo rijedak poremećaj koji se javlja kod ljudi. (B. P. Pillai i sur., 2009.)



Slika 7. Strukturni prikaz molekule indirubina

Lai i sur. (2016) ispitivali su mehanizam protuupalnog djelovanja indirubina u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na modelima glodavaca s LPS izazvanim mastitisom. Naime, mastitis predstavlja bolest uzrokovanu Gram-pozitivnim *S. aureus* ili Gram-negativnom *E. Coli* koja se pojavljuje tijekom poroda ili rane laktacije. Utvrđeno je da LPS Gram-negativnih bakterija izaziva mastitis kod goveđih i mišjih modela i potiče izlučivanje proupalnih citokina, a važnu ulogu u obrani od navedenih patogena ima urođeni imunosni sustav. Utvrđeno je da indirubin smanjuje lokalnu nekrozu tkiva i aktivaciju neutrofila tako što smanjuje proizvodnju LPS-om potaknutih IL-1 i IL-6 te faktora nekroze tumora TNF- α . Nadalje, indirubin sprječava fosforilaciju NF- κ B i MAPK što dovodi do utišavanja upalnog odgovora. Ovim istraživanjem utvrđeno je da se indirubin može koristiti u prevenciji mastitisa uzrokovanog LPS-om pokazujući protuupalno djelovanje. (J. Lai i sur., 2016)

U drugom istraživanju na maloj populaciji od 20 pacijenata ispitivao se protuupalni učinak indirubina tijekom terapije zračenjem. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije skupine. Prva je skupina bila izložena kemoterapiji, a druga je uz kemoterapiju uzimala biljne pripravke s indirubinom. Kliničko istraživanje pokazalo je da primjena indirubina smanjuje poteškoće u gutanju, smanjuje vjerojatnost razvoja anoreksije i oštećenja sluznice usta i gastriontestinalnog trakta. Ovi simptomi često se javljaju tijekom primjene kemoterapije. Zbog malog broja ispitanika, ovo djelovanje indirubina zahtjeva dodatna klinička ispitivanja i utvrđivanje učinkovitosti i sigurnosti primjene. (W. C. You i sur., 2009.)

Kronična mijeloična leukemija je bolest kod koje dolazi do stvaranja povećanog broja nezrelih leukocita koji prerano napuštaju koštanu srž i odlaze u krv. Kod većine pacijenata postoji genetski preduvjet za razvoj CML-a, a on uključuje prisutnost mutacije u tzv. Philadelphia kromosomu. Ukoliko se ne liječi, prosječna duljina života je 3 do 4 godine nakon otkrivanja bolesti. U jednom opisu slučaja 31-godišnjeg pacijenta koji je nakon dijagnosticiranja CML-a i prisutnosti Philadelphia kromosoma uzimao pripravak s indirubinom u dozi od 100 mg/d i njegovim manje toksičnim metabolitom meizoidnigom u dozi od 50 mg/d, utvrđeno je poboljšanje bolesti. Nakon 3 mjeseca slezena više nije bila povećana, a analizom koštane srži je utvrđena remisija bolesti nakon koje je pacijent uzimao indirubin u dozi održavanja od 50 mg/d. U daljnjim istraživanjima utvrđeno je da indirubin djeluje kao snažni inhibitor CKD-a

potičući apoptozu tumorskih stanica. Tijekom cijelog liječenja potvrđena je prisutnost Philadelphia kromosoma s 100 %-tnom vjerojatnošću zbog čega je u terapiju uveden imatinib. Iako je ovo pojedinačan slučaj, utvrđeno je da se remisija bolesti postigla upotrebom indirubina, ali bez djelovanja na Philadelphia kromosom zbog čega je u terapiju bilo potrebno uvesti imatinib kako bi se stanje pacijenta poboljšalo. (F.Chen i sur., 2010)

Indigo naturalis je tamnoplavi prah dobiven sušenjem listova biljaka *Indigofera tinctoria* (L.), *Isatis indigotica* (Fort.), *Polygonum tinctorium* (Ait.) i *Baphicacanthus cusia* (Nees). U kineskoj medicini koristi se od 1. stoljeća p.Kr. u liječenju čireva, afti, zaušnjaka te u posljednjih 50 godina u sistemske terapiji psorijaze. Psorijaza je bolest kože uzrokovana povećanom proliferacijom keratinocita, nepravilnom diferencijacijom epidermalnih stanica i upalnim odgovorom. Y.K. Lin i sur., (2009.) proučavali su učinak indirubina u terapiji psorijaze. Utvrđeno je da indirubin normalizira proliferaciju i diferencijaciju keratinocita inhibirajući ekspresiju PCNA gena, čija je aktivnost povećana kod pacijenata s psorijazom, i potičući sintezu involucrina, proteina ljudske kože. Postoje dokazi koji upućuju da primjenom *per os* pripravaka Indigo naturalis postoji opasnost od razvoja plućne arterijske hipertenzije, ishemijskih lezija sluznice debelog crijeva i poremećaja u radu jetre, stoga se ne preporuča njegova primjena bez liječničkog nadzora ili u svrhu kliničkih ispitivanja pod kontrolom stručnjaka (www.mskcc.org).

4.5. KOMUNIKACIJA IZMEĐU CRIJEVNE MIKROBIOTE I MOZGA

4.5.1. Povišene koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama kao odgovor na stres

Pretpostavlja se da crijevna mikrobiota čovjeka ima značajnu ulogu u reguliranju brojnih funkcija u mozgu, a svakodnevno se javlja sve više uvjerljivih dokaza koji potvrđuju tu pretpostavku. Do sada je utvrđeno da je crijevna mikrobiota čovjeka uključena u brojne neurološke procese, ponašanje, starenje i razvoju neurodegenerativnih bolesti. Iako bakterije u crijevima proizvode brojne metabolite, smatra se da je jedan od najvažnijih prekursora izatinskih derivata triptofan. Trp je esencijalna aminokiselina koja se uz pomoć bakterijskih i ljudskih stanica može metabolizirati u niz različitih molekula koje sudjeluju u raznim procesima kao što je sinteza proteina. Stanice domaćina sposobne su metabolizirati hranom dobiveni Trp na triptamin, 5-hidroksitriptamin, 5-hidroksitriptofan i kinurein. U brojnim istraživanjima utvrđeno je kako promijene u koncentraciji Trp-a utječu na raspoloženje i ponašanje kod ljudi. Tako je od prije poznato kako su promijene u signalizaciji 5-HT, derivata Trp-a, povezane s anoreksijom, bulimijom, pretilosti, kognitivnim deficitom i poremećajima raspoloženja. Izatin je s druge strane signalna molekula dobivena iz Trp-a kao produkt i bakterijskih stanica u crijevima i stanica domaćina. Povećanom sintezom izatina javljaju se metaboličke promijene koje izazivaju anksioznost kod glodavaca. Tijekom jednog ispitivanja u kojem su štakori F344 s nedostatkom crijevnih bakterija bili izloženi akutnom stresu, pokazano je da nedostatak crijevne mikrobiote utječe na ponašanje i neuroendokrini razvoj štakora. Različiti tipovi stresa pokazali su različite koncentracije izatina u mozgu, urinu i serumu. Kod štakora kojima je bilo onemogućeno kretanje i koji su bili izloženi visokoj glasnoći, razine izatina u mozgu su se povećale 2-4 puta više nego li u kontrolnoj skupini koja nije bila izložena visokoj glasnoći. Nadalje, štakori koji su bili izloženi dva sata na temperaturi od 4°C pokazali su 2-3 puta veću koncentraciju izatina u dnevnom urinu, a štakori kojima je hrana bila nedostupna 3 dana sa slobodnim pristupom vodi, pokazali su 5 puta veću koncentraciju izatina u mokraći. Kod ljudi je pronađeno da u nekolicini neuroloških procesa dolazi do povišenja koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama. Tako su utvrđene povišene koncentracije izatina u mokraći kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti i povišene koncentracije u cerebrospinalnoj tekućini kod pacijenata oboljelih od bulimije. Iako još uvijek nije poznat točan i potpun biosintetski put izatina u organizmu koji dovodi do povišenih koncentracija u tjelesnim

tekućinama, prema dosadašnjim istraživanjima otkriveno je da se izatin sintetizira iz Trp-a. (A. Medvedev i O. Buneeva,2022.)

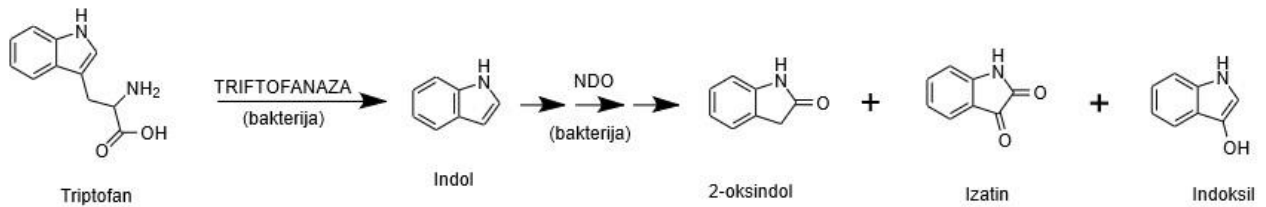
4.5.2. Učinak izatina na neurotransmitore

U *in vitro* uvjetima izatin je ispitan kao potencijalni inhibitor brojnih receptora u mozgu, ali u *in vivo* uvjetima utvrđeno je da izatin pokazuje najveću osjetljivost u minimalnoj koncentraciji od 1 mmol/dm³ do 10 mmol/dm³ na inhibiciju MAO-B i natriuretskih peptida. S druge strane, pri istim koncentracijama izatin nije pokazao inhibitorno djelovanje na NMDA, AMPA, M2, dopaminske i glicinske receptore. Utvrđeno je da je inhibicija pojedinačnih receptora slaba, ali da djelovanje izatina kao inhibitora na više receptora istovremeno ima sinergistični učinak što pojačava inhibitorno djelovanje. Tako je pronađeno da izatin ima antikonvulzivno djelovanje neizravno inhibirajući 5-HT₃ receptore. Odnosno, izravnim djelovanjem na neke do sada nepoznate mete, može doći do modulacije 5-HT₃ receptora zbog kojih se javlja antikonvulzivno djelovanje, a da pri tome ne dolazi do interakcije izatina s ciljnim 5-HT₃ receptorom. (A. Medvedev i O. Buneeva,2022.) Područje djelovanja izatina na neurotransmitore u mozgu je novo i nedovoljno istraženo područje te je potrebno provesti detaljnija ispitivanja kako bi se utvrdio točniji mehanizam inhibitornog djelovanja izatina na 5-HT₃ receptore.

4.5.3. Učinak bakterija na sintezu izatina

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da je triptofan prekursor u sintezi izatina. Iako do sada nije otkriven točan i potpun sintetski put izatina u kojem sudjeluju bakterijske stanice i stanice domaćina, postoji nekoliko pretpostavljenih načina. U ovom radu bit će prikazan jedan od njih (slika 7.). Smatra se da bakterijskom triptofanazom dolazi do kidanja postraničnog lanca triptofana čime nastaje indol. Nastali produkt je daljnji supstrat za bakterijsku naftalen dioksidogenu (NDO). ApSORpcijom nastalog indolskog derivata dolazi do oksidacije pomoću CYP450 enzima pri čemu nastaje izatin, ali i drugi srodni indolski derivati. Učinak izatina dobivenog sintezom iz indola uz pomoć bakterijskih enzima glodavaca F344 ispitan je intraperitonealnim injektiranjem indola u koncentraciji od 500 mg/kg. Rezultati su pokazali povišene razine izatina u mozgu što je utjecalo na promijene u ponašanju glodavaca koji su se pokazali više sedirani od kontrolne skupine. Ovo otkriće potvrdilo je pretpostavku da do

povišenih razina izatina dolazi zbog sudjelovanja bakterijskih enzima koji sintetiziraju izatin iz indola čija povišena koncentracija utječe na rad mozga. (A. Medvedev i O. Buneeva,2022.)



Slika 8. Sinteza izatina pomoću bakterijskih enzima u crijevima čovjeka

Od prije je poznato da pacijenti oboljeli od nekih neurodegenerativnih bolesti imaju povišene razine izatina u mozgu. Utvrđeno je da crijevna mikrobiota čovjeka sadrži 373 TnaA-sličnih gena koji su zaduženi za sintezu triptofanaze. Iako u više od 60 % pronađenih gena nije definirano u kojim se bakterijskim vrstama oni nalaze, utvrđeno je da rod bakterija Enterococcaceae, koje dominiraju u crijevima pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti, imaju TnaA-slične gene. Preostaje dalje utvrđivati povezanost prisutnosti TnaA-sličnih gena u bakterijama roda Enterococcaceae i njihove brojnosti kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti. (A. Medvedev i O. Buneeva,2022.)

5. ZAKLJUČCI

- Strukturni motiv izatina koristi se u sintezi brojnih izatinskih derivata koji su pokazali protutumorsko, antibakterijsko, antioksidativno, antikonvulzivno, protuupalno djelovanje i mnoga druga. Kompleksi izatinskih derivata s metalnim ionima imaju snažno citotoksično djelovanje, a izatinski derivati s hidrazinom na položaju C3 pokazali su snažno proapoptotičko djelovanje u *in vitro* uvjetima.
- Sunitinib, derivat izatina, je lijek odobren od strane EMA-e za liječenje GIST-a, MRCC-a i pNET-a. Trenutno se nalazi i u kliničkim ispitivanjima kao dvojna terapija s imunoterapeutcima (docetaksel, kapecitabin, paklitaksel) kako bi terapija tumora postala učinkovitija.
- Sunitinib djeluje kao inhibitor više tirozin kinaza. Inhibira VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, RET i CSF-1R vežući se vezno mjesto ATP-a te tako sprječava unutarstaničnu signalizaciju koja omogućava stanicama proliferaciju, preživljavanje i nepravilan rast krvnih žila svojstven tumorskim stanicama.
- Sunitinib je lijek koji se uzima tijekom 4 tjedna u dozi od 50 mg dnevno nakon kojeg slijedi dvotjedna stanka. Ciklusi se ponavljaju sve dok pacijent odgovara na navedu terapiju.
- Najčešće nuspojave koje se javljaju tijekom uzimanja sunitiniba su dijareja, umor, mučnina i anoreksija. Od ozbiljnijih nuspojava kod 6 % pacijenata može se javiti hipotireodizam, a kod 1 % pacijenata smanjenje LVEF. Smrt pacijenata javlja se u 6 % slučajeva prema Motzerovoj studiji.
- Sunitinib se može uzimati s hranom ili bez nje jer hrana ne utječe na apsorpciju lijeka. Maksimalnu koncentraciju postiže 6 do 12 sati nakon primjene. Metabolizira se preko CYP3A4 enzima pa se ne preporuča uzimanje lijekova koji djeluju kao inhibitori ili induktori navedenog enzima. U najvećem postotku eliminira se putem fecesa.
- Proces razvoja tumora uključuje mutaciju i selekciju stanica sa sve izraženijim mogućnostima proliferacije, preživljavanja, širenja i metastaziranja. Rast i širenje tumora omogućava angiogeneza kojom dolazi do nepravilnog rasta krvnih žila. Ovaj je proces neophodan za opskrbu tumorskih stanica hranjivim tvarima i kisikom.
- Proces angiogeneze je složen proces koji možemo podijeliti u četiri koraka, a najznačajniju ulogu u liječenju tumora imaju VEGFR i PDGFR.

- MRCC je tumor kojeg uzrokuje mutacija u VHL genu zbog koje ne dolazi do stvaranja VCB-CUL 2 kompleksa koji je zadužen za razgradnju HIF-2 α proteina. Kao posljedica navedene mutacije, dolazi do nakupljanja HIF proteina unutar bubrežnih stanica što dovodi do nekontrolirane diobe stanica i angiogeneze.
- GIST je tumor koji se kod pacijenata najčešće javlja u želudcu i tankom crijevu. Pretpostavlja se da se razvija iz Cajalovih intersticijskih stanica, a uzrok je mutacija u KIT i PDGFRA genima. Kao posljedica mutacije u navedenim genima, dolazi do sinteze membranskih receptora kojima nije potrebno vezanje liganda kako bi se aktivirali. Takvi receptori ostaju konstitutivno aktivirani dajući signal stanici za proliferaciju i diobu.
- Neuroendokrine tumore gušterače možemo podijeliti na funkcionalne i nefunkcionalne. Funkcionalni pNET-ovi dijele se na somatostatinoze, gastrinoze, inzulinome, glukagonome i VIP-ome.
- Izatinski derivati fluorokinolona pokazali su antibakterijsko djelovanje prema bakterijama vrste *H. influenzae*, *K. pneumonia*, *P.aeruginosa* i drugima u radu navedenim bakterijama.
- Indirubin je izatinski derivat s protuupalnim, antiproliferativnim, hepatoprotektivnim i protulekemijskim djelovanjem. Iako njegova sigurnost i učinkovitost nije dokazana, kliničkim ispitivanjem utvrđeno je da bi se zbog navedenih djelovanja mogao koristiti u terapiji psorijaze, prevenciji mastitisa uzrokovanog LPS-om *E. Coli* i *S. aureus* i kao dodatna terapija CML-a. Zbog nedovoljno dokaza, trenutno nije prisutan na tržištu te se smije koristiti samo u svrhu kliničkih ispitivanja pod nadzorom liječnika.
- Smatra se da pomoću bakterijskih enzima u crijevima dolazi do sinteze izatina iz triptofana što uzrokuje povećane koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama i mozgu. Navedena promjena u koncentraciji izatina javlja se kao odgovor na izloženost akutnom stresu, prisutnost povećanog broja bakterija roda Enterococcaceae kod Parkinsonove bolesti te se javlja kod pacijenata oboljelih od bulimije.
- Izatin ima antikonvulzivno djelovanje neizravno inhibirajući signalni put preko 5-HT₃ receptora.

Iz podataka navedenih u sklopu izrade ovog diplomskog rada vidljiva je važnost izatina i navedenih izatinskih derivata u različitim područjima farmacije. Iako je ova molekula otkrivena prije više od 150 godina, i dalje raste interes za sintezu derivata i otkriće novih lijekova u liječenju tumora, bakterijskih i virusnih infekcija, protuupalnih i antikonvulzivnih lijekova,

lijekova u liječenju Parkinsonove bolesti i brojnih drugih. Napretkom farmacije i srodnih znanosti u budućnosti nas čekaju nova saznanja o izatinskim derivatima, a neka od njih možda budu inspiracija budućim generacijama farmaceuta u otkriću novih lijekova s izatinskim prstenom.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-HT3 - 5-hidroksitriptamin tip 3

Akt – ili protein kinaza B

AMPA - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izooksazolpropionska kiselina (eng. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)

ATP – adenozin trifosfat

AUC – površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije o vremenu (eng. Area Under the ROC Curve)

BAD – eng. Bcl-2-associated death promoter

BAX – eng. Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 – eng. B-cell leukemia/lymphoma 2 protein.

CKD – o ciklinu ovisna kinaza (eng. Cyclin-dependent kinase)

C_{max} – maksimalna koncentracija

CML – kronična mijelocitna leukemija (eng. Chronic myelogenous leukemia)

COX-2 – ciklooksigenaza tip 2

CSF-1R – receptor faktora rasta kolonija 1 (eng. Colony stimulating factor 1 receptor)

DAG - diacil-glicerol

EMA – Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode (eng. European Medicine Agency)

FLT3 - Fms-slične tirozin kinaze 3 (eng. fms-like tyrosine kinase 3)

GIST – gastrointestinalni stromalni tumor

HIF-2 α – hipoksijom inducirani faktor 2 alfa (eng. Hypoxia-Inducible Factor-2 alpha)

ICC – Cajalove intersticijske stanice (eng. Interstitial cells of Cajal)

Ig-slični receptori – imunoglobulinu slični receptor

IL-1/6 – interleukin 1 ili 6

IP3 - inozitol-1,4,5-trifosfat

KIT- eng. Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase

LPS - lipopolisaharid

M2 – muskarinski-acetilkolinski receptor tip 2

MAO-B – monoaminoksidaza tip B

MAPK – mitogenom-aktivirana proteinska kinaza (eng. mitogen-activated protein kinases)

MEK – MAP kinaza/ERK kinaza

MRCC - uznapredovali karcinom bubrežnih stanica (eng.metastatic renal cell carcinoma)

mTRKI – inhibitori više tirozin kinaza (eng. Multi-target tyrosine kinase inhibitor)

NDO - bakterijska naftalen dioksigenaza (eng. Naphthalene 1,2-dioxygenase)

NF- κ B – nuklearni faktor kapa B (eng. Nuclear factor kappa B)

NMDA – eng. N-methyl-D-aspartate receptor

PCNA – eng. Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF – faktor rasta trombocita (eng. Platelet-derived growth factor)

PDGFR – receptor za faktor rasta trombocita (eng. platelet-derived growth factor receptor)

PI3K - fosfatidil-inozitol-3-kinaza

PIP2 - fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat

PIP3 - fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfat

PKC - protein kinaza C

PLC γ – fosfolipaza C γ

pNET – neuroendokrini tumori gušterače (eng. Pancreatic neuroendocrine tumours)

Raf – eng. rapidly accelerated fibrosarcoma

RET - receptor glijalnog neurotrofnog faktora (eng. Rearranged during Transfection)

RTK - receptorska tirozin kinaza

SH2 – eng. Src homology 2

Shp1 – eng. specificity protein 1

Shp2 - specificity protein 2

STS – sarkomi mekog tkiva (eng. Soft tissue sarcomas)

TnaA – gen za triptofanazu A (eng. tryptophanase gene A)

TNF- α - faktor nekroze tumora (eng. Tumor necrosis factor)

Trp - triptofan

VCB-CUL2 kompleks – VHL-elongin C-elongin B- kulin 2 kompleks (eng. VHL-eloC-eloB-Cullin 2 complex)

V_D – prividni volumen distribucije

VEGF-A,B,C – vaskularni endotelni faktor rasta tipa A,B ili C

VEGFR – receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta

VHL gen -Von Hippel- Lindauov gen (eng. Von Hippel-Lindau gen)

VIP - vazoaktivni intestinalni peptid (eng. vasoactive intestinal peptide)

7. LITERATURA

Adams VR, Leggas M.. Sunitinib Malate for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma and Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin.Ther.*, 2007, 29, 1338–1353.

Amaya, GM, Durandis R, Bourgeois, DS, Perkins JA, Abouda AA, Wines KJ, ... Jackson KD. Cytochromes P450 1A2 and 3A4 Catalyze the Metabolic Activation of Sunitinib. *Chem.Res.Toxic.*, 2018, 31, 570–584.

Cancer, 2023., <https://www.who.int>, pristupljeno 2.5.2023

Carrato Mena A, Grande Pulido E, Guillén-Ponce C. Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib. *ACDs*, 2010, 21(Supplement 1), S3–S11

Chen F, Li L, Ma D, Yan S, Sun J, Zhang M, ... Hou M. Imatinib achieved complete cytogenetic response in a CML patient received 32-year indirubin and its derivative treatment. *Leuk. Res.*, 2010, 34(2), 75–77

Ferraz de Paiva RE, Vieira EG, Rodrigues da Silva D, Wegermann CA, Costa Ferreira AM. Anticancer Compounds Based on Isatin-Derivatives: Strategies to Ameliorate Selectivity and Efficiency Advances in the treatment of pancreaticneuroendocrine tumours, *Front Mol Biosci.*, 2021, 7, 627272.

Fluorokinoloni, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr> , pristupljeno 2.5.2023.

Gao F , Visvardis E-EP, Sita-Lumsden A, Waxman, Advances in the treatment of pancreatic neuroendocrine tumours, *J, QJM*, 2012, 105, 819-822

Gore ME, Szczylik Porta C, Bracarda S, Bjarnason GA, Oudard S, ... Bukowski R. Safety and efficacy of sunitinib for metastatic renal-cell carcinoma: an expanded-access trial. *The Lancet Oncol.*, 2009, 757–763.

Indirubin-Purported Benefits, Side Effects & More, 2022, <https://www.mskcc.org>, pristupljeno 21.5.2023.

Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2021. godini (tablica 5. 50 najkorištenijih lijekova po DDD/1000 stanovnika/dan u 2021. godini), 2007.-2023., <https://halmed.hr/> , pristupljeno 23.4.

Lai J, Liu Y, Liu C, Qi M, Liu R, Zhu X, ... Hu C. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*, 2016, 40(1), 1–12.

Lin YK, Leu YL, Yang SH, Chen HW, Wang CT, Pang JHS. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. *J. Dermatol. Sci.*, 2009, 54(3), 168–174

Medvedev A, Buneeva O. Tryptophan Metabolites as Mediators of Microbiota-Gut-Brain Communication: Focus on Isatin. *Front. Behav. Neurosci.*, 2022, 16-922274

Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, ... Choueiri TK. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *NEJM*, 2013, 369, 722–731.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, ... Figlin RA Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2009, 3584–3590.

Pancreatic Neuroendocrine Tumors (Islet Cell Tumors) Treatment – Patient Version, 2023, <https://www.cancer.gov>, pristupljeno 4.5.2023.

Pandeya SN, Sundari CG, Mariammal N, Saravanan P, Balaji SS, Kumar RS., Sriram D. Synthesis and anti-bacterial activity of Mannich bases of ciprofloxacin and lomefloxacin with isatin and its derivative. *Indian J. Pharm. Sci.*, 1998, 60, 280-282

PDGFRA gene, 2021., <https://medlineplus.gov>, pristupljeno 16.4. 2023.

Pillai BP, Chong VH, Yong AM. Purple urine bag syndrome. *Singap Med J*, 2009, 50(5), 193-4

Rak bubreg, 2020-2023., <https://www.onkologija.net>, pristupljeno 12.5.2023.

Sažetak opisa svojstava lijeka, Sunitinib, 2023., <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.5.2023.

Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, 2011, 1097–1105.

Sutent (Sunitinib) Action and Clinical Pharmacology, 2023. <https://www.pfizermedicalinformation.ca>, pristupljeno 30.4.2023.

Svjetski dan raka, 2023., <https://www.hzjz.hr>, pristupljeno 2.4. 2023.

Tridente G. Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors. Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 199–219.

VHL-gene, von Hippel-Lindau tumor supressor, 2021., <https://medlineplus.gov>, pristupljeno 12.5.2023.

Xu Z, Zhao S-J, Lv Z-S, Gao F, Wang Y, Zhang F, ... Deng J-L. Fluoroquinolone-isatin hybrids and their biological activities. *Eur. J Med. Chem.*, 2018, 162, 396-406.

You WC, Hsieh CC, Huang JT. Effect of Extracts from Indigowood Root (*Isatis indigotica* Fort.) on Immune Responses in Radiation-Induced Mucositis. *J Altern Complement Med*, 2009, 15(7), 771–778.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Izatin je prirodni alkaloid narančaste boje izoliran iz biljaka roda *Isatis* prisutnih po cijelom svijetu. O.L. Erdman i A. Laurent prvi su puta 1841. godine sintetizirali izatin oksidacijom indiga smjesom dušične i kromne kiseline, a do danas je otkriven velik broj izatinskih derivata od kojih su neki pokazali značajna antitumorska, antibakterijska, antikonvulzivna, protuupalna i brojna druga djelovanja. Iako izatinski derivati imaju širok spektar djelovanja, do sada se antitumorsko djelovanje pokazalo najznačajnijim. Sunitinib je derivat izatina koji je 2006. godine registrirala EMA u liječenju GIST-a, a kasnije i za liječenje neoperabilnih ili metastatski dobro diferenciranih tumora gušterače (pNET) i metastatskog karcinoma bubrežnih stanica (MRCC). Osim što je registriran kao lijek u navedenim indikacijama, sunitinib prolazi kroz klinička ispitivanja kao dvojna terapija s docetakselom, kapecitabinom i paklitakselom. Inhibitor je više tirozin kinaza te tako sprječava rast tumora, proliferaciju stanica i angiogenezu, a značajno inhibitorno djelovanje pokazao je prema VEGFR i PDGFR. Indirubin je poznat izatinski derivat s protuupalnim, antiproliferativnim, hepatoprotektivnim i protuleukemijskim djelovanjem. Iako njegova sigurnost i učinkovitost nije dokazana, pokazao je značajnu aktivnost u terapiji psorijaze, prevenciji mastitisa uzrokovanog LPS-om *E. Coli* i *S. aureus* te kao dodatna terapija CML-a. Hibridi izatinskih derivata s fluorokinolonima ispituju se kao antibakterijska terapija u liječenju infekcija uzrokovanih *Haemophilus influenzae*, *K. pneumonia*, *P.aeruginosa*. U najnovijim istraživanjima pronađeno je da djelovanjem bakterijskih enzima u crijevima dolazi do sinteze izatina iz triptofana što uzrokuje povećane koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama i mozgu. Do navedene promjene dolazi tijekom izloženosti akutnom stresu, tijekom Parkinsonove bolesti zbog povećanog broja bakterija roda Enterococcaceae te se često javlja kod pacijenata oboljelih od bulimije. Ovim istraživanjem ispituje se djelovanje bakterijske mikroflore na rad i funkciju mozga te predstavlja novo područje koje će u budućnosti dati brojne odgovore na do sada neodgovorena pitanja.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

FARMAKOLOŠKO DJELOVANJE I PRIMJENA IZATINA I IZATINSKIH DERIVATA

Petra Bulat

SAŽETAK

Izatin je prirodni alkaloid narančaste boje izoliran iz biljaka roda *Isatis* prisutnih po cijelom svijetu. O.L. Erdman i A. Laurent prvi su puta 1841. godine sintetizirali izatin oksidacijom indiga smjesom dušične i kromne kiseline, a do danas je otkriven velik broj izatinskih derivata od kojih su neki pokazali značajna antitumorska, antibakterijska, antikonvulzivna, protuupalna i brojna druga djelovanja. Iako izatinski derivati imaju širok spektar djelovanja, do sada se antitumorsko djelovanje pokazalo najznačajnijim. Sunitinib je derivat izatina koji je 2006. godine registrirala EMA u liječenju GIST-a, a kasnije i za liječenje neoperabilnih ili metastatski dobro diferenciranih tumora gušterače (pNET) i metastatskog karcinoma bubrežnih stanica (MRCC). Osim što je registriran kao lijek u navedenim indikacijama, sunitinib prolazi kroz klinička ispitivanja kao dvojna terapija s docetakselom, kapecitabinom i paklitakselom. Inhibitor je više tirozin kinaza te tako sprječava rast tumora, proliferaciju stanica i angiogenezu, a značajno inhibitorno djelovanje pokazao je prema VEGFR i PDGFR. Indirubin je poznat izatinski derivat s protuupalnim, antiproliferativnim, hepatoprotektivnim i protuleukemijskim djelovanjem. Iako njegova sigurnost i učinkovitost nije dokazana, u tradicionalnoj se kineskoj medicini koristi u terapiji psorijaze, prevenciji mastitisa uzrokovanog LPS-om *E. Coli* i *S. aureus* te kao dodatna terapija CML-a. Hibridi izatinskih derivata s fluorokinolonima ispituju se kao antibakterijska terapija u liječenju infekcija uzrokovanih *H. influenzae*, *K. pneumonia*, *P.aeruginosa*. U najnovijim istraživanjima pronađeno je da djelovanjem bakterijskih enzima u crijevima dolazi do sinteze izatina iz triptofana što uzrokuje povećane koncentracije izatina u tjelesnim tekućinama i mozgu. Do navedene promjene dolazi tijekom izloženosti akutnom stresu, tijekom Parkinsonove bolesti zbog povećanog broja bakterija roda Enterococcaceae te se često javlja kod pacijenata oboljelih od bulimije. Ovim diplomskim radom prikazana su najistaknutija farmakološka djelovanja izatina i izatinskih derivata i učinak bakterijske mikroflore na rad i funkciju mozga.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranica, 8 slika, 1 graf i 29 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Izatinski derivati; sunitinib; antitumorsko djelovanje; angiogeneza; indirubin, antibakterijsko, protuupalno djelovanje

Mentor: **Dr. sc. Petra Turčić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Petra Turčić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ivana Perković, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY AND APPLICATION OF ISATIN AND ISATIN DERIVATIVES

Petra Bulat

SUMMARY

Isatin is natural alkaloid, isolated as orange solid from plants of *Isatis* genus. First synthesis of isatin dates back to 1841. when O.L. Erdman and A. Laurent obtained it by oxidation of indigo with mixture of nitric and chromic acid. Up to now, large number of isatin derivatives with various pharmacological activities, some of which are antibacterial, antitumor, anticonvulsant, anti-inflammatory etc., have been reported. Isatin derivatives as antitumor agents have been mostly studied and Sunitinib is the one of isatin derivatives which EMA registered in 2006. for treatment of GIST, pNet's and MRCC. At the moment, Sunitinib is in the clinical trial in combination with capecitabine, paclitaxel and docetaxel in treatment for the different types of tumours. It is multi-tyrosine receptor kinase inhibitor and therefore it prevents growth and proliferation of tumors cells and angiogenesis. Significant inhibitory activity has been reported with VEGFR and PDGFR. Indirubin is isatin derivative with anti-inflammatory, antiproliferative, hepatoprotective and antileukemic activity. Although it's safety and efficiency are not proven, in Chinese traditional medicine it is used in treatment of psoriasis, mastitis caused by *E. Coli* and *S. aureus* prevention and as additional therapy of the CML. Isatin hybrids of fluoroquinolones show antibacterial activity to *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and many others. Recent studies reported that isatin can be synthesized from triptofan by gastrointestinal bacterial enzymes which leads to high isatin concentration in body fluids and brain. This is often caused by acute stress, large number of Enterococcaceae in patient with Parkinson disease and bulimia. This review shows the most prominent pharmacological effect of isatin and isatin derivatives and the effect of bacterial microflora on activity and function of brain.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 8 figures, 1 graph and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Isatin derivatives; sunitinib; antitumor agents; angiogenesis; indirubin, antibacterial, anti-inflammatory

Mentor: **Petra Turčić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Petra Turčić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željko Maleš, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Perković, Ph.D. Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.