

Ispitivanje citotoksičnosti derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika na THP-1 staničnoj liniji

Šalov, Mirela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:412908>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Mirela Šalov

**Ispitivanje citotoksičnosti derivata itakonske
kiseline kao potencijalnih citostatika na THP-1
staničnoj liniji**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Marija Matijašića.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na ukazanoj prilici i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i dr.sc. Mariju Matijašiću na stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji i prijateljima što vjeruju u mene i kada ja sumnjam.

„Nothing is so dangerous to the progress of the human mind than to assume that our views of science are ultimate, that there are no mysteries in nature, that our triumphs are complete and that there are no new worlds to conquer.“

Humphry Davy

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Razvoj novog lijeka	2
1.1.1	Odabir bolesti	2
1.1.2	Odabir mete lijeka	2
1.1.3	Potruga za spojem uzorom.....	3
1.1.4	Optimiranje strukture lijeka.....	8
1.1.5	Preklinička ispitivanja	9
1.1.6	Kliničke studije.....	9
1.1.7	Registracija	11
1.2	Citotoksičnost	11
1.3	Itakonska kiselina	14
1.4	Rak.....	15
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	17
3.	MATERIJALI I METODE	19
3.3	Reagensi.....	22
3.4	Laboratorijski uređaji i oprema	23
3.5	Uzgoj staničnih kultura.....	24
3.6	Određivanje broja stanica bojanjem tripanskim plavilom	24
3.7	Određivanje citotoksičnosti MTS testom	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA	26
5.	ZAKLJUČCI	35
6.	LITERATURA.....	37
7.	SAŽETAK/SUMMARY	43

POPIS KRATICA

ADME (engl. *Absorption, distribution, metabolism and excretion*,) apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje lijekova

AMP adenzin-monofosfat

ATCC (engl. *American Type Culture Collection*)

ATP adenzin-trifosfat

BRCA (engl. *BReast CAncer gene*) gen raka dojke

CEBPA (engl. *CCAAT Enhancer Binding Protein α*)

CQ klorokin-difosfat

DMSO dimetil-sulfoksid

DNA deoksiribonukleinska kiselina

EGFR-TKI inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta-tirozin-kinaza

EK Europska komisija

FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) fetalni goveđi serum

GCCP (engl. *Good Cell Culture Practice*) Dobra praksa za uzgoj staničnih linija

HALMED Agencija za lijekove i medicinske proizvode

HTS (engl. *High Throughput Screening*) visokoprotočna pretraživanja

IC₅₀ (engl. *Half-maximal Inhibitory Concentration*)

LADME (engl. *Liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion*) oslobađanje, apsorpcija, distribucija, biotransformacija i izlučivanje lijekova

LDH laktat-dehidrogenaza

M mol/dm³

MQ meflokin-hidroklorid

MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol

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

NADH nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NaOH natrijev hidroksid

NKCC2 Na-K-2Cl kotransporter

OECD (engl. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*)

PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) fosfatni pufer

QSAR (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR*) kvantitativni odnos strukture i aktivnosti

RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*)

1. UVOD

Ljudi su davno prepoznali blagotvorne i toksične učinke mnogobrojnih tvari, biljnoga i životinjskog podrijetla. Krajem 17. stoljeća počele su se koristiti metode promatranja i eksperimentiranja u istraživanju učinka tradicionalno korištenih lijekova. Međutim, tada nije bilo moguće razumjeti mehanizme djelovanja lijekova zato što nisu postojale metode za pročišćavanje aktivnih tvari iz sirovoga materijala niti metode za ispitivanje hipoteza o prirodi djelovanja lijekova. Krajem 18. i početkom 19. stoljeća, napretkom kemije i fiziologije, počele su se razvijati metode eksperimentalne farmakologije koje su postavile temelje za razumijevanje djelovanja lijekova na razini organa i tkiva. Paradoksalno, to vrijeme razvoja farmakologije praćeno je raznim neznanstveno utemeljenim izjavama proizvođača i prodavača lijekova. Precizno procjenjivanje terapijskih tvrdnji bilo je moguće tek uvođenjem kontroliranih kliničkih studija, otprilike prije 60 godina. Posljednja tri desetljeća, razvojem novih tehnika i ubrzanim prikupljanjem podataka, produbljeno je razumijevanje djelovanja lijekova na staničnoj i molekularnoj razini (*Katzung, 2018*).

1.1 Razvoj novog lijeka

Poznavanjem mehanizma djelovanja otvoren je put razvoju lijekova na temelju identificiranja mete u organizmu te potom dizajniranja odgovarajućeg lijeka. Postoji više faza u razvoju novoga lijeka, a cijeli proces je iznimno dugotrajan i skup proces (*Patrick, 2013*).

1.1.1 Odabir bolesti

Prvi je korak u razvoju novoga lijeka izabrati bolest za koju će se razvijati novi lijek. Logično je odabrati bolest za koju još ne postoji odgovarajuća terapija, ali proizvođači moraju uzeti u obzir i ekonomske faktore. S obzirom na velika ulaganja u istraživanje i razvoj novih lijekova, potrebno je osigurati i odgovarajuću financijsku dobit. Posljedično, najveći broj istraživanja usmjeren je na bolesti česte u razvijenom dijelu svijeta kao što su migrena, depresija, čir na želucu, pretilost, rak i kardiovaskularne bolesti, dok su istraživanja tropskih bolesti koje se pojavljuju u zemljama u razvoju malobrojna. Međutim, primijećen je povećan broj istraživanja za antimalarike zbog povećanog turizma u zemlje gdje je malarija raširena (*Patrick, 2013*).

1.1.2 Odabir mete lijeka

Sljedeći je korak identificirati odgovarajuću metu lijeka. U većini slučajeva molekula lijeka djeluje kao agonist ili kao antagonist sa specifičnom ciljnom molekulom koja ima ulogu

u patofiziologiji bolesti. Ta ciljna molekula naziva se receptor. Agonisti svojim vezanjem aktiviraju receptor te iniciraju prijenos signala koji će potaknuti određeni biološki odgovor. Na taj način djeluju neki lijekovi, ali i prirodni ligandi kao što su hormoni i neurotransmiteri. Suprotno, antagonisti inhibiraju receptor vezanjem na njega. Neki lijekovi djeluju kao alosterički modulatori, vežući se na receptor na nekom drugom mjestu od mjesta vezanja prirodnih liganda te imaju drugačiji biološki učinak (*Katzung, 2018*). Važno je razumjeti koje molekule i na koji način sudjeluju u patofiziologiji bolesti kako bi se moglo odrediti hoće li se razvijati agonisti ili antagonisti. Primjera radi, agonisti serotoninskih receptora korisni su u liječenju migrene, dok su antagonisti dopaminskih receptora korisni antidepresivi (*Patrick, 2013*).

Većina receptora za klinički značajne lijekove su proteini. Vezanje lijekova na proteinske receptore iskorišteno je za njihovu identifikaciju i pročišćavanje iz tkiva te su prvo pronađeni receptori prema lijekovima koji se na njih vežu. Napretkom molekularne biologije omogućeno je identificiranje novih receptora strukturnom homologijom s već poznatim receptorima. Tako je otkriveno da se većina lijekova zapravo veže na više različitih receptora te je započeo razvoj selektivnijih lijekova (*Katzung, 2018*). Što je lijek selektivniji prema svojoj meti, manja je vjerojatnost da će imati neželjene učinke (*Patrick, 2013*).

Otkriveni su i „orphan receptori“, receptori kojima trenutno nisu poznati prirodni ligandi. Pronalaskom novih meta mogu se razvijati lijekovi s novim mehanizmom djelovanja, a „orphan receptori“ su potencijalna meta za razvoj novih lijekova (*Katzung, 2018*). Kod određenih bolesti, kao što je rak i infekcija HIV-om, može biti korisno utjecati na više različitih meta istovremeno. Kod takve kombinirane terapije, nedostatak je to što se koristi više različitih lijekova, pa je novi cilj razvoj lijekova koji sami mogu djelovati selektivno na više meta (*Patrick, 2013*).

1.1.3 Potraga za spojem uzorom

Pristup razvoju većine novih lijekova jest prvo otkriti spoj uzor pri čemu se provodi *screening* biološke aktivnosti velikog broja prirodnih produkata, pretražuju se prethodno sintetizirani spojevi ili knjižnice peptida, nukleinskih kiselina i ostalih organskih molekula. U ovom se koraku koriste različiti biološki testovi kojima je cilj odrediti aktivnost i selektivnost lijeka, odnosno farmakološki učinak (*Katzung, 2018*).

Mnogi lijekovi dobiveni su iz prirodnih izvora ili su razvijeni na temelju aktivne djelatne tvari otkrivene u prirodnom izvoru. Aktivna djelatna tvar je spoj odgovoran za biološku aktivnost prirodnoga izvora. Većina biološki aktivnih prirodnih produkata sekundarni su metaboliti s kompleksnom strukturom i kiralnim centrima što otežava njihovu sintezu, a ekstrakcija iz prirodnoga izvora je spor, skup i neučinkovit proces. Iz toga se razloga dizajniraju jednostavniji analozi (*Patrick, 2013*).

Odabir odgovarajućeg biološkoga testa iznimno je važan za uspješan razvoj lijeka. S obzirom da se ispituje velik broj spojeva, testovi trebaju biti brzi, jednostavni i relevantni. U ovoj fazi razvoja lijeka nije moguće istraživanje na ljudima, pa se koriste metode *in vitro* (na izoliranim stanicama, tkivima, enzimima ili receptorima) i *in vivo* (na životinjama) (*Patrick, 2013*). U zadnje vrijeme *in silico* metode dobivaju na značaju u razvoju novih lijekova (*Wang i sur, 2015*).

***In vitro* metode**

In vitro testovi ne provode se na živim životinjama nego se koriste specifična tkiva, stanice ili enzimi. Ove se metode preferiraju u odnosu na *in vivo* metode jer su jeftinije, jednostavnije za izvođenje, manje kontroverzne te mogu biti automatizirane.

U prošlosti je bio problem izolirati i pročistiti dovoljne količine enzima koji bi se koristili u ispitivanjima, ali danas je to riješeno genetičkim inženjerstvom tako što se klonira gen za određeni enzim u brzo-rastućoj stanici, poput kvasca ili bakterije (*Patrick, 2013*). Posebno su pogodne prokariotske bakterije zbog svoje jednostavnosti i lakoće kojom se mogu razmnožavati, a najviše korištena vrsta je *Escherichia coli*. Kvasci, kao najjednostavniji eukarioti, korisni su za istraživanje stanične strukture i funkcije jedinstvene za eukariote. Najistraživaniji kvasac je *Saccharomyces cerevisiae*. Ipak, za razumijevanje složenoga ljudskog organizma, potrebne su ljudske stanice i stanice ostalih sisavaca izolirane u kulturi. Pomoću kultiviranih stanica razjašnjen je mehanizam replikacije DNA, ekspresije gena, sinteze i dorade proteina i stanične diobe kao i signalni mehanizmi koji kontroliraju stanični rast i diferencijaciju unutar organizma (*Cooper i Hausman, 2010*).

Kulture animalnih stanica nastaju usitnjavanjem tkiva tako da se dobije suspenzija stanica koja se zatim stavlja u posudicu za kulturu s hranjivom podlogom. Većina vrsta animalnih stanica prihvaćaju se za dno stanične posudice i na njoj rastu. Hranjiva podloga za

uzgoj animalnih stanica sadrži sol, glukozu, različite aminokiseline i vitamine koje stanice ne mogu same sintetizirati te serum kao izvor polipeptidnih faktora rasta, nužnih za stimulaciju staničnih dioba (*Cooper i Hausman, 2010*).

Najčešće se koriste tumorske stanice i stanice zametka zbog sposobnosti brzog rasta. Razlikuju se primarne stanične kulture koje nisu modificirane, dobivaju se iz embrionalnog tkiva i rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze, te transformirane stanične linije dobivene iz tumorskog tkiva (*Patrick, 2013*). Od primarnih se staničnih kultura mogu dobiti sekundarne procesom presađivanja u razrijeđenoj koncentraciji. Taj se proces može ponavljati više puta, međutim, većina primarnih stanica u kulturi ne može beskonačno rasti. Nasuprot tomu, tumorske i embrionalne matične stanice imaju sposobnost neograničene proliferacije tvoreći besmrtnne stanične linije (*Cooper i Hausman, 2010*).

Lijek, kada se ispituje *in vitro* testovima, za razliku od *in vivo* testova, ne doživljava transformaciju odgovarajućim metaboličkim enzimima niti prelazi barijere što je posebno korisno na početku razvoja lijeka. *In vitro* testovi koriste se kod istraživanja afiniteta lijeka za receptore, fiziološkoga učinka, kod ispitivanja učinka antibakterijskih lijekova, kao i kod ispitivanja farmakokinetičkih svojstava (*Patrick, 2013*). Primjerice, Caco-2 stanična linija izolirana iz humanoga kolorektalnog adenokarcinoma koristi se u predviđanju apsorpcije u tankom crijevu. U ranim fazama rasta Caco-2 stanice ostaju neidentificirane sa samo nekoliko mikrovila. Pod određenim uvjetima diferencijacijom nastaje polarizirani monosloj stanica učvršćen uskim spojevima („tight junction“) te brojnim mikrovilima na apikalnoj strani. Unatoč tome što potječu od debeloga crijeva, Caco-2 stanice imaju većinu morfoloških i funkcionalnih svojstva stanica tankoga crijeva uključujući enzime disaharidazu i peptidazu te izražene transportere karakteristične za enterocite (*Pereira i sur., 2016*). Mikrosomi i hepatociti izolirani iz stanica jetre sadrže citokrom P450 enzime te se mogu koristiti za procjenu metabolizma lijekova, kao i za identificiranje mogućih lijek-lijek interakcija. Razvijene su i umjetne membrane kojima se istražuje prolaženje lijekova kroz krvno-moždanu barijeru (*Patrick, 2013*).

Kako bi se poboljšala ponovljivost, pouzdanost, vjerodostojnost i pravilna primjena rezultata dobivenih *in vitro* metodama, sastavljene su smjernice o dobroj praksi za uzgoj staničnih linija, GCCP (engl. *Good Cell Culture Practice*) (*Aschner i sur., 2011*).

***In vivo* metode**

In vivo testovi često uključuju induciranje određenoga kliničkog stanja kako bi životinja razvila simptome bolesti. Potom se životinja liječi ispitivanim lijekom te se prati hoće li se simptomi smanjiti. U ove se svrhe koriste i transgenične životinje kojima je genom modificiran. Moguće je zamijeniti, primjerice, mišje gene s humanim genima. Na taj se način dobivaju humani receptori ili enzimi kao mete u ispitivanjima. Također, moguće je i promijeniti gene kako bi životinja postala osjetljivija na određene bolesti kao što je rak dojke, a potom ispitivati koliko dobro lijekovi preveniraju bolest (*Patrick, 2013*).

Postoji nekoliko problema povezanih s *in vivo* testovima. Dugotrajni su, skupi i uzrokuju patnju životinja. Rezultati mogu zavarati i teško ih je objasniti bez *in vitro* testova. Uobičajeno, *in vitro* testovi služe kako bi se odredilo stupa li lijek u interakciju s metom, a potom se farmakokinetička svojstva određuju *in vivo* testovima. Također, različite životinjske vrste mogu davati različite rezultate. Jedan od najpoznatijih primjera je talidomid, koji ima teratogen učinak na zečevima i ljudima, ali ne i na miševima (*Patrick, 2013*).

Korištenje životinja u testiranjima pokušava se smanjiti, međutim, potpuna zamjena *in vitro* metodama zahtijeva poznavanje i razumijevanje svih staničnih i molekulskih događaja i puteva te točan mehanizam oslobađanja, apsorpcije, distribucije, biotransformacije i izlučivanja lijekova (engl. *Liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion, LADME*). Razvoj alternativnih metoda sve više napreduje, ali je potrebno dodatno usavršavanje kako bi bili prikladniji (*Ukelis i sur., 2008; Stokes, 2015*). Razmatranjem načina kojima bi se izbjegla nehumanost te postigao etički prihvatljiviji odnos prema eksperimentalnim životinjama razvijen je 3R princip što označava smanjenje (engl. *Reduction*), zamjenu (engl. *Replacement*) i poboljšanje (engl. *Refinement*) upotrebe eksperimentalnih životinja. Ovaj pristup potiče smanjenje broja životinja koje se koriste u istraživanjima te zamjenu svjesnih živih životinja materijalom koji nema osjetila ili ima manju mogućnost osjeta boli. Nadalje, poboljšanje kvalitete života eksperimentalnih životinja može utjecati i na smanjene oscilacije u rezultatima s obzirom da stres i bol uzrokuju hormonsku neravnotežu (*Russell i Burch, 1959; Doke i Dhawale, 2015*).

***In silico* metode**

Najčešći razlozi za neuspješan razvoj lijeka jesu loša farmakokinetika lijeka i njegova toksičnost. Stoga je važno te parametre istražiti u ranoj fazi razvoja lijeka. U suvremeno vrijeme, napretkom kombinatorne kemije i visokoprotočnih pretraživanja (engl. *High Throughput Screening*, HTS), značajno je porastao broj kemijskih spojeva za koje su potrebni podaci o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu, izlučivanju (engl. *Absorption, distribution, metabolism and excretion*, ADME) i toksičnosti. Kombinatorna kemija omogućuje sintezu velikih serija blisko povezanih knjižnica spojeva koristeći istu kemijsku reakciju i odgovarajući reagens. Zatim se iz takvih knjižnica spojeva visokoprotočnim pretraživanjem biraju potencijalne molekule lijeka (*Van de Waterbeemd i Gifford, 2003*). Na taj se način automatski testira veliki broj spojeva u odnosu na veliki broj meta te je bitno dobiti rezultate koji se jednostavno detektiraju kao što su rast stanica, promjena boje zbog reakcije katalizirane enzimom ili pomak radioaktivno označenog liganda od receptora (*Patrick, 2013*). Sve boljim razumijevanjem odnosa strukture lijeka i njegovih ADME parametara, razvijeni su *in silico* modeli koji predviđaju farmakokinetiku lijeka te povećavaju efikasnost HTS-a (*Van de Waterbeemd i Gifford, 2003*).

In silico pretraživanje, odnosno računalne stimulacije, relativno su jeftina metoda identificiranja potencijalnih interakcija između molekula lijeka i izabranih meta (*Verbanac i sur., 2005*). Postoje dvije vrste *in silico* modeliranja: molekulsko i podatkovno modeliranje. Kod molekuskoga modeliranja potrebno je poznavati trodimenzionalnu strukturu proteina ili se koristi model farmakofora kako bi se procijenio potencijal interakcije molekule i određenoga proteina. Podatkovno se modeliranje temelji na kvantitativnom odnosu strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR). Statističkim alatima pronalaze se korelacije između svojstva i niza molekulskih i strukturnih deskriptora. Deskriptori mogu biti vezani uz eksperimentalnu kemiju poput veličine molekula i opisivanja vodikovih veza, ali i uz teorijsku kemiju poput topološke i kvantne kemije. Dobri modeli predviđanja ovise o pravilnom izboru matematičkoga pristupa i molekulskih deskriptora te dovoljnom broju eksperimentalnih podataka. U većini slučajeva baze podataka su ograničene te je potrebno daljnje unaprjeđenje modela (*Van de Waterbeemd i Gifford, 2003*).

1.1.4 Optimiranje strukture lijeka

Kemijskim modifikacijama moguće je postići bolja farmakodinamička i farmakokinetička svojstva spoja uzora (*Katzung, 2018*). Cilj je dobiti molekulu koja ima dobru selektivnost i afinitet prema meti te minimalne nuspojave. Ne manje važno je i mogućnost jednostavne sinteze te kemijska stabilnost lijeka.

Kod optimizacije strukture bitno je poznavati funkcionalne skupine i vrste intermolekulskih veza. Uobičajena strategija podešavanja interakcija vezanja lijeka jesu varijacije lako dostupnih supstituenata. Primjerice, moguće je maknuti ili zamijeniti alkilne supstituente i mijenjati pozicije supstituenata na aromatskom prstenu. Proučava se kako varijacija jednog supstituenta utječe na aktivnost spoja, međutim treba uzeti u obzir sinergistički utjecaj dva ili više supstituenata na aktivnost. Strategija optimizacije strukture je i dodavanje funkcionalnih skupina ili supstituenta na postojeću strukturu radi dodatnih veznih interakcija s metom. Ukoliko spoj ima dvije važne skupine za vezanje spojene lancem, moguće je skraćivanje ili produženje lanca. Također, kod sinteze analoga moguće je i proširenje ili smanjivanje prstenova u strukturi. Često se originalni aromatski i heteroaromatski prstenovi zamjene s prstenom drugačije veličine ili pozicije heteroatoma. Koriste se i izosteri te bioizosteri. Izosteri su skupine sličnih fizičkih i kemijskih svojstava, a bioizoster jest skupina kojom se može zamijeniti druga skupina u strukturi lijeka bez utjecaja na biološku aktivnost. Primjerice, kod antagonista histamina, tiourea je važna za vezanje, ali je i odgovorna za neželjene toksične učinke. Zamjenom s bioizosterom, ostaje sposobnost vezanja na metu, a izbjegnuti su problemi s toksičnošću. Pojednostavljenje molekule često je potrebno kod spojeva uzora pronađenih u prirodnim izvorima te je moguće ukloniti funkcionalne skupine koje nisu dio farmakofora. Uvođenjem krutih funkcionalnih skupina i prstenastih struktura možemo smanjiti broj mogućih konformacija molekule (*Patrick, 2013*).

Optimiziranjem hidrofilnih i hidrofobnih svojstava moguće je utjecati na topljivost, apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijeka. Jako hidrofilne molekule teško prolaze kroz stanične membrane, sklonije su vezanju za proteine plazme, metaboličkim reakcijama konjugacije i brzom izlučivanju. Jako hidrofobne molekule otapaju se u česticama masti i slabo se apsorbiraju. Polarnost molekule može se mijenjati ovisno o polarnim i hidrofobnim funkcionalnim skupinama. Mogu se dizajnirati lijekovi otporniji na metabolizam uvođenjem steričkih štitova i blokatora metabolizma, zaštitom osjetljivih funkcionalnih skupina

te uvođenjem metabolički stabilniji skupina. Osjetljive funkcionalne skupine se mogu i maknuti ukoliko nisu bitne za interakciju s metom ili se mogu premjestiti (*Patrick, 2013*).

1.1.5 Pretklinička ispitivanja

Niti jedan lijek nije potpuno siguran, stoga je cilj pretkliničkih pokusa procijeniti rizik povezan s izloženošću lijeku uzimajući u obzir terapijske potrebe i vjerojatno trajanje upotrebe lijeka (*Katzung, 2018*).

Akutna toksičnost odnosi se na štetne učinke koji se javljaju nakon primjene jednokratne doze ispitivane tvari ili nakon nekoliko doza danih unutar 24 sata. Određuje se maksimalna doza pri kojoj nema toksičnog učinka i minimalna smrtonosna doza odnosno najmanja doza koja je dovela do smrti eksperimentalne životinje. Također se određuje i srednja smrtonosna doza (LD₅₀) koja označava statistički određenu jednokratnu dozu lijeka za koju se očekuje da će kod 50 posto životinja izazvati smrt.

Subkronična toksičnost određuje se pomoću ponavljanih doza u razdoblju od 90 dana. Tim se ispitivanjima dobivaju podaci o značajnim toksičnim učincima, utvrđuju ciljni organi i mogućnost akumulacije te se procjenjuje razina izloženosti kod koje nema vidljivih štetnih učinaka izlaganja.

Kronična toksičnost daje informacije o opasnostima po zdravlje tijekom dugotrajne izloženosti lijeku, a uobičajeno se ispituje 12 mjeseci. Pretklinički pokusi ispituju i učinak na reprodukciju, uključujući utjecaj na funkciju spolnih organa, parenje, začeće, trudnoću, razvoj začeca i porod te karcinogeni i mutageni potencijal (*OECD Guidelines, 2018*).

Ova faza u razvoju lijeka ima brojne nedostatke: ispitivanje toksičnosti dug je i skup proces, potreban je veliki broj životinja kako bi se prikupilo validirane podatke, ekstrapolacija terapijskog i toksičnog učinka s životinja na ljude može biti pogrešna te je statistički mala vjerojatnost uočavanja rijetkih štetnih događaja (*Katzung, 2018*).

1.1.6 Kliničke studije

Lijek koji pokazuje bolji željeni učinak na životinjskim modelima u odnosu na postojeće lijekove, ima prihvatljivu farmakokinetiku, malo metabolita, razumno poluvrijeme života te nema ozbiljnijih nuspojava prelazi na klinička ispitivanja. Mnogobrojni lijekovi koji su imali obećavajući potencijal ne prođu ovu fazu.

Prva faza kliničkih ispitivanja uključuje zdrave dobrovoljce te je cilj procijeniti sigurnost lijeka, njegovu farmakokinetiku i utvrditi dozu lijeka. Testiraju se različite doze lijeka kako bi odredili dozu koja se može tolerirati. Uobičajeno, početna doza je jedna desetina najveće sigurne doze korištene kod životinja računano po kilogramu. Postepeno se doza povećava sve dok se ne primijete blage nuspojave. Kako bi se izbjegle potencijalne interakcije, tijekom studije, dobrovoljci ne uzimaju druge lijekove, kofein, alkohol niti cigarete. Ispituje se i utjecaj hrane na apsorpciju lijeka te se utvrđuje način uzimanja lijeka.

Rana druga faza kliničkih ispitivanja provodi se na ograničenom broju ispitanika kako bi se testirala terapijska učinkovitost. Kasnija faza uključuje veći broj ispitanika te se provodi kao dvostruko slijepa, placebo kontrolirana studija. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine gdje jedna skupina dobiva lijek, a druga placebo. U dvostruko slijepoj studiji, niti doktori, niti ispitanici ne znaju primjenjuje li se lijek ili placebo. Određuje se i najefikasniji režim doziranja. Korištenje placeba je, u nekim slučajevima, neetički te se koriste postojeći lijekovi kao zamjena.

Treća faza kliničkih ispitivanja provodi se jednako kao i druga faza, ali na puno većem broju ispitanika. U ovoj se fazi utvrđuje učinkovitost lijeka i konačno optimizira doza. Podijeljena je na fazu a i b te ukoliko lijek prođe fazu a, može biti registriran. Faza b provodi se nakon registracije uspoređujući lijek s već postojećim lijekovima za istu indikaciju.

U četvrtoj fazi kliničkih ispitivanja, lijek je na tržištu i može se propisivati, međutim, i dalje se prati učinkovitost i moguća pojava rijetkih ili neočekivanih nuspojava. S obzirom da podatci prikupljeni tijekom pred-marketinške faze razvoja lijeka (pretklinička i klinička ispitivanja) ne mogu predvidjeti sve nuspojave koje se mogu pojaviti nakon što lijek dođe u promet, ova faza nikada ne završava (*Patrick, 2013*). Sumnje na nuspojave lijekova u Republici Hrvatskoj trebaju se u pisanom obliku prijaviti Agenciji za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), a u slučaju cjepiva i Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo. Sumnju na nuspojavu lijeka obvezni su prijaviti: zdravstveni radnici koji dolaze u doticaj s pacijentom/korisnikom lijeka, proizvođač lijeka, nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet, nositelj odobrenja za paralelni uvoz, uvoznik, veleprodaja te zdravstveni radnik koji sudjeluje u kliničkom ispitivanju u svojstvu ispitivača (www.halmed.hr).

Uz kliničke studije vezani su brojni etički problemi. Primjerice, upitno je treba li uključiti u ispitivanja nesvjesne i psihički bolesne osobe koje ne mogu dati voljni pristanak, a možda bi imali koristi od istraživanoga lijeka. Većina se ispitivanja ne provodi na djeci, pa se

prilikom propisivanja lijekova samo modificira doza za odrasle na temelju tjelesne težine. Međutim, djeca nisu male odrasle osobe, farmakodinamička i farmakokinetička svojstva lijeka mogu se bitno razlikovati u odnosu na odrasle osobe (*Patrick, 2013*).

1.1.7 Registracija

Farmaceutske kompanije koje razviju novi lijek dobiju patentno pravo na proizvodnju i prodaju toga lijeka tijekom određenoga razdoblja kako bi mogli vratiti uloženi novac i zaraditi za nova istraživanja. Patentno pravo ne odnosi se samo na strukturu novoga lijeka nego i na strukturu postojećega lijeka s različitim kiralnim centrom ili ako se postojeći lijek proizvede u obliku nove soli ili je poboljšana formulacija (*Patrick, 2013*).

Odobrenje za stavljanje lijeka u promet može se dati samo za lijek za koji je temeljem stručno-znanstvene ocjene dokumentacije o lijeku utvrđeno da je lijek odgovarajuće farmaceutske kakvoće te da je korist njegove primjene veća od rizika. U Republici Hrvatskoj u prometu može biti samo onaj lijek koji ima odobrenje za stavljanje u promet dano od HALMED-a ili Europske komisije (EK) (www.halmed.hr).

1.2 Citotoksičnost

Citotoksičnost je sposobnost neke tvari da inducira staničnu smrt, a može se očitovati kao nekroza stanica ukoliko stanice izgube integritet membrane, može dovesti do smanjene vijabilnosti stanica te stanice prestaju aktivno rasti i dijeliti se ili može aktivirati genetski program kontrolirane stanične smrti, apoptozu (*Eisenbrand i sur., 2002*). Zbog svoga brzog rasta, dostupnosti, jednostavnosti i dobro definiranih uvjeta, stanične linije predstavljaju relevantnu alternativu životinjskim modelima te se naširoko koriste u istraživanjima. Razvojem tehnologije i znanosti sve se manje koriste radioaktivne i komplicirane metode, a sve je veći fokus na razvoju jednostavnih homogenih metoda koje mogu biti automatizirane, pa su tako razvijene metode koje mogu mjeriti različite krajnje točke (engl. *endpoint*) kao biljege vijabilnosti stanica, citotoksičnosti i apoptoze (*Riss i Moravec, 2004*). Metode se temelje na ispitivanjima propusnosti membrane, mitohondrijske funkcije, promjena u morfologiji stanica i promjena u replikaciji stanica. Promjene u propusnosti membrane mogu se mjeriti bojenjem (tripansko plavilo), praćenjem unutarstaničnih enzima poput laktat-dehidrogenaze (LDH), mjerenjem oslobođenih proteina označenih kromom (^{51}Cr) ili pomoću radioaktivnih nukleotida.

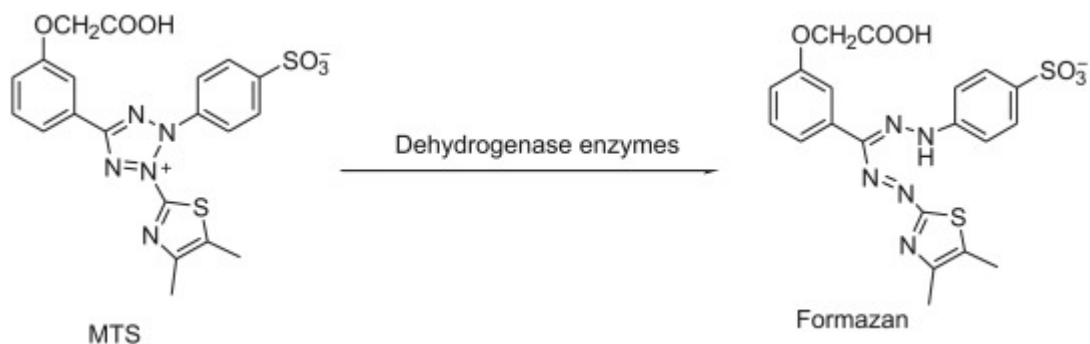
Promjene u morfologiji stanica, membransko preslagivanje, fragmentacija DNA, aktivacija kaspaza, oslobađanje citokroma c i ostalo pridonose procjenjivanju apoptotičkog učinka tvari (*Eisenbrand i sur., 2002*). Postoji velik broj različitih metoda koje ispituju citotoksičnost, a izbor metode ovisi o staničnim linijama, financijskim mogućnostima te dostupnim uređajima. Najčešće korištene metode za detekciju mrtvih stanica temelje se na izgubljenom integritetu stanične membrane te obuhvaćaju mjerenje sadržaja koji je izašao iz citoplazme u medij ili mjere tvar koja prolazi kompromitiranu staničnu membranu (*Riss i sur., 2019*).

Metoda bojenja tripanskim plavilom koristi se za određivanje broja živih stanica prisutnih u staničnoj kulturi. Boja ulazi u citoplazmu stanice, no žive stanice imaju membranske pumpe kojima tu boju izbacuju, a mrtve stanice nemaju, stoga mrtve stanice akumuliraju boju te ih pod mikroskopom vidimo plavo obojane, a žive stanice ostaju neobojane. Obojane (mrtve) stanice se ne uzimaju u obzir kod brojanja stanica za presađivanje (*Strober, 2001*). Postoji velik broj boja, primjerice propidijev jodid i GelRed 10, koje ulaze u stanicu i vežu se za nukleinsku kiselinu te se koriste za bojenje stanica koje se potom detektiraju mikroskopskim metodama ili protočnom citometrijom (*Riss i sur., 2019*).

Najčešći ispitivani biljeg kojeg oslobađaju oštećene stanice u medij je citoplazmatski enzim LDH. Nalazi se u svim stanicama te katalizira proces pretvorbe piruvata u laktat tijekom kojeg NAD^+ prelazi u NADH. Aktivnost LDH-a mjeri se kao oksidacija NADH u NAD^+ ili se NAD^+ reducira u NADH, a on se dalje koristi za redukciju mnogih molekula koje imaju obojeni, fluorescenti ili luminiscenti produkt. Koncentracija produkta u linearnoj je korelaciji s koncentracijom LDH-a u kulturi stanica odnosno s brojem mrtvih ili oštećenih stanica (*Decker i Lohmann-Matthes, 1988; Kumar i sur., 2018; Riss i sur., 2019*).

Brzi kolorimetrijski testovi temeljeni na tetrazolijevoj soli jesu testovi za procjenu vijabilnosti stanica koji mjere metaboličku sposobnost stanica u kulturi. Koriste se MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) i MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol). Dehidrogenaze metabolički aktivnih stanica stvaraju redukcijske ekvivalente (NADH, NADPH) te dolazi do redukcije žuto obojenoga tetrazolija u ljubičasti formazanski produkt (Slika 1). Nakon smrti, stanice brzo gube sposobnost redukcije tetrazolija stoga je intenzitet ljubičaste boje formazana proporcionalan broju živih stanica u kulturi (*Mosmann, 1983*). Kod MTS testa, za razliku od MTT testa, nastaje

u vodi topljivi formazan zbog prisutnosti fenazin metosulfata, intermedijarnog akceptora elektrona koji prenosi elektrone s NADH i reducira tetrazolij (www.pediaa.com).

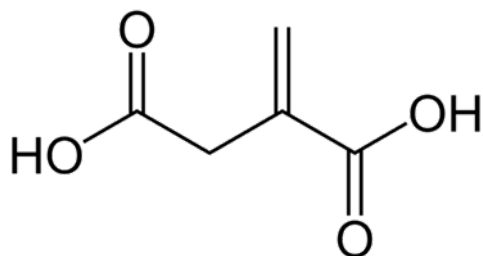


Slika 1. Redukcija tetrazolijeve soli u formazanski produkt (preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mts-assay>)

Sličan testovima temeljenim na redukciji tetrazolija jest test redukcije resazurina u fluorescentni produkt resorufin (*Riss i Moravec, 2004*).

Metabolička aktivnost može se mjeriti i bioluminiscentnim adenozin-trifosfat (ATP) testom. Bioluminiscencija je poseban oblik kemiluminescencije, a okarakterizirana je kao proces kataliziran enzimima luciferaza, dok su supstrati emisije fotona luciferini. ATP kao glavni prijenosnik metaboličke energije, dobar je indikator vijabilnosti stanica (*Fan i Wood, 2007*). ATP je nukleotid, ester adenina i riboze te njegovom hidrolizom, pri čemu nastaju fosfatne skupine, dolazi do otpuštanja energije. Nakon stanične smrti, prvo prestaje sinteza ATP-a te koncentracija unutarstaničnog ATP-a trenutačno pada. Osim bioluminiscentnim testom, koncentracija ATP-a može se odrediti enzimskim, spektroskopskim, radioaktivnim ili kromatografskim metodama, međutim, bioluminiscentni ATP test najosjetljiviji je, najbrži i najselektivniji (*Lomakina i sur., 2015*). Metoda se temelji na reakciji supstrata luciferina koji u prisutnosti kisika, magnezijevih iona i ATP-a prelazi u oksiluciferin uz nastajanje adenozin-monofosfata (AMP) i pirofosfata. Oksiluciferin prelaskom iz pobuđenoga u osnovno stanje emitira energiju te je intezitet emitirane energije proporcionalan koncentraciji ATP-a (*Shama i Malik, 2013*).

1.3 Itakonska kiselina



Slika 2. Kemijska struktura itakonske kiseline (preuzeto s: https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska_kiselina)

Itakonska kiselina jest dikarboksilna kiselina s egzometilenskim dijelom konjugiranim s karboksilnom kiselinom (Slika 2). Spojevi s itakonskom jezgrom prirodni su spojevi izolirani iz različitih vrsta lišajeva i gljivica. Primjerice, cetomelična kiselina, metabolički produkt lišaja *Chaetomella*, poznata je kao snažan inhibitor farnezil-transferaze i korisna je u razvoju lijekova protiv raka (*Gibbs i sur., 1993*). Itakonat je i metabolit specifičan za makrofage te posreduje antimikrobne funkcije u makrofagu inhibirajući izocitratnu-liazu, jedan od enzima bakterijskoga mehanizma preživljavanja (*Cordes i sur., 2015*). Dokazano je i sudjelovanje itakonske kiseline u regulaciji peritonealnih tumora (*Weiss i sur., 2018*).

Reaktivna α -metilenska skupina omogućuje povezivanje ili polimerizaciju (*Zerkowski i Solaiman, 2014*) te su sintetizirani mnogobrojni polimeri i kopolimeri itakonske kiseline. Spojevi s izloženim nezasićenim β -ugljicima smatrani su najboljim supstratima za Michaelovu adiciju. Michaelove akceptorske skupine odgovorne su za kovalentno vezanje lijeka na cisteinski ostatak specifičnog proteina što je ključno strukturno obilježje mnogih protutumorskih i antivirusnih lijekova (*Perković i sur., 2020*). Inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta - tirozin-kinaza (EGFR-TKI), poput afatiniba, neratiniba i osimertiniba kovalentno se vežu na cisteinski ostatak na položaju 797 receptora (*Minari i sur., 2016*), dok etakrilna kiselina inhibira NKCC2 (Na-K-2Cl kotransporter) u uzlaznom dijelu Henleove petlje i makule dense, također inhibira izoenzime glutation-S-transferaze

prekomjerno izražene u tumorskim tkivima te smanjuje otpornost na kemoterapiju (*Somberg i Molnar, 2009*).

1.4 Rak

U stanicama raka nema temeljnih regulacijskih mehanizama proliferacije, diferencijacije i preživljavanja kao kod normalne stanice te stanice raka nekontrolirano rastu i dijele se. Gubitak kontrole rasta nastaje zbog nakupljanja poremećaja različitih staničnih regulacijskih sustava. Bilo koja vrsta stanica u tijelu može postati stanica raka te posljedično postoji više od stotinu vrsta raka koji se razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu te može biti dobroćudni (benigni) ili zloćudni (maligni). Za razliku od zloćudnog tumora koji se može proširiti na susjedna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfatičkog sustava, dobroćudni tumor ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao. Prema vrsti stanica iz kojih nastaju tumori se dijele na karcinome koji obuhvaćaju epitelne stanice, sarkome odnosno solidne tumore vezivnih tkiva te leukemije i limfome. Leukemija i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunskog sustava (*Cooper i Hausman, 2010*).

Ključne promjene koje nastaju u stanicama tijekom zloćudne preobrazbe jesu: održavanje signala za diobu stanica, izbjegavanje supresije rasta, izbjegavanje stanične smrti, replikacijska besmrtnost, poticanje angiogeneze, poticanje invazije i metastaziranja, promijenjena regulacija staničnoga metabolizma, nestabilnost genoma i mutacije, izbjegavanje imunskog sustava i upala koja potiče tumorigenezu (*Hanahan i Weinberg, 2011*).

Genske promjene koje dovode do razvoja raka obuhvaćaju aktivaciju staničnih onkogeni i inaktivaciju tumorskih supresorskih gena. Nije dovoljna jedna genska promjena već je to proces koji uključuje više uzastopnih promjena. Onkogeni kodiraju proteine koji kontroliraju proliferaciju i apoptozu stanica, a mogu se aktivirati točkastim mutacijama, translokacijom, duplikacijom i delecijom gena odnosno kromosomskim promjenama te amplifikacijom gena odgovarajućih protonkogeni (*Croce, 2008*). Primjerice, u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji Philadelphia kromosom nastaje translokacijom *abl* (Abelson murine leukemia) protoonkogeni s 9. na 22. kromosom. Posljedično dolazi do fuzije *abl* s genom *bcr*

te nastaje fuzijski Bcr/Abl protein koji dovodi do poremećaja regulacije aktivnosti Abl proteinske tirozinske kinaze i transformacije stanica (*Drexler i sur., 1998*).

Tumorski supresorski geni imaju ulogu u rastu stanica, proliferaciji stanica, mehanizmima popravka DNA i ostalim ključnim staničnim signalnim funkcijama poput indukcije apoptoze. Oni inhibiraju mitogene signalne putove, inhibiraju napredovanje staničnoga ciklusa i angiogenezu, inhibiraju invaziju i metastaze, stabiliziraju genom, faktori su u popravku DNA te induciraju apoptozu. Gubitak funkcije tumorskih supresorskih gena otkriveno je u mnogim vrstama raka uključujući rak jajnika, pluća, glave i vrata, gušterače, maternice, dojke, mjehura te debelog crijeva (*Joyce i sur., 2020*). *BRCA1* i *BRCA2* jesu primjeri poznatih tumorskih supresorskih gena čije mutacije značajno povećavaju vjerojatnost razvoja određenih epitelnih zloćudnih bolesti, posebice raka dojke i jajnika (*Casaubon i sur., 2020*). Akutna mijeloična leukemija povezana je s nasljednom mutacijom u *CEBPA* genu. *CEBPA* gen kodira stvaranje CCAAT vezajućega α -proteina, transkripcijskoga faktora te se vjeruje da djeluje kao tumorski supresor (<https://medlineplus.gov>).

Pravovremeno otkriće raka uvelike pridonosi uspješnom liječenju. Mogućnosti liječenja obuhvaćaju kirurško uklanjanje tumora, zračenje, kemoterapiju, fototerapiju, imunoterapiju te, u novije vrijeme, ciljano liječenje pametnim lijekovima. Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se nakon kirurškoga odstranjivanja primarnoga tumora, dok se neoadjuvantna kemoterapija primjenjuje prije kako bi se smanjila veličina tumora te povećala vjerojatnost uspješnog liječenja. Lijekovi koji se primjenjuju u kemoterapiji su citostatici te hormonska terapija. Citostatike, ovisno o mehanizmu djelovanja, dijelimo na lijekove koji djeluju na nukleinske kiseline, antimetabolite, lijekove koji djeluju na strukturne proteine, inhibitore signalnih puteva te inhibitore različitih enzima. Njihov najveći nedostatak je što ne oštećuju samo tumorske stanice, već i normalne stanice uzrokujući brojne nuspojave. Danas se strateški razvijaju lijekovi usmjereni protiv meta specifičnih za tumore ili koji su pretjerano ekspimirani u njima, poput protein-kinaza za epidermalni faktor rasta, Bcr-Abl kinaze i kinaze povezane s angiogenezom (*Cooper i Hausman, 2010; Corrie, 2008; Katzung, 2018*).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Broj osoba oboljelih od malignih bolesti u stalnom je porastu te je to drugi najčešći uzrok smrti, nakon srčano-krvožilnih bolesti. Međutim, danas se rak smatra kroničnom bolešću te postoji stalna potreba za razvojem novih, učinkovitijih i selektivnijih citostatika. Razvoj lijeka je dugotrajan i skup proces te uključuje brojne *in vitro*, *in vivo* i *in silico* metode ispitivanja. Test citotoksičnosti spada u *in vitro* metode te je ključan u razvoju potencijalnih citostatika. Ukoliko lijek pokaže toksičan učinak u *in vitro* postupku na stanicama, korelacijom se može pretpostaviti i toksičnost *in vivo*.

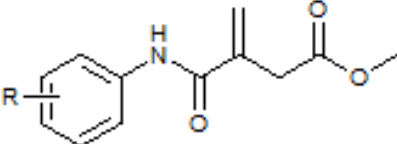
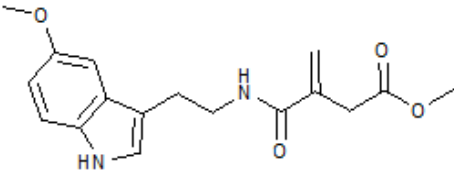
Cilj ovoga diplomskog rada jest ispitati citotoksičnost spojeva sintetiziranih na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko–biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stanicama akutne monocitne leukemije THP-1. Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline, fluoroanilina, piridina, indola, klorokina i meflokina. Itakonska kiselina bitan je dio strukture nekih protutumorskih lijekova. Antimalarici klorokin i meflokin imaju protutumorski potencijal. Također, aromatski prstenovi fluoroanilin, piridin i indol prisutni su u strukturi mnogih citostatika kao što su sorafenib, imatinib te sunitinib (*Perković i sur., 2020; Verbaanderd i sur., 2017*).

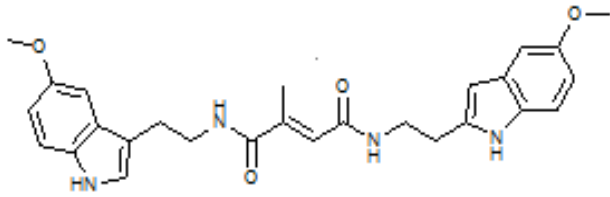
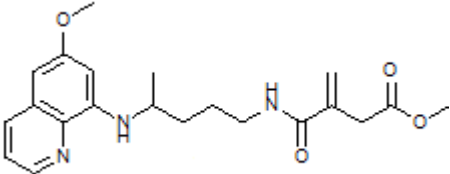
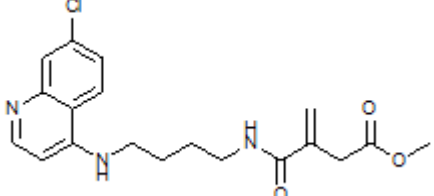
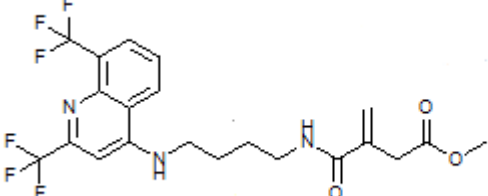
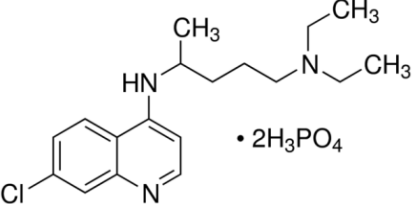
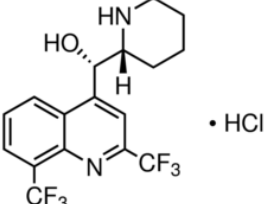
3. MATERIJALI I METODE

3.1 Testirani spojevi

Korišteni su spojevi sintetizirani pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Zorc te suradnika Perković I., Beus M., Schols D., Persoons L., Uzelac L., Kralj M na Zavodu za Farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ispitano je ukupno 10 derivata itakonske kiseline, označenih kao V1, V2, V3, V4, V6, V8, V9, MI3, MI5, MI7 te kinolonski antimalarici klorokin-difosfat (CQ) i meflokin-hidroklorid (MQ) (*Perković i sur., 2020*).

Tablica 1. Pregled korištenih spojeva

SPOJ	STRUKTURA	KEMIJSKO IME
V1 (R=p-F)		metil 3-[(4-fluorofenil) karbamonil]but-3-enoat
V2 (R=m-CF₃)		metil 3-[[3- trifluorometil) fenil]karbamonil}but-3-enoat
V3 (R=p-CF₃)		metil 3-[[4-trifluorometil) fenil]karbamonil}but-3-enoat
V4 (R=H)		metil 3-[(piridin-3-il) karbamonil]but-3-enoat
V6 (n=1)		metil 3-[[piridin-3-il) metil]karbamonil}but-3-enoat
V8		metil-3-[[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil] karbamonil}but-3-enoat

V9		(2E)-N'-[2-(5-metoksi-1H-indol-2-il)etil]-2-metilbut-2-endiamid
MI3		metil-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)but-3-enoat
MI5		etil 3-({4-[(7-klorokinolin-4-il)amino]butil}karbamoil)but-3-enoat
MI7		metil-3-[(4-{[2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il]amino}butil)karbamoil]but-3-enoat
Klorokin difosfat		4-N-(7-klorokinolin-4-il)-N,N,1-N-dietilpentan-1,4-diamin difosfat
Meflokin hidroklorid		[2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il]-piperidin-2-ilmetanol hidroklorid

3.2 Stanične linije

U ispitivanju je korištena THP-1 stanična linija dobivena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica (TIB-202).

THP-1 je stanična linija akutne monocitne leukemije originalno izolirana iz periferne krvi jednogodišnjega muškog djeteta. THP-1 stanice uzgajaju se u suspenziji, rastu pojedinačno ili u manjim skupinama i nisu adherentne. Promjera su 12 - 14 μm , a vrijeme udvostručavanja im je otprilike 60 - 70 sati. Imaju umjerene količine bazofilne citoplazme koja sadrži male azurofilne granule i nekoliko vakuola. Jezgre stanica uvučene su i nepravilnoga oblika. Stanična linija akutne monocitne leukemije pozitivna je na prisutnost α -naftil butirata esteraza, proizvodnju lizozima, fagocitnu aktivnost i sposobnost obnavljanja odgovora T-limfocita (*Tsuchiya i sur., 1980*). Iako ih obilježava praktički besmrtni životni ciklus, stabilan fenotip i jednostavnost korištenja, njihov je nedostatak smanjena metabolička aktivnost u odnosu na monocite iz periferne krvi čovjeka (*Bosshart i Heinzelmann, 2016*).

3.3 Reagensi

Tablica 2. Korišteni reagensi

REAGENS	PROIZVOĐAČ/NAČIN IZRADE
Otopina antibiotika i antimikotika (A5955, 096M4759V)	Sigma-Aldrich
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3580, 0000360412)	Promega
Dimetil sulfoksid (DMSO) (D5879, 99H0020)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 medij (R7388, RNBB6311)	Sigma-Aldrich
Fetalni goveđi serum (FBS) (R7524, 126K3398)	Sigma-Aldrich

Fosfatni pufer PBS (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)	Za 200 mL pufera: otopiti 8,00 g NaCl, 1,38 g Na ₂ HPO ₄ , 0,29 g KH ₂ PO ₄ , 0,19 g KCl u 200 mL ultra čiste vode (miliQ H ₂ O), promiješati, otopinu filtrirati i prilagoditi pH s NaOH
Staurosporin (S4400, 120K4017)	Sigma-Aldrich
Tripansko plavilo	Sigma-Aldrich

3.4 Laboratorijski uređaji i oprema

Tablica 3. Laboratorijski uređaji i oprema

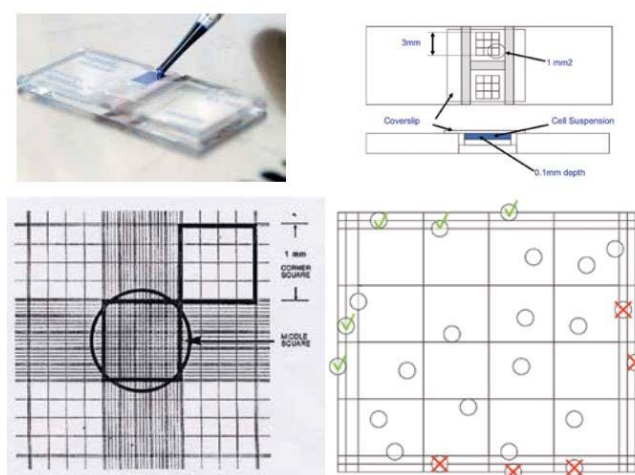
UREĐAJI I OPREMA	PROIZVOĐAČ/MODEL
Boce za uzgoj stanica, 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH
Centrifuga	Centrifuge 5810R Eppendorf
Plastične epruvetice	Eppendorf
Inkubator s kontroliranom atmosferom CO ₂ ,	Jouan Ig650
Kivete	
Komora za sterilni rad, MSC-ADVANTAGE	Thermo Fisher Scientific
Invertni mikroskop, Axio Vert S100	Zeiss
Neubauerova komorica za brojanje stanica	ImProved Neubauer MillScience
Mikropipete (obične i multikanalne)	Ranin
Pločice s 96 jažica, Cell Culture Plate with Lid, SIAL0596	Sigma-Aldrich
SpectraMax i3x	Molecular Devices

3.5 Uzgoj staničnih kultura

THP-1 stanice uzgajane su u hranjivom mediju za rast RPMI 1640 u kojega su dodani 10 % fetalni goveđi serum (FBS) te 1 % suspenzija antibiotika i antimikotika. Stanice su presađivane u komori za sterilni rad, što uključuje centrifugiranje stanične suspenzije (300 g, 8 minuta), nakon čega je supernatant odliven te talog stanica resuspendiran u odgovarajućoj količini hranjivog medija. Tako pripremljena stanična suspenzija stavljena je u bocu za uzgoj stanica te inkubirana u CO₂ inkubatoru pri odgovarajućim uvjetima atmosfere (95 % zraka, 5 % CO₂, 90 % vlažnosti) i temperature (37 °C). Za održavanje staničnih linija stanice su presađivane 2-3 puta na tjedan. Stanice korištene u pokusu presađivane su 7 puta.

3.6 Određivanje broja stanica bojanjem tripanskim plavilom

Pomiješano je 10 µL suspenzije stanica te 90 µL 0,4 % otopine tripanskog plavila u PBS-u. Alikvot od 10 µL pripremljene otopine nanešen je na Neubauerovu komoricu za brojanje. Brojenjem stanica u predviđenim komorama te množenjem dobivene srednje vrijednosti s indeksom pločice (10000) i razrjeđenjem (10x) utvrđen je broj stanica u 1mL suspenzije. Stanice su izbrojene u 3 kvadranta uključujući stanice na lijevom i gornjem kutu, a isključujući stanice na desnom i donjem kutu (Slika 3).



Slika 3. Neubauerova komorica za brojanje stanica (preuzeto s: <https://www.sigmaaldrich.com>)

3.7 Određivanje citotoksičnosti MTS testom

THP-1 stanice su nasađene na pločice s 96 jažica, u koncentraciji od 35 000 stanica po jažici. Stanice su tretirane prethodno pripremljenim otopinama sintetskih spojeva u koncentracijama 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM. Kao kontrolni spoj u testu je korišten staurosporin u koncentracijskom rasponu od 10 μM do 1 pM. Kao negativna kontrola korišten je stanični medij, a kao pozitivna kontrola suspenzija stanica. Kao kontrola korišten je i DMSO, otapalo u kojem su otopljeni spojevi, budući da je u visokim koncentracijama i sam toksičan. Sve je rađeno u duplikatu. Ploče su inkubirane preko noći na 37 °C u atmosferi s 5 % CO_2 .

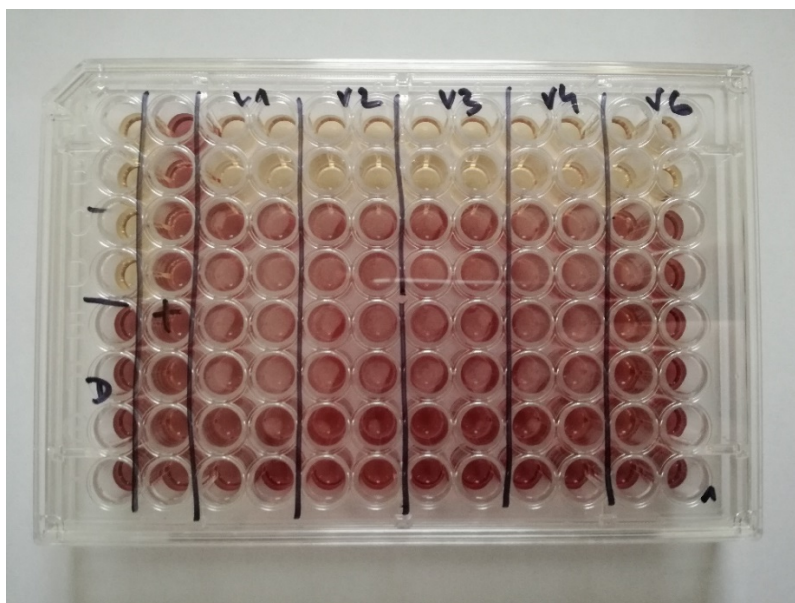
Nakon dodatka MTS supstrata, ploče su inkubirane 6 sati na 37 °C u atmosferi s 5 % CO_2 . Koncentracija formazana, koja je proporcionalna broju živih stanica, izmjerena je spektrofotometrijski na 490 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra.

4. REZULTATI I RASPRAVA

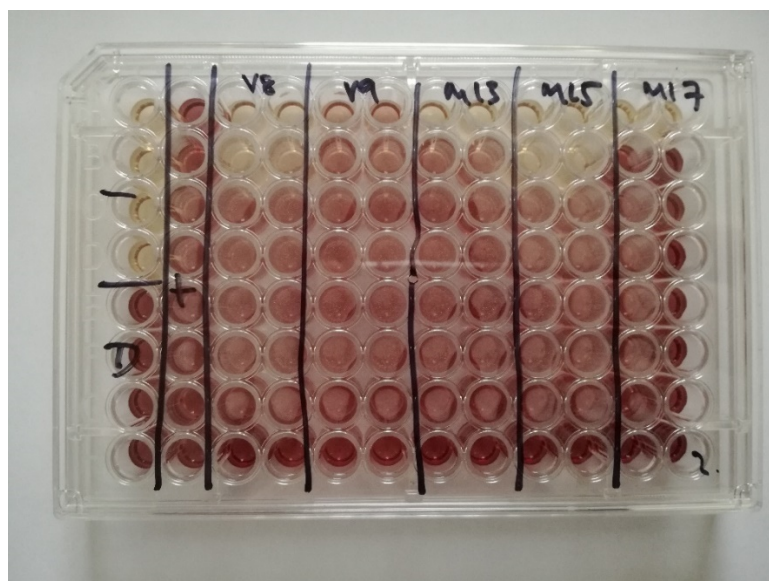
U ovom istraživanju kultura stanica akutne monocitne leukemije THP-1 tretirana je s ukupno 13 sintetskih spojeva: 10 derivata itakonske kiseline, klorokin-difosfat, meflokin-hidrokloridom i staurosporinom.

Itakonska kiselina, fluoroanilin, piridin i indol korišteni su u sintezi novih spojeva zato što su se pokazali kao bitan farmakofor u strukturi mnogih citostatika. Klorokin-difosfat i meflokin-hidroklorid su kinolonski antimalarici. S obzirom da različiti antimalarici pokazuju izravnu ili posrednu aktivnost protiv tumorskih stanica, koriste se u brojnim kliničkim ispitivanjima protiv različitih vrsta tumora. Mogu se koristiti sami ili u kombinaciji s konvecionalnim protutumorskim lijekovima (*Choi i sur., 2016*). Staurosporin je inhibitor proteinskih kinaza te se koristi u istraživanjima kao usporedni standard indukcije stanične smrti.

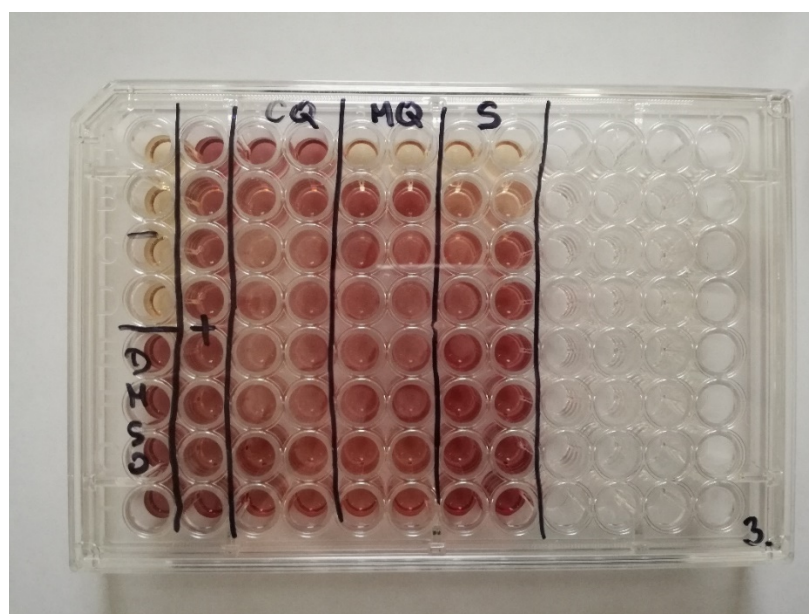
Citotoksičnost sintetskih spojeva ispitivana je na THP-1 staničnoj liniji nakon 24 sata inkubacije u CO₂ inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO₂, te 95% vlažnosti, a preživljavanje stanica određeno je MTS testom (Slike 4, 5 i 6).



Slika 4. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva **V1, V2, V3, V4, V6**



Slika 5. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva V8, V9, MI3, MI5, MI7



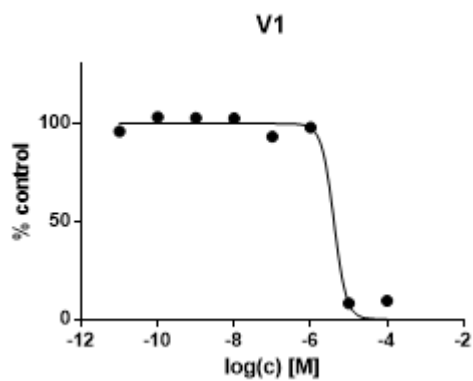
Slika 6. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva klorokina (CQ), meflokina (MQ) i staurosporina (S).

Rezultati ispitivanja su prikazani u Tablici 4. Citotoksični učinak je izražen kao IC₅₀ vrijednost, odnosno kao koncentracija ispitivanoga spoja pri kojoj preživljavanje stanica iznosi 50 %.

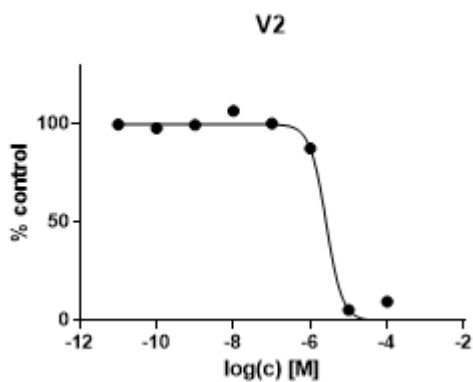
Tablica 4. Citotoksična aktivnost spojeva ispitana na kulturi stanica akutne monocitne leukemije THP-1

SPOJ	IC ₅₀ (uM)
V1	4,11
V2	2,59
V3	2,52
V4	2,79
V6	3,17
V8	4,62
V9	62,5
MI3	18,07
MI5	1,99
MI7	34,09
CQ	>100
MQ	19,17
staurosporin	0,4

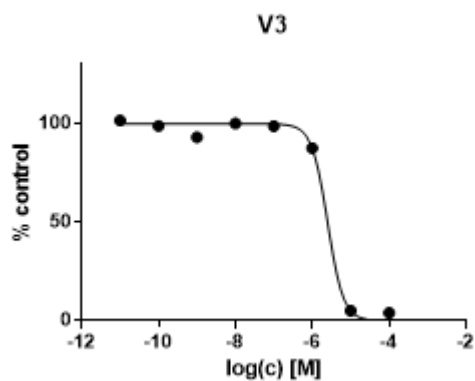
Rezultati mjerenja citotoksične aktivnosti anilinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.1, 4.2 i 4.3. Spoj V1 derivat je itakonske kiseline i fluoroanilina te pokazuje nešto manji citotoksični učinak u odnosu na spojeve V2 i V3 koji su derivati itakonske kiseline i trifluorometilanilina, a međusobno se razlikuju po položaju trifluormetilne skupine.



Graf 4.1 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V1

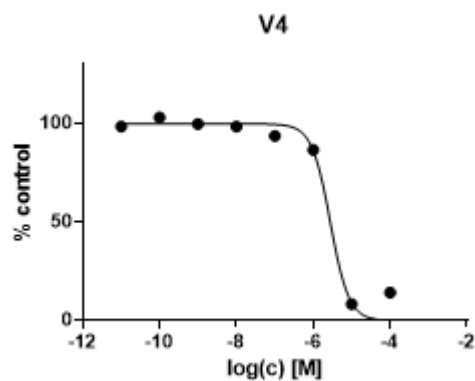


Graf 4.2 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V2

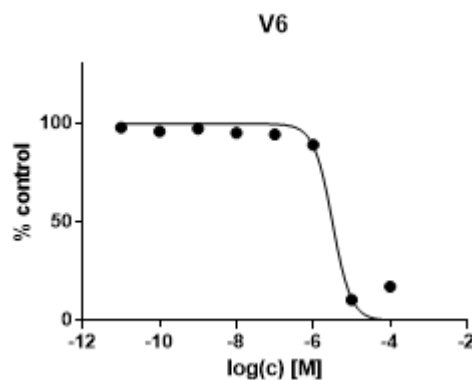


Graf 4.3 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V3

Rezultati mjerenja citotoksične aktivnosti piridinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.4 i 4.5. Spoj V4 je derivat itakonske kiseline i piridina te je pokazao citotoksičnost blisku spojevima V2 i V3. Iz dobivenih rezultata, može se očitati kako je produljenje alifatskog lanca za jednu metilensku skupinu kod spoja V6, smanjilo citotoksični učinak.

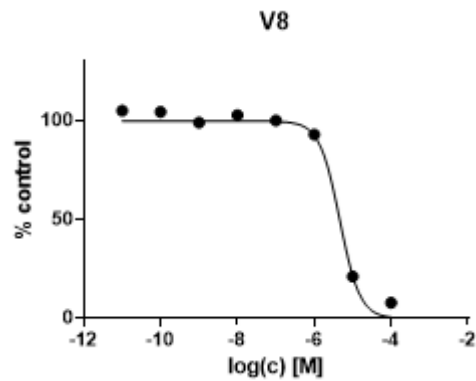


Graf 4.4 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V4

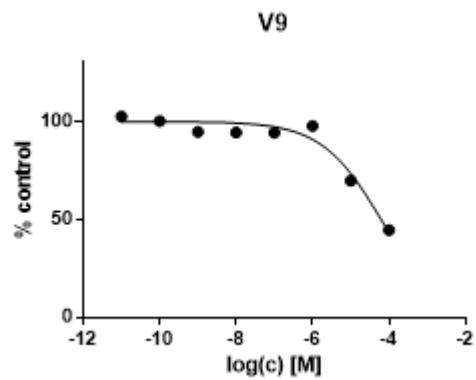


Graf 4.5 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V6

Rezultati mjerenja citotoksične aktivnosti indolskih derivata prikazani su na Grafovima 4.6 i 4.7. Spojevi V8 i V9 su derivati itakonske kiseline i indola, no V9 sadrži dvije molekule indola u strukturi kao simetrični homodimer te je u ovom ispitivanju pokazao značajno manju citotoksičnost u odnosu na V8.

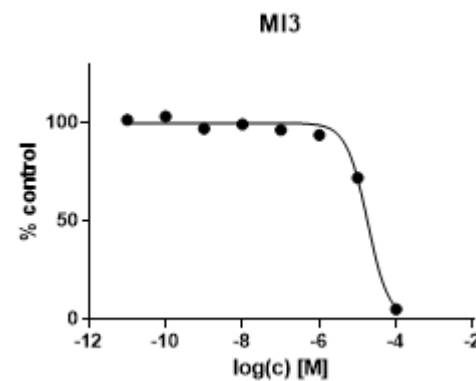


Graf 4.6 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V8

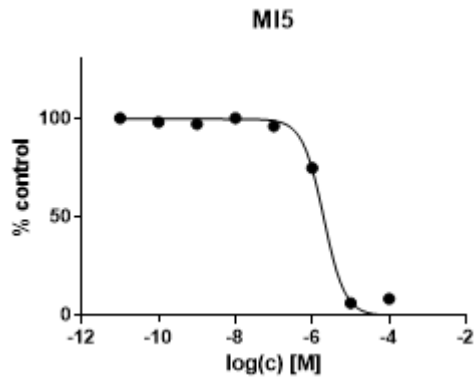


Graf 4.7 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja V9

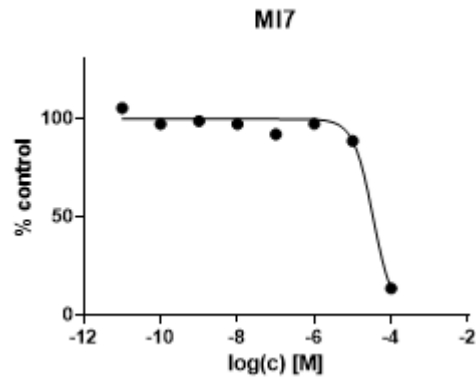
Rezultati mjerenja citotoksične aktivnosti konjugata itakonske kiseline i kinolinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.8, 4.9 i 4.10.



Graf 4.8 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja MI3

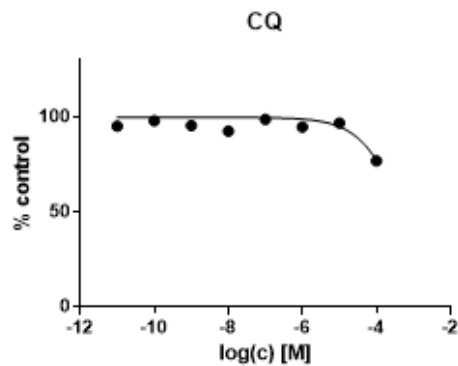


Graf 4.9 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja MI5

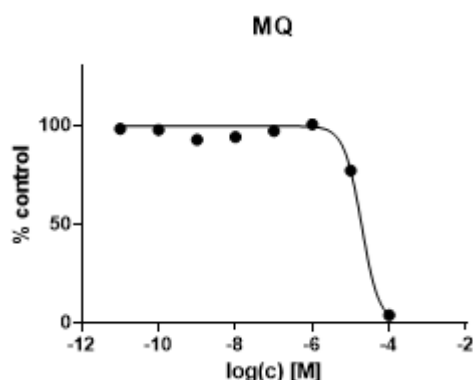


Graf 4.10 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja MI7

Rezultati mjerenja citotoksične aktivnosti antimalarika klorokin-difosfata i meflokin-hidroklorida prikazani su na Grafovima 4.11 i 4.12.



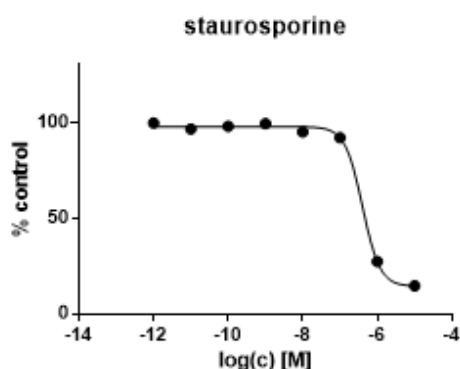
Graf 4.11 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja CQ



Graf 4.12 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja MQ

Konjugat itakonske kiseline i primakina, MI3 pokazao je određeni citotoksični učinak. Najtoksičniji spoj u ovom ispitivanju je bio MI5, konjugat itakonske kiseline i klorokina, koji pokazuje drastičnu razliku u učinku u odnosu na klorokin-difosfat. MI7 je konjugat itakonske kiseline i meflokina te pokazuje određenu citotoksičnost, no nešto manju u usporedbi s meflokin-hidrokloridom.

Rezultat mjerenja citotoksične aktivnosti standarda staurosporina prikazan je na Grafu 4.13. Uspoređujući sa staurosporinom, svi sintetski spojevi imaju veću IC_{50} vrijednost odnosno pokazuju manju citotoksičnost. Kao novi protutumorski lijek s najviše potencijala može se razmatrati konjugat itakonske kiseline i klorokina, MI5. Značajniju citotoksičnost pokazali su i spojevi V2, V3, V4 i V6, te V1 i V8.



Graf 4.13 Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji staurosporina

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- ✓ Svi ispitivani spojevi u određenim koncentracijama toksični su za stanice akutne monocitne leukemije THP-1.
- ✓ Od ispitivanih suspstanci, najznačajniju citotoksičnost pokazuje spoj MI5 čija IC_{50} vrijednost iznosi 1,99 μM .
- ✓ Klorokin-difosfat ne pokazuje značajni toksični učinak te je njegova IC_{50} vrijednost veća od 100 μM .
- ✓ Usporedbom s kontrolnim spojem, staurosporinom, kojemu je izmjerena IC_{50} vrijednost od 0,4 μM , citotoksičnost ispitivanih spojeva je manja, no daljnim ispitivanjima i modifikacijama u strukturi može se povećati njihov citotoksični učinak.

6. LITERATURA

Aschner M, Suñol C, Bal-Price A. Cell Culture Techniques. *Neuromethods*, 2011.

Bosshart H. i Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 2016, 4, 438.

Casaubon JT, Kashyap S, Regan JP. BRCA 1 and 2. *StatPearls*, 2020.

Cell quantification, <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-quantification>, pristupljeno 11.7.2021.

Choi AR, Kim JH, Woo YH, Kim HS, Yoon S. Anti-malarial drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells. *Anticancer Res*, 2016, 36, 1641–1648.

Cooper G, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup, peto izdanje. Medicinska naklada Zagreb, 2010, str. 15-20, 33-36, 725-734.

Cordes T, Michelucci A, Hiller K. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu Rev Nutr*, 2015, 35, 451–473.

Corrie, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 2008, 36, 24–28.

Croce, C. M. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358, 502–511.

Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 1988, 115, 61–69.

Drexler HG, MacLeod RA, Uphoff CC. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leuk Res*, 1999, 3, 207-15.

Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40, 193–236.

Familial acute myeloid leukemia with mutated CEBPA, <https://medlineplus.gov/>, pristupljeno 10.7.2021.

Fan F, Wood KV. Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2007, 5, 127–136.

Farmakovigilancija, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.7.2021.

Gibbs JB, Pompliano DL, Mosser SD, Rands E, Lingham RB, Singh SB, Scolnick EM, Kohl NE, Oliff A. Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks Ras processing in vivo. *J. Biol. Chem*, 1993, 268, 7617–7620.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, 2011, 144, 646-674.

Itakonska kiselina, https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska_kiselina, pristupljeno 20.6.2021.

Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. *StatPearls*, 2020.

Katzung GB. Basic & Clinical Pharmacology. New York, McGraw-Hill Education, 2018, str. 1-20.

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 6.

Lomakina GY, Modestova YA, Ugarova NN. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry Moscow*, 2015, 80, 701–713.

Minari R, Bordi P, Tiseo M. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5, 695–708.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55-63

MTS-assay, <https://www.sciencedirect.com>, pristupljeno 9.7.2021.

OECD Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening, 2018, Paris, OECD Publishing

OECD Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing, 2018, Paris, OECD Publishing, OECD Series on Testing and Assessment.

OECD Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, 2018, Paris, OECD Publishing, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4

OECD Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2018, Paris, OECD Publishing, Section 4

Patrick LG. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford, Oxford University Press, 2013, str. 187 - 215.

Pereira C, Costa J, Sarmiento B, Araujo F. Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. U: Concepts and models for drug permeability studies – Cell and tissue-based in vitro culture models. Sarmiento B, urednik, Elsevier, 2015, str. 57-75.

Perković I, Beus M, Schols D, Persoons L, Zorc B. Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Molecular Diversity*, 2020, 1-14.

Postupak odobranja lijeka, 2021., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.7.2021.

Riss TL, Moravec RA. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2004, 21, 51–62.

Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, Methuen & Co LTD., 1959.

Shama G, Malik DJ. The uses and abuses of rapid bioluminescencebased ATP assays, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2013, 115-125.

Somberg JC, Molnar J. The pleiotropic effects of ethacrynic acid. *Am J Ther*, 2009, 16, 102–104

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 2015, 111, A3.B.1-A3.B.3.

Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J. Cytotoxicity Assays: *In Vitro* Methods to Measure Dead Cells. U: Assay Guidance Manual. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ Jr, Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, urednici, Bethesda, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2019.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980, 26,171-6.

Ukelis U, Kramer PJ, Olejniczak K, Mueller SO. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 51, 108–118.

Van de Waterbeemd H, Gifford E. Admet in silico modeling: Towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2, 192-204.

Verbaanderd C, Maes H; Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, Agostinis P, Bouche G. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents, *eCancer*, 2017, 11, 781.

Verbanac D, Jelić D, Stepanić V, Tatić I, Žihher D, Koštrun S. Combined in silico and in vitro Approach to Drug Screening, *Croatica Chemica Acta*, 2005, 78, 133-139.

Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, Liu X, Luo X, Luo C, Chen K, Zheng M, Jiang H. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2015, 48, 488–515

Weiss JM, Davies LC, Karwan M, Ileva L, Ozaki MK, Cheng RYS, Ridnour LA, Annunziata CM, Wink DA, McVicar DW. Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumours. *J Clin Invest*, 2018, 128, 3794–3805.

What is the Difference Between MTT and MTS Assay, 2019., <https://pediaa.com>, pristupljeno 3.7.2021.

Zerkowski JA, Solaiman DKY. 2-Fatty acrylic acids: new highly derivatizable lipophilic platform molecules. *J Am Oil Chem Soc*, 2014, 91, 1225–1233.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Razvoj novoga lijeka dugotrajan je i skup proces. Nakon što se izabere bolest za koju će se razvijati novi lijek i identificira meta na koju će lijek djelovati, različitim biološkim testovima ispituje se farmakološki učinak molekula. Optimiranjem strukture molekule poboljšavaju se njena farmakodinamička i farmakokinetička svojstva. Tijekom razvoja lijeka koriste se brojne *in vitro*, *in vivo* i *in silico* metode. Testovi citotoksičnosti korisni su alati u otkrivanju potencijalnih citostatika. U tu svrhu, zbog jednostavnosti korištenja i lakoće manipuliranja, često se koriste stanične linije. Uslijed velikog broja oboljelih od malignih bolesti i neadekvatne postojeće terapije, postoji stalna potreba za razvojem učinkovitijih i selektivnijih citostatika.

U ovom su radu ispitani derivati itakonske kiseline kao potencijalni citostatici. Ispitivanje je provedeno na stanicama akutne monocitne leukemije THP-1. Nakon što su stanice tretirane otopinom sintetskih spojeva u različitim koncentracijama, određena je vijabilnost stanica pomoću MTS testa. Rezultati su prikazani u obliku IC_{50} vrijednosti. Svi ispitivani spojevi pokazuju citotoksični učinak na stanice, a najučinkovitiji je spoj MI5, konjugat itakonske kiseline i klorokina.

The development of a new drug is a time consuming and expensive process. Once the disease for which the new drug will be developed is selected and the target on which the drug will act is identified, the pharmacological effect of the molecules is examined by various biological tests. Optimizing the drug structure improves the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. Numerous *in vitro*, *in vivo* and *in silico* methods are used during development. Cytotoxicity tests are useful tools in detecting potential cytostatics. These tests use cell lines due to the simplicity and ease of manipulation. Considering the large number of patients with malignant diseases and inadequate existing therapy, there is a constant need to develop more effective and selective cytostatics.

This thesis analyzed itaconic acid derivatives as potential cytostatics. The study was performed on acute monocyte leukemia THP-1 cells. After the cells were treated with a solution of synthetic compounds at different concentrations, cell viability was determined by using the MTS assay. The results are presented in the form of IC₅₀ values. All test compounds showed cytotoxic effect on cells, with the most effective compound was MI5, a conjugate of itaconic acid and chloroquine.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva ulica 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI DERIVATA ITAKONSKE KISELINE KAO POTENCIJALNIH CITOSTATIKA NA THP-1 STANIČNOJ LINIJI

Mirela Šalov

SAŽETAK

Razvoj novoga lijeka dugotrajan je i skup proces. Nakon što se izabere bolest za koju će se razvijati novi lijek i identificira meta na koju će lijek djelovati, različitim biološkim testovima ispituje se farmakološki učinak molekula. Optimiranjem strukture lijeka poboljšavaju se farmakodinamička i farmakokinetička svojstva. Ukoliko lijek prođe pretkliničku i kliničku fazu razvoja, pokreće se postupak registracije lijeka. Tijekom razvoja koriste se brojne *in vitro*, *in vivo* i *in silico* metode. Testovi citotoksičnosti korisni su alati u otkrivanju potencijalnih citostatika. U tu svrhu, zbog jednostavnosti korištenja i lakoće manipuliranja, često se koriste stanične linije. Uslijed velikog broja oboljelih od malignih bolesti i neadekvatne postojeće terapije, postoji stalna potreba za razvojem učinkovitijih i selektivnijih citostatika.

U ovom su radu ispitani derivati itakonske kiseline kao potencijalni citostatici. Ispitivanje je provedeno na stanicama akutne monocitne leukemije THP-1. Nakon što su stanice tretirane otopinom sintetskih spojeva u različitim koncentracijama, određena je vijabilnost stanica pomoću MTS testa. Rezultati su prikazani u obliku IC₅₀ vrijednosti. Svi ispitivani spojevi pokazuju citotoksičnost za stanice, a najučinkovitiji je spoj MI5, konjugat itakonske kiseline i klorokina.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 19 grafičkih prikaza, 4 tablice i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citotoksičnost, derivati itakonske kiseline, THP-1 stanična linija

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Komentor: **Dr.sc. Mario Matijašić**, znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Mario Matijašić, *znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Dr. sc. Donatella Verbanac, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal biochemistry and hematology
2 Domagojeva Street, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CYTOTOXICITY TESTING OF ITACONIC ACID DERIVATIVES AS POTENTIAL CYTOSTATICS ON THP-1 CELL LINE

Mirela Šalov

SUMMARY

The development of a new drug is a time consuming and expensive process. Once the disease for which the new drug will be developed is selected and the target on which the drug will act is identified, the pharmacological effect of the molecules is examined by various biological tests. Optimizing the drug structure improves the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. If the drug passes the preclinical and clinical phase of development, the drug registration procedure is initiated. Numerous in vitro, in vivo and in silico methods are used during development. Cytotoxicity tests are useful tools in detecting potential cytostatics. They use cell lines due to the simplicity and ease of manipulation. Considering the large number of patients with malignant diseases and inadequate existing therapy, there is a constant need to develop more effective and selective cytostatics.

This thesis analyzed itaconic acid derivatives as potential cytostatics. The study was performed on acute monocyte leukemia THP-1 cells. After the cells were treated with a solution of synthetic compounds at different concentrations, cell viability was determined by using the MTS assay. The results are presented in the form of IC50 values. All test compounds were cytotoxic for cells but the most effective compound was MI5 which is a conjugate of itaconic acid and chloroquine.

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

Thesis includes: 45 pages, 19 figures, 4 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cytotoxicity, itaconic acid derivates, THP-1 cell line

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-Mentor: **Mario Matijašić, Ph.D.** *Research accociate*, University of Zagreb School of Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mario Matijašić, Ph.D. *Research associate*, University of Zagreb School of Medicine

Donatella Verbanec, Ph.D. *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021.