

**Sveučilište Josipa Jurja Strossayera u Osijeku**

**Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne  
bioznanosti**

**Katarina Mišković, dipl.ing.**

**BIOLOŠKI UČINCI NOVIH MONOMETINSKIH CIJANINSKIH  
DERIVATA**

**Doktorska disertacija predložena Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne  
doktorske studije zbog stjecanja akademskog stupnja doktora molekularnih bioznanosti –  
modul biomedicine**

**Osijek, 2012**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti  
Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: (odabrati prema temi) Temeljne medicinske znanosti

Doktorski rad

### BIOLOŠKI UČINCI NOVIH MONOMETINSKIH CIJANINSKIH DERIVATA

Katarina Mišković, dipl.ing.

**Rad je izrađen:** Medicinski fakultet Osijek  
**Mentor br.1:** *Dr.sc.Mirela Baus Lončar, izv.prof.*  
**Mentor br.2:** *Dr.sc.Ljubica Glavaš-Obrovac, red.prof.*

#### Kratki sažetak magistarskog/Dokorskog rada ili disertacije

Četnaest novo sintetiziranih monometinskih cijaninskih derivata (MCD) na osnovi monomernih TO i YO boja vežu se za DNK mehanizmom vezanja za mali utor, izuzev MCD 8 koji se interkalira u DNK. Derivati pokazuju blagu do veliku citotoksičnost na panelu od 11 tumorskih linija u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji. MCD 4, 8 i 14 su odabrani za daljnje *in vitro* i *in vivo* analize. MCD 4 zaustavlja stanični ciklus G2/M fazi i izvrstan je kandidat za fluorescentnu mikroskopiju. MCD 8 zaustavlja stanični ciklus u S i G2/M fazi i pokazao se kao izvrstan kandidat za vizualizaciju nukleinskih kiselina. Na mišjem modelu toksičnost MCD 4 je veća u odnosu na MCD 8 koji pokazuje prolazni učinak. MCD 4 i 8 ne pokazuju protutumorski učinak na rast nerazvijenog mišjeg karcinoma dojke (4T1).

**Broj stranica:** 88

**Broj slika:** 20

**Broj tablica:** 9

**Broj literaturnih navoda:** 94

**Broj priloga:** 2

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** monometinski cijaninski derivati, citotoksičnost, fluorescencija, vizualizacija, protutumorski učinak

**Datum obrane:** 11. lipnja 2012.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof.dr.sc.** Jerko Barbić, izv.profesor, predsjednik
2. **Prof.dr.sc. Mirela Baus Lončar**, izv.profesor, mentor I
3. **Prof.dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac**, redovni profesor, mentor II
4. **Dr.sc.Ivo Piantanida**, znan.savjetnik, član
5. **Dr.sc.Ruža Frkanec**, docent, član
6. **Prof.dr.sc. Biserka Žinić**, izv.profesor, zamjena člana

**Rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku Europske avenije 24.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
Institute Ruđer Bošković, Zagreb  
University of Dubrovnik  
University postgraduate interdisciplinary study Molecular bioscience  
Scientific Area: Biomedicine and health  
Scientific Field: Basic medical science

PhD thesis

### BIOLOGICAL EFFECT OF NOVEL MONOMETHINE CYANINE DERIVATIVES

Katarina Mišković, dipl.ing.

Thesis performed at Medical faculty Osijek  
Supervisor 1: *Dr.sc.Mirela Baus Lončar*, Associate Professor  
Supervisor 2: *Dr.sc.Ljubica Glavaš-Obrovac*, full professor

#### Short abstract

Monomeric TO and YO dyes were used as a base for synthesis a fourteen novel monomethine cyanine derivatives (MCD). All derivatives react with DNA as DNA minor groove binders except MCD 8 who is intercalator. On panel of 11 tumour cell lines MCDs expressed mild to strong cytotoxicity depending on applied concentration. For further *in vivo* and *in vitro* analysis MCD 4, 8 and 14 were chosen. MCD 4 stops cell cycle in G2/M phase. It is excellent candidate for dye in fluorescent microscopy. MCD 8 interferes with cell cycle at S and G2/M. It is good candidate for nuclear acids visualization. On toxicity level MCD 4 expressed higher effect compared to reversible MCD 8 effect. They do not suppress growth of undeveloped mouse breast carcinoma (4T1).

Number of pages: 88

Number of figures: 20

Number of tables: 9

Number of references: 94

Original in: Croatian

Key words: monomethine cyanine derivatives, cytotoxicity, fluorescence, visualization, antitumor effect

Date of the thesis defense: 11. june 2012.

#### Reviewers:

1. **Prof.dr.sc.** Jerko Barbić, izv.profesor, predsjednik
2. **Prof.dr.sc. Mirela Baus Lončar**, izv.profesor, mentor I
3. **Prof.dr.sc. Lubica Glavaš-Obrovac**, redovni profesor, mentor II
4. **Dr.sc.Ivo Piantanida**, znan.savjetnik, član
5. **Dr.sc.Ruža Frkanec**, docent, član
6. **Prof.dr.sc. Biserka Žinić**, izv.profesor, zamjena člana

Thesis deposited in: National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb.; University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3; City and University Library in Osijek Europske avenije 24

Doktorska disertacija je izrađena na Medicinskom fakultetu Osijek u sklopu dva projekta : “Uloga malih zaštitnih TFF proteina u zdravlju i bolesti” (219-0982914-2179) pod vodstvom prof.dr.sc.Mirele Baus Lončar i prof.dr.sc.Ljubice Glavaš-Obrovac, voditelja projekta “Mehanizam bioloških učinaka novih malih molekula na stanice tumora čovjeka” (219-0982914-2176). Disertacija je izrađena u sklopu Sveučilišnog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti pri Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

# SADRŽAJ:

SAŽETAK

ABSTRACT

<b>1.UVOD</b> .....	1
<b>2.LITERATURNI PREGLED</b> .....	4
2.1. Cijaninske boje – mehanizam vezanja cijaninskih boja i fluorescencija u službi detekcije.....	8
2.2. Stanični ciklus .....	10
2.3.Ksenobiotici .....	13
2.4.Mišji model - <i>in vivo</i> testiranje .....	14
<b>3.MATERIJAL I METODE</b> .....	16
3.1. Materijal.....	16
3.1.1. Ispitivani spojevi .....	17
3.1.2. Stanične linije.....	18
3.1.3. Laboratorijski miševi .....	18
3.1.4. Kemikalije .....	19
3.2. Metode <i>in vitro</i> .....	19
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i> .....	19
3.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka MTT testom .....	20
3.2.3. Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija.....	21
3.2.4. Stanični ciklus.....	22
3.3. Vizualizacija nukleinskih kiselina .....	24

3.4. Pokusi <i>in vivo</i> na mišjem modelu .....	24
3.4.1. Up and down metoda – određivanje letalne i optimalne doze .....	25
3.4.2. Akutna i kronična toksičnost ispitivanih spojeva .....	26
3.4.2.1. Hematološki i biokemijski parametri.....	26
3.4.2.2. Histomorfološka analiza organa životinja .....	27
3.4.3. Utvrđivanje protutumorskog učinka <i>in vivo</i> na tumorskom modelu .....	28
3.4.3.1. Priprema stanične suspenzije tumorskih stanica i implantacija.....	28
3.4.3.2. Procjena protutumorskog učinka .....	29
3.5. Statistička obrada podataka .....	29
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
4.1. <i>In vitro</i> istraživanje.....	32
4.1.1. Citotoksični učinak monometinskih cijaninskih derivata (MCD )1-14 .....	32
4.1.2. Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija MCD 4,8,14.....	34
4.1.3. Stanični ciklus MCD 4 i 8 .....	38
4.2. Vizualizacija nukleinskih kiselina pomoću MCD 4,8,14 .....	41
4.3. <i>In vivo</i> učinak MCD 4 i 8 spojeva .....	44
4.3.1. Procijena toksičnosti MCD 4 i 8 .....	44
4.3.1.1. Određivanje letalne i optimalne doze Up and down metodom.....	44
4.3.1.2. Utjecaj na hematološke i biokemijske parametre.....	49
4.3.1.3. Histomorfološka analiza organa .....	54
4.3.2. Učinak MCD 4 i 8 na rast implantiranog tumora .....	59
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>61</b>

**6.ZAKLJUČAK..... 70**

**7.LITERATURA..... 73**

**PRILOZI**

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ŽIVOTOPIS

## **1. Uvod**



Kemija, a posebno organska kemija, je vrlo široko područje koje je snažno povezano i inkorporirano u sve faze kreiranja novog lijeka, od otkrića, dizajna do krajnjeg produkta. Kako spoznaje o kemiji života sve više rastu, tako se na molekularnoj razini počinju razumijevati kompleksne međustanične i unutrastanične interakcije. Upravo razumijevanje na molekularnoj razini omogućuje dizajniranje molekula koje su selektivno pogodne za interakciju sa ciljnom biološkom metom budući da je učinak lijeka uvijek rezultat kemijske interakcije [6]. Kako su tumorska oboljenja jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu razvoj antitumorskih lijekova je otvoreno područje za istraživanje. Procjenjuje se da je 2006.g u Europi umrlo 1,7 milijuna ljudi od tumora, a prema prognozama postotak tumorskih oboljenja će nadalje biti u porastu uglavnom zbog sve starije populacije. Upravo stoga postoji stalni interes za razvojem novih lijekova [56] koji bi djelovali sami ili kao nadopuna već postojećim terapijama. Tumorske stanice imaju sposobnost brzog dijeljenja i često poremećen mehanizam popravka DNK i kontrole staničnog ciklusa. Jedan od mehanizama djelovanja citotoksičnih protutumorskih spojeva je direktno vezanje na DNK što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa tumorskih stanica i njihovog uništenja. Iz tog razloga su male molekule sa sposobnošću vezanja za nukleinske kiseline od velikog interesa u razvoju protutumorskih lijekova. Preduvjet njihovu razvoju u smjeru protutumorskih lijekova je poznavanje prirode njihove interakcije s molekulom DNK. Dva su osnovna modela nekovalentnog vezivanja molekule za DNK: interkaliranje i vezanje za mali utor DNK (eng. DNA binder) [35]. Organske molekule koje se vežu za mali utor DNK imaju široki raspon biološke aktivnosti: osim što pokazuju antiparazitsku, antibakterijsku, antigljivičnu i antiviralnu aktivnost [62], značajne su u biotehnologiji kao fluorescentni spojevi [44]. DNK vezujući spojevi mogu se isto tako primijeniti i za pojačavanje citotoksičnog učinka DNK alkilatora i drugih DNK djelujućih spojeva s ciljem njihove primjene u manjoj koncentraciji kako bi se smanjile nepoželjne nuspojave [63]. Neki od, za mali utor vezujućih spojeva, su u fazi kliničkog testiranja i čine novu obitelj protutumorskih lijekova [16] poput Tallimustina, derivata distamicina A. Monometinski cijaninski derivati velika su grupa spojeva i sintetiziraju se kao modifikacije dvije osnovne monomerne boje: oksazol žute (YO) i tiazol narančaste (TO). Za njih je utvrđeno da imaju sposobnost vezanja na molekulu DNK te da pokazuju sposobnost fluorescencije. Detekcija na osnovu fluorescencije je široko rasprostranjena metoda u medicinskim testovima uključujući DNK analizu poput detekcija na gelu, DNK mikro test genske ekspresije (eng. micro array) ili DNK sekvencioniranje. Potreba za novim, stabilnim, ne toksičnim i financijski dostupnim fluorescentnim probama je vrlo velika i stalno prisutna. Stoga pronalazak novih spojeva sa dvostrukim potencijalom poput monometinskih cijaninskih derivata otvara velike mogućnosti istraživanja usmjerene na dvije strane: protutumorski efekt i fluorescentno obilježavanje nukleinskih kiselina. Predklinička evaluacija uključuje *in vitro* analize prirodnih supstanci i

njihovih derivata na specifične molekulske mete. Ta evaluacija podrazumijeva testove apoptoze, mitoze, kontrole staničnog ciklusa, prijenosa signala, provjera citotoksičnosti na kultiviranim tumorskim i normalnim stanicama, te provjera antitumorske aktivnosti *in vivo* na animalnom modelu [13]. Cilj ovog istraživanja je procijeniti protutumorski učinak monometinskih cijaninskih derivata i njihovu potencijalnu primjenu kao novih fluorescentnih boja za obilježavanje nukleinskih kiselina. U skladu sa zadanim ciljem postavljena je hipoteza koja pretpostavlja da novosintetizirani monometinski cijaninski derivati:

1. djeluju toksično na tumorske stanične linije uz poštediti učinak na normalne stanične linije
2. pokazuju neznatan ili nikakav citotoksični učinak na zdrava tkiva uz zaustavljanje rasta tumorske mase
3. pokazuju specifičan mehanizma vezivanja za DNK/RNK što utječe na njihov biološki učinak
4. imaju sposobnost fluorescencije s potencijalnom primjenom pri vizualizaciji stanica i nukleinskih kiselina

Na osnovu postavljenih ciljeva, očekuje se odabir jednog ili više monometinskih cijaninskih derivata kao kandidata za daljnji razvoj u protutumorskoj terapiji, odnosno daljnji razvoj i komercijalizacija jednog ili više derivate u području obilježavanja i vizualizacije nukleinskih kiselina.

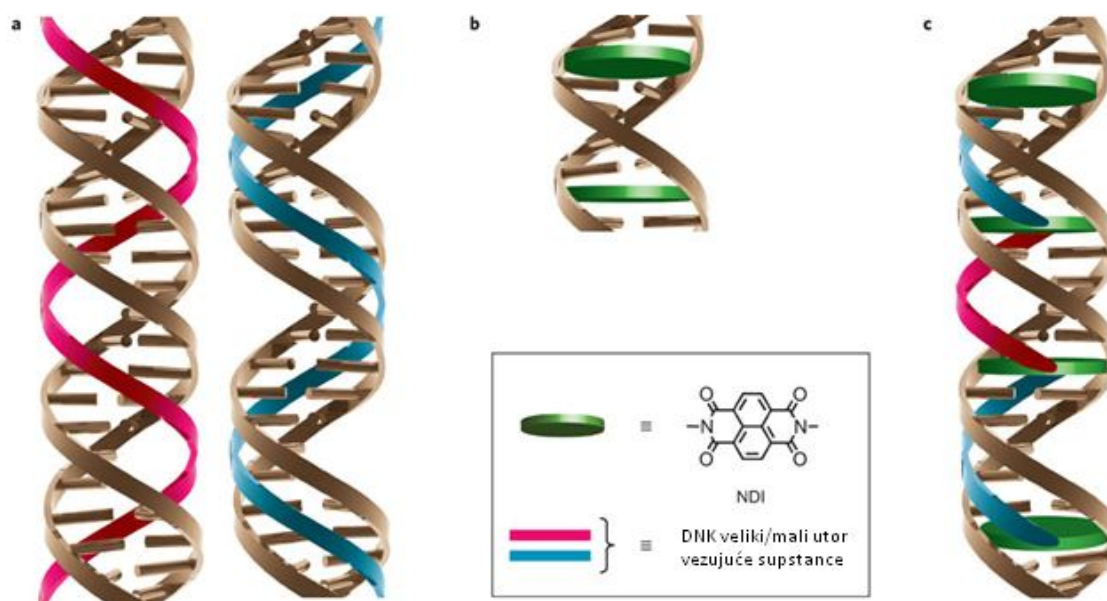
## **2. Literaturni pregled**

Maligna oboljenja predstavljaju široku skupinu neoplazmi s različitim genetskim abnormalnostima i varijabilnim odgovorom na terapiju [53]. Iako su kliničke slike tumorskih oboljenja izuzetno različite i heterogene ispod te velike varijabilnosti leži relativno mali broj „kritičnih događaja“ koji su nužni za razvoj bilo kojeg tipa tumora [25]. Izazov za znanstvenu zajednicu je utvrđivanje i razumijevanje molekularne osnove osnovnih događaja u procesu tumorske preobrazbe stanica koji dovode do progresije bolesti kao i razvoj terapija koje djeluju specifično i usmjerene su upravo na te „kritične“ događaje [25,73]. Cilj razvoja novih protutumorskih lijekova - kemoterapeutika dizajn je novih kemijskih spojeva koji bi imali izuzetnu učinkovitost i povećanu selektivnost. Jedan od novih pristupa je sinteza malih molekula sa sposobnošću prepoznavanja i vezanja za specifičan slijed u DNK [75].

Spojevi koji stupaju u interakcije s nukleinskim kiselinama, tj. deoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) - mogu se podijeliti u dvije glavne grupe: interkalatori i mali/veliki utor DNK vezujući spojevi (eng. groove-binder) [19,48] (Slika 1). Umetanjem planarne molekule između susjednih parova baza dolazi do produženja molekule DNK za 3,4 Å što je jednako visini jedne baze DNK. Na mjestu umetnute molekule dolazi do odmotavanja dvostruke uzvojnice, odnosno do smanjenja uzvojitosti DNK [80]. (Ovaj način interakcije s DNK naziva se interkalacija [66]. Neki od DNK interkalatora poput doksorubicina, epirubicina, mitoksantrona i akridinil anisidida (m-AMSA) trenutno se primjenjuju u liječenju različitih karcinoma i leukemija, a brojni drugi i kao boje za nukleinske kiseline [53]. Mali utor DNK vezujući spojevi, za razliku od interkalatora, ne uzrokuju velike konformacijske promjene u DNK i vrlo su slični standardnim ključ-brava modelima za vezanje liganda i makromolekule. To su uglavnom molekule srpastog oblika [3] koje se vežu za mali utor DNK te, kao i interkalatori, imaju dokazanu kliničku primjenu u antitumorskoj i antibakterijskoj terapiji poput mitomicina [66], kromomicina A3 ili ekteinascidina [45]. Razlikuju se, osim prema načinu vezanja za DNK, koji može biti kovalentno i nekovalentno [26], i prema selektivnosti za slijed u DNK (GC, AT regija), brzini staničnog popravka oštećenja nastalog njihovim djelovanjem i prema prirodi primarne mete. Protutumorska učinkovitost im je snažno povezana s mehanizmom izazivanja smrti stanice [63].

Većina spoznaja o mehanizmu interakcije mali utor vezujućih spojeva s DNK rezultat je istraživanja na polipirolnom antibiotiku distamicinu A i netropsinu. Zbog njihovog zakrivljenog oblika, koji dobro odgovara topologiji dvostruke DNK, sposobni su stupiti u interakciju s malim utorom B oblika DNK. Distamicin A, netropsin i njihovi derivati se stoga nazivaju „oblik-selektivni“ DNK vezujući spojevi. U osnovi, što je mali utor dublji i strmiji u području AT bogate sekvence uz odsustvo 2-amino skupine gvanidina (G), to su optimalniji uvjeti za prilagodbu oblika kemijskog spoja uz maksimalnu stabilizaciju

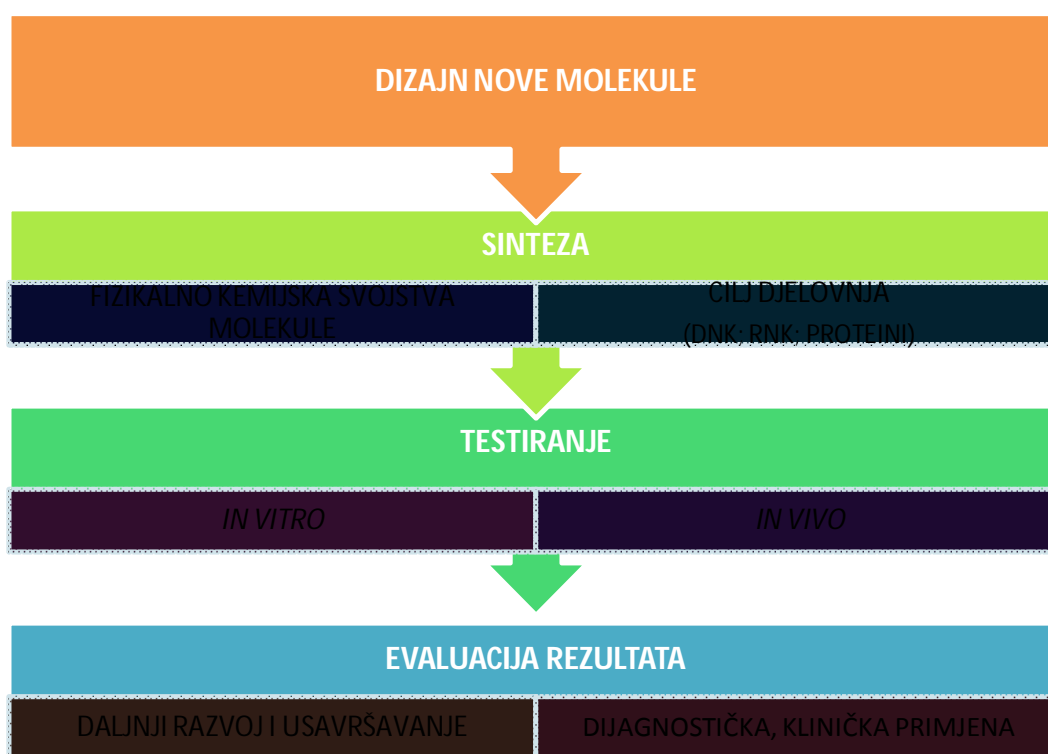
van der Waals-ovim vezama. Za ukupnu stabilnost veze ligand- DNK odgovorne su vodikove veze, koje se uspostavljaju između parova baza u unutrašnjosti utora s veznim amidima, kao i elektrostatske interakcije s protoniranim aminima [63].



**Slika 1: Mehhanizmi vezanja kemijskih spojeva za DNK molekulu** Shematski prikaz interakcije stranih molekula s molekulom DNK : **a)** proteini se uglavnom vežu u veliki utor (ružičasto), a male molekule u mali utor (plavo); **b)** umetanje interkalatora (primjer naftalen diimidin -NDI, zeleno) između susjednih parova baza **c)** kombinirani mehanizam interkaliranja i vezanja za molekula u mali i/ili veliki utor DNK (preuzeto i prilagođeno iz [78]).

Mali utor vezujući spojevi mogu se primjenjivati i kao „pojačivači“ citotoksičnog učinka DNK alkilatora i DNK kidajućih spojeva s ciljem smanjenja nepoželjnih popratnih pojava kemoterapije. Npr. distamicin A u kombinaciji s bleomicinom, C1027 i duokarmicinom A povećava cijepanje DNK i apoptozu. Njihovo sinergističko djelovanje dovodi do promjene konformacije DNK uslijed vezivanja distamicina A za mali utor što omogućuje citostatiku bolju dostupnost ciljnog slijeda DNK [63].

Za novo sintetizirani kemijski spoj za koji se *in vitro* utvrdi da stupa u interakciju s DNK treba se potvrditi mehanizam djelovanja nizom bioloških testova. *In vitro* metodama utvrđuje se dali je novo sintetizirani spoj interkalator, za mali utor DNK vezujući ligand ili inhibitor topoizomeraza. Daljnjim testovima na staničnoj razini utvrđuje se utjecaj spoja na DNK. Primjenom *in vitro* metoda prate se učinci testiranog spoja na molekularne mete koje sudjeluju u programiranoj smrti stanica, staničnom ciklusu ili prijenosu signala. Procjenjuje se citotoksičnost na tumorskim i normalnim stanicama i *in vivo* procjena protutumorskog učinak na životinjskom modelu [8]. Razvoj novog spoja od ideje do moguće primjene prikazuje Slika 2. Idealan kandidat za protutumorski lijek je spoj koji učinkovito inhibira rast tumorskih stanica bez štetnog učinka na normalne stanice, može se unijeti u organizam oralnim putom i lako se apsorbira [12]. Kriterij odabira potencijalnog protutumorskog spoja je sljedeći: *in vitro* inhibira više staničnih linija pri umjerenom niskoj koncentraciji ( $IC_{50} = 50 \mu M$  i niže), niska sistemska toksičnost (testni model: štakor,  $LD_{50} > 1920 \text{ mg/kg}$ ) i niski do umjereni oralni klirens ( $< 83 \text{ L/h}$ ) kod ljudi [12,33].



Slika 2: Shematski put razvoja nove molekule od ideje do moguće primjene

## 2.1. Cijaninske boje – mehanizam vezanja cijaninskih boja i fluorescencija u službi detekcije

Cijaninske boje su najstarije i najviše istražene obitelji umjetnih pigmenata [48]. Prvobitna primjena bila im je u fotografiji u boji, visoko energetske laserima i pohrani digitalne fotografije [11]. Osamdesetih godina 20. stoljeća Lee i suradnici otkrili su da stara fotografska boja tiazol-narančasta (eng. Thiazole orange -TO) ima izvrsna fluorescentna svojstva koja se mogu primijeniti u detekciji nukleinskih kiselina [18, 46, 47]. Upravo to otkriće povećalo je interes za primjenom cijaninskih boja u biologiji i biomedicini [18] u obliku molekularnih proba na osnovi oksazol žute (eng. Oxazole Yellow -YO) i tiazol narančaste (TO, odnosno YOYO i TOTO boja [30]. Slijedećih godina dizajnirane su, sintetizirane i komercijalizirane brojne mono i trimetinske cijaninske boje [37]. Većina fluorescentnih boja koja se danas primjenjuje za vizualizaciju DNK pripadaju cijaninskoj obitelji budući da te molekule imaju velik afinitet prema dvostrukim uzvojnica nukleinskih kiselina, jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra i brzo povećanje emisijske fluorescencije uslijed vezanja na DNK [11].

Asimetrične cijaninske boje su pobudile veliki interes zahvaljujući svojstvu dobrog bojanja nukleinskih kiselina. Vezanjem na nukleinske kiseline (dvolančane i jednolančane) pojačava se intenzitet njihove fluorescencije i često se primjenjuju za fluorescentno obilježavanje DNK kao tzv. fluorescentni DNK markeri. Asimetrične cijaninske boje su fluorescentni ligandi koji se vežu u mali utor DNK za razliku od interkalatora koji se selektivno vežu za dvostruku DNK bez mogućnosti vezanja za jednostruku DNK poput 4/6-diamidino-2-fenylindole-a (DAPI) i derivata Hoechst boje. Nadalje, usporedbom sa interkalirajućim bojama nađeno je da cijaninske boje uzrokuju manje promijene DNK uslijed vezanja. To je posebno značajno u studijama koje zahtijevaju da DNK ne bude razvučena kao što je slučaj s fluorescentnom mikroskopijom [81]. Interkaliranjem između parova baza dolazi do produženja lanca DNK u osnovi za jedan bazni par prema vezanoj boji [23]. Dodatna prednost asimetričnih cijaninskih boja kao DNK markera je njihov relativno dug apsorpcijski maksimum što smanjuje probleme pozadinske refleksije od biološkog materijala [18]. Ove boje imaju srpasti oblik koji odgovara zakrivljenosti maloga utora i istovremeno su kationi koji stabiliziraju vezivanje za negativno nabijenu DNK [1]. Stoga bi boje koje kombiniraju karakteristike liganda koji se veže za mali utor DNK i fotofizička svojstva običnih asimetričnih cijaninskih boja bile od velike važnosti za detekciju i istraživanje DNK [81].

Dva dobro proučena spoja koji se vežu na mali utor i preferiraju vezanje za A-T regiju B-DNK su Hoechst 33258 i DAPI. Uslijed vezanja za DNK intenzitet fluorescentnog signala se povećava, što je dovelo do njihove široke primjene kao fluorescentnih markera za obilježavanje DNK. Iako je porast

fluorescencije kod DAPI-a i Hoechst-a 33258 umjeren (20-30x) ono što ih čini posebnima je njihovo selektivno vezanje na dvolančanu DNK, ali ne na jednolančanu DNK [42]. U usporedbi s njima, cijaninske nesimetrične boje poput tiazol narančaste (TO) i oksazol žute (YO) postižu i do 1000x veći porast intenziteta fluorescencije nakon interkaliranja u DNK [9]. Prema tome, kombinacija povoljnih spektralnih karakteristika kakve pokazuju interkalirajuće cijaninske boje i spoj koje se vežu za mali utor DNK uz dokazanu selektivnost prema dvolančanoj DNK bila bi dobra nadopuna u procesima vizualizacije DNK [42].

Lokalizacija i cjelovitost nukleinskih kiselina u stanicama može se pratiti pomoću fluorescentnog mikroskopa zahvaljujući vezanju fluorokromnih markera. Cijaninske boje poput YO i TO uspješno se koriste u tu svrhu [23,24]. Boje za obilježavanje DNK živućih stanica koje se koriste u fluorescentnoj mikroskopiji trebaju biti slabo ili u potpunosti netoksične, jakog i postojanog intenziteta signala [36]. DAPI i Hoechst [54] su dvije cijaninske boje koje se uglavnom primjenjuju za vizualizaciju jezgre koju pod UV svjetlom bojaju plavo. Osim u fluorescentnoj mikroskopiji, boje su svoju primjenu našle i kao fluorescentne probe [82] za obilježavanje staničnih organela, detekciju proteina, konformacijske studije, protočnu citometriju, DNK sekvencioniranje, detekciju u mikročip studijama, kvantifikaciju nukleinskih kiselina, kao i u kapilarnoj i gel elektroforezi [39, 69, 43] i metodi lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) [1, 9]. SYBR Green I (patentirani komercijalni proizvod tvrtke Molecular Probes, Eugene, Oregon, SAD) jedna je od najčešće korištenih monometinskih cijaninskih boja koja omogućava praćenje sinteze produkata lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu kod metode kvantitativne reakcije lančane polimeraze [28] koja se primjenjuje za praćenje ekspresije gena. Određivanje krivulje taljenja (engl. melting curve) omogućava utvrđivanje razlika u slijedu umnoženih fragmenata NK [68]. SYBR Green I ima mali afinitet vezivanja za jednostruku DNK i veže se u mali utor dvolančane DNK [86].

Dvije serije od ukupno 14 (8+6) u ovom radu istraživanih monometinskih cijaninskih derivata (MCD) sintetizirane su na Kemijskom fakultetu Sveučilišta u Sofiji pod vodstvom prof. Todora G. Deligeorgieva. Sintetizirani su: MCD 1-14: 2-[(3-metil-(3H)-benzotiazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-metoksibenzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 1**); 2-[(3-metil-(3H)-benzooksazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-metoksibenzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 2**); 2-[(3-metil-(3H)-benzooksazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-etoksibenzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 3**); 2-[(3-metil-(3H)-benzotiazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-(2-hidroksietoksi)-benzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 4**); 2-[(3-Metil-(3H)-benzooksazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-(2-hidroksietoksi)-



benzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 5**); 2-[(3-metil-(3H)-benzooksazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-klorobenzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat (**MCD 6**); 2-[(4-metil-(5H)-pirido-[1,2-a]-pirimidin-2-iliden)-metil]-3-metilbenzotiazolium perklorat (**MCD 7**); 2-[(1-cijano-4-metil-(3H)-benzotiazolo-[3,2-a]-pirido-2-iliden)-metil]-3-metilbenzooksazolium perklorat (**MCD 8**); 1-[3-(N-tributilfosfonium)propil]-[(4-metil-4H-oksazol[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD 9**); 1-[3-(N-trifenilfosfonium)propil]-[(4-metil-4H-oksazol[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD10**); 1-[3-(N-tributilfosfonium)propil]-[(4,6-dimetil-4H-oksazol[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD 11**); 1-[3-(N-trifenilfosfonium)propil]-[(4,6-dimetil-4H-oksazol[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD 12**); 1-[3-(N-tributilfosfonium)propil]-[(4-metil-4H-tiazolo[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD 13**); 1-[3-(N-trifenilfosfonium)propil]-[(4-metil-4H-tiazolo[4,5-b]piridin-2-iliden)metil]kvinolinium dihidrid (**MCD 14**).

Sinteza, kemijska struktura i karakteristike spojeva MCD 1-8 su prethodno objavljene u radu [17]. Dokazano je da se spojevi MCD 1-8 [29] vežu za dvolančanu DNK, dok se MCD 7 i 8 vežu i na dvolančanu RNK. Dobiveni rezultati govore u prilog mali utror vezujućeg modela za MCD 1-6 i interkaliranja za MCD 7,8. Svi spojevi, osim MCD 7 su fluorokromi te je istražen i njihov potencijal fluorescentnih markera u stanicama i na izoliranim NK. Na modelu HeLa stanične linije nakon 60-120 minutne inkubacije, u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji ( $10^{-6}$  i  $10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup>), MCD 1 i 2 se lokaliziraju unutar stanice i fluoresciraju.

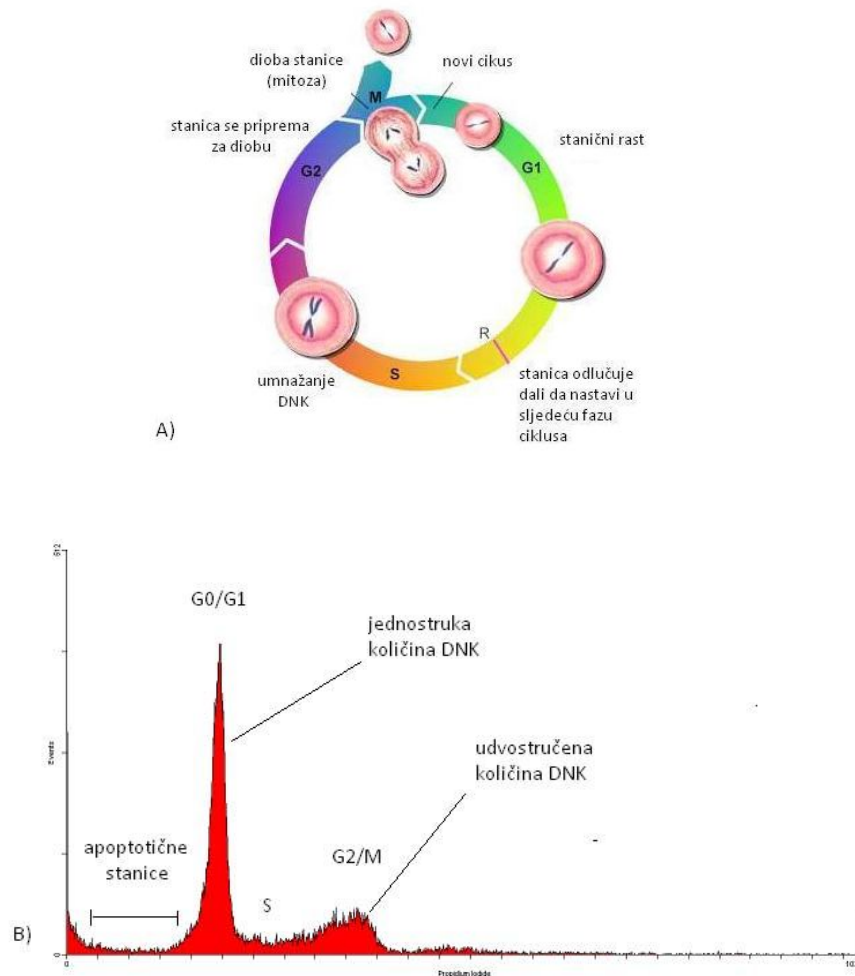
## 2.2. Stanični ciklus

Zdrave stanice našeg organizma dijele mitozom tek nakon primljenog signala o potrebi umnažanja, za razliku od tumorskih koje se dijele i bez signala o potrebi umnožavanja (Cell). Stanični ciklus reguliraju brojni proteini koji zajedno čine kontrolni sustav. Podijeljen je u 4 faze poznate kao: G1, S, G2 i M faza (Slika 3). G1 i G2 su faze rasta stanice koje omogućuju stanici da prekontrolira vanjske i unutarnje okolišne faktore kako bi bila sigurna da su ostvareni odgovarajući uvjeti za napredak u S, odnosno M fazu. U slučaju nepovoljnih izvan staničnih uvjeta, stanica može otići u posebno stanje G0 u kojem ostaje dok se uvjeti ne poboljšaju. U S (eng. synthesis) fazi dolazi do umnažanje DNK i dupliciranja kromosoma. M faza ili mitoz je karakterizirana sa dva glavna događaja: podjela jezgre i citoplazme (citokineza). Tijekom M faze duplicirani kromosomi se razdvajaju i putuju prema suprotnim polovima stanice kako bi u novo nastalim stanicama kćeri broj kromosoma bio isti kao u stanici majci. Kontrola

ciklusa odvija se kroz tri kontrolne ili restriksijske točke. Prva kontrolna točka ili „start“ točka je na kraju G1 faze. Ukoliko su izvanstanični uvjeti povoljni uz prisutne čimbenike rasta i diobe, stanica prolazi prvu kontrolnu točku i započinje dupliciranje genetičkog materijala. Druga kontrolna točka je G2/M na kraju G2 faze. U toj točki stanica kontrolira uspješnost dupliciranja genetičkog materijala i prisutnost mitogenih faktora. Prolaz kroz kontrolnu točku stanicu vodi u mitozu gdje je treća kontrolna točka na prijelazu metafaze u anafazu. U toj točki se kontrolira jesu li svi kromosomi vezani za diobeno vreteno i potiče se razdvajanje sestrinskih kromatida. Prijelaz iz jedne faze u drugu i kontrola cijelog ciklusa je pod utjecajem skupine proteinskih kinaza poznatih kao ciklin ovisne kinaze (Cdk) koje u suradnji sa ciklinima omogućuju odvijanje staničnog ciklusa kombinacijom fosforilacije/defosforilacije. U slučaju oštećenja DNK aktiviraju se posebni zaštitni mehanizmi koji zaustavljaju stanični ciklus u određenoj kontrolnoj točki [2]. Usklađenost staničnog ciklusa prema signalima iz okoline ključno je svojstvo za održavanje homeostaze u tkivu i organizmu. Obilježje tumorskih stanica je „bijeg“ od različitih kontrolnih mehanizama što dovodi do „samostalnog i samovoljnog“ umnažanja tumorskih stanica u organizmu bez stvarne potrebe. Brojni novodizajnirani antitumorski lijekovi djeluju tako da oštećuju DNK što izaziva zastoj u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivaciju procesa poznatog kao apoptoza ili programirana stanična smrt. Oštećenje DNK, uočeno u G1 kontrolnoj točki, aktivira p53 protein koji aktivira kaskadni niz reakcija koje dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa što stanici daje vrijeme za popravak oštećenja. G2/M kontrolna točka je od posebnog interesa pri dizajnu novih antitumorskih supstanci budući da zaustavljanje staničnog ciklusa u G2/M točki, može potaknuti staničnu smrt putem mitotičke katastrofe te na taj način djelovati terapijski uklanjajući tumorske stanice [2,75,85]. Na taj način djeluju alkilirajući spojevi poput npr. eteinasidina (ET-743) i MS-247, koje se vežu na mali uter i zaustavljaju stanični ciklus u G2/M točki [14,21,22,83].

Metoda praćenja udjela stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa prati sadržaj DNK unutar stanica. Stanice se prema sadržaju DNK dijele u tri grupe: stanice u G1 fazi koje sadrže ne replicirane DNK molekule, stanice u S fazi sa djelomično dupliciranim sadržajem DNK i stanice u G2 i M fazi koje sadrže repliciranu DNK tj. imaju količinu dvostruko veću količinu DNK u odnosu na G1 fazu [2]. Prosječne vrijednosti zastupljenosti faza u 1 staničnoj populaciji je 60% st. U G1, 20% u S i 20% stanica u G2/M fazi. Određivanje sadržaja DNK moguće je metodom protočne citometrije (eng. Fluorescence-activated cell sorter - FACS) uz primjenu DNK vezujućih fluorescentnih boja poput propidij jodida (eng. Propidium iodide – PI). Metoda je zasnovana na određivanju sadržaja DNK (preko intenziteta obojenja DNK sa propidij jodidom) u pojedinačnoj stanici te određivanjem udjela stanica u pojedinoj fazi. Protočni citometar je u osnovi fluorescencijski mikroskop koji može analizirati pokretne stanice u suspenziji koje

su u ovom slučaju obilježene propidij jodidom. Nakon obasjavanja stanica s UV svjetlošću stanice emitiraju fluorescencijski signal proporcionalan količini DNK unutar stanice te ih je moguće razvrstati u jedno od faza :S,G1 ili G2/M fazu. Program ugrađen u protočni citometar prevodi ove svjetlosne signale u histogram u kojem se prikazuje emitirani intenzitete fluorescencije (populacija st u S, G1 i G2/M fazi) i broj stanica koje emitiraju taj signal. Obično se prati 20 000 stanica i određuje njihova distribucija u fazama st. ciklusa. Na ovaj način preko usporedbe s kontrolnim stanicama moguće je utvrditi utječe li određeni spoj na stanični ciklus promatranih stanica i u kojoj fazi ga zaustavlja (Slika 3).



**Slika 3. Shematski prikaz staničnog ciklusa (A) i DNK histogram (B).** Karakteristične faze staničnog ciklusa (G1, S, G2, M) i prva kontrolna točka na kraju G1 faze DNK Histogram prikazuje nesinhronizirani stanični ciklus HeLa stanične linije sa karakterističnim pikovima pojedinih staničnih faza. (Slika 3A preuzeto i prilagođeno iz [87,92].

### 2.3. Ksenobiotici

Ksenobiotici su strane tvari koje se nalaze u organizmu, a ne bi trebale biti prisutne ili su prisutne u mnogo većoj koncentraciji od dozvoljene [31]. S medicinskog stajališta ksenobiotici od biološke važnosti su lijekovi, karcinogene tvari i kemikalije iz okoliša npr. insekticidi, pesticidi, poliklorirani bifenili [59]. U njihovu uklanjanju iz organizma važnu ulogu ima jetra koja neutralizira različite produkte vlastitog metabolizma kao i ksenobiotike unešene u organizam apsorpcijom preko tankoga crijeva (probava), upijanjem preko kože i udisanjem (pluća). Najčešće kratkotrajne i dugotrajne biološke posljedice okolišnih štetnih tvari odnose se na promjene u hematopoetskom sustavu [79]. Ravnoteža između procesa detoksifikacije i aktivacije tvari u organizmu ovisi o kemijskoj strukturi supstance, i određena je brojnim varijablama kao što su: genetika pojedinca, spol, endokrini status, dob, načinu prehrane i prisustvo drugih spojeva [71].

Ksenobiotici iz hrane i pića moraju proći kroz crijevni epitel, bazalnu membranu i kapilarni endotel prije ulaska u krvotok. Pet je načina prijenosa ksenobiotika duž crijeva: aktivni transport, pinocitoza, filtracija kroz pore, limfna apsorpcija i pasivna difuzija. Pasivna difuzija je glavni način apsorpcije ksenobiotika [31]. Odvija se bez utroška energije na osnovu koncentracijskog gradijenta, a tvar putuje u ovisnosti o veličini i naboju uz preduvjet propusnosti stanične membrane za taj spoj.

Enzimi koji metaboliziraju lijekove poznati su kao oksidaze miješane funkcije ili monooksigenaze i sadrže mnoge enzime uključujući citokrom P450, citokrom b<sub>5</sub>, NADPH-citokrom reduktazu i mnoge druge [71]. Enzima iz obitelji citokroma P450 najviše ima u stanicama jetre i epitelu crijeva i pri tome je smješten u glatkom endoplazmatskom retikulumu. Najvažniji enzimi u metabolizmu lijekova su članovi jedne od obitelji CYP 1, CYP 2 (A,B,C,D,E), CYP 3 [59]. Oni sudjeluju u biotransformaciji metabolita koji su toksični za jetru [31]. Najvažnije svojstvo citokroma P450 je vezanje i aktivacija dva atoma kisika [4] što se događa u prvom koraku u nizu reakcija metaboličke razgradnje.

Metabolizam ksenobiotika odvija se u dvije faze. Prva faza obuhvaća hidroksilaciju, oksidaciju, redukciju, hidrolizu, dealkilaciju i epoksidaciju pri čemu nastaje molekula smanjene toksičnosti. Hidroksilacija je najvažnija reakcija I faze ( $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R-OH + H_2O + NADP^+$ ) pri čemu uglavnom lipofilni supstrati postaju hidrofilniji [59]. Nastala molekula se može izlučiti iz organizma ili ulazi u drugi dio metaboličke transformacije koji pretpostavlja vezanje sa konjugacijskim agensom. Druga faza reakcija podrazumijeva sulfataciju, acetilaciju, metilaciju i konjugaciju sa glukuronskom kiselinom,

glutationom i glicinom. Osim što razgrađuju strane i suvišne spojeve, monooksigenaze sudjeluju u biosintezi kolesterola, stereoidnih hormona, žučnih soli i oksidaciji masnih kiselina [71].

Prehrambene navike mogu utjecati na razinu izoenzima citokroma P450 što dovodi do promjena u metabolizmu ksenobiotika [69]. Uzimanje lijeka ili nekog drugog spoja može dovesti do povećanja aktivnosti različitih jetrenih izoenzima koji su odgovorni za razgradnju istih. Ako je povećanje aktivnosti enzima koji razgrađuje lijek rezultat povećane razine enzima, tada se proces naziva indukcija, a spoj je izazivač (pojačivač). Izazivači citokroma P450 stimuliraju sintezu novih izoenzima pojačavanjem razine njihove transkripcije. Enzimi grupacije P450 su osjetljivi na promjenu temperature, tlaka, pH i prisustvo specifičnog spoja [72] poput ugljik (IV) sulfida, 2-alil-2-izopropil acetamida, barbiturata koji sadrže alile i teških metala [71]. Lipaze mijenjaju lipidnu sredinu monooksigenaza ili njihovu proteinsku strukturu mehanizmom kompeticije. Pri tome dolazi do promijene izoenzima iz aktivne P450 forme u inaktivnu P420 formu [41, 71, 84]. Formiranje P420 je konformacijska promjena koja se promatra u kontekstu fenomena „slabe točke“ reakcijskog ciklusa P450. Nastaje kao rezultat jedne od usputnih reakcije zbog promijenjenog odnosa hema i proteina uz gubitak veze cisteina i tiolata na atomu željeza popraćeno protoniranjem tiola [72]. P420 karakteriziran je Soret-om prugom na 420 nm kod CO reduciranog oblika [41] za razliku od P450 koji daje spektralnu prugu na 450 nm [72].

#### **2.4. Mišji model - *in vivo* testiranje**

Primjena životinja u farmakološkim testovima radi procjene toksičnosti nove supstancije i njenog potencijalnog protutumorskog učinka uvriježeni je model evaluacije. Jedan od najčešćih životinjskih modela su mišji modeli zbog fiziološke sličnosti sa čovjekom. Dizajn pokusa treba biti tako osmišljen da na što manjem uzorku dobijemo odgovore o poželjnim i nepoželjnim svojstvima testiranog spoja. Prvenstveno treba utvrditi razinu toksičnosti i spektar koncentracija koje se mogu primijeniti bez neželjenih posljedica. Još prije 50 godina Russel i Burch su u knjizi „The Principles of Humane Experimental Technique“ sugerirali toksikolozima da za svoje studije koriste mali broj miševa visoko srođenih sojeva. Za testiranje toksičnosti prema Festingu (Michael F.W. Festing: Improving Toxicity Screening and Drug Development by Using Genetically Defined Strains, ) preporuča se mišji model umjesto štakorskog jer su životinje manje što znači jeftinije za uzgoj, potrebno je manje spoja, sojevi su visoko srođeni što eliminira lažno negativne rezultate i njihovu raspršenost i lakše je odrediti genske

lokuse koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika definirane vrste (miša)[67]. Za određivanje toksičnog djelovanja potrebno je odrediti koncentraciju spoja koja ne izaziva smrt životinja. Nekada određivana jednokratno primijenjena doza spoja koja izaziva uginuće 50% životinje pokusne skupine (LD<sub>50</sub> doza) potpuno je uklonjena iz protokola OECD grupacije (eng. „*Organization for Economic Cooperation and Development*“) zbog nehumanosti. Razvijene su alternativne metode, a jedna od njih je i „Up and Down“ metoda (precizno opisana u poglavlju: Materijali i metode). Metoda je predložena 1940. godine od strane Alexandra Mood-a i Wilfrida Dixona i poznata je još kao „dizajn stubišta“ [88]. Upisana je pod protokolom OECD 425 [93].

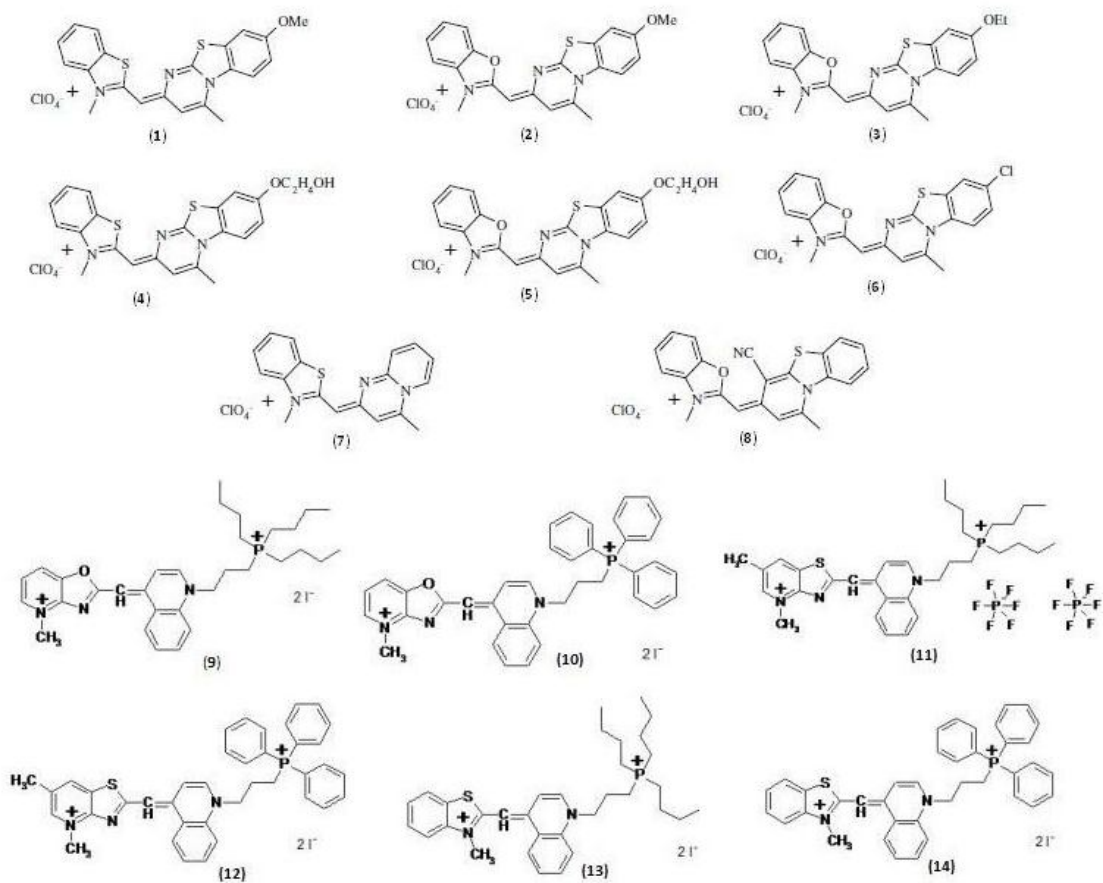
Miševi korišteni u ovom istraživanju visoko su srođeni soj na miješanoj genetičkoj podlozi C<sub>57</sub>BL/6J miša i 129S<sub>1</sub>/SvImJ gena. Miševi su nakon više od 20 generacija uparivanja braće i sestara genetički identični s genima fiksiranim na svakom lokusu i potječu od jednog ili drugog roditeljskog soja [92]. Nastali soj fenotipski daje crne ili sivo-smeđe miševe. Dobro se razmnožavaju bez pretjeranog gubitka dlake. Karakteristika 129/Sv soja visoka je spontana pojavnost teratoma testisa [90]. C<sub>57</sub>BL/B6 je sklon pretilosti uzrokovane prehranom, dijabetesu tipa 2 i aterosklerozi, očnim anomalijama, smanjenoj gustoći kostiju, gubitku dlake uslijed prekomjernog timarenja, gubitku sluha jer su homozigoti na *Cdh23<sup>ahl</sup>*, mutaciju vezanu uz gubitak sluha što dovodi do progresivne gluhoće nakon 10 mjeseci starosti. Prednosti soja su: jednostavan uzgoj, dobra produkcija, dug život i niska predispoziciju za razvoj tumora [89].

### **3. Eksperimentalni dio**

### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. Ispitivani spojevi

Monometinski cijaninski derivati 1-14 su sintetizirani na Institutu za organsku kemiju i Centru za fitokemiju u Sofiji, Bugarska, te analizirani na Odjelu za organsku kemiju i biokemiju Instituta „Ruđer Bošković“ Zagreb (Slika 1). Za potrebe *in vitro* i *in vivo* eksperimenata derivati su pripremljeni otapanjem u DMSO kao koncentrirane  $10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> otopine, a neposredno pred primjenu pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi, odnosno fiziološkoj otopini za potrebe *in vivo* pokusa.



Slika 4: Strukturene formule monometinskih cijaninskih derivata



### 3.1.2. Stanične linije

Učinak monometinskih cijaninskih derivata (MCD) ispitivan je na humanim, mišjoj i jednoj psećoj staničnoj liniji. Humane stanične linije su: adenokarcinom želuca (AGS), bronhioalveolarni karcinom (NCI-H358), adenokarcinom vrata maternice (HeLa), karcinom ždrijela (HEp-2), karcinom gušterače (MIAPaCa-2), karcinom debelog crijeva (HT-29, CaCo-2), metastaze karcinoma debelog crijeva izolirane iz limfnog čvora (SW-620), kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi (K562), leukemija T – stanica (JURKAT), limfom T – stanica (HuT-78), endotelne stanice aorte (HAEC), normalni limfociti i normalni fibroblasti (BJ). Mišja stanična linija je karcinom dojke (4T1). Epitelne stanice bubrega psa (MDCK).

Obzirom da se radi o komercijalno dostupnim staničnim linijama suglasnost etičkog povjerenstva nije nužna.

### 3.1.3. Laboratorijski miševi

Toksičnost ispitivanih spojeva određena je na divljem tipu visoko srođenih životinja razvijenih križanjem mišjih sojeva 129/Sv i C57BL/6j. Životinje su uzgojene u Vivariju – uzgojnoj i eksperimentalnoj jedinici Medicinskog fakulteta Osijek. Za eksperiment su korišteni miševi oba spola u dobi od 8-10 tjedana starosti. Miševi su bile raspoređeni u skupine po 4 životinje u jednom kavezu veličine 207x140x365 mm površine 530 cm<sup>2</sup> u strogo kontroliranim uvjetima koji podrazumijevaju režim 12 sati svjetla, 12 sati tame, slobodan pristup hrani i vodi (*ad libitum*) i obitavanje u samoventilirajućim kavezima br.2L uz svakodnevni nadzor stručnog osoblja. Kavezi se nalaze na pripadajućem samoventilirajućem sustavu za pročišćavanje zraka model Bio A.S. Vent light (Ehret, Njemačka). Tijekom pokusa životinje su hranjene peletiranom hranom tipa 4RF25 (Mucedola srl, Italija). Stelja – prostirka (Scobis Uno i Scobis Duo u omjeru 2:1) u kavezu je mijenjana dva puta tjedno. Eksperiment je proveden prema ILAR Pravilniku za uzgoj i primjenu laboratorijskih životinja, Direktiva EU [51] i Hrvatskog zakona za zaštitu životinja [61].

Za procjenu protutumorskog učinka korištene su ženke soja BalbC stare 14-15 tjedana.

### 3.1.4. Kemikalije

Tijekom izrade ove doktorske radnje korištene su brojne kemikalije visoke čistoće (p.a- pro analysi) kupljene od različitih proizvođača. To su:

- GIBCO Invitrogen (Paisely, Velika Britanija): Dulbecco modificirani Eagle-ov medij (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), 0,25% tripsin EDTA, fetalni goveđi serum (FBS), Na-piruvat i antibiotik-antimikotik 100x
- Invitrogena (Oregon, SAD : SYBS Safe 10000x DMSO je također proizvod). Sigm-Aldrich (St.Louis, SAD) : Tripansko plavilo, HEPES, MTT, agaroz, Tris baza, PI, RNase A, Hoechst 33258 i doksorubicin, L-glutamin, SDS i 0,5 M.
- Cascade Biologics-a (Portland, SAD): Medij 200 i suplement rasta niskog sadržaja seruma
- Fermentas International-a (Burlington, Kanada): DNK/RNK standard (1 k baza Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka): PFA, boje eozin G i hemalaun
- ACROS ORGANICS-a (New Jersey, SAD).DMSO Kemike (Zagreb, Hrvatska): 96% tehnički etanol, apsolutni etanol, ksilen, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ledena octena kiselina i dietileter

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Stanice su kultivirane u bocama za kulturu stanica površine 25 i 75 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon, Njemačka) u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife<sup>TM</sup>, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima 37°C/5% CO<sub>2</sub> uz visku vlažnosti. HeLa, HEp-2, MIAPaCa-2, HT-29, CaCo-2, SW-620, BJ, MDCK stanične linije su kultivirane u DMEM mediju uz dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100U/0,1mg penicilin/streptomycin antibiotika. Stanične linije AGS, NCI-H358, K562, JURKAT, HuT-78, limfociti, 4T1 su kultivirane u RPMI-1640 mediju uz dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1mM natrij-piruvata, 10mM HEPES-a i 100U/0,1mg penicilin/streptomycin antibiotika. HAEC stanična linija je kultivirana u mediju 200 uz dodatak suplementa rasta. Za održavanje i presađivanje adherentnih staničnih linija (AGS, NCI-H358, HAEC, HeLa, HEp-2, MIAPaCa-2, HT-29, CaCo-2, SW-620, BJ, MDCK) koristio se 0,25% tripsin/EDTA za odvajanje stanica od podloge kako bi se mogle

presaditi u drugu bocu za uzgoj. Tripsinizacija je trajala od 1,5–2 minute na sobnoj temperaturi (eng. room temperature-RT) za HAEC staničnu liniju, te 6-8 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru za preostale stanične linije. Gustoća nasađivanja u svrhu kontinuiteta održavanja stanične linije ovisi o veličini stanica, afinitetu njihovog rasta i brzini umnožavanja. Preostale stanične linije (K562, JURKAT, HuT-78, limfociti) rastu kao stanične suspenzije koje su održavane razrjeđivanjem originalne suspenzije oduzimanjem dijela volumena i dodavanje svježeg medija. Vijabilnost i brojnost stanica je određena bojanjem sa tripan plavilom u Bürker-Türk komorici. Žive stanice s neoštećenom staničnom membranom ne propuštaju boju Tripan plavilo te su nebojene, za razliku od mrtvih stanica, koje se bojaju plavo. Poznavanje broja stanica (br. stanica x10<sup>4</sup>/ml) omogućuje nasađivanje točno određenog broja stanica za pokus.

### 3.2.2. Određivanje citotoksičnog učinka MTT testom [55]

Test se temelji na utvrđivanju metaboličke aktivnosti enzima dehidrogenaza koje cijepaju žute tetrazolijeve MTT soli (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromid) i stvaraju ljubičasto obojene kristale formazana. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica i prati se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 do 590 nm pomoću čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

**Materijal:** MCD 1-14, medij (DMEM, RPMI 1640, 200), 0,25% tripsin/EDTA, 10x MTT stock otopina, PBS, DMSO, 10% SDS.

**Postupak:** Adherentne stanične linije su nasađene na ploče sa 96 jažica u koncentraciji 2x10<sup>4</sup> st/ml. Nasađene ploče su ostavljene preko noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru da se stanice smire i priljube za podlogu. Slijedeći dan stanice su tretirane s monometinskim cijaninskim derivatima u koncentracijskom rasponu od 10<sup>-8</sup> mol/dm<sup>3</sup> do 10<sup>-5</sup> mol/dm<sup>3</sup> tijekom sljedećih 72 sata ili kontrolne grupe samo sa medijem. Petog dana testa uklonjen je medij sa stanica a, u svaku jažicu je dodana otopina 1xMTT/PBS u koncentraciji 5mg/mL uz inkubaciju od 4 sata u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Nakon toga, dodan je DMSO i stanice su inkubirane na sobnoj temperaturi uz laganu trešnju na orbitalnoj tresilici da bi se otopili nastali formazanski kristali. Intenzitet obojenja očitao je na čitaču mikropločica.

Stanice koje rastu u suspenziji su nasađene na ploče sa 96 jažica u koncentraciji 1x10<sup>5</sup> st/ml. Odmah po nasađivanju, na stanice su dodane ispitivane supstance u koncentracijskom nizu od 10<sup>-8</sup> mol/dm<sup>3</sup> do 10<sup>-5</sup>

$10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Stanice su bile izložene djelovanju ispitivanih spojeva tijekom sljedećih 72 sata. Četvrti dan testa u svaku jažicu je dodana otopina 1xMTT/PBS u koncentraciji 5mg/mL uz 4h inkubaciju, nakon čega je dodan 10% SDS i nastavljena je inkubacija preko noći. 5. dana testa je izvršeno očitavanje na mikročitaču. Kontrole su rasle u istim uvjetima kao i tretmani s tim da su kontrole početnog broja nasađenih stanica dodane 4. dan testa. Na osnovu očitanih rezultata apsorbancije za tretmane, kontrole i pozadinu (eng. background) određuje se postotak preživljenja prema formuli:

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

Background adherentne stanice = MTT + DMSO

Background stanice u suspenziji = medij + MTT + 10%SDS

### 3.2.3. Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija

Da bi se utvrdila sposobnost i stabilnost fluorescencije monometinskih cijaninskih derivata uključujući njihovu lokalizaciju unutar žive stanice primijenjen je metoda proučavanja fluorescentnim mikroskopom (Axioscope 2 MOT, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Njemačka) povezanim sa računalom i softverom koji omogućuje snimanje i obradu slike. Rezultat se očituje kao digitalna fotografija u JPEG formatu. Mikroskop ima sustav od 4 filtra koji omogućuju detekciju svjetlosti na različitim valnim duljinama i to:  $\lambda_{\text{exc}}$  365/12 nm  $\lambda_{\text{em}}$  397 nm (f1),  $\lambda_{\text{exc}}$  = 450–490 nm  $\lambda_{\text{em}}$  = 520 nm (f3),  $\lambda_{\text{exc}}$  530–585 nm  $\lambda_{\text{em}}$  615 nm (f2) i vidljivo područje (f4). Fluorescencija i lokalizacija se promatrala na zdravim, metabolički aktivnim i morfološkim reprezentativnim stanicama.

**Materijal:** HeLa stanična linija, DMEM, 1xPBS, MCD 4, MCD 8, MCD 14, Hoechst 33258, PI.

**Postupak:** Stanice u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/ml su nasađene na ravno, sterilno predmetno staklo na koje je silom privlačenja priljubljena silikonska komorica (Flexi perm, Greiner, Njemačka) koja formira barijere i tvori 8 jažica u koje su nasađene stanice. Stanice su inkubirane kroz 24h u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Sljedeći dan sa stanica je uklonjen medij i zamijenjen je s medijem u kojem su dodani ispitivani monometinski cijaninski derivati (MCD 4, 8 ili 14) u finalnom razrjeđenju  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Stanice su

inkubirane sa ispitivanim spojevima kroz različito vrijeme (30, 60, 90 i 120 minuta) u mraku na sobnoj temperaturi. Paralelno sa tretmanima na stanice se nanosi i Hoechst 33258 (koncentraciji  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>), boja koja služi kao pozitivna kontrola lokalizacije u jezgri. Po isteku zadanog vremena uklonjene je silikonska komorica, stanice su dobro isprane PBS-om, pokrivene pokrovnicom i promatrane pod mikroskopom u potpunom mraku prvo pod normalnim osvjetljenjem a zatim pod UV osvjetljenjem i odgovarajućim filterima uz dokumentiranje. Uz tretirane stanice promatraju se i kontrolne stanice kako bi se isključila strana fluorescencija koja može potjecati od medija, samih stanica [65] ili predmetnog stakla. U slučaju da stanice izgledaju neobično kad ih se pogleda pod mikroskopom, potrebno je na stanice dodati propidij jodid (PI) u koncentraciji ( $10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup>), inkubirati 10 minuta i pogledati pod filterom ( $f_2 \lambda_{exc}$  530–585 nm  $\lambda_{em}$  615 nm) da se vidi dali su stanice žive. Detekcija crvene boje u većem broju stanica upućuje na mrtve stanice koje nisu pogodne za pokus.

#### **3.2.4. Stanični ciklus**

Prisutnost strane supstance može utjecati na uobičajeni tijek staničnog ciklusa što može dovesti do zaustavljanja staničnog ciklusa u nekoj od faza (S, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ili M) ili do smrti stanice. Učinak monometinskih cijaninskih derivata br. 4 i 8 na stanični ciklus HeLa tumorskih stanica praćeno je nakon 24, 48 i 72 sata. Prikupljene stanice su obilježene PI i analizirane na protočnom citometru (Becton Dickinson FACScalibur) primjenom ModFit LT programa baziranog na DNK histogramu. Metoda se zasniva na vezivanju fluorescentne boje PI za DNK i mjerenju intenziteta fluorescencije koji je direktno proporcionalan sadržaju DNK u svakoj stanici. Normalni sadržaj DNK upućuje na stanice u G<sub>1</sub> fazi i to se prikazuje kao prvi pik na histogramu, drugi pik su stanice u G<sub>2</sub> i M fazi sa udvostručenim sadržajem DNK, a između je plato koji predstavlja stanice u S fazi [2]. Za analizu DNK histograma primijenjen je WinMDI i Cylchred program.

**Materijal:** HeLa stanična linija, DMEM, 1xPBS (137 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), monometinski cijaninski derivati br. 4 i 8, 0,25% tripsin/EDTA, apsolutni etanol, RNasaA, PI

**Postupak:** HeLa stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji  $1 \times 10^5$ /ml u ukupnom volumenu od 3 ml/jažici. Nakon 24-satnog mirovanja u CO<sub>2</sub> inkubatoru na stanice su dodani ispitivani spojevi i inkubirani kroz 24,48 i 72 sata.

Finalne koncentracije monometinskih cijaninskih derivata br.4 i 8 u ovisnosti o vremenu su prikazane u tablici.

Vrijeme /h	Koncentracija monometinskih cijaninskih derivata	
	4	8
24	$10^{-4}$ mol/dm <sup>3</sup>	$10^{-5}$ mol/dm <sup>3</sup>
48	$10^{-4}$ mol/dm <sup>3</sup>	$10^{-5}$ mol/dm <sup>3</sup>
72	$10^{-5}$ mol/dm <sup>3</sup>	$10^{-6}$ mol/dm <sup>3</sup>

**Tablica 1:** Shema aplikacije MCD 4 i 8 za procjenu utjecaja na stanični ciklus u ovisnosti o vremenu i danoj koncentraciji

Po isteku vremena tretmana, medij u kojem su stanice uzgojene, prikupljen je u 15 ml epruvete. Stanice su pomoću tripsina odvojene od površine jažice i prikupljene ispiranjem sa medijem iz odgovarajuće epruvete. Centrifugiranjem su stanice spuštene na dno epruvete, a medij je uklonjen dekantiranjem. Sijedi postupak ispiranja stanica sa 3 ml PBS koji se ponavlja dva puta sa među korakom centrifugiranja. Nakon trećeg dodavanja 1,5 ml PBS-a epruvete sa stanicama su stavljene na led, dobro promiješane, a njihov sadržaj je protisnut u novu Falcon epruvetu kroz mrežicu (mlinarsko platno). Na stanice je uz lagano, stalno miješanje dodano 3 ml hladnog apsolutnog etanola. Tako pripremljene stanice su pohranjene u ledenicu na -20°C do trenutka analize. Na dan analize stanice su centrifugirane, isprane sa 2 ml PBS-a i ponovo centrifugirane. Na same stanice, nakon odvajanja supernatanta, je dodano 200µl RNaseA finalne koncentracije 0,1 µg/µl i inkubirano u vodenoj kupelji 15 minuta na 37°C. Nakon inkubacije u svaki uzorak je dodano 200µl PI finalne koncentracije 1 µg/ml. Uzorci su prebačeni u posebne epruvete za analizu na BD FACScaliburu i ostavljene 15 minuta u mraku na hladnom prije same analize.

### 3.3. Vizualizacija nukleinskih kiselina (NK)

Da bi smo provjerili dali monometinski cijaninski derivati imaju mogući primjenu u vizualizaciji NK primijenili smo metodu horizontalne elektroforeze na 1 % agaroznom gelu (sustav za elektroforezu BIO RAD, Hercules, CA, SAD). Kao standard za usporedbu korištena je komercijalno dostupna i primjenjivana boja SYBR Safe, koja je također, po svojoj prirodi monometinski cijaninski derivat. Za vizualizaciju je primijenjen Molecular Imager Gel Doc™ XR+ (BIO RAD, Hercules, CA, USA) uređaj.

**Materijal:** agaroz, 1xTAE pufer (40mM TRIS, 5 mM Na-acetat, 1 mM EDTA), standard za nukleinske kiseline, monometinski cijaninski derivati br. 4.,6.,8., SYBR Safe, izolirana genomska DNK i RNK

**Postupak:** Pripremljen je 1% agarozni gel (1 g agaroze/100 ml TAE pufera) s definiranim jažicama. Nakon polimerizacije gela (25 min/RT), na gel su nanoseni izolirane DNK, RNK i standard za nukleinske kiseline. Elektroforeza se odvijala pri uvjetima: 90V/45 minuta. U međuvremenu pripremljene su svježe vodene otopine monometinskih cijaninskih derivata u konačnoj koncentraciji od 2 µg/ml. Otopina SYBR Safe-a pripremljena je prema uputi proizvođača (razrjeđenje 10.000x). Po završetku elektroforeze, gel je potopljen u otopinu odgovarajućeg spoja i inkubiran u mraku 15 i 45 minuta na sobnoj temperaturi prije vizualizacije na Molecular Imager Gel Doc™ XR+ uređaju. To je metoda tzv. naknadnog bojanja. Provedeni su i pokusi s ciljem vizualizacije NK tako da su uzorci pomiješani s odgovarajućim spojem (konačna koncentracija od 2µg/ml, SYBR Safe) i nanoseni na gel. Elektroforeza se odvijala pri uvjetima: 90V/45 minuta. Ovo je metoda tzv. prethodnog bojanja (eng.pre staining). Uzorci su na Molecular Imager Gel Doc™ XR+ bili izloženi djelovanju TRANS bijelog, EPI bijelog i UV svjetla i pomoću QuantityOne® programa je zabilježen rezultat u vidu slike koja je eksportirana u JPEG format.

### 3.4. Pokusi *in vivo* na mišjem modelu

Za potrebe evaluacije toksičnosti MCD 4 i 8 primijenjen je mišji model koji je poslužio i za procjenu protutumorskog učinka na rast implantiranog tumora.

**Materijal:** MCD 4 i 8, fiziološka otopina, inzulinska šprica 1 ml, igla G 27, 70 % etilni alkohol, digitalna vaga, DMSO, eter, pribor za disekciju (pincete, škare, skalpel), krvne mikro epruvete

(eng. microteiner) za hematološke (K2E, Becton Dickinson, SAD) i biokemijske analize (SST, Becton Dickinson, SAD), 1xPBS, 4%PFA/PBS pH = 7,4, 5% HNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etanol (25%, 50%, 70%, 96%, 100%), benzol, ksilol, parafin, hemalaun, 1% eozin, kanada balzam.

### 3.4.1. „Up and Down“ metoda [64]– određivanje letalne i optimalne doze

Metoda je definirana tako da i spoj od interesa aplicira i životinjama u odabranom koncentracijskom nizu pri čemu se kreće se od najniže k višoj koncentraciji. Životinja koja je primila tretman promatra se tijekom 24h. Ukoliko preživi i nema nikakvih vidljivih promjena u načinu ponašanja primjenjuje se sljedeća u nizu odabranih koncentracija. Ukoliko neka od životinja uginu, aplicirana doza ispitivanog spoja smatra se letalnom i testiranje se zaustavlja. Za daljnje testiranje toksičnosti odabire se jedna od koncentracija koja nije izazvala uginuće. U cilju istraživanja toksičnosti monometinskih cijaninskih derivata spojevi su aplicirani intraperitonealno (i.p.) [76].

**Postupak:** Mužjaci visoko srođenog križanog soja 129/Sv i C57BL/6j u dobi između 3 i 4 mjeseca starosti su izvagani i podijeljeni u skupine po 2 životinje u kavezu. Svakoj skupini aplicirana je jedna od koncentracija iz koncentracijskog niza. Za derivat br. 8 aplicirane su samo koncentracije od 3,5 i 7,0 mg/kg, jer je on u kontaktu s fiziološkom otopinom pri višim koncentracijama formirao pahuljasti talog i nije se mogao aplicirati. Životinjama je dana koncentracija u ukupnom volumenu od 300 µl. Životinje su vagane svaki dan računajući i nulti dan, odnosno dan prve aplikacije. Slijedile su još dvije aplikacije derivata s vremenskim razmakom od 13 dana (Tablica 2). Životinje su promatrane sljedećih 13 dana od trenutka 3. aplikacije.

Aplikacija:	Dan aplikacije:	MCD 4 - ispitivana koncentracija (mg/kg)	MCD 8 - ispitivana koncentracija (mg/kg)
1.	0.	3,5; 7; 15; 30	3,5; 7
2.	13.	3,5; 7; 15; 30	3,5; 7
3.	26.	3,5; 7	3,5; 7

**Tablica 2 :** Shema aplikacije monometinskih cijaninskih derivata radi određivanja točne koncentracije za ispitivanje toksičnosti primjenom „Up and down“ metode



### 3.4.2. Akutna i kronična toksičnosti ispitivanih spojeva

Test akutne toksičnosti proveden je davanjem jednokratne aplikacije monometinskih cijaninskih derivata br. 4 i 8. Životinje su žrtvovane 13. dan nakon aplikacije spoja. Test kronične toksičnosti trajao je 40 dana, pri čemu je životinjama 3x aplicirana ista doza testnih spojeva. Životinje su žrtvovane s ciljem evaluacije toksičnog učinka 39. dan od prve aplikacije.

Aplicirani spoj	Doza (mg/kg)	Aplicirani volumen ( $\mu$ l)	Način primjene	Žrtvovanje (dan)
MCD 4	7	300	Jednokratno	13.
		300	Višekratno (0., 13., 26.)	39.
MCD 8	7	300	Jednokratno	13.
		300	Višekratno (0., 13., 26.)	39.
DMSO	7	300	Jednokratno	13.
		300	Višekratno (0., 13., 26.)	39.

**Tablica 3:** Vremenski tijek i shema aplikacije monometinskih cijaninskih derivata i DMSO-a tijekom *in vivo* testiranja akutne i kronične toksičnosti

**Postupak:** Odabrane životinje (mužjaci i ženke u omjeru 1:1) visoko srođenog križanog soja 129/Sv i C57BL/6j su izvagane i podijeljene u testne grupe od 4 životinje uključujući i kontrolne skupine (Ukupno 48 životinja). Svakoj testnoj skupini aplicirano je 300  $\mu$ l spoja koncentracije 7 mg/kg. Kontrolne grupe su primile ukupno 300  $\mu$ l fiziološke otopine koja je sadržava DMSO u koncentraciji 7 mg/kg. Tijekom testnog perioda zdravstveno stanje životinja se pratilo svakodnevnim nadzorom i mjerenjem težine. Po završetku testnog perioda životinje su žrtvovane na način da su uspavane eterom i jednokratno im je uzeta krv za hematološke i biokemijske analize. Krv se prikupljala aspiracijom pomoću igle i šprice iz srca životinje. Životinje su pri tome bile u dubokoj anesteziji. Po uzimanju uzorka krvi, slijedila je nekropsija životinje.

#### 3.4.2.1. Hematološki i biokemijski parametri

Uzorci krvi žrtvovanih životinja su analizirani na Odjelu za medicinsku biokemiju Kliničko bolničkog centra Osijek. Uzorci su obrađeni i podvrgnuti analizi najkasnije 2h po uzorkovanju. Određeni

su sljedeći hematološki parametri: eritrociti (E), leukociti (L), hemoglobin (Hgb), hematokrit (HE), trombociti (TRC). Od biokemijski parametara određena je koncentracije kolesterola, bilirubina, kreatinina, ureje, iona Na i K, glukoze i enzima: transaminaza (alanin aminotransferaza-ALT, aspartat aminotransferaza-AST, gama glutamiltransferaza-GGT) i alkalne fosfataze (AP).

#### 3.4.2.2. Histomorfološka analiza organa životinja

Za potpuno evaluaciju toksičnosti monometinskih cijaninskih derivata iz svake životinje uzeti su sljedeći organi: mozak, srce, pluća, jetra, slezena, želudac, tanko crijevo sa Peyerovim pločama, debelo crijevo, bubrezi i bedrena kost.

**Postupak:** Svaki organi je nakon vađenja opran od zaostalih tragova krvi u PBS, lagano posušen i izvagan na analitičkoj vazi. Odmah po vaganju organi su pohranjeni na 48h u 4% PFA/PBS kako bi se organi fiksirali. Dalje su organi ispirani tekućom vodom kako bi se uklonio fiksativ. Uzorci bedrene kosti su nakon fiksacije, a prije daljnje obrade, dekalcificirani ispiranjem fiksativa tekućom vodom (24h), dodavanjem 5% HNO<sub>3</sub> (24h), nakon toga je dodan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24h) i konačno ispiranje sa tekućom vodom kroz 24h. Dalje slijedi normalni postupak obrade kako je opisano u nastavku. Nakon ispiranja vodom slijedi dehidracija tkiva uranjanjem tkiva na 2h u alkoholni niz rastuće koncentracije od 25, 50, 70, 96 i 100%. Nakon dehidracije tkiva su uklopljena u parafinske blokove potapanjem u smjesu benzola i alkohola u omjeru 1:1, potom u čistom benzolu i konačno u smjesu parafina i benzola (u omjeru 1:1) na temperaturi od 58°C kroz 20 min. Za to vrijeme benzol je ispario i na tkiva je dodan čisti tekući parafin koji se stvrdne usljed naglog hlađenja te su tako dobiveni parafinski blokovi tkiva. Pomoću kliznog mikrotoma LEICA SM 2000R (Nussloch, Belgija) dobiveni su serijski rezovi tkiva debljine 6 µm koji su preneseni na predmetna mikroskopska stakla. Tkivni rezovi su deparafinirani provlačenjem tkiva 2x kroz ksilol (10 minuta) i rehidracijom pomoću silaznog alkoholnog niza (100%, 96%, 70% po 5 minuta u svakoj koncentraciji). Rehidrirana tkiva su isprana u destiliranoj vodi i obojena HE metodom koja podrazumijeva bojanje 5 minuta sa hemalaunom (hemotoksilin + K-alaunom), ispiranje tekućom i destiliranom vodom i uranjanje u 1% vodenu otopinu eozina na 5-10 minuta. Hemalaun boji jezgre u plavo, a eozin citoplazmu u ružičasto. Nakon bojanja preparati su ponovno dehidriraju uzlaznim nizom alkohola (70%, 96% 100% po 5 minuta, etanol:ksilol (1:1) i 2x ksilol po 5 minuta). Izrada trajnih preparata je završena dodatkom kanada balzama i pokrivanjem pokrovnim staklom [20]. Histološki preparati organa žrtvovanih životinja analizirani su svjetlosnim mikroskopom Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss Jena GmbH, Njemačka).

Dodatno tkivni rezovi pluća i jetre obojeni su PAS-u (periodična kiselina – Schiff-ov reagens) metodom koja se koristi za detekciju glikogena i mucina koji su na preparatu obojeni crveno-ružičasto. Postupak je sljedeći: nakon deparafinizacije rezova preparati se uranjaju na 5 minuta u otopinu 0,5% periodične kiseline ( $\text{HIO}_4$ ), ispiru u destiliranoj vodi, te inkubiraju 15 minuta u Schiff-ov reagensu. Slijedi ispiranje u toploj vodi 5 minuta i kontrastno bojanje Mayer-ovim hemotoksilinom. Po završetku se preparati ispiru u tekućoj vodi i uklope u kanada balzam.

### 3.4.3. Utvrđivanje protutumorskog učinka *in vivo* na tumorskom modelu

Evaluacija protutumorskog učinka provedena je primjenom suspenzije uzgojenih i izoliranih tumorskih stanica koje su u pokusnim životinjama izrasle u tumor. Životinjama su jednokratno i višekratno aplicirani monometinski cijaninski derivati br.4 i 8. Učinkovitost MCD – a se pratila mjerenjem veličine razvijenog tumora.

**Materijal:** 4T1 stanična linija, Hanks-ova otopina, pribor za disekciju (škarice, pincete, skalpel), 70% etanol, najlonska mrežica (mlinarsko platno), staklena čašica, eter, inzulinska šprica, igla 20G, kaliper, MCD 4 i 8, fiziološka otopina

#### 3.4.3.1. Priprema stanične suspenzije tumorskih stanica i njihova implantacija u životinju

**Postupak:** Životinjama je potkožno, u bedrenu regiju primijenjena stanična suspenzija tumorskih stanica mišjeg karcinoma dojke (4T1). Na mjestu aplikacije, kroz vremenski period od tri tjedna, razvila se tumorska tvorba promjera 5-7 mm. Nakon žrtvovanja, iz životinja je izolirana razvijena tumorska masa. Tvorba je, u malom volumenu Hanks-ove otopine (cca 5 ml) pomoću škarica usitnjena i protisnuta kroz mrežicu (veličina pora 100  $\mu\text{m}$ ), te razrijeđena dodatkom novog volumena Hanks-ove otopine. Na taj način su dobivene pojedinačne stanice koje su 2x centrifugirane (5000 g / 5 minuta) s ciljem ispiranja i dobivanja što čistih stanica. Brojnost živih tumorskih stanica određena je bojanjem tripanskim plavilom. U bedrenu regiju svakog pokusnog miša ubrizgano je 0,1 ml suspenzije tumorskih stanica koncentracije  $5 \times 10^5$  stanica/ml.

### Aplikacija monometinskih cijaninskih derivata

Spojevi su primijenjeni na dva načina: jednokratno (7 mg/kg) 9. dan od iniciranja ili u višekratnim dozama (doza od 4mg/kg aplicirana 4 puta s razmakom od 72 h) s prvom aplikacijom 6. dan od iniciranja tumorskih stanice. Spojevi su pripremljeni kao i za pokuse toksičnosti.

#### 3.4.3.2. Procjena protutumorskog učinka

Evaluacija učinkovitosti djelovanja MCD 4 i 8 određena je usporedbom volumena poraslih tumora između kontrolnih i pokusnih skupina životinja. Mjerena su tri ortogonalna promjera tumora (P1, P2, P3) pomoću kalipera s točnošću od  $\pm 1$  mm. Volumen tumora određen je pomoću formule:

$$V = \frac{P1 * P2 * P3 * \pi}{6} [\text{mm}^3]$$

Kod jednokratne aplikacije MCD –a volumen izraslog tumora mjereno je 10.,13.,15.,17. i 20. dan od iniciranja stanične suspenzije. U pokusu višekratne aplikacije volumen tumora mjereno je 6.,8.,10.,13.,15. i 17. dan od iniciranja.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su pomoću statističkog programa Statistica for Windows v. 8.0 [74]. Rezultati istraživanja prikazani su na tablicama i grafikonima uz raspravu i odgovarajuće zaključivanje o istraživanim pojavama. Od statističkih parametara prikazana je aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) i standardna pogreška aritmetičke sredine ( $s\bar{x}$ ). Ispitivanje značajnosti razlika u fazama staničnog ciklusa obavljeno je pomoću t-testa i pretpostavke nejednakih varijanci na tablicama su prikazane P vrijednosti dobivene analizom varijance na opisani način. Statistički značajan utjecaj tretmana smatran je onaj kod kojeg je izračunata vrijednost P bila manja od 0,05 ( $P < 0,05$ ). Također, za istraživana svojstva provedena je i višefaktorijalna analiza varijance (MANOVA, 2x3x1 za hematološke parametre), odnosno (Manova, 2x3x2 za biokemijske pokazatelje). Prilikom izračuna u obzir uzete su dvije aplikacije (akutna i kronična), dva (4 i 8) odnosno tri (kontrola, 4, 8) tretmana i oba spola. Statistički značajan utjecaj aplikacije,

tretmana i spola smatran je onaj kod kojeg je izračunata vrijednost P MANOVA je bila manja od 0,05 ( $P < 0,05$ ). Ukoliko je utvrđen statistički značajan utjecaj tretmana na istraživano svojstvo ( $P < 0,05$ ) pristupilo se *post-hoc* analizi (utvrđivanje razlika između skupina). Fisherov LSD (test najmanje značajnih razlika) korišten je kako bi se izračunale razlike između skupina na razini  $P < 0,05$ . Statistički značajne razlike između pokusnih skupina naznačene su različitim slovima (a, b, c, d i e), odnosno pojedine skupine se međusobno statistički razlikuju samo ako se sva slova razlikuju ( $a \neq b \neq c \neq d \neq e$  ;  $ab = a$  i  $b$ ;  $ab \neq cde$ ).

## **4. Rezultati**

## 4.1. *In vitro* istraživanje

### 4.1.1. Citotoksični učinak monometinskih cijaninskih derivata 1-14

Citotoksični učinak analiziranih spojeva MCD- 1-14 procijenjen je na osnovu rezultata dobivenih testiranjem na petnaest staničnih linija i usporedbom s doksorubicinom kao kontrolnim spojem te je prikazan kao  $IC_{50}$  vrijednosti (Tablica 4). Analizirani MCDi pokazuju veliku varijabilnost u sposobnosti inhibicije staničnog rasta normalnih i tumorskih staničnih linija. Varijabilnost ovisi o tipu stanica, strukturi MCD, primijenjenoj koncentraciji kao i mehanizmu djelovanja testiranog spoja. Na osnovu rezultata sažetih u Tablici br. 1 jasno se uočavaju razlike u djelotvornosti pojedinih MCD-a. MCD 1-8 pokazuju citotoksični učinak na većinu testiranih staničnih linija uz djelomično poštediti učinak na HAEC staničnu liniju (MCD 4-6, 8). Posebno je izražena citotoksična aktivnost na maligne stanične linije krvnih stanica bijele loze (K562, Jurkat, HuT 78). MCD 9-13 ne pokazuju nikakav citotoksični učinak za razliku od MCD 14 koji inhibira stanični rast AGS i HeLa stanične linije, dok je na ostale tumorske stanične linije imao slab ili zanemariv inhibicijski učinak. MCD 9-14 ne pokazuju citotoksični učinaka normalne stanične linije (BJ, MDCK). Usporedbom MCD 4, 8 [53] i 14 [rezultati u objavi], koji se međusobno razlikuju po mehanizmu djelovanja], najveću djelotvornost ima MCD 4 što je vidljivo iz njegovog inhibitornog učinka na MIAPaCa ( $IC_{50} = 0,51\mu M$ ) i HEp-2 ( $IC_{50} = 0,93\mu M$ ) stanične linije. HeLa stanice su podjednako osjetljive na MCD 8 i 14 ( $IC_{50} = 8,2\mu M$ , odnosno  $IC_{50} = 7,2\mu M$ ), dok je učinak MCD 4 na njih slabiji do 10 puta ( $IC_{50} = 80\mu M$ ). Na CaCo-2 stanice učinak pokazuje samo MCD 8. Osjetljivost NCI-H358 stanične linije na MCD 4 i 8 je podjednaka. MCD 14 nema učinka na rast NCI-H358 stanica. Doksorubicin je, u odnosu na MCD 4,8,14, znatno citotoksičniji. Djelotvornost MCD 1-3 i doksorubicina na CaCo-2, HeLa, MIAPaCa, HEp-a i NCI-H358 stanice je vrlo bliska i usporediva, ali zbog velike toksičnosti na limfocite i HAEC stanice su isključeni iz daljnje evaluacije. Za daljnje ispitivanje biološke aktivnosti odabrali smo MCD 4 i 8 zbog izraženog citotoksičnog učinka na tumorske stanične linije uz poštediti učinak na HAEC staničnu liniju. Citotoksičnost MCD 8 je 10x jača na HeLa liniju ( $IC_{50} = 8,2\mu M$ ) i više od 4x na HAEC ( $IC_{50} = 50\mu M$ ) stanice u odnosu na MCD 4 (HeLa =  $80\mu M$ ; HAEC  $>200\mu M$ ). Spojevi se razlikuju po mehanizmu vezivanja za DNK (MCD 4 = DNK mali utor vezujući spoj; MCD 8 = DNK interkalator) što je, uz citotoksični učinak, bio prevladavajući čimbenik za odabir testnih spojeva.

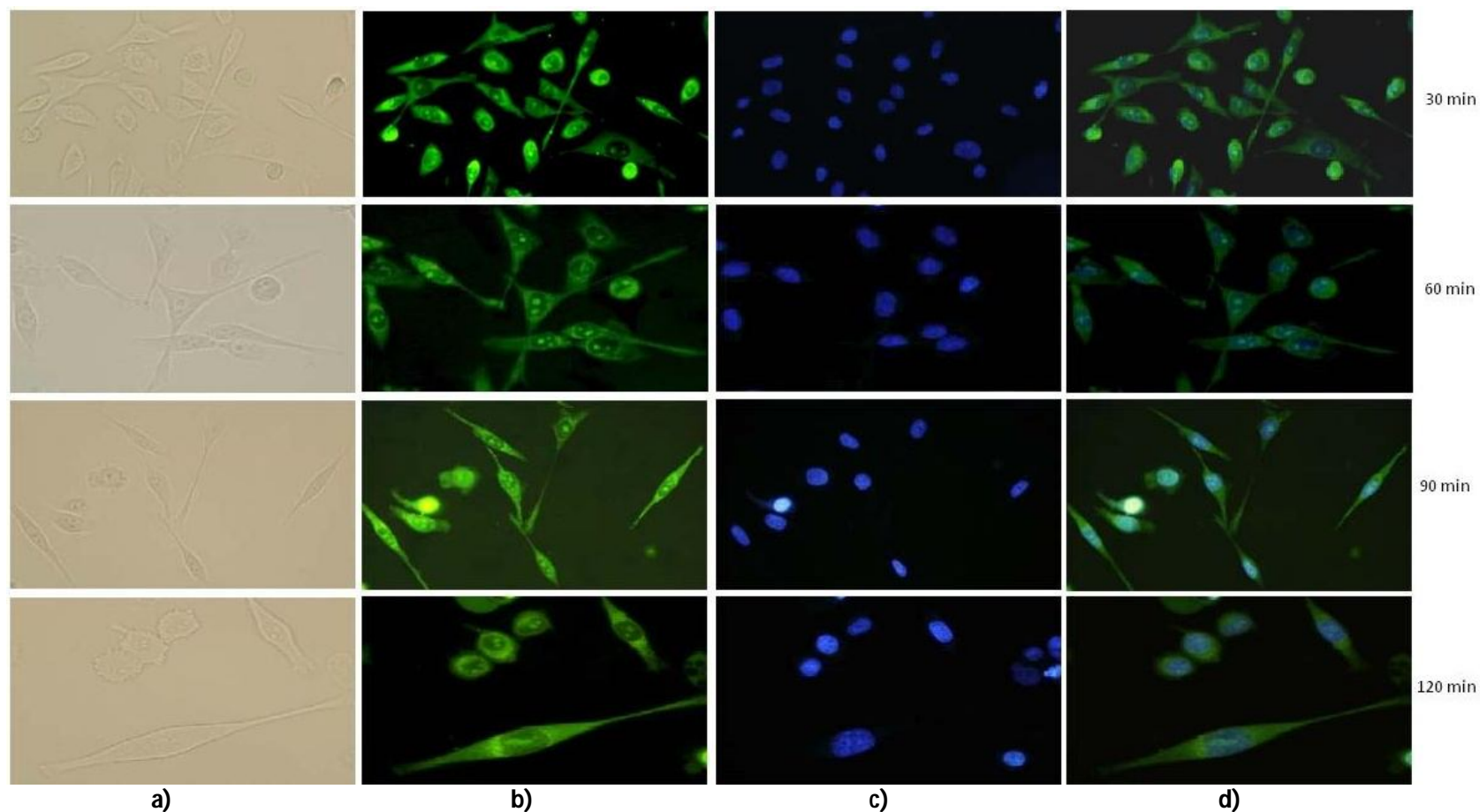
IC <sub>50</sub> / μM															
Stanične linije	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Doxorubicin
AGS	-	-	-	-	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	7.1 ± 1.95	0.1 ± 0.0
SW-620	0.2 ± 0.07	0.6 ± 0.09	0.1 ± 0.07	0.55 ± 0.24	5.2 ± 1.29	5.8 ± 0.35	7.0 ± 1.07	6.8 ± 0.84	-	-	-	-	-	-	-
HT-29	0.5 ± 0.12	0.5 ± 0.07	0.6 ± 0.10	1.1 ± 0.14	7.2 ± 2.50	5.1 ± 0.49	5.2 ± 0.90	5.9 ± 0.05	-	-	-	-	-	88.2 ± 6.77	-
CaCo-2	0.8 ± 0.01	1.0 ± 0.01	0.8 ± 0.22	> 100	40 ± 11.3	8.2 ± 0.02	10.1 ± 1.10	9.6 ± 1.70	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0.7 ± 0.2
HeLa	0.5 ± 0.04	2.1 ± 0.20	2.0 ± 0.71	80 ± 14.30	80 ± 14.7	3.9 ± 0.91	9.9 ± 0.50	8.2 ± 0.65	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	7.2 ± 2.89	3.0 ± 0.3
MIAPaCa-2	0.06 ± 0.01	0.5 ± 0.21	0.1 ± 0.04	0.51 ± 0.05	8.5 ± 0.09	2.1 ± 0.06	1.8 ± 0.28	2.2 ± 0.13	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	32.6 ± 22.54	0.6 ± 0.1
HEp-2	0.5 ± 0.03	0.7 ± 0.21	0.5 ± 0.02	0.93 ± 0.04	6.8 ± 0.05	7.0 ± 1.03	3.6 ± 0.89	5.5 ± 1.00	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	57.2 ± 20.41	0.5 ± 0.1
NCI-H358	0.6 ± 0.05	0.8 ± 0.18	0.1 ± 0.01	2.1 ± 0.31	9.0 ± 2.12	1.1 ± 0.17	2.0 ± 0.22	2.4 ± 0.05	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0.7 ± 0.1
K562	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.00	0.001 ± 0.0007	0.06 ± 0.003	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.01	-	-	-	-	-	-	-
Jurkat	0.1 ± 0.04	0.5 ± 0.25	0.09 ± 0.01	0.9 ± 0.06	6.6 ± 1.40	0.52 ± 0.16	1.3 ± 0.04	3.9 ± 0.07	-	-	-	-	-	-	-
HuT 78	0.01 ± 0.006	0.1 ± 0.03	0.05 ± 0.003	0.5 ± 0.04	0.7 ± 0.12	0.06 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.5 ± 0.23	-	-	-	-	-	-	-
HAEC	3.3 ± 0.90	1.1 ± 0.25	1.0 ± 0.54	>200	70 ± 9.35	50.3 ± 3.4	9.6 ± 0.44	50.1 ± 6.1	-	-	-	-	-	-	-
Limfociti	0.1 ± 0.02	0.04 ± 0.32	0.01 ± 0.006	1.2 ± 0.07	0.59 ± 0.07	0.09 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.1 ± 0.26	-	-	-	-	-	-	-
BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	0.5 ± 0.1
MDCK	-	-	-	-	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	3.9 ± 0.4

**Tablica 4.: Osjetljivost staničnih linija na tretman MCD 1-14 i usporedba sa doxorubicinom.** Rezultati predstavljaju koncentraciju koja dovodi do 50% inhibicije staničnog rasta (IC<sub>50</sub>). Citotoksičnost MCD-a je određena pomoću MTT testa u trajanju od 72h. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost IC<sub>50</sub>±SD tri nezavisna ponavljanja učinjena najmanje u triplikatu.

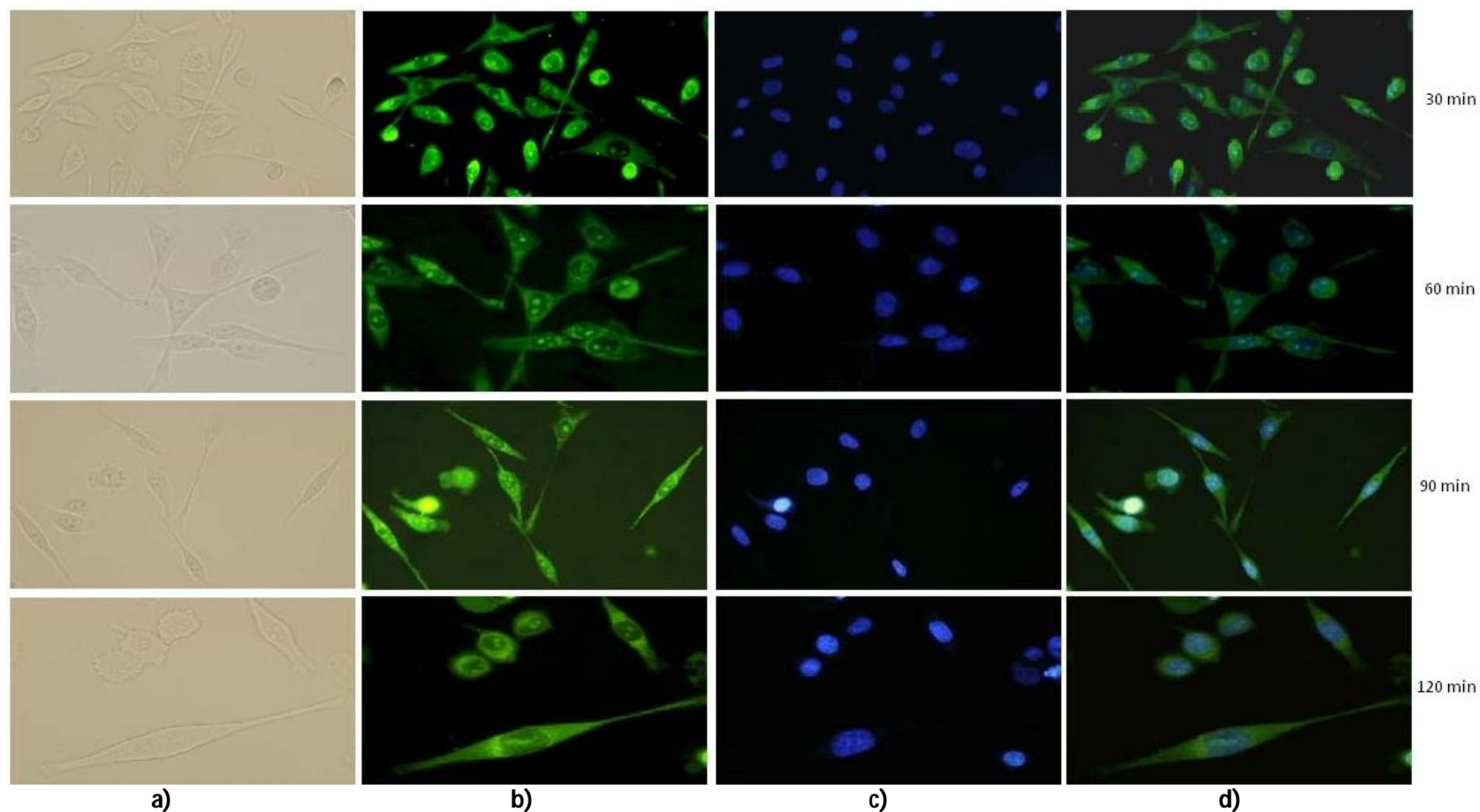


#### 4.1.2. Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija MCD 4,8,14

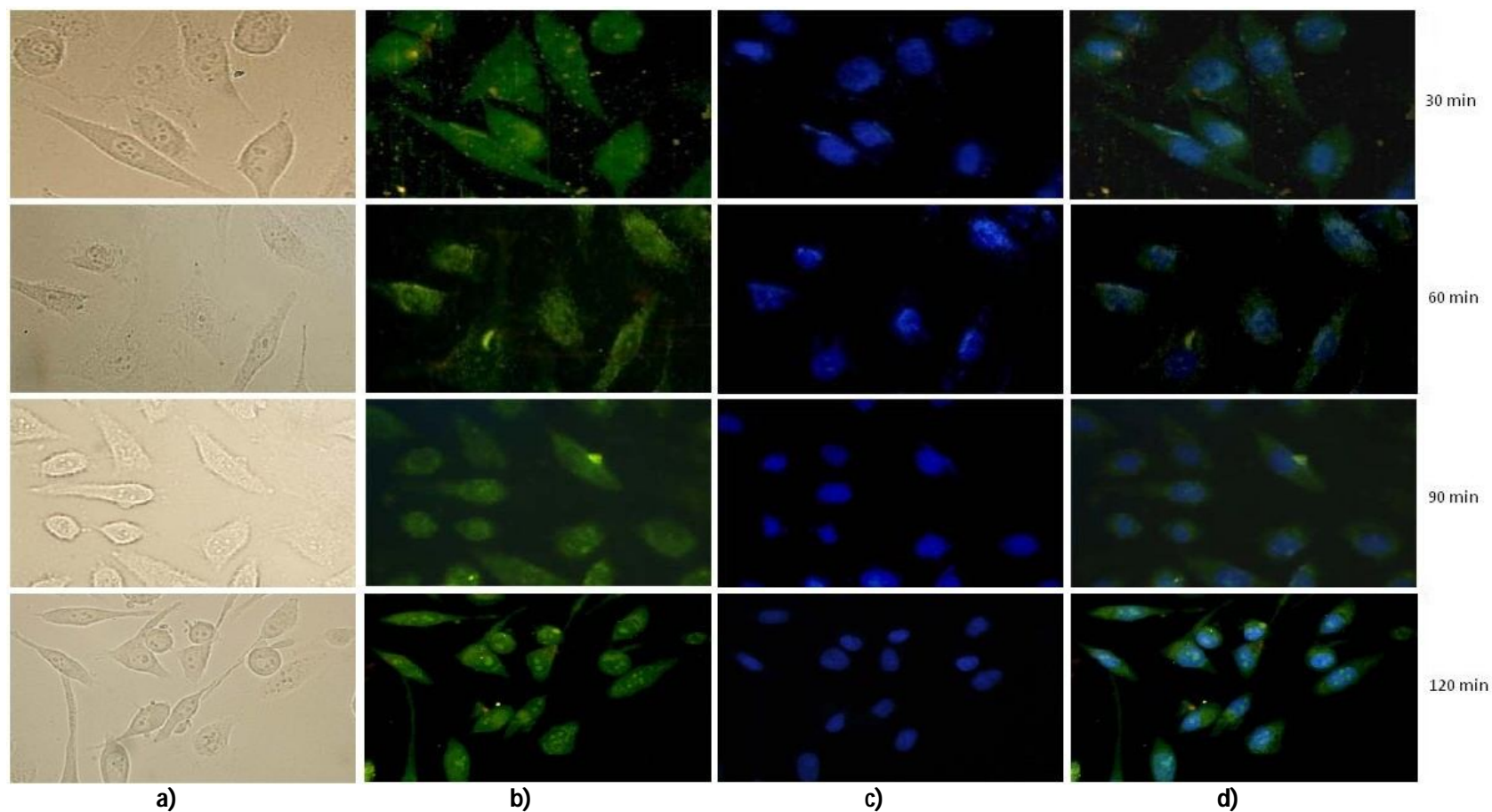
Model za promatranje, detekciju ulaska i lokalizaciju monometinskih cijaninskih derivata (4, 8, 14) unutar stanice bila je HeLa stanična linija. Tijekom testnog perioda od 30 do 120 minuta derivati ulaze u stanicu i vežu se za DNK i/ili RNK, a rezultat se očituje kao jasno vidljiva, stabilna zelena fluorescencija. Nakon prvih 30 minuta inkubacije derivati prolaze kroz staničnu membranu i lokaliziraju se unutar stanice. U usporedbi s Hoechst 33258, bojom koja se primarno veže za DNK unutar jezgre i detektira se kao plavo obojenje jezgre (Slika 5c, 6c, 7c), zeleni signal (Slika 5b, 6b, 7b) je raspršen po cijeloj stanici uključujući i jezgrice što upućuje na to da se MCD preferirano vežu za RNK. Signal je stabilan u ispitivanom vremenu kod MCD 4, dok kod MCD 8 s vremenom (nakon 90 i 120 minuta) počinje gubiti na intenzitetu (Slika 2b). Najjasnija slika je nakon 60 minutne inkubacije. MCD 14 sporije ulazi u stanicu tako da je nakon 30 i 60 minuta prisutan u stanici ali i u mediju i na površini stanice. MCD 14 tek nakon 120 minuta u potpunosti ulazi u stanicu bez zaostalih dijelova supstance u okolini i na površini stanica. Signal je slabiji u odnosu na MCD 4 i 8 što se uočava po zamućenosti slike i nejasnoći signala. Preklapanje zelenog i plavog signala (Slika 5d, 6d, 7d) jasno pokazuje razliku u lokalizaciji i preferirano vezanje ispitivanih derivata. Sva tri analizirana derivata pokazuju gotovo identičan obrazac ponašanja. Nikakve značajne morfološke promjene na tretiranim stanicama nisu uočene pod vidljivom svjetlošću (Slika 5a, 6a, 7a) što je dobar znak koji upućuje da su stanice vijabilne i stoga reprezentativne.



**Slika 5: Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija MCD 4.** Hela stanice su inkubirane 30 - 120 min i analizirane pod slijedećim uvjetima: **(a)** vidljiva svjetlost, **(b)** MCD br. 4  $C = 10\mu\text{M}$  na  $\lambda_{\text{exc}} = 450\text{--}490\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$  rezultirajući zelenom fluorescencijom, **(c)** plavo obojene jezgre stanice uslijed bojanja sa Hoechstom 33258  $C = 100\mu\text{M}$  detektirano pod UV svjetlom, **(d)** preklap slika b) i c). Povećanje 200x (30 minuta); 400x (60, 90, 120 minuta).



**Slika 6: Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija MCD 8.** HeLa stanice su inkubirane 30 - 120 minuta i analizirane pod sljedećim uvjetima: **(a)** vidljiva svjetlost, **(b)** MCD br. 8  $C = 10\mu\text{M}$  na  $\lambda_{\text{exc}} = 450\text{--}490\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$  rezultirajući zelenom fluorescencijom, **(c)** plavo obojene jezgre stanice uslijed bojanja sa Hoechstom 33258  $C = 100\ \mu\text{M}$  detektirano pod UV svjetlom, **(d)** preklap slika b) i c). Povećanje 200x (30 minuta); 400x (60, 90, 120 minuta).



**Slika 7: Ulazak u stanicu i stanična lokalizacija MCD 14.** HeLa stanice su inkubirane 30 - 120 minuta i analizirane pod sljedećim uvjetima: **(a)** vidljiva svjetlost, **(b)** MCD br. 8  $C = 10\mu\text{M}$  na  $\lambda_{\text{exc}} = 450\text{--}490\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520\text{nm}$  rezultirajući zelenom fluorescencijom, **(c)** plavo obojene jezgre stanice uslijed bojanja sa Hoechstom 33258  $C = 100\mu\text{M}$  detektirano pod UV svjetlom, **(d)** preklop slika b) i c). Povećanje 400x.

### 4.1.3. Utjecaj spoja MCD 4 i 8 na stanični ciklus

Utjecaj spoja MCD 4 i 8 na stanični ciklus praćen je na modelu tumorskih stanica vrata maternice (Hela stanična linija). Na osnovu intenziteta fluorescentnog signala stanice su podijeljene u G1, S, G2/M fazu. Spojevi MCD 4 i 8 su aplicirane u dvije različite koncentracije ( $10^{-4}$  i  $10^{-5}$  M;  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M) i ostavljeni da djeluju tijekom 24, 48, 72 sata.

MCD 4 nakon 24 sata ne uzrokuje značajne promjene staničnog ciklusa u odnosu na kontrolu. Iako se brojčano uočava veliki udio stanica u G2/M fazi, zbog izražene varijacije u mjerenju nije nađena statistički značajno odstupanje u odnosu na kontrolu. Međutim, djelovanje MCD 4 nakon 48 sati uzrokuje znatno smanjenje udjela stanica u S fazi ( $P < 0,001$ ) i povećanje udjela stanica u G2/M fazi ( $P = 0,043$ ). Nakon 72 sata uočeno je značajno smanjenje udjela stanica u G1 fazi na 20,9% u odnosu na kontrolne stanice 63,1% ( $P < 0,001$ ). Smanjenje udjela stanica u G1 fazi je popraćen povećanjem udjela stanica u S fazi na 59,5% ( $P = 0,001$ ). Djelovanje MCD 4 kroz 72 sata ne pokazuje značajan zastoj stanica u G2/M fazi kao što se uočava u tretmanu od 48 sati (Tablica 5). Vjerojatni uzrok takvog rezultata za vremenski period od 72 sata je 10 puta niža koncentracija spoja MCD 4 koja je primijenjena ( $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) u odnosu na 24 i 48 sati ( $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>). Povećanje udjela G2/M faze nakon 48 sati je u skladu sa mehanizmom djelovanja spoja odnosno mali utvor vezujuće supstance. Rezultati upućuju na zaključak da su djelovanje spoja na stanični ciklus HeLa stanične linije i karakteristični mehanizam ovisni o koncentraciji spoja i vremenu djelovanja.

Spoj MCD 8 već nakon 24 sata djelovanja u odnosu na kontrolne stanice uzrokuje smanjenje udjela stanica u G1 i povećanje udjela u S fazi ( $P = 0,005$ ). Tijekom 48 sati dolazi do značajnih promjena u svim fazama staničnog ciklusa (Tablica 6). G1 faza je smanjena na 37,8%, a S (38,8%) i G2/M (23,5%) su povećane. Nakon 72 sata stanični ciklus tretiranih stanica se vraća u normalne vrijednosti u odnosu na kontrolu MCD 8 u koncentraciji od  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> u ovisnosti o vremenu djelovanja uzrokuje značajnu promjenu udjela stanica u svim fazama staničnog ciklusa. Djelovanje ovisi o primijenjenoj koncentraciji ( $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) i duljini izloženosti spoju (48 i 72 sata) Djelovanje spojeva na stanični ciklus je najizraženije nakon 48 sati. Učinkovitost zaustavljanja staničnog ciklusa u određenoj fazi ovisi o koncentraciji spoja, pa je MCD 4 djelotvoran pri  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> koncentraciji, a MCD 8 pri  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>.

Faze staničnog ciklusa (%)	Vrijeme / h								
	24			48			72		
	Kontrola	MCD 4	P - vrijednost	Kontrola	MCD 4	P - vrijednost	Kontrola	MCD 4	P - vrijednost
<b>G1</b>	60,3 ± 2,93	49,1 ± 11,64	0,396	62,3 ± 1,41	70,3 ± 6,27	0,261	63,1 ± 2,58	20,9 ± 2,30	<0,001
<b>S</b>	28,7 ± 1,63	19,1 ± 5,53	0,157	29,3 ± 1,89	7,4 ± 1,84	<0,001	26,6 ± 2,02	59,5 ± 5,40	0,001
<b>G2/M</b>	11,0 ± 2,38	31,8 ± 13,16	0,195	8,4 ± 1,67	22,3 ± 5,18	0,043	10,3 ± 0,89	19,6 ± 4,60	0,106
<b>Sub G1</b>	26,6 ± 2,73	32,3 ± 7,89	0,526	23,4 ± 2,46	26,5 ± 4,69	0,577	20,8 ± 0,77	17,9 ± 1,79	0,177

**Tablica 5. Utjecaj spoja MCD 4 na stanični ciklus.** Prikazana je zastupljenost pojedine faze staničnog ciklusa tijekom 24, 48 i 72 sata djelovanja spoja. MCD 4 je apliciran u koncentraciji  $10^{-4}$ M (24h; 48h) i  $10^{-5}$ M (72h). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) broja analiziranih uzoraka (n = 6 po skupini) i standardna pogreška tretmana ( $S\bar{x}$ ) uz definiranu P-vrijednost ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene crvenom bojom. Vrijednost sub G1 je dobivena računskim putem i predstavlja udio mrtvih stanica u analiziranom uzorku.

Faze staničnog ciklusa (%)	Vrijeme / h								
	24			48			72		
	Kontrola	MCD 8	P - vrijednost	Kontrola	MCD 8	P - vrijednost	Kontrola	MCD 8	P - vrijednost
<b>G1</b>	60,3 ± 2,93	47,3 ± 1,38	0,005	62,3 ± 1,41	37,8 ± 0,61	<0,001	63,1 ± 2,58	62,4 ± 1,34	0,799
<b>S</b>	28,7 ± 1,63	36,1 ± 1,21	0,005	29,3 ± 1,89	38,8 ± 1,61	0,003	26,6 ± 2,02	29,1 ± 1,72	0,368
<b>G2/M</b>	11,0 ± 2,38	16,7 ± 1,75	0,090	8,4 ± 1,67	23,5 ± 1,56	<0,001	10,3 ± 0,89	8,6 ± 1,61	0,378
<b>Sub G1</b>	26,6 ± 2,73	31,0 ± 0,27	0,271	23,4 ± 2,46	22,7 ± 3,55	0,867	20,8 ± 0,77	27,0 ± 0,85	<0,001

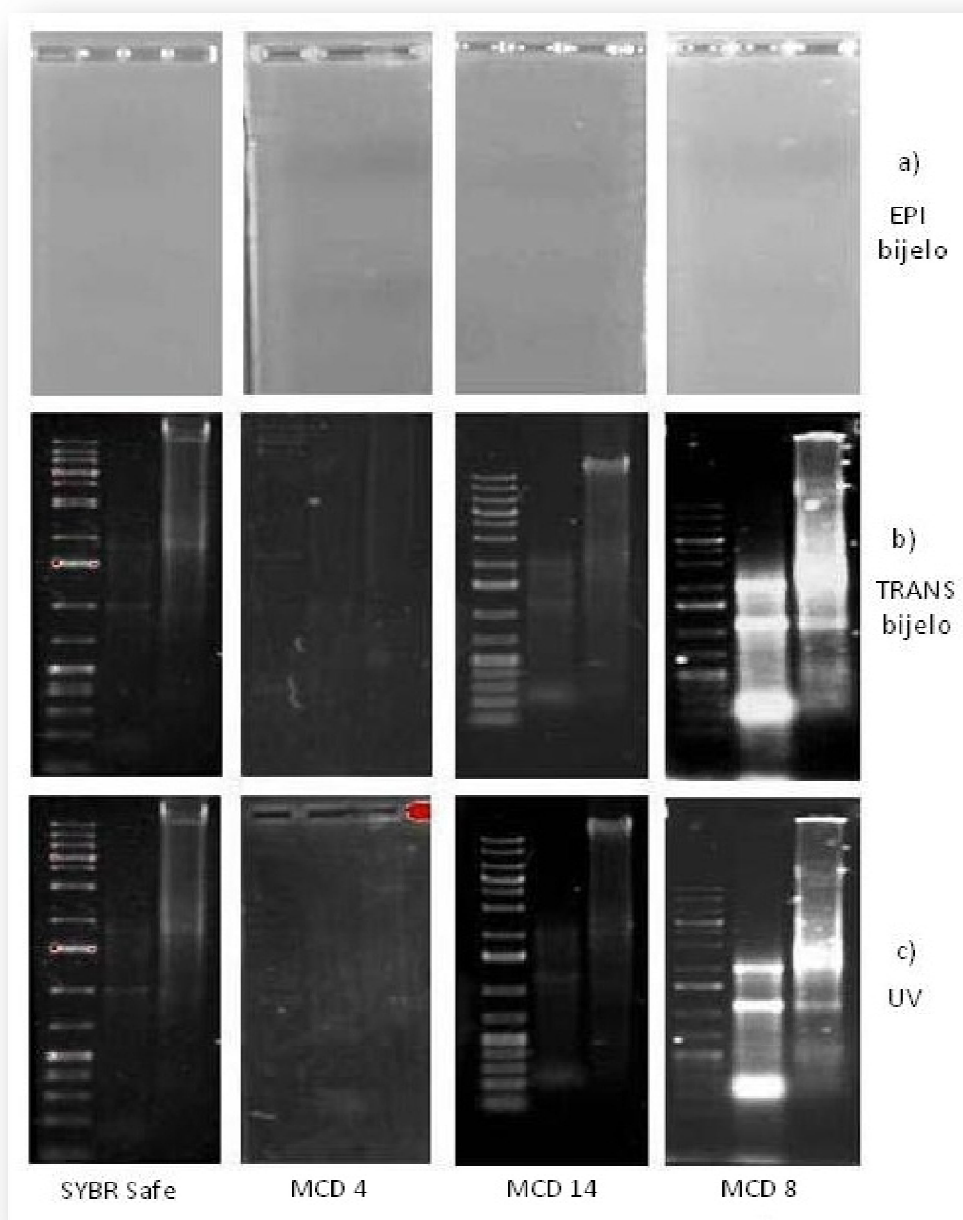
**Tablica 6. Utjecaj spoja MCD 8 na stanični ciklus.** Prikazana je zastupljenost pojedine faze staničnog ciklusa tijekom 24, 48 i 72 sata djelovanja spoja. MCD 8 je apliciran u koncentraciji  $10^{-5}$ M (24h; 48h) i  $10^{-6}$ M (72h). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) broja analiziranih uzoraka (n = 6 po skupini) i standardna pogreška tretmana ( $S\bar{x}$ ) uz definiranu P-vrijednost ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su označene crvenom bojom. Vrijednost sub G1 je dobivena računskim putem i predstavlja udio mrtvih stanica u analiziranom uzorku.



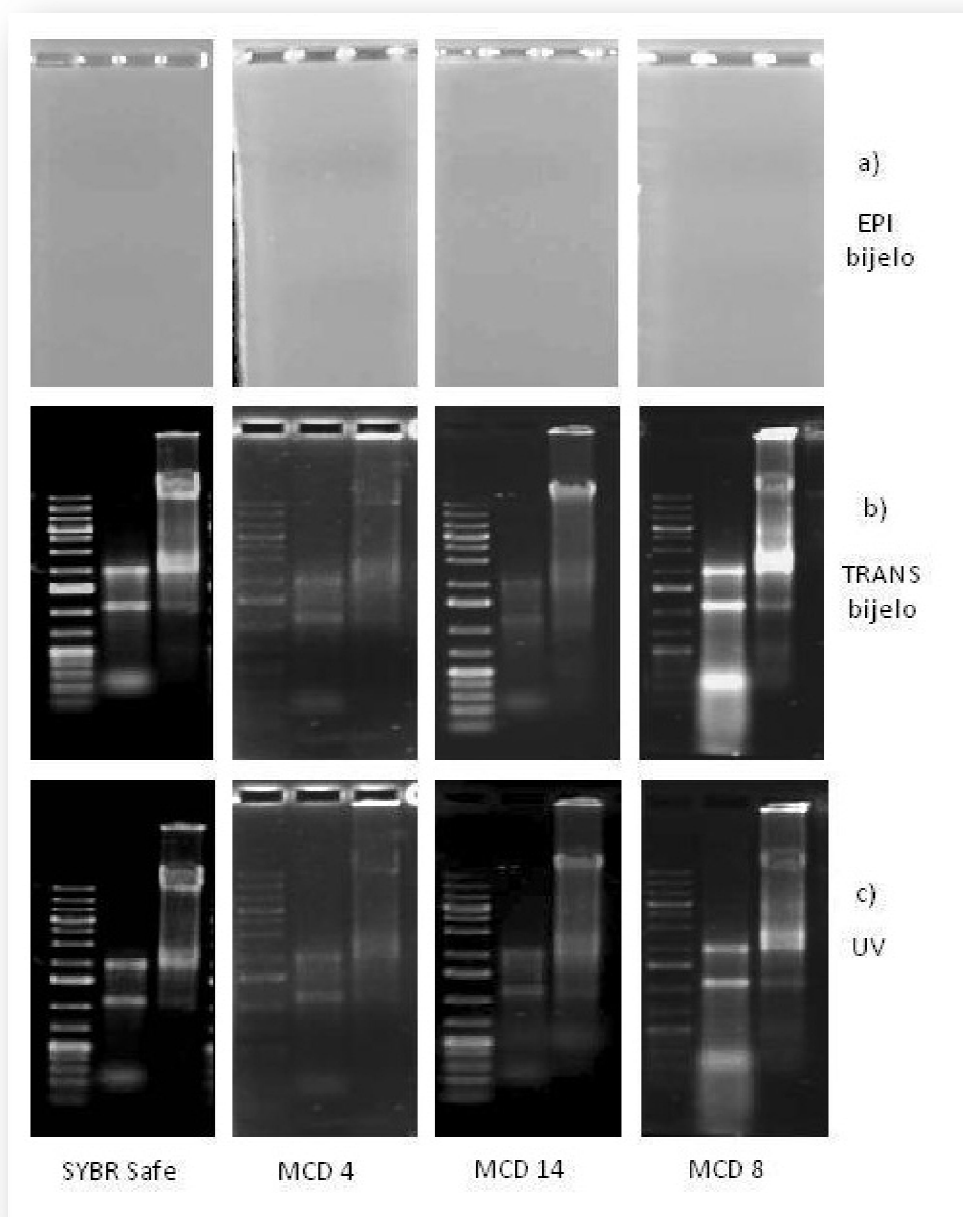
#### **4.2. Vizualizacija nukleinskih kiselina pomoću spojeva MCD 4, 8 i 14**

Vizualizacija nukleinskih kiselina i standarda nukleinskih kiselina pomoću MCD 4, MCD 8 i MCD 14 uspoređena je sa SYBR Safe kromoforom kao standardnom, komercijalno dostupnom bojom za vizualizaciju. EPI bijelo svjetlo nije prihvatljivo za osvjetljenje gelova jer se svjetlost odbija od površine gela i ne daje nikakav rezultat. MCD 4 ni nakon 45 minuta inkubacije ne daje jasno vidljivu sliku ni pri jednom tipu osvjetljenja te nije dobar kandidat za vizualizaciju NK. Za razliku od njega, MCD 8 i MCD 14 uz osvjetljenje gela TRANS bijelim i UV svjetlom vizualizira NK. Inkubacija gela s elektroforetski razdvojenim NK 15 minuta sa MCD 8 i sa MCD 14, moguće je jasno uočiti NK (Slika 8). Produljenom inkubacijom gela kroz 45 minuta povećava jasnoću i intenzitet bojanja NK (Slika 9) u kvaliteti usporedivoj sa bojanjem komercijalno primjenjivanim SYBR Safe kromoforom. 2 µg/ml je finalna koncentracija ispitivanih spojeva MCD 4,8,14 koji su dali prikazane rezultate pri razrjeđenju 2500x. Koncentracija SYBR Safe-a je nepoznata, ali je pripremljen prema uputi proizvođača.





**Slika 8:** Bojanje gel elektroforezom razdvojenih NK kroz 15 minuta sa SYBR Safe kromoforom, MCD 4, 14 i 8. Gelovi inkubirani 15 minuta nakon provedene elektroforeze u 2.500x razrijeđenoj vodenoj otopini MCD 4, 14, 8 i 10.000 x razrijeđenoj vodenoj otopini SYBR Safe-a. Na svaki gel je nanesen uzorak markera (1. jažica) i uzorak RNK (2. jažica) i DNK (3. jažica). Gel je izložen EPI bijelom (a), TRANS bijelom (b) i UV svjetlu (c) pomoću Molecular Imager Gel Doc™ XR+ uređaja.



**Slika 9:** Bojanje gel elektroforezom razdvojenih NK kroz 45 minuta sa SYBR Safe kromoforom, MCD 4, 14 i 8. Gelovi inkubirani 15 minuta nakon provedene elektroforeze u 2.500x razrijeđenoj vodenoj otopini MCD 4, 14, 8 i 10.000 x razrijeđenoj vodenoj otopini SYBR Safe-a. Na svaki gel je nanesen uzorak markera (1. jažica) i uzorak RNK (2. jažica) i DNK (3. jažica). Gel je izložen EPI bijelom (a), TRANS bijelom (b) i UV svjetlu (c) pomoću Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ uređaja.

### 4.3. *In vivo* učinak spojeva MCD 4 i 8

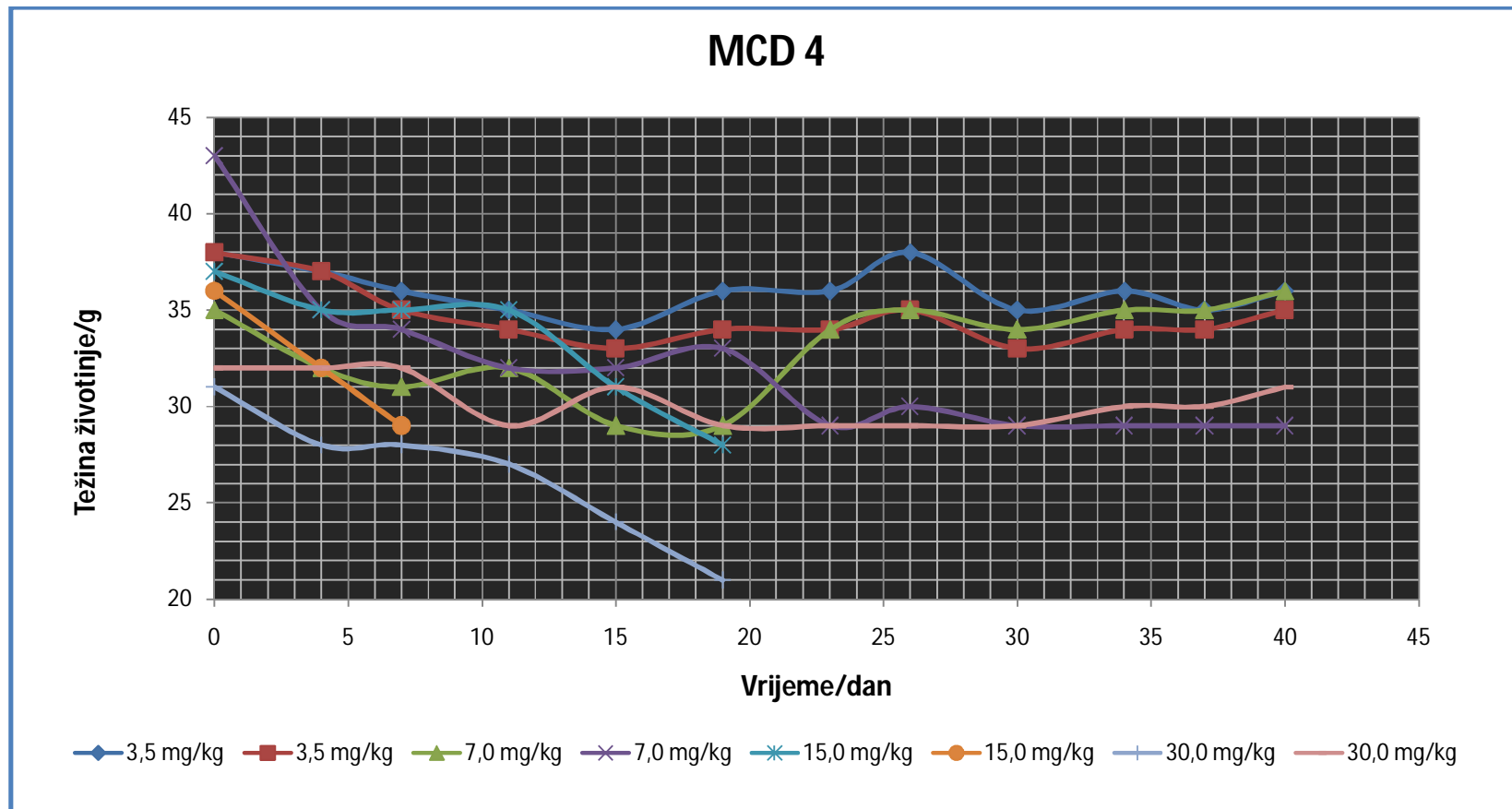
#### 4.3.1. Procjena toksičnosti MCD 4 i 8

##### 4.3.1.1. Određivanje letalne i optimalne doze „*Up and down*“ metodom

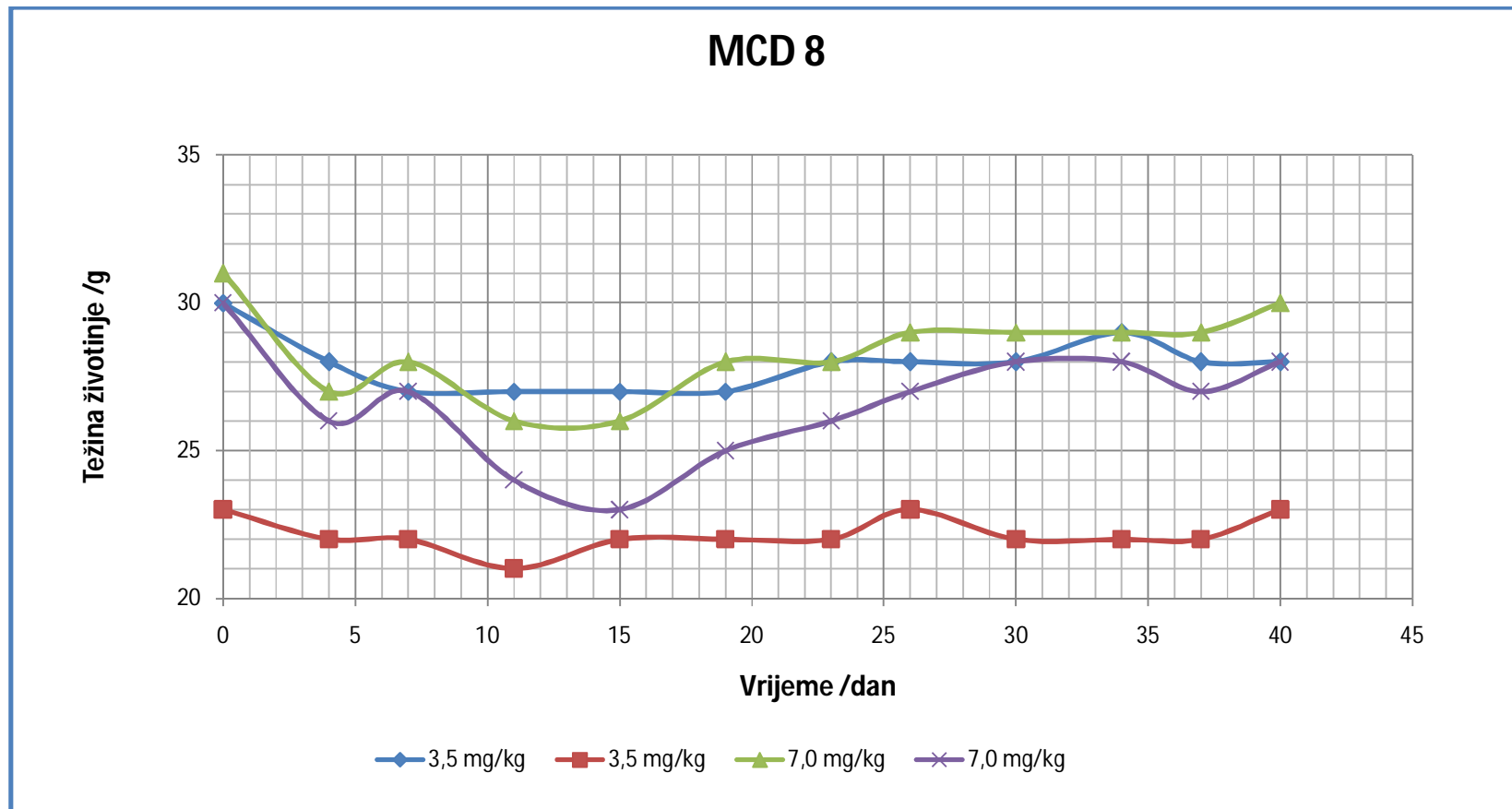
Primjenom metode rastućih i padajućih koncentracija („*Up and down*“) MCD 4 od 3,5 mg/kg do 30 mg/kg, te MCD 8 od 3,5 -7,0mg/kg utvrđena je letalna doza od 15 mg/kg za MCD 4. Letalna doza za MCD 8 nije utvrđena zbog netopljivosti spoja u fiziološkoj otopini pri koncentracijama većim od 7,0 mg/ml. Iako su životinje, prema pravilima metode, preživjele prvih 24 sata od aplikacije, više koncentracije nisu testirane zbog netopljivosti MCD 4 i MCD 8 u vodenim otopinama. Životinje su zatim podvrgnute testu vremenske i koncentracijske tolerancije uz tri aplikacije spoja (0., 13. i 26. dan) te je praćeno njihovo ponašanje, težina i opći izgled kroz 40 dana. Miš koji je primio dozu za MCD 4 od 15 mg/kg uz gubitak tjelesne mase od 19,46% uginuo je 7. dan nakon aplikacije. Druga jedinka, iz iste skupine, je uginula 19. dan pokusa, odnosno 5. dan od druge aplikacije spoja uz gubitak mase od 17,65%. Doza od 30mg/kg je dovela do uginuća životinje 19. dan uz gubitak tjelesne mase od 32,26% (Slika 10). Primijećeno je da životinjama treba oko 5 dana da se oporave od primljene doze što se očitivalo u njihovom opće fizičkom stanju i ponašanju. Uočen je znatniji pad u težini do 15. dana, a nakon toga tjelesna težina počinje rasti i/ili se ustaljuje.

Primijenjene koncentracije MCD 8 nisu izazvale uginuće životinja tijekom testnog perioda. Pri koncentraciji od 3,5 mg/kg MCD 8 težina životinja je neznatno oscilirala, dok je pri koncentraciji od 7,0 mg/kg ta oscilacija bila nešto izražajna. Nakon 15. dana tjelesna težina se ustaljuje (Slika 11).

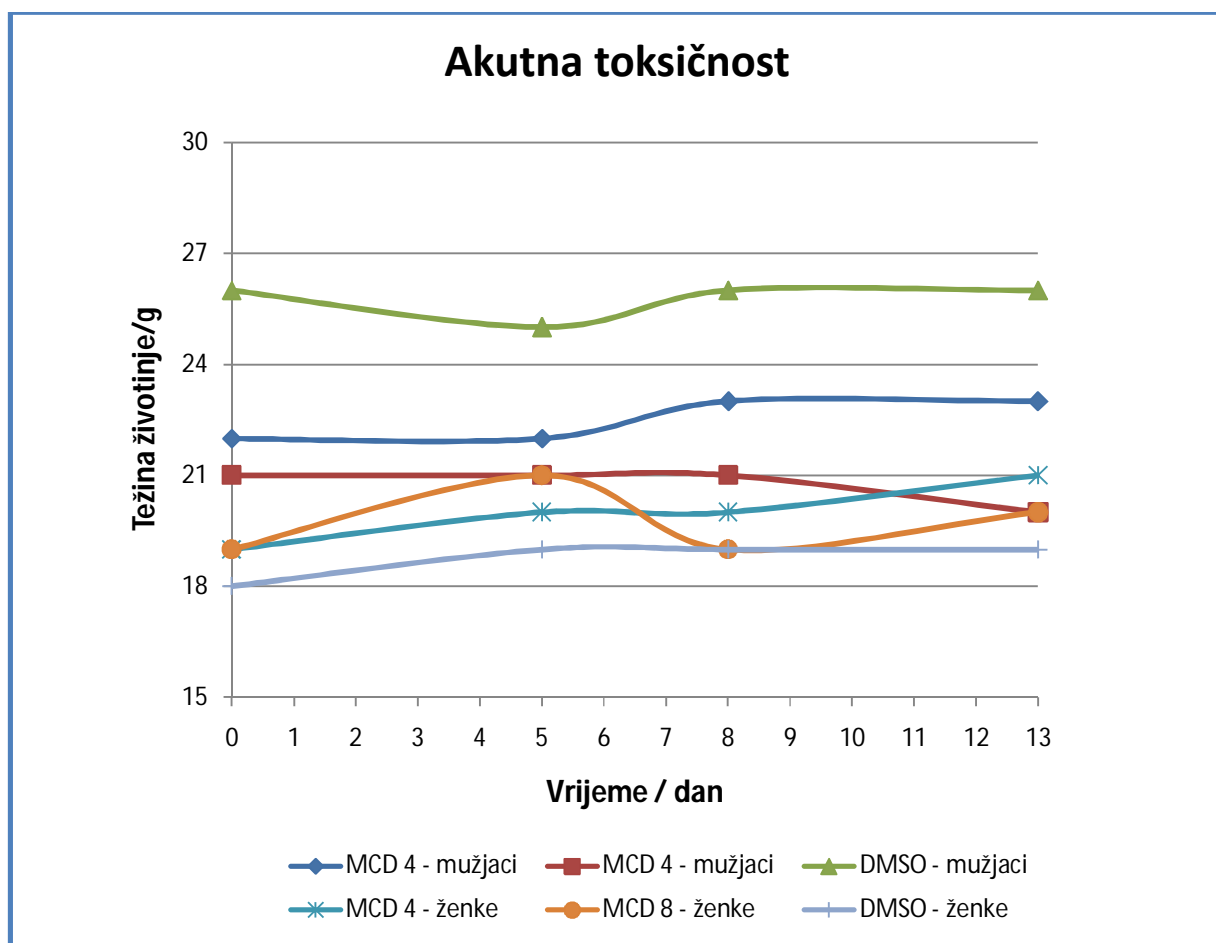
Na osnovu prethodno dobivenih rezultata odabrana je doza od 7 mg/kg za daljnja testiranja MCD 4 i MCD 8. Praćenje tjelesne težine životinje tijekom evaluacije akutnog i kroničnog efekta MCD 4 i 8 je pokazala da je odabrana doza od 7 mg/kg adekvatna jer nije utjecala na težinu testnih životinja (Slika 12 i 13). Oscilacije od  $\pm$  1-2 g su očekivane i ne smatraju se značajnim za ovaj pokus.



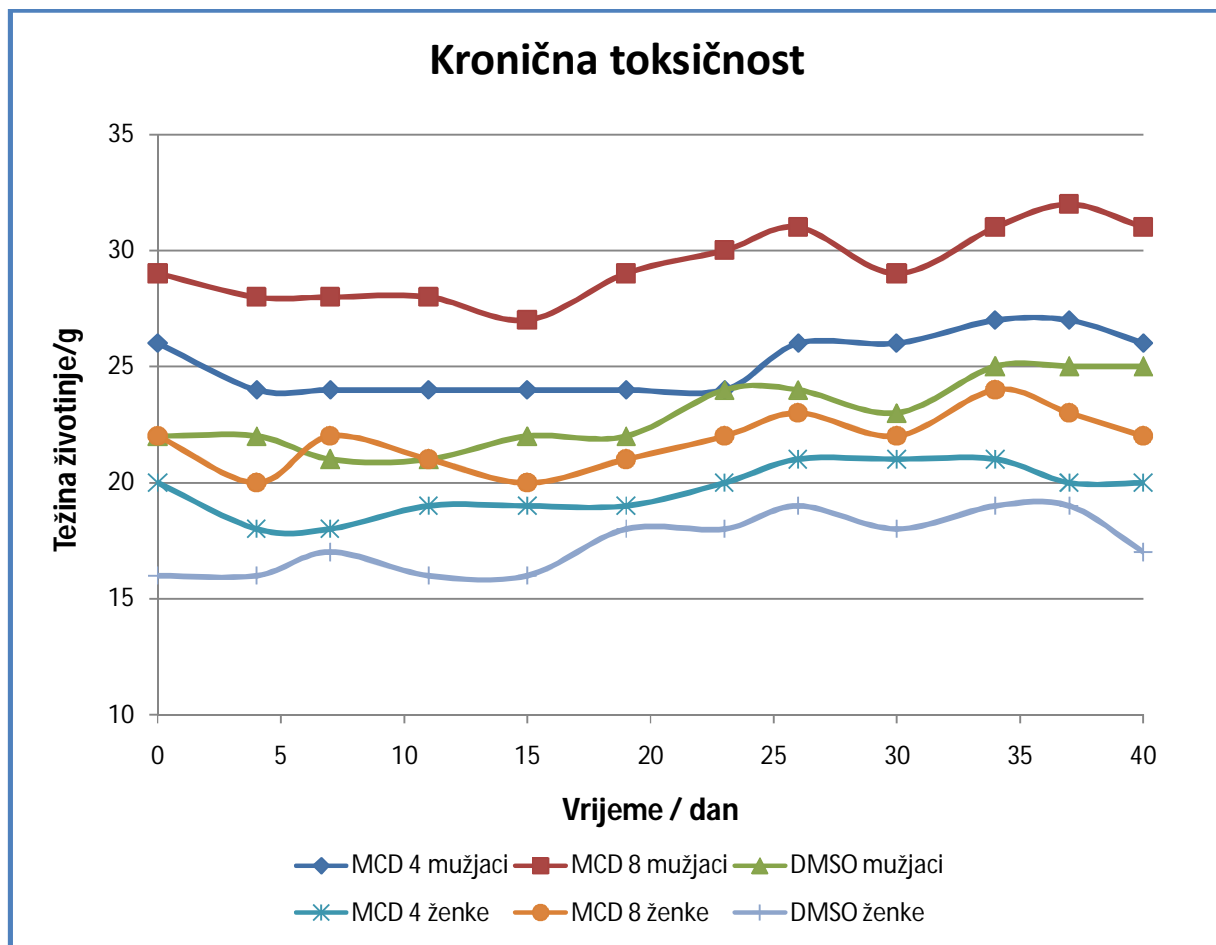
**Slika 10: Praćenje tjelesne mase životinja tretiranih sa MCD 4.** Životinje (n = 2) u testnim skupinama primile su tri različite pojedinačne doze spoja (3,5; 7,0; 15,0; 30,0 mg/kg). Spoj je apliciran 3x (0., 13. i 26. dan), te je praćena tjelesna težina životinja. Težina životinja mjerena je svaki treći dan od dana prve aplikacije (0.dan).



**Slika 11: Praćenje tjelesne mase životinja tretiranih sa MCD 8.** Životinje (n = 2) u testnim skupinama primile su tri različite pojedinačne doze spoja (3,5; 7,0 mg/kg). Spoj je apliciran 3x (0., 13. i 26. dan), te je praćena tjelesna težina životinja. Težina životinja mjerena je svaki treći dan od dana prve aplikacije (0. dan).



**Slika 12. Praćenje težine životinja u tretmanu akutne toksičnosti.** Tijekom evaluacije akutne toksičnosti (1 x 7,0 mg/kg) životinje su vagane svaki dan. Prikazane su reprezentativne vrijednosti njihovih težina. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost težine eksperimentalne skupine (n = 4) za sve primijenjene spojeve (MCD 4 i 8; kontrola) na oba spola.



**Slika 13. Praćenje težine životinja u tretmanu kronične toksičnosti.** Tijekom evaluacije kronične toksičnosti životinje su vagane svaki dan i primile su ukupno 21 mg/kg spoja (3 x 7,0 mg/kg). Prikazane su reprezentativne vrijednosti njihovih težina. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost težine eksperimentalne skupine (n = 4) za sve primijenjene spojeve (MCD 4 i 8; kontrola) na oba spola.

#### 4.3.1.2. Utjecaj ispitivanih spojeva na hematološke i biokemijske parametre

Rezultati analize hematoloških i biokemijskih parametara u ovisnosti o tretmanu (spoj MCD 4 i MCD 8), aplikaciji (akutno, kronično) i spolu životinja su prikazani u tablicama 3, 4a i 4b.

Aplikacija spoja MCD 4 na testnu grupu mužjaka u odnosu na kontrolne DMSO mužjake u akutnoj toksičnosti nema utjecaj na određivane hematološke parametre. U kroničnoj toksičnosti, odnosno višekratnoj aplikaciji, također nema promjena u hematološkim parametrima. Međusobna usporedba vrijednosti svakog parametra u akutnoj i kroničnoj toksičnosti s kontrolama pokazala je sljedeće: spoj MCD 4 najveći učinak pokazuje u kroničnoj toksičnosti na MCH i MCHC čija je vrijednost snižena na 12,5 pg, odnosno 241,7g/L u usporedbi sa akutnom aplikacijom ( $P = 0,003$ ). Najniži broj eritrocita zabilježen je kod kontrolne akutne skupine ( $P = 0,022$ ) u odnosu na MCD 4 i 8 izložene skupine. MCD 4 u kroničnoj toksičnosti povećava broj L, E, TRC, HE i snižava vrijednost Hb, MCV, MCH, MCHC parametara u odnosu na akutnu toksičnost.

MCD 8 ne utječe na promjene hematoloških parametara ni u akutnoj ni u kroničnoj toksičnosti u odnosu na kontrolne grupe. Međusobna usporedba svakog parametra u akutnoj i kroničnoj toksičnosti također je pokazala da nema razlike bez obzira na aplikaciju.

Vrijednost HE je generalno povišena u svim skupinama kronične toksičnosti u odnosu na akutnu aplikaciju ( $P = 0,040$ ), ali nije prikazano nikakvom oznakom slova jer nema razlika između skupina prema post hoc testu. Kod TRC parametra nije utvrđena statistička značajnost zbog velike razlike u očitanim vrijednostima ( $S\bar{x} = 75,2$ ).

Ženke su isključene iz prikaza hematoloških parametara zbog nejednakog broja uzoraka po grupama.

Statistički je obrađene međusobna povezanost tretmana (MCD 4, 8, kontrole) i aplikacije (jednokratno – akutna toksičnost, višekratno – kronična toksičnost).



	Akutno			Kronično			$S_{\bar{x}}$	Aplikacija	Tretman
	MCD 4	MCD 8	Kontrola	MCD 4	MCD 8	Kontrola		P - vrijednost	MCD 4, 8
<b>L</b> <b>10<sup>9</sup>/L</b>	2,8	4,3	2,7	3,9	3,6	6,2	0,42	0,124	0,544
<b>E</b> <b>10<sup>9</sup>/L</b>	10,0 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>ab</sup>	9,6 <sup>b</sup>	10,6 <sup>a</sup>	10,1 <sup>ab</sup>	10,5 <sup>a</sup>	0,11	0,022	0,480
<b>Hb</b> <b>g/L</b>	142,5	144,5	141,5	132,3	140,3	143,0	1,73	0,242	0,464
<b>HE</b> <b>L/L</b>	0,522	0,518	0,509	0,550	0,526	0,544	0,01	0,040	0,578
<b>MCV/</b> <b>fl</b>	52,1	51,6	52,9	51,7	52,2	51,7	0,20	0,429	0,595
<b>MCH /</b> <b>pg</b>	14,2 <sup>a</sup>	14,4 <sup>ab</sup>	14,7 <sup>ab</sup>	12,5 <sup>c</sup>	13,9 <sup>ab</sup>	13,6 <sup>bc</sup>	0,20	0,003	0,090
<b>MCHC</b> <b>g/L</b>	273,0 <sup>a</sup>	279,3 <sup>a</sup>	278,0 <sup>a</sup>	241,7 <sup>b</sup>	266,5 <sup>a</sup>	263,0 <sup>ab</sup>	3,53	0,003	0,091
<b>TRC</b> <b>10<sup>9</sup>/L</b>	888,3	390,0	750,5	1012,0	1009,8	804,8	75,2	0,071	0,354

**Tablica 7: Hematološki parametri mužjaka nakon jednokratne i višekratne aplikacije.** Akutna i kronična aplikacija promatrana u odnosu na kontrolu i međusobni odnos tretmana. Životinje su dobile jednokratno (7mg/kg) i višekratno (3 x 7mg/kg) spojeve. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) broja analiziranih uzoraka (n = 4 po skupini i tretmanu) i standardna pogreška tretmana ( $S_{\bar{x}}$ ). a, b, c – označava međusobno statistički značajne razlike po skupinama uz definiranu P- vrijednost (P < 0,05).

Spoj MCD 4 kod jednokratne aplikacije (akutna toksičnost) u odnosu na kontrolne DMSO životinje kod mužjaka utječe na povišenje razine AST, ALT i LDH ( $P < 0,001$ ) i smanjenje koncentracije glukoze ( $P = 0,001$ ). ALP, urea, kreatinin,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  su nepromijenjeni. Kod ženki je izrazito snižena koncentracija glukoze ( $P < 0,001$ ) dok su ostali parametri nepromijenjeni. U kroničnoj toksičnosti kod mužjaka svi mjereni parametri se ne razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod ženki kronično izlaganje spoju uzrokuje povišenje razine AST, ALT, LDH ( $P < 0,001$ ) i smanjenje ALP ( $P < 0,001$ ). Ostali parametri su nepromijenjeni. Rezultati upućuju na veću osjetljivost ženki, u odnosu na mužjake u dužem vremenskom periodu izlaganja. Mužjaci brže reagiraju i metaboliziraju MCD 4 u odnosu na ženke.

Spoj MCD 8 u akutnoj toksičnosti kod mužjaka u odnosu na kontrolne DMSO životinje uzrokuje povišenje razine AST, ALT, LDH ( $P < 0,001$ ) i smanjenje koncentracije glukoze ( $P = 0,001$ ). ALP, urea, kreatinin,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  su nepromijenjeni. Kod ženki AST, ALT i LDH su sniženi, ali ne na statistički značajnoj razini koja je zabilježena za glukozu ( $P < 0,001$ ). ALP, urea, kreatinin,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  su nepromijenjeni. Kronična aplikacija spoja MCD 8 kod oba spola ne dovodi do statistički značajne promijene određivanih parametara. Rezultati upućuju na kratkotrajni učinak spoja i njegovu brzu razgradnju.

Vrijednosti za ukupni bilirubin i GGT nisu prikazane jer su bile ispod granice detekcije.

Akutno		AST U/L	ALT U/L	ALP U/L
MCD 4	m	614,8 <sup>a</sup>	71,1 <sup>ab</sup>	92,5 <sup>cd</sup>
MCD 4	ž	538,9 <sup>ab</sup>	65,0 <sup>abc</sup>	132,6 <sup>ab</sup>
MCD 8	m	715,5 <sup>a</sup>	92,7 <sup>a</sup>	126,7 <sup>abc</sup>
MCD 8	ž	276,8 <sup>bcd</sup>	38,7 <sup>cde</sup>	153,8 <sup>a</sup>
Kontrola	m	294,8 <sup>bcd</sup>	37,3 <sup>cde</sup>	103,8 <sup>bcd</sup>
Kontrola	ž	449,0 <sup>abc</sup>	55,3 <sup>bcd</sup>	160,3 <sup>a</sup>
<b>Kronično</b>				
MCD 4	m	215,3 <sup>cd</sup>	33,1 <sup>cde</sup>	78,6 <sup>d</sup>
MCD 4	ž	412,8 <sup>abc</sup>	56,9 <sup>bcd</sup>	104,5 <sup>bcd</sup>
MCD 8	m	138,8 <sup>d</sup>	32,4 <sup>de</sup>	104,3 <sup>bcd</sup>
MCD 8	ž	213,5 <sup>cd</sup>	27,7 <sup>de</sup>	131,7 <sup>ab</sup>
Kontrola	m	138,5 <sup>d</sup>	22,8 <sup>e</sup>	110,9 <sup>bcd</sup>
Kontrola	ž	198,7 <sup>cd</sup>	27,4 <sup>de</sup>	155,7 <sup>a</sup>
$\bar{Sx}$		37,42	4,07	4,74
Aplikacija <b>P - vrijednost</b>		<0,001	<0,001	0,046
Tretman 4, 8 <b>P - vrijednost</b>		0,070	0,042	0,001
Spol <b>P - vrijednost</b>		0,939	0,640	<0,001

**Tablica 8a: Biokemijski parametri nakon jednokratne i višekratne aplikacije.** Akutna i kronična aplikacija promatrana u odnosu na kontrolu i međusobni odnos tretmana i spola. Životinje su dobile jednokratno (7mg/kg) i višekratno (3 x 7mg/kg) spoj. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) broja analiziranih uzoraka (n = 4 po skupini i tretmanu) i standardna pogreška tretmana ( $\bar{Sx}$ ). a, b, c, d, e – označava međusobno statistički značajne razlike po skupinama uz definiranu P- vrijednost (P < 0,05).

Akutno		LDH U/L	GLUKOZA mmol/l	UREA mmol/l	KREATININ μmol/l	Na mmol/l	K mmol/l
MCD 4	m	3257,5 <sup>a</sup>	8,58 <sup>bc</sup>	9,96	8,35 <sup>c</sup>	157,5 <sup>a</sup>	5,60
MCD 4	ž	2014,3 <sup>b</sup>	3,78 <sup>e</sup>	10,76	21,40 <sup>ab</sup>	151,4 <sup>bc</sup>	4,79
MCD 8	m	2351,3 <sup>ab</sup>	6,78 <sup>cd</sup>	8,60	12,93 <sup>bc</sup>	154, <sup>3ab</sup>	5,27
MCD 8	ž	803,0 <sup>cd</sup>	7,06 <sup>cd</sup>	11,16	22,25 <sup>ab</sup>	149,5 <sup>c</sup>	5,17
Kontrola	m	1047,3 <sup>cd</sup>	11,59 <sup>a</sup>	9,24	7,08 <sup>c</sup>	154,2 <sup>ab</sup>	4,58
Kontrola	ž	1324,5 <sup>bcd</sup>	10,27 <sup>ab</sup>	12,03	26,50 <sup>a</sup>	151,9 <sup>bc</sup>	5,38
<b>Kronično</b>							
MCD 4	m	741,3 <sup>cd</sup>	8,90 <sup>abc</sup>	10,44	13,55 <sup>abc</sup>	152,8 <sup>bc</sup>	5,29
MCD 4	ž	1516,5 <sup>bc</sup>	6,77 <sup>cd</sup>	9,97	12,37 <sup>bc</sup>	148,9 <sup>c</sup>	4,31
MCD 8	m	426,5 <sup>d</sup>	10,09 <sup>ab</sup>	10,44	11,40 <sup>bc</sup>	150,6 <sup>bc</sup>	5,35
MCD 8	ž	719,3 <sup>cd</sup>	5,17 <sup>de</sup>	9,58	12,85 <sup>bc</sup>	150,6 <sup>bc</sup>	4,54
Kontrola	m	478,3 <sup>d</sup>	10,27 <sup>ab</sup>	9,49	13,33 <sup>bc</sup>	149,5 <sup>c</sup>	4,70
Kontrola	ž	475,5 <sup>d</sup>	5,64 <sup>de</sup>	10,84	13,13 <sup>bc</sup>	152,0 <sup>bc</sup>	4,44
$\bar{Sx}$		152,34	0,422	0,28	1,42	0,485	0,126
Aplikacija <b>P - vrijednost</b>		<0,001	0,711	0,777	0,179	0,004	0,168
Tretman 4, 8 <b>P - vrijednost</b>		<0,001	0,001	0,800	0,940	0,350	0,588
Spol <b>P - vrijednost</b>		0,233	<0,001	0,083	0,013	0,003	0,168

**Tablica 8b: Biokemijski parametri nakon jednokratne i višekratne aplikacije.** Akutna i kronična aplikacija promatrana u odnosu na kontrolu i međusobni odnos tretmana i spola. Životinje su dobile jednokratno (7mg/kg) i višekratno (3 x 7mg/kg) spoj. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) broja analiziranih uzoraka (n = 4 po skupini i tretmanu) i standardna pogreška tretmana ( $\bar{Sx}$ ). a, b, c, d, e – označava međusobno statistički značajne razlike po skupinama uz definiranu P- vrijednost (P < 0,05).

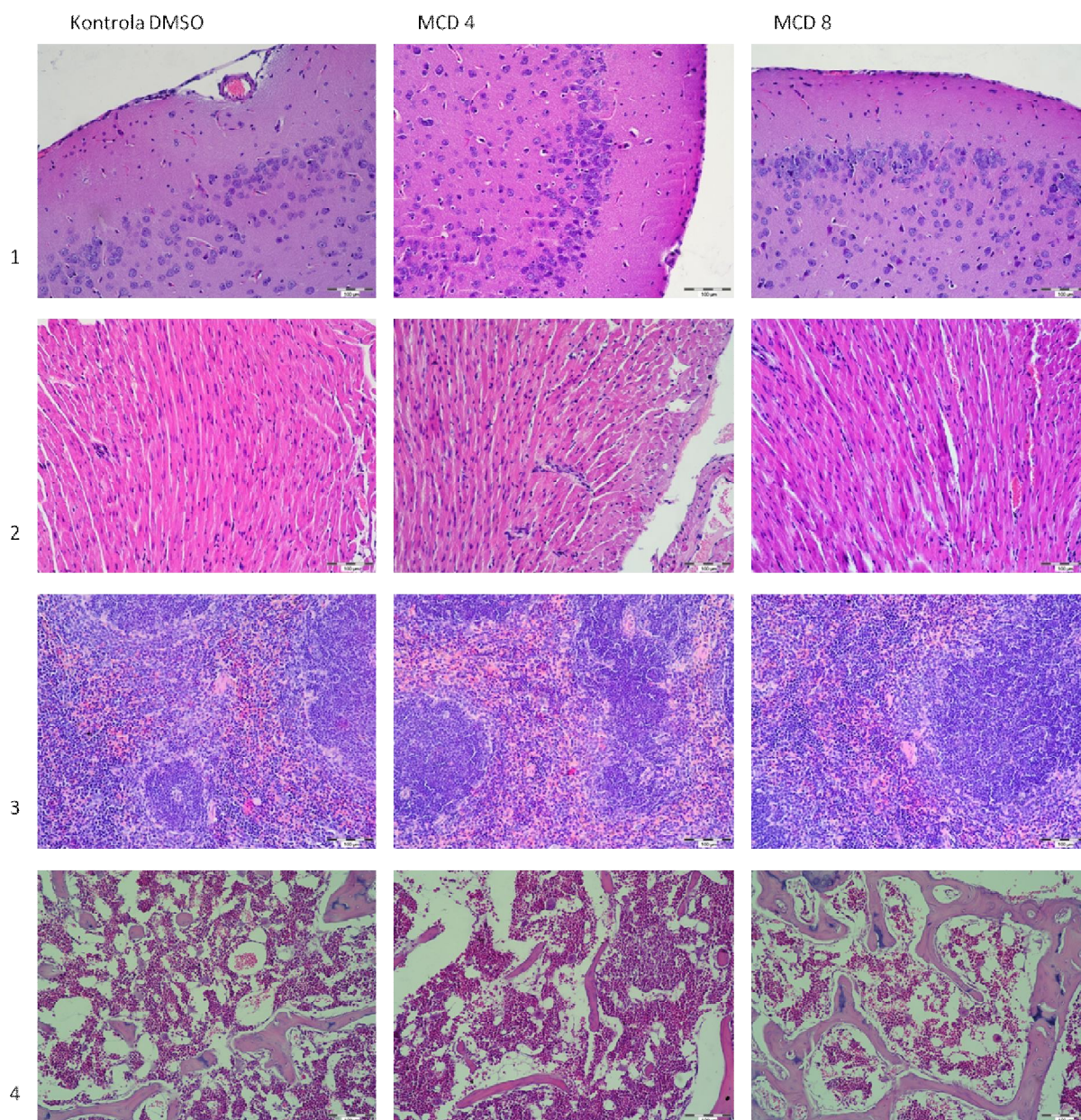
#### 4.3.1.3. Histomorfološka analiza organa

Vanjski izgled i ponašanje životinja u pokusnim grupama tretiranim sa spojevima MCD 4 i 8 nije se razlikovalo od kontrolnih životinja. Prilikom uzimanja tkiva i organa za histološku analizu nisu uočene nikakve makroskopske promijene na njima. Histološki su obrađeni i analizirani: mozak, srce, slezena, kost, želudac, tanko i debelo crijevo, jetra, bubreg i pluća životinja. Pri tome je utvrđeno da su testirani spojevi uzrokovali morfološke promijene na jetri i plućima dok su ostali organi ostali morfološki nepromijenjeni.

Histološkom analizom jetre uočeno je da su hepatociti, prostori oko krvnih žila i žučnih vodova bili normalne građe. Međutim, unutar parenhima jetre nađena su difuzno raspoređena, sitna žarišta fokalnih nekroza u vidu manjih nakupina limfocita u svih tretiranih životinja bez obzira na spol i aplicirani spoj (Slika 15). Uočene promijene su bile jače izražene u grupi životinja kod kojih se ispitivala akutna u odnosu na grupu životinja kod kojih se ispitivala kronična toksičnost spojeva MCD 4 i 8. Kontrolne grupe životinja, izložene DMSO-u imaju slične nakupine koje su jednake po svome intenzitetu pojavljivanja bez obzira na akutnu ili kroničnu izloženost.

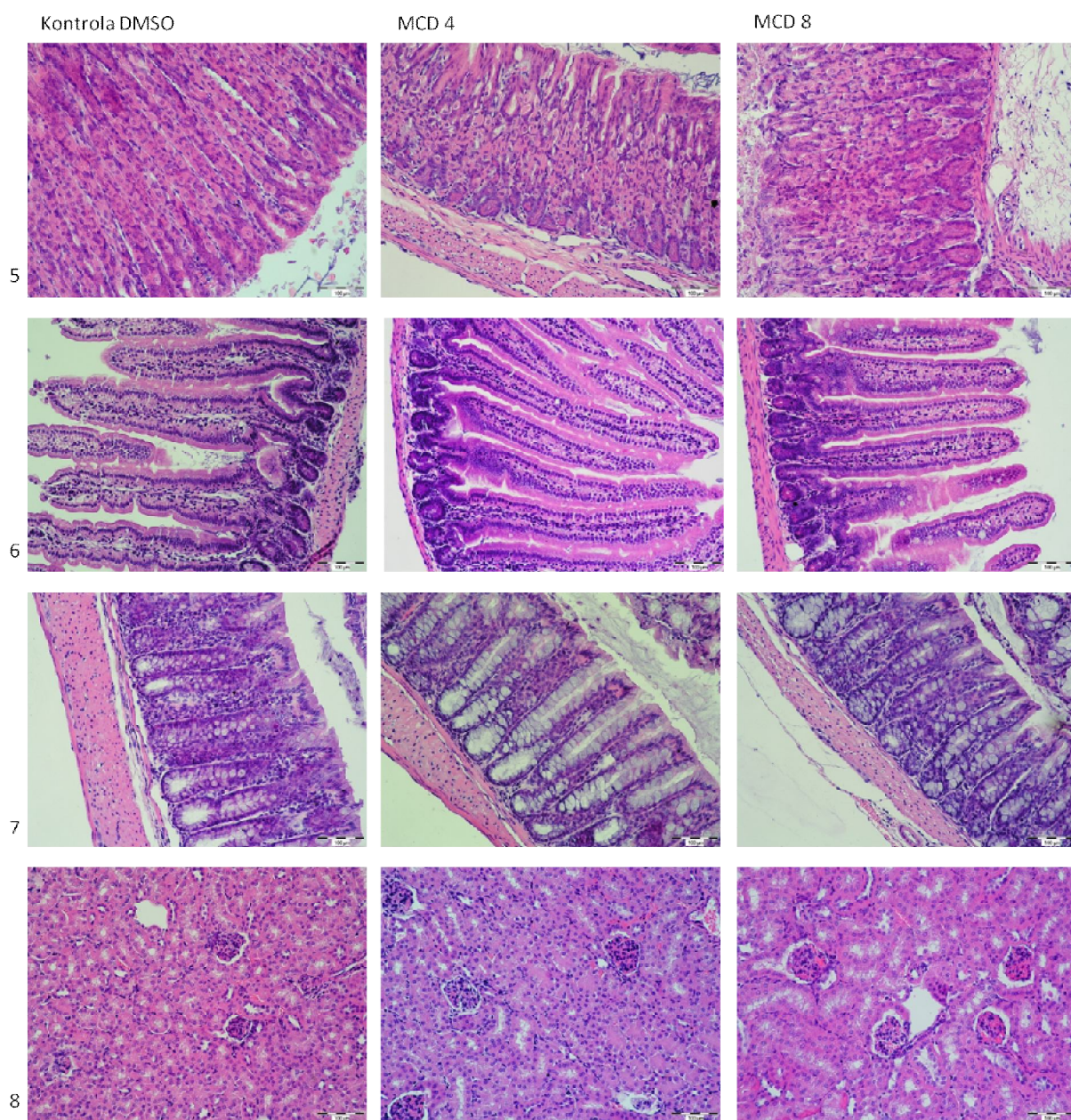
U plućnom parenhimu nađena su područja kolabiranih alveola – atelektaze (slika 16a). Osim sitnih žarišta atelektaza, uočene su i promijene na srednje velikim krvnim žilama pluća. U njihovoj zadebljanoj stjenici je uočen precipitat u obliku eozinofilnih, hijalinih nakupina koje nisu ni glikogen ni mucini jer su PAS negativne (Slika 16b). Morfološke promjene u plućima nisu spolno specifične, spojevi djeluju jednako, ali vrijeme izlaganja tretmanu utječe na način da su promjene u kroničnoj toksičnosti više izražene.





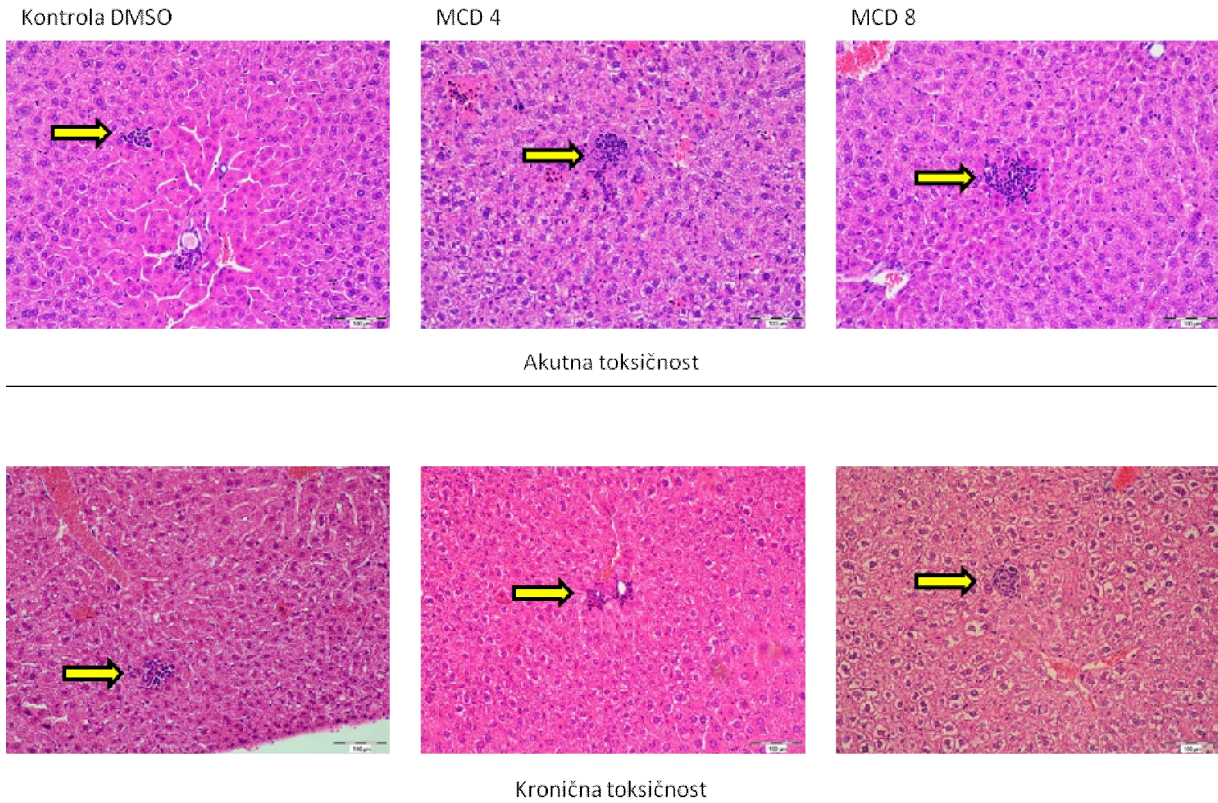
**Slika 14a. Histološka građa mozga(1), srca(2), slezene (3) i kosti (4) kontrolnih i testnih skupina (MCD 4 i 8) miševa iz tretmana akutne toksičnosti. Životinjama je jednokratno aplicirano 7 mg/kg spoja, uzeti organi i obojani standardnim HE bojanjem. Povećanje 200x. Linija označava 100 µm.**





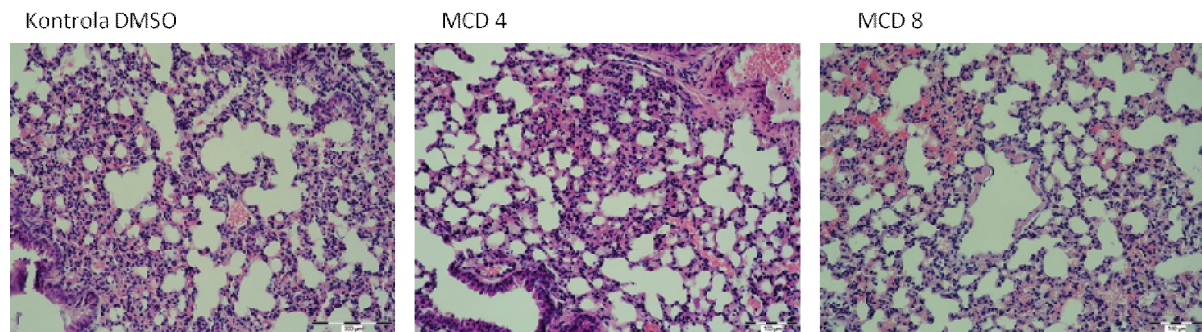
**Slika 14b.** Histološka građa želudca (5), tankog crijeva (6), debelog crijeva (7) i kore bubrega (8) kontrolnih i testnih skupina (MCD 4 i 8) iz tretmana akutne toksičnosti. Životinjama je jednokratno aplicirano 7 mg/kg spoja, uzeti organi i obojani standardnim HE bojanjem. Povećanje 200x. Linija označava 100  $\mu$ m.



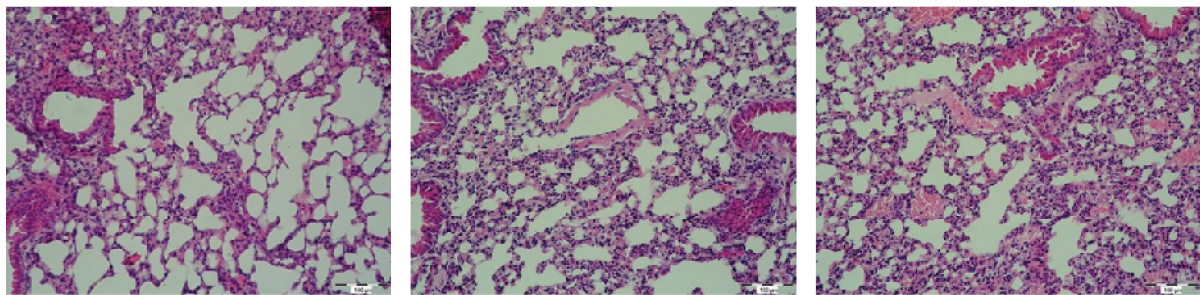


**Slika 15. Histološka građa jetre kontrolnih i testnih skupina životinja u tretmanu akutne(7 mg/kg) i kronične toksičnosti (3 x 7 mg/kg).** Patološko nakupljanje limfocita (strelica) prisutno je u jetri kontrolnih i MCD 4 i 8 tretiranih životinja. Kod akutne izloženosti spojevima skupine limfocita su veće u tkivu spojevima izloženih životinja nego u kontrolnih životinja. Kod kronične izloženosti veličina limfocitnih nakupina je podjednaka kod kontrolnih i spojevima izloženim životinjama. Nakupine limfocita u grupi akutno izloženih životinja (MCD 4 i 8) su veće u usporedbi s kronično izloženim životinjama. HE bojanje. Povećanje 200x



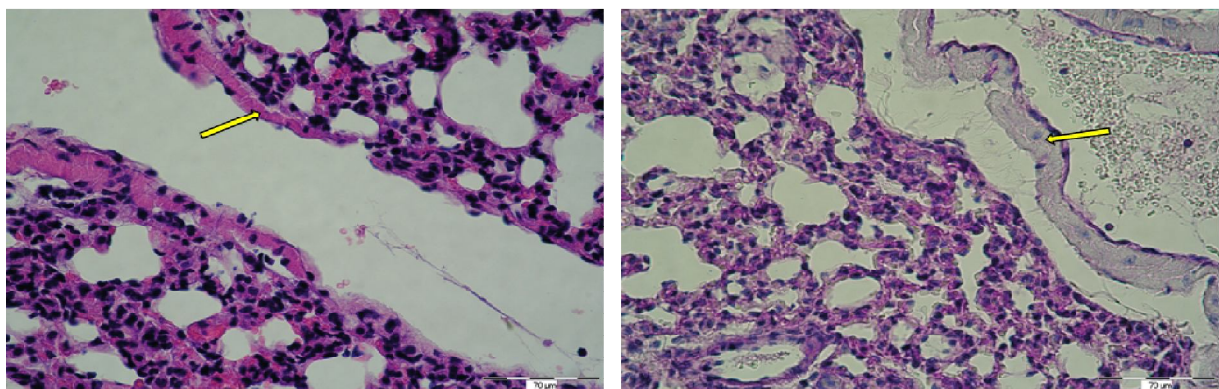


Akutna toksičnost



Kronična toksičnost

**Slika 16a. Histološka građa pluća kontrolnih i testnih skupina životinja u tretmanu akutne (7 mg/kg) i kronične toksičnosti (3x7 mg/kg).** U plućnom parenhimu prisutne su razlike u gustoći plućnog parenhima, kolabirane alveole tzv. atelektaze i promjene na krvnim žila (slika 12b) Promijene su izražajnije u kroničnoj toksičnosti neovisno o apliciranom spoju (kontrola i tretman). HE bojanje. Povećanje 200x



a) HE, 400x

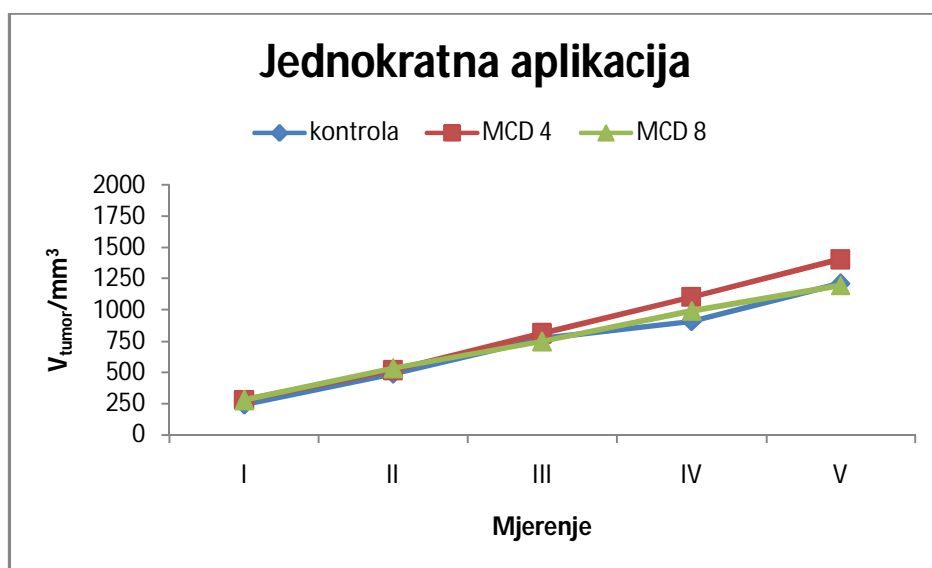
b) PAS, 400x

**Slika 16b. Krvne žile pluća** miša izloženog MCD 8 spoju (kronično). Promjene na krvnim žilama su vidljive kao naslage na stjenci srednje velike krvne žile (strelica) koje su PAS negativne. Povećanje 400x

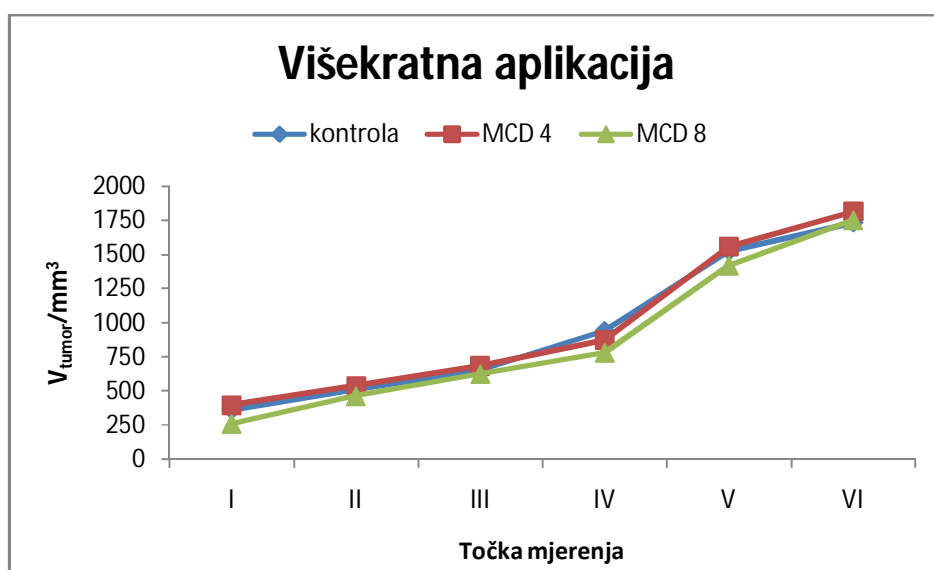
#### 4.3.2. Protutumorski učinak MCD 4 i 8 na rast implantiranog tumora

Spojevi MCD 4 i 8 jednokratno primijenjeni u koncentraciji 7 mg/ml na izrasli karcinom dojke u mišjem modelu nemaju inhibitorni učinka na rast, odnosno smanjenje volumena tumora u odnosu na kontrolu. Tijekom prvih 15 dana veličina tumora je približno ista u kontrolnim (774,7 mm<sup>3</sup>) i pokusnim grupama (MCD 4 = 778,8 mm<sup>3</sup>; MCD 8 = 749,4 mm<sup>3</sup>). Ujednačeno povećanje volumena se nastavlja i u slijedeća dva mjerenja između MCD 8 i kontrole. Uočava se nešto veći volumen tumora kod grupe koja je primala MCD 4. Tumor veći za 12% u odnosu na tretman sa MCD 8, odnosno 11% u odnosu na kontrolu je izmjeren pri V mjerjenju (Slika 17).

Višekratna aplikacija MCD 4 i 8 također ne pokazuje nikakav značajan antitumorski i inhibitorni učinak na rast mišjeg karcinoma dojke. Volumen tumora izmjeren u skupini životinja koja je primala MCD 4 ne odstupa od veličine tumora u kontrolnoj skupini. Tretman sa MCD 8 kratkotrajno usporava rast izraslog tumora, ali već kod VI mjerjenja (17. dan od iniciranja) uočava se da je veličina tumora dostigla tumor kontrolne skupine uz minimalnu razliku od 1% povećanja u tretiranoj skupini (Slika 18).



**Slika 17: Učinak jednokratno apliciranih MCD br. 4 i 8 na rast mišjeg karcinoma dojke (4T1).** Osam dana nakon iniciranja tumorskih stanica jednokratno su aplicirani MCD 4 i 8 u koncentraciji 7 mg/kg. Kroz 3 točke i 5 mjerenja (I-V) pratio se volumen karcinoma dojke. Mjerenje je učinjeno 10., 13., 15., 17. i 20. dan od iniciranja.



**Slika 18: Učinak višekratno apliciranih MCD 4 i 8 na rast mišjeg karcinoma dojke (4T1).** Peti dan od iniciranja tumorskih stanica višekratno (6.,9.,12. i 15. dan od iniciranja) aplicirani su MCD 4 i 8 u koncentraciji 4 mg/kg. Kroz 3 točke i 6 mjerenja (I-VI) pratio se volumen karcinoma. Mjerenje je učinjeno 6., 8., 10.,13., 15. i 17. dan od iniciranja.

Tijekom eksperimenta niti jedna životinja nije uginula. Uginuća u pokusnim skupinama su nastala kao rezultat naraslog tumora. Skupina koja je izložena djelovanju MCD 4 prva je počela ugibati dva dana od posljednjeg mjerenja, a u MCD 8 i kontrolnoj skupini 4, odnosno 5 dana po završetku.

**5. Rasprava**

Dosadašnje spoznaje o monometinskim bojama [18] i aktualne smjernice razvojne farmakologije dovele su do razvoja i sinteze novih monometinskih cijaninskih derivata. Cilj ovog istraživanja je procjena protutumorskog učinka niza novosintetiziranih MCD-a i njihove potencijalne primjene kao fluorokroma za obilježavanje nukleinskih kiselina. Rezultati istraživanja odgovorili su na postavljena pitanja o citotoksičnom i protutumorskom učinku *in vitro* i *in vivo*.

*Biološki učinci spojeva* j MCD – 1-14 i doksorubicina kao kontrolnog spoja istraživani su u *in vitro* uvjetima na panelu normalnih i tumorskih staničnih linija. Vrijednost  $IC_{50}$  korištena je kao parametar procijene citotoksičnog učinka. Rezultati pokazuju veliku raznolikost u inhibicijskim učincima između pojedinih derivata. Učinci spojeva bili su ovisni o vrsti stanica na kojima je testiran pojedini spoj, primijenjenoj koncentraciji i strukturi analiziranih derivata. Prema učinkovitosti inhibicije rasta stanica spojevi se mogu podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine spojevi MCD 1-8, koji pokazuju izrazitu citotoksičnost s naglaskom na inhibitorni učinak ispitivanih spojeva na leukemijske stanične linije K562, Jurkat i HuT78 (Tablica 1.  $IC_{50} = 0,001 - 6,6 \mu M$ ). Prosječna vrijednost  $IC_{50}$  bila je  $0,77 \mu M$  što odgovara kriteriju selektivnosti za odabir spoja prema kojem je spoj sa potencijalom za daljnji razvoj onaj koji ima  $IC_{50}$  niži od  $50 \mu M$  [12]. Prema navedenom kriteriju, MCD 1-8 su dobri kandidati za dalja ispitivanja učinkovitosti na modelima solidnih tumora. U ovu skupinu ubrojen je i spoje MCD 14 koji pokazuje određenu djelotvornost na AGS, HeLa i MIAPaCa-2 liniju ( $IC_{50} = 7,1 \mu M; 7,2 \mu M; 32,6 \mu M$ ). Podrijetlo takve jake selektivnosti prema stanicama nije poznato [29]. Spojevi MCD 9-13 su zbog svog citotoksičnog kapaciteta svrstani u drugu skupinu spojeva koji ne udovoljavaju kriteriju ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Dodatni kriterij odabira spojeva za ispitivanja *in vivo* je poštediti učinak na normalne stanične linije. Rezultati su uputili na tri kandidata: MCD 4 ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ), MCD 8 ( $IC_{50} = 50,1 \mu M$ ) i MCD 14 ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) za daljnju procjenu učinaka u *in vivo* uvjetima.

Ulazak nekog spoja u stanicu i njegova lokalizacija određena je kemijskom strukturom spoja [34,75]. Usporedba strukture i načina vezanja spojeva MCD 1-8 za dvostruku DNK i RNK ukazuje na značajan utjecaj radikala vezanog za dužu os aromatske jezgre. Spojevi MCD 1-6 mogu stvarati višestruke H-veze, a vežu se u mali utor dvostruke DNK. MCD 7 i MCD 8 se preferirano vežu mehanizmom interkaliranja za dvostruku DNK i za RNK [29]. MCD 14 ima sličan mehanizam vezanja za DNK kao MCD 4, ali se razlikuju u lipofilnosti. MCD 14 je lipofilniji zbog velikog fosfonijevog supstituenta, za razliku od MCD 4 koji je znatno manja i hidrofilnija molekula. Jaka fluorescencija MCD 1-6, 8, 14 u kontaktu sa DNK i/ili RNK omogućila je učinkovito praćenje i detekciju ulaska i lokalizacije spojeva unutar stanice pomoću fluorescentne mikroskopije.



Spojevi MCD 1 i 2 uočeni su u stanicama nakon 60 minuta inkubacije [29], dok MCD 9 ulazi u stanicu nakon 30 minuta inkubacije [58] a njegov signal spoja opada s vremenom izlaganja. Prisutnost zelene fluorescencije spoja MCD 4 u stanicama i nakon 120 minuta od inkubacije upućuje na njegovu strukturnu očuvanost. (Slika 2b). Fluorescentni signal spoja MCD 8 slabi nakon 90 minuta (Slika 2b) što može biti posljedica degradacije strukture spoja ili reakcije sa staničnim makromolekulama. MCD 14 najsprije, pretpostavlja se zbog veličine molekule, prolazi kroz staničnu membranu uz nakupljanje spoja na površini (Slika 3a) stanice. Potrebno je 120 minuta da taj spoj u cijelosti prođe kroz staničnu membranu i da se lokalizira u staničnim organelima. Na osnovi dosadašnjih spoznaja [29,58] o strukturi ispitivanih spojeva pretpostavljeni mehanizam njihovog ulaska u stanicu je difuzija. Zajedničko obilježje svih ispitanih MCD-a je zeleni fluorescentni signal raspršen po cijeloj stanici. Signal je vidljiv u jezgri i citoplazmi što upućuje na interakciju MCD-a ne samo s genomskom nego i sa mitohondrijskom DNK i RNK. Bojanje kromoforom Hoechst 33258 uzeto je kao pozitivna kontrola isključive lokalizacije u jezgri i vezanja za dvostruku kromosomalnu DNK (Slika 1-3c). Usporedba s lokalizacijom MCD-a (Slika 1 – 3d) pokazuje razliku u lokalizaciji fluorokromnih boja MCD 4, 8 i 14 u odnosu na Hoechst 33258. Dobra strana MCD derivata je u tome što emitiraju fluorescencijski signal nakon pobuđivanja standardnim osvjetljenjem (vidljivim djelom spektra) dok je za vizualizaciju Hoechst 33258 nužno UV osvjetljenje. Dodatno, MCD derivati obilježavaju žive stanice što je jedan od većih doprinosa istraživanja u okviru ovoga rada jer većina fluorescentnih boja zahtjeva fiksiranje stanica. Danas se dvije boje, Hoechst 33258 i DRAQ5 [54] koriste za bojanje jezgre živih stanica. Nedostatak Hoechst 33258 je ekscitacija u UV području koje djeluje štetno na stanice i ubija ih skraćujući vrijeme analize. Budući u fluorescentnoj mikroskopiji boja za obilježavanje živih stanica treba zadovoljiti kriterij niske citotoksičnosti i fototoksičnosti u kombinaciji sa postojećim signalom (eng. photobleaching) [54] MCD 4 se pokazao kao vrlo dobar kandidat za vizualizaciju živih stanica jer ni nakon 2 sata izloženosti nema naznake slabljenja intenziteta fluorescentnog signala, bez promjena u vitalnosti stanica (Slika 1 a-d). Citotoksičnost spoja MCD 4 na HeLa staničnom modelu 10 puta je niža u odnosu na spojeve MCD 8 i 14 (Tablica 1). Na osnovi dobivenih rezultata fluorokroma poput MCD 4 koji se može primijeniti za praćenje živih stanica ima veliki potencijal za daljnji razvoj u području fluorescentne mikroskopije i analize stanica.

S obzirom na uočenu razliku u učincima na rast tumorskih i normalnih stanica između ispitivanih MCD spojeva, kao i potencijal spoja MCD 4 kao fluorokroma ispitan je učinak spojeva MCD 4 i MCD 8 na stanični ciklus. Da bismo potvrdili dobivene rezultate učinaka ispitivanih spojeva na stanični ciklus korištene su kao kontrolni spojevi doksorubicin i Hoechst 33258. Doksorubicin je DNK interkalirajući spoj koji se primjenjuje za liječenje različitih vrsta tumora [60] i primijenjen u niskim koncentracijama

zaustavlja stanični ciklus u G1 točki [15, 50]. Hoechst 33258 djeluje prvenstveno tako da se veže za mali utor DNK, a pokazuje i sposobnost interkaliranja [7] te zaustavlja stanični ciklus u S fazi što je dokazano ispitivanjima na HeLa stanicama [75]. Spoj MCD 4 zaustavlja stanični ciklus HeLa stanica u G2/M fazi, što upućuje na interakcije ovog spoja s DNK i njegovo vezanje na mali utor DNK. S vremenom se udio stanica u G2/M fazi smanjuje iako i dalje ostaje povišen u odnosu na kontrolu. Dodatni učinak je značajno povećanje udjela stanica u S fazi nakon 72 sata. Učinak MCD 4 na stanični ciklus ovisi o vremenu djelovanja spoja i primijenjenoj koncentraciji. U stanicama izloženim spoju MCD 8 uočena je brža promjena staničnog ciklusa pa se već nakon 24 sata uočava povećano nakupljanje stanica u S i G2/M fazi što je još naglašenije nakon 48 sati. Međutim, nakon 72 sata spoj gubi svoju moć zaustavljanja staničnog ciklusa pri promatranoj koncentraciji ( $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>). Učinkovitost MCD 8 je također uvjetovana primijenjenom koncentracijom. Mehanizam djelovanja MCD 8 na stanični ciklus nije usporediv sa doksorubicinom kao intrekalatorom jer ne blokira stanice u G1 fazi. Njegova aktivnost u S i G2/M fazi je djelomično usporediva sa Hoechst 33258 i navodi na zaključak da MCD 8 djeluje kombiniranim mehanizmom djelovanja: interkaliranjem i vezanjem na mali utor. Spojevi MCD 4 i MCD 8 imaju sličan učinak na rast stanica i njihov stanični. Iako je uočena razlika u IC<sub>50</sub> vrijednosti za ova dva spoja koja je za MCD 8 10 puta niža u odnosu na MCD 4.

Vizualizacija NK koja se zasniva na fluorescenciji ovisna je o sposobnosti kromofora da se velikim afinitetom veže za NK i pri tome emitira fluorescentni signal povećanog intenziteta [10]. Sposobnost vizualizacije NK sa MCD 8 nakon provedene elektroforeze metodom naknadnog bojanja (eng. poststaining) [39] usporediva je sa SYBR Safe-om koji je danas jedna od najčešće primjenjivanih boja za vizualizaciju NK na elektroforetskim gelovima. Intenzitet fluorescentnog signala je rastao tijekom promatranog vremena. Veći intenzitet signala se dobiva primjenom TRANS bijelog svijetla koje prolazi kroz medij (gel). Prolaz svjetlosti kroz gel je moguć zbog njegove transparentnosti. Razlika u vizualizaciji uzoraka (DNK, RNK, DNK marker) između MCD 8 i SYBR Safe vjerojatno potječe od razlike u koncentraciji primijenjenih kromofora. SYBR Safe je komercijalni kromofor nepoznate koncentracije za krajnjeg potrošača [43] te je teško usporediti učinak MCD 8 u finalnoj koncentraciji od 2 µg/ml sa SYBR Safe-om, no očigledna je sličnost intenziteta zabilježenog signala koji je bio jači pri TRANS bijelom osvjetljenju. Dobiveni rezultat za MCD 8 u suglasnosti je sa drugim istraživanjima monometinskih cijaninskih derivata primijenjenih u finalnoj koncentraciji od 1 µg/ml i bojanje u trajanju od 60 minuta [43] MCD 4 i 14 pod istim uvjetima (15 i 45 minuta; 2 µg/ml) nisu dali zadovoljavajući rezultat. Budući da su MCD 8 i 14 spojevi kreirani na osnovi monometinskih TO i YO boja i emitiraju fluorescentni signal u vidljivom dijelu spektra nije isključeno njihovo bolje vizualiziranje uz primjenu modernih vizualizacijskih sustava sa

laserskom tehnologijom i integriranim filtrima različitih valnih duljina (zeleni 532nm; crveni 633nm; plavi 488nm), u usporedbi sa nama dostupnom standardnom 300 nm UV transiluminatoru [39].

Unutarstanična lokalizacija MCD 4 i 8, sposobnost vezanja za DNK/RNK, značajan učinak na stanični ciklus i citotoksičnost čini ih pogodnim kandidatima za ispitivanja toksičnog i protutumorskog učinka *in vivo* na mišjem modelu.

*In vivo* procjena protutumorskog učinka ključni je korak u predkliničkom razvoju kemoterapeutika [*In vivo* modeli omogućuju praćenje učinka potencijalnog terapeutika u složenom organskom sustavu gdje postoji mogućnost da spoj uopće ne dolazi do ciljne mete npr. proteina ili nukleinskih kiselina zbog slabe propusnosti stanične membrane ili da ne djeluje zbog mehanizma izlučivanja ksenobiotika (eng. drug efflux pumps) [52]. Također omogućuje odabir najboljeg spoja sa protutumorskim učinkom, najboljeg načina apliciranja i optimalne koncentracije spoja. Prvi životinjski model koji se primjenjuje je mišji model uz dodatan oprez jer je poznato da niti jedan mišji tumorski model ne odgovara u potpunosti promjenama uočenim kod ljudi [5].

Kako bismo procijenili u kojoj mjeri su spojevi MCD 4 i MCD 8 toksični istražena je njihova moguća akutna i kronična toksičnost. Procjena toksičnosti nekog spoja određuje se analizom hematoloških i biokemijskih parametara uz patohistološki pregled različitih organa. Oštećenje se može dogoditi nekoliko dana do nekoliko tjedana nakon primjene spoja. Kontrolne i testne skupine životinja žrtvovane su 14. i 40. dan po završetku izlaganja. Pri analizi rezultata uzeto je u obzir da su kontrolne skupine životinja izložene djelovanju DMSO-a, otapala za MCD 4 i 8. Utvrđena LD<sub>50</sub> doza (koncentracija pri kojoj ugiba više od pola testne skupine) za DMSO apliciran u trbušnu šupljinu miševa iznosi 2,5 g/kg tjelesne mase [49]. Težina životinja, kao indikator reakcije na izloženost spoju, tijekom pokusa za sve testne skupine bila je ujednačena (Slike 8. i 9.) uz manje oscilacije. Za procjenu toksičnog učinka MCD 4, MCD 8 i DMSO su primijenjeni u koncentraciji od 7mg/kg. DMSO apliciran u trbušnu šupljinu u koncentraciji od 7mg/kg (350 puta niža od utvrđene LD<sub>50</sub> koncentracije) ne djeluje štetno i primjenjiv je u korištenom mišjem modelu.

Hematološki parametri životinja izloženih djelovanju MCD 4 i MCD 8 uspoređeni su s kontrolnim skupinama životinja. Dodatno su pregledani preparati bedrene kosti izloženih i kontrolnih životinja sa ciljem bolje procijene hematoloških parametara. S kliničkog stajališta značaj imaju samo parametri koji se statistički razlikuju od kontrolnih skupina.



Hematološki parametri životinja izloženih spojevima MCD 4 i MCD 8 nisu se značajno promijenili ni nakon 40 dana izlaganja (Tablica 4). Međusobna usporedba MCD 4 i MCD 8 u odnosu na kontrolu po parametrima i vremenu izlaganja pokazuje prisutne, ali zanemarive i statistički neznčajne razlike. Srednja vrijednost broja leukocita životinja nulte skupine koja nije izložena nikakvom spoju je  $6,4 \times 10^9/L$  što je usporedivo s kontrolnim životinjama. Iako nema statistički značajnog smanjenja, uočen je snižen broj leukocita i u jednokratnom i višekratnom izlaganju. Spojevi izazivaju neku vrstu upalne reakcije što se vidi na histološkim preparatima tkiva jetre po nakupinama limfocita koje se smanjuju u produženom izlaganja (Slika 11). Rezultati upućuju da životinje koje su primale MCD 4 i MCD 8 u produženom izlaganju (kronična toksičnost) učinkovito uklanjaju spojeve iz organizma jer se nakupine limfocita smanjuju. Svi ostali analizirani hematološki parametri (E, Hb, HE, MCV, MCH, MCHC, TRC) kontrolne i izloženih skupina životinja međusobno se ne razlikuju. Histološki preparati kosti (Slika 10a ) upućuju na normalnu građu kosti i koštane srži što je u suglasnosti sa nepromijenjenim hematološkim parametrima (broj E, L TRC).

Biokemijski parametri životinja izloženih djelovanju MCD 4 i MCD 8 uspoređeni su s kontrolnim skupinama životinja. Biokemijski parametri su brži i time bolji pokazatelji toksičnosti nekoga spoja jer omogućuju uvid u metaboličku funkciju jetre kao ključnog organa za metaboliziranje ugljikohidrata, proteina, lipida i brojnih ksenobiotika, izlučnu sposobnost bubrega i metabolizam masnih kiselina. Pojedini jetreni enzimi čije se koncentracije mogu mjeriti u krvi, kao što su ALT i AST i krajnji produkti metabolizma, ukazuju na mogućnost oštećenja jetre i jetrene disfunkcije. Porast aktivnosti jetrenih enzima upućuje na nastalo oštećenje jetrenih stanica ili promjenu u propusnost stanične membrane uslijed čega enzimi izlaze iz citoplazme i ulaze u krvni serum. ALT je enzim specifičan za jetru prisutan u citoplazmi gdje katalizira reakciju transaminacije. Bilo koje oštećenje jetrenih stanica dovodi do povećanja koncentracije ALT-a u serumu. AST se u malim količinama osim u jetri, nalazi i u srčanom i skeletnim mišićima i njegove povišene serumske koncentracije pokazatelj su mogućih oštećenja tih organa.

Pri jednokratnom izlaganju pokusnih životinja spoju MCD 4 uočena je povećana koncentracija AST, ALT i LDH u krvi neovisno o spolu i do 2 puta u odnosu na kontrole dok je glukoza snižena. Višestruko davanje MCD 4 utječe samo na ženke uz dodatno sniženje vrijednosti AP-a. Promjene su statistički značajne i upućuju na otežani rad i oštećenje jetre. Koncentracije AST i ALT su u jednokratnom izlaganju kod mužjaka povišene za 100% odnosno za 15% kod ženki, dok su u

višekratnom izlaganju povišene za 50% u krvi mužjaka i 100% u krvi ženki u odnosu na kontrolu. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da mužjaci brže reagiraju na prisutnost stranog spoja, ali i da se brže prilagođavaju i izlučuju stranu tvar, dok ženke reagiraju sporije na isti strani spoj. Vrijednost kreatinina statistički je nepromijenjena u odnosu na kontrolne skupine i kod jednokratnog i višekratnog izlaganja. Uočena je razlika u koncentraciji i kreatinina kod jednokratnog izlaganja životinja po spolu. Ženke imaju statistički višu koncentraciju kreatinina u krvi u odnosu na mužjake. S vremenom (višekratno izlaganje) razlike između mužjaka i ženki nestaju. Istovremeno nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji uree. Ova dva parametra upućuju na zaključak da MCD 4 u danim koncentracijama ne utječe na normalnu funkciju bubrega i njihovu moć izlučivanja. Poznato je da sniženje koncentracije kreatinina upućuje na poremećaj funkcije bubrežnog glomerula, dok razina ureje raste znatno prije pada kreatinina uslijed smanjenja bubrežne moći izlučivanja. Histološki nalaz preparata bubrega (10b) pokazuje zdravo tkivo bez patoloških promjena što je dodatni dokaz netoksičnog djelovanja MCD 4 na bubrege. Koncentracije i natrija i kalija su nepromijenjene i neovisne o vremenu izlaganja. Koncentracija glukoze je kod obadva spola pri jednokratnom izlaganju statistički značajno snižena. Istovjetan učinak nije uočen nakon višekratnog izlaganja.

Koncentracija AST, ALT i LDH nakon jednokratnog izlaganja spoju MCD 8 je statistički značajno promijenjena. U krvi mužjaka je povećana i do 100% , dok je u ženki smanjena i 50%. Višekratno izlaganje ne dovodi do razlike u koncentracijama enzima prisutnih u cirkulaciji, osim kod koncentracije LDH izmjerene u krvi ženki koja se povećala za 66%. Alkalna fosfataza, Na, K, urea i kreatinin su ostali nepromijenjeni u životinja izloženih MCD 8 u odnosu na kontrolne životinje i kod jednokratnog i višekratnog izlaganja. Glukoza je statistički snižena kod obadva spola u jednokratnom izlaganju. Histološki preparati bubrega (Slika 10b) potvrđuju zdravo tkivo što govori u prilog ne toksičnosti primijenjene koncentracije MCD 8.

Sveobuhvatno gledano na osnovu biokemijskih parametara osjetljivost životinja je veća na MCD 4 nego na MCD 8 kojeg životinje brže ili lakše razgrađuju neovisno o spolu. Na osnovu dobivenih rezultata proizlazi da dugotrajnije izlaganje MCD 4 ima veći toksični učinak na ženke, što se može povezati s razlikama u farmakokinetici ksenobiotika koja je ovisna o brojnim čimbenicima pa tako i o spolu [40]. Manja tjelesna težina i veličina organa, povećani udio tjelesne masti i smanjena glomerularna filtracija kod žena u odnosu na muškarce utječe na farmakokinetiku spoja [77].

Histomorfološkom analizom procijenjen je toksični učinak MCD 4 i MCD 8 na organe izloženih životinja u odnosu na kontrole. Normalna građa organa i uočene promjene su prikazane grafički (Slika 10a,b, 11, 12).

Tkivni preparati jetre imaju normalnu histološku građu iako su uočene neuobičajene nakupine limfocita vidljive na histološkim rezovima MCD 4 i MCD 8 izloženih i kontrolnih životinja (Slika 11). Nakupine su manje kod kronične u odnosu na akutnu toksičnosti što se podudara s izmjerenim koncentracijama enzima AST, ALT i LDH, kao i blagog porasta broja leukocita. Iste patološke promjene uočene su kod oba spola životinja. Nakupljane limfocita je uobičajeni znak upalne reakcije koja može biti uzrokovana prisustvom nekog mikroorganizma. Vjerojatnost takve reakcije se ne može isključiti jer se uočene promjene nalaze i kod kontrolnih životinja. Iako su životinje u zatvorenom i ventiliranom sustavu vjerojatnost vanjske infekcije je moguća. Uz eventualnu postojeću reakciju izlaganje stranom spoju povećalo bi aktivnost jetre i aktivaciju dodatnih limfocita. Bez dodatnog ispitivanja metabolizma i puta izlučivanja spojeva teško je dati točan odgovor o podrijetlu i uzroku uočene promjene. Potrebno je uzeti u razmatranje intraperitonealni način primjene, „prvi“ prolaz kroz jetru i putove moguće razgradnje spojeva, odnosno biotransformacije na bezopasne razgradne produkte. Budući da nema promjena u histologiji jetre, a nakupine se smanjuju, možemo reći da spojevi uzrokuju reverzibilnu upalnu reakciju.

Uočene promjene u tkivu pluća vjerojatno su posljedica žrtvovanja životinja uz anesteziju dietil eterom [38]. Tkivo pluća spojevima izloženih i kontrolnih skupina životinja pokazuju sljedeće promjene. Nejednaku gustoću tkiva pluća dok su na stjenkama srednje velikih krvnih žila uočeni precipitati nepoznatog podrijetla i sastava koji se opisuju kao eozinofilne, hijaline nakupine (Slika 12b). U plućnom parenhimu vidljiva su područja kolabiranih alveola – atelektaze (slika 12a). Atelektaze nastaju kao rezultat nedostatnog protoka zraka kroz pluća zbog začepjenja bronha pri čemu zrak iz pluća ulazi u krvotok što dovodi do stiskanja i uvlačenja pluća. Jedan od mogućih uzroka atelektaze je nedostatak surfaktanta, odnosno tekućine koja oblaže plućne alveole i smanjuje površinsku napetost [32,70]. Obzirom da se ove promjene uočavaju i kod kontrolnih i spojevima tretiranih životinja vrlo je vjerojatno da su nastale kao posljedica primjene dietil etera[56].

Ispitivanje protutumorskog učinka MCD 4 i MCD 8 na rast nerazvijenog i djelomično razvijenog mišjeg karcinoma dojke (4T1 stanična linija) jednokratnim i višekratnim izlaganjem testnim spojevima nije pokazalo značajan učinak na smanjenje razvijenog karcinoma. Kontrolne skupine životinja imale su jednaki rast karcinoma kao i skupine koje su primale MCD 4 i 8 (Slika 13 i 14). Neučinkovitost MCD 4 i 8 na zaustavljanje rasta razvijenog karcinoma može biti posljedica nekoliko važnih čimbenika koji nisu prisutni u *in vitro* uvjetima testiranja. Kod *in vitro* analize spoj se direktno primjenjuje na uzgojene stanice i nema prepreke njegovom djelovanju. Citotoksični učinak je rezultat kemijske strukture spoja, primijenjene koncentracije i propusnosti stanične membrane koji u kombinaciji omogućuje ulazak spoja u stanicu. U *in vivo* sustavu učinkovitost spoja je funkcija tri varijable: djelotvornost na ciljnom mjestu djelovanja x koncentracija spoja na ciljnom mjestu djelovanja x biološka varijabilnost [95]. Koncentracija spoja na ciljnom mjestu djelovanja određena je farmakokinetikom koja obuhvaća apsorpciju, raspodjelu, metaboličku biotransformaciju i izlučivanje spoja [95]. Spoj može biti neučinkovit ako se ne apsorbira i izluči nepromijenjen, metaboličkom biotransformacijom aktivne komponente su postale inaktivne, ili je došlo do formiranja kompleksa nekom od bioloških molekula npr. proteinima što rezultira nedjelotvornošću spoja. Testovi toksičnosti i povišene razine aktivnosti jetrenih enzima ukazuju da se spojevi apsorbiraju, ali da najvjerojatnije dolazi do njihove metaboličke razgradnje posredovane citokromom P450 iz endoplazmatskom retikulumu jetrenih stanica i stanica tankog crijeva [77]. Nakupljanje limfocita uočeno u histološkim rezovima jetre upućuje na upalnu reakciju posredovanu prisustvom MCD 4, 8 i DMSO. Dodatni dokaz koji upućuje na metaboličku biotransformaciju spojeva lagani je pad težine životinja 5 do 10 dana po prvom izlaganja nakon čega težina životinja prestaje opadati. Slijedi faza stagnacije tjelesne težine životinja nakon koje dolazi do njenog porasta što nadalje ukazuje da su životinje učinkovito uklonile spojeve i počele se oporavljati od nastalih oštećenja.

## **6. Zaključak**

### ***In vitro* efekt**

- 14 novosintetiziranih spojeva MCD-a pokazuje različit inhibitorni učinak na analizirane normalne i tumorske stanične linije u ovisnosti o mehanizmu djelovanja, vezanom radikalu i primijenjenoj koncentraciji spoja
- MCD 1-8 imaju izrazito snažan citotoksični učinak na 11 tumorskih staničnih linija (AGS, CaCo-2, HeLa, HEP-2, HT-29, MIAPaCa-2, NCI-H358, SW-620, K562, Jurkat, HuT 78) uključujući 3 leukemijske linije; MCD 14 ima umjeren citotoksični učinak ovisno o osjetljivosti stanične linije dok MCD 9-13 ne djeluju citotoksično
- MCD 4, 8 i 14 su odabrani za daljnju analizu zbog različitog mehanizma djelovanja i izraženog citotoksičnog učinka uz poštediti učinak na normalne stanične linije sa  $IC_{50} > 50 \mu M$
- **MCD 4** je po mehanizmu interakcija s nukleinskim kiselinama mali utor vezujući spoj; zaustavlja stanični ciklus stanica adenokarcinoma vrata maternice (HeLa) u G2/M fazi i izuzetno je dobar kandidat u fluorescentnoj mikroskopiji za vizualizaciju živih stanica
- **MCD 8** je po mehanizmu interakcija s nukleinskim kiselinama interkalator koji zaustavlja stanični ciklus stanica adenokarcinoma vrata maternice (HeLa stanica) u G2/m i S fazi; izvrstan je kandidat za vizualizaciju nukleinskih kiselina na gelu
- **MCD 14** je po mehanizmu interakcija s nukleinskim kiselinama mali utor vezujući spoj; njegova fluorescentna svojstva nisu dostatna za daljnji razvoj bilo u području fluorescentne mikroskopije bilo za vizualizaciju nukleinskih kiselina

### ***In vivo* učinak**

- MCD 4 i MCD 8 i značajno utječu na povišenje koncentracije jetrenih enzima AST, ALT i LDH u krvi izloženih životinja u odnosu na kontrolne životinje 14. i 40. dana od izlaganja
- Klinički značajnog učinka na hematološke parametre nema ni nakon 40 dana
- MCD 4 uzrokuje veću toksičnost životinja, posebno kod ženki i njihovog produženog izlaganja
- MCD 8 pokazuje kratkotrajni toksični učinak koji se ne uočava kod životinja izloženih višekratnim dozama spoja.
- MCD 4 i MCD 8 uzrokuju reverzibilnu upalnu reakciju i sporadično nakupljanje limfocita u tkivu jetre kod oba spola životinja
- MCD 4 i MCD 8 ne uzrokuju uočene patološke promjena plućnog tkiva; promijene su posljedica djelovanja etera ili genskog naslijeđa soja
- MCD 4 i MCD 8 ne djeluju toksično na mozak, srce, slezenu, želudac, tanko i debelo crijevo, bubrege i kost izloženih životinja
- MCD 4 i MCD 8 primijenjeni jednokratno (7 mg/kg) i višekratno (4x4 mg/kg) ne pokazuju protutumorski učinak na nerazvijeni mišji karcinom dojke (4T1) u primijenjenim koncentracijama

## **7.Literatura**



1. Ahmad AI (2007) BOXTO as a real-time thermal cycling reporter dye. *J.Biosci.* 32:229-239
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 5<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York
3. Ananya P, Bhattacharya S (2012) Chemistry and biology of DNA-binding small Molecules. *CURRENT SCIENCE*, 102: -
4. Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001) Review: Cytochrome P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 737–747
5. Ariz U, Mato JM, Lu SC, Martinez Chantar ML (2010) Nonalcoholic Steatohepatitis, Animal Models, and Biomarkers: What is new? *Bioinformatics Methods in Clinical Research* ch.6; Humana Press, New York
6. Avendano C, Menendez JC (2008) *Chemistry of Anticancer Drugs*. ELSEVIER, Amsterdam
7. Bailly C, Colson P, Henichart JP, Houssier C (1993) The different binding modes of Hoechst 33258 to DNA studied by electric linear dichroism. *Nucleic Acids Res* 21:3705-3709
8. Baribault H (2010) *Mouse Models for Drug Discovery*, Humana Press, New York 602: 135-155 (to je pretzl)
9. Bengtsson M, Karlsson JH, Westman G, Kubista M (2003) A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 31:e45
10. Benson SC, Mathies RA, Glazer AN (1993) Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: stability and applications of the DNA complexes *Nucleic Acids Res* 21:5720-5726
11. Biver T, De Biasi A, Secco F, Venturini M, Yarmoluk S (2005) Cyanine dyes as Intercalating agents: Kinetic and Thermodynamic Studies on the DNA/Cyan 40 and DNA/CCyan2 Systems. *Biophysical J.* 89:374-383
12. Boik JC, Newman RA (2008) Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds. *BMC Pharmacology* 8:1-13
13. Boulikas T (2008) Introduction to Anticancer Therapeutics, in *Anticancer Therapeutics* (ed S. Missailidis), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, poglavlje 4
14. Cai X, Gray Jr PJ, Von Hoff D (2009) DNA minor groove binders: Back in the groove. *Cancer Treatment Reviews* 35: 437–450
15. Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ, Chen C-Y (2006) *Phellinus linteus* sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer* 95:282 – 288

16. David-Cordonnier MH, Hildebrand MP, Baldeyro B, Lansiaux A, Keuser C, Benzschawel K (2007) Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA-intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors. *EU.J. Med. Chem.* 42: 752-771
17. Deligeorgiev TG, Gadjev NI, Vasilev AA, Maximova VA, Timcheva I, Katerinopoulos HE, Tsikalas GK (2007) Synthesis and properties of novel asymmetric monomethine cyanine dyes as non-covalent labels for nucleic acids. *Dyes and Pigments* 75: 466-473
18. Deligeorgiev TG, Kaloyanova S, Juan J. Vaquero JJ (2009) Intercalating Cyanine Dyes for Nucleic Acid Detection *Recent Patents on Materials Science*. 2: 1-26
19. Demeunynck M, Bailly C, Wilson WD (2002) Eds. DNA and RNA Binders; Wiley-VCH, Weinheim
20. Duančić V (1983) Osnove histologije čovjeka. Medicinska knjiga, Zagreb
21. Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, et al. (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 37:97-105
22. Erba E, Mascellani E, Pifferi A, D'Incalci M (1995) Comparison of cell-cycle phase perturbations induced by the DNA minor groove alkylator tallimustine and by melphalan in the SW626 cell line. *Int J Cancer* 62:170-5
23. Eriksson M, Karlsson JH, Westman G, Åkerman B (2003) Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: dissociation rates in free solution and electrophoresis gels. *Nucleic Acids Res* 31:6235-6242
24. Eriksson M, Westerlund F, Mehmedovic M, Lincoln P, Westman G, Larsson A, Akerman B (2006) Comparing mono- and divalent DNA groove binding cyanine dyes-Binding geometries, dissociation rates, and fluorescence properties. *Biophysical Chemistry* 122:195-205
25. Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *NATURE* 411:342-348
26. Fegan A, Pravin SS, Balasubramanian S (2008) Rigid cyanine dye nucleic acid labels *Chem Commun (Camb)* 17: 2004-2006
27. Filazi A, Sireli M, Kalkan F (2003) The influence of amitraz on biochemical parameters in mice. *Human & Experimental Toxicology* 22: 99-101
28. Giglio S, Monis PT, Saint CP (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:136-136.

- 
29. Glavaš-Obrovac LJ, Piantanida I, Marczi S, Mašić L, Timcheva II, Deligeorgiev TG (2009) Minor structural differences of monomethine cyanine derivatives yield strong variation in their interactions with DNA, RNA as well as on their in vitro antiproliferative activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4747-4755
  30. Glazer AN, Rye HS (1992) Stable dye–DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature* 359: 859-861
  31. Grace D, Abraham S, Varghese A, Sathianarayanan (2009) Absorption and Metabolism of Xenobiotics: An Overview. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. 7:-
  32. Greenfield L J, Chernick V, Hodson WA, Brumley GW (1967) Alterations in Pulmonary Surfactant following Compression Atelectasis, Pulmonary Artery Ligation, and Reimplantation of the Lung. *Annals of Surgery* 166: 109-117
  33. Guyton AC, Hall JE (2006) *Medicinska fiziologija* 11. izdanje, MEDICINSKA NAKLADA, ZAGREB
  34. Haldane A, Finlay GJ, Hay MP, Denny WA, Bagueley BC (1999) Cellular uptake of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA). *Anticancer Drug Des.* 14:275-280
  35. Haq I (2002) Thermodynamics of drug–DNA interactions. *Archives of Biochem. Biophys.* 15: 1-15
  36. Haraguchi T, Ding DQ, Yamamoto A, Kaneda T, Koujin T, Hiraoka Y (1999) Multiple-color fluorescence imaging of chromosomes and microtubules in living cells. *Cell Struct Funct.* 24:291–298
  37. Haugland RP (2002) *Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9<sup>th</sup> ed. Molecular Probes Inc, Eugene, OREGON
  38. Hudenstierna G, Rothen HU (2000) Atelectasis formation during anesthesia: causes and measures to prevent it. *J Clin Monit Comput* 16:329-335
  39. Hilal H, Taylor JA (2008) Cyanine dyes for the detection of double stranded DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70:1104-1108
  40. Honkakoski P, Kojo A, Lang M A (1992) Regulation of the mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and Phenobarbital. *Biochem. J.* 285:979-983
  41. Kadish KM, Smith KM, Guillard R (1999) *The Porphyrin Handbook*, Academic Press, ELSEVIER, New York

42. Karlsson JH, Eriksson M, Perzon E, Åkerman B, Lincoln P, Westman G (2003) Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 31: 6227-6234
43. Kovalska VB, Tokar VP, Losytskyy MY, Deligeorgiev T, Vassilev A, Gadjev N, Drexhage KH, Yarmoluk SM (2006) Studies of monomeric and homodimeric oxazolo[4,5-b] pyridinium cyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids visualization. *J. Biochem. Biophys. Methods* 68:155–165
44. Lah J, Drobnak I, Dolinar M, Vesnaver G (2008) What drives the binding of minor groove-directed ligands to DNA hairpins? *Nuc. Acids Res.* 36: 897-904
45. Leal JFM, Martínez-Díez M, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, Negri A, Gago F, Guillén-Navarro MJ, Avilés P, Cuevas C, García-Fernández LF, Galmarini CM (2010) PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent *in vitro* and *in vivo* anti-tumour activity. *British Journal of Pharmacology* 161:1099–1110
46. Lee LG, Chen Ch-H, Chiu LA (1986) Thiazole Orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 7: 508-517
47. Lee LG, Chen Ch-H: (1989) US4883867
48. Levitus M, Ranjit S (2011) Cyanine Dyes in Biophysical Research: The Photophysics of Polymethine Fluorescent Dyes in Biomolecular Environments. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 44:123-151
49. Lewis RJ (1996) *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials* 9<sup>th</sup> New York, NY: Van Nostrand Reinhold 1996 1:1364
50. Li B, Xu H, Li Z, Yao M, Xie M, Shen H, Shen S, Wang X, Jin Y (2012) Bypassing multidrug resistance in human breast cancer cells with lipid/polymer particle assemblies. *International Journal of Nanomedicine* 7:187–197
51. Louhimies S (2002) Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. *ATLA* 30:217-219
52. Lucumi E, Darling C, Jo H, Napper AD, Chandramohanadas R, Fisher N, Shone AE, Jing H, Ward SA, Biagini GA, DeGrado WF, Diamond SL, Greenbaum DC (2010) Discovery of Potent Small-Molecule Inhibitors of Multidrug-Resistant *Plasmodium falciparum* Using a Novel Miniaturized High-Throughput Luciferase-Based Assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3597–3604.

- 
53. Marczi S, Glavaš-Obrovac LJ, Belovari T, Stojković R, Ivanković S, Šerić V, Piantanida I, Žinić M (2007) Biological properties of 4-methyl-2,7-diamino-5,10-diphenyl-4,9-diazapyrenium hydrogensulfate (ADAP). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62: 595-604
  54. Martin RM, Leonhardt H, Cardoso CM (2005) DNA Labeling in Living Cells Cytometry Part A 67A:45–52
  55. Mickisch G, Fajta S, Bier H, Tschada R, Alken P (1991) Cross-resistance patterns related to glutathione metabolism in primary human renal cell. *Urol. Res.*19: 99-103
  56. Milano A, Apice G, Ferrari E, Fazioli F, de Rosa V, Salzano de Luna A, Iaffaioli RV, Caponigro F (2006) New emerging drugs in soft tissue sarcoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59: 74–84
  57. Miller R, Thomas P (1967) Pulmonary Surfactant: Determination from Lung Extracts of Patients receiving Diethyl Ether or Halothane. *Anesthesiology* 28:1089-1092
  58. Mišković K, Tumir L, Crnolatac I, Deligeorgiev TG, Vasilev A, Kaloyanova S, Baus Lončar M, Piantanida I, Glavaš-Obrovac Lj (2010) Biological properties of cyanine dyes equipped with bulky phosphonium substituents. HDBMB Congress: The secret life of biomolecules, Opatija, Hrvatska
  59. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA (2011) Harperova ilustrirana biokemija 28. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb
  60. Najmeh T, Houri S, Parvin M, Firouzeh B, Arash HN, Abdolfattah S, Ebrahim H (2012) Combination effect of PectaSol and Doxorubicin on viability, cell cycle arrest and apoptosis in DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines. *Cell Biol Int.* (u pripremi za print)
  61. Narodne novine (2006) Zakon o zaštiti životinja. Zagreb: Narodne novine d.d., 135:3045
  62. Neidle S, Kelland LR, Trent JO, Simpson IJ, Boykin DW, Kumar A, Wilson WD (1997) CYTOTOXICITY OF BIS(PHENYLAMIDINIUM)FURAN ALKYL DERIVATIVES IN HUMAN TUMOUR CELL LINES: RELATION TO DNA MINOR GROOVE BINDING *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 7: 1403-1408
  63. Nelson SM, Ferguson LR, Denny WA (2007) Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mutation Research* 623:24-40
  64. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, Approved: June 1998.

- 
65. Pitts JD, Sloboda RD, Dragnev KH, Dmitrovsky E, Mycek MA (2001) Autofluorescence characteristics of immortalized and carcinogen-transformed human bronchial epithelial cells. *J Biomed Opt.* 6:31-40
  66. Palchaudhuri R, Hergenrother PJ (2007) DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* 18:497–503
  67. Proetzel G, Wiles MVMouse (2010) *Mouse Models for Drug Discovery*. Humana Press, Totowa, New York, 602:1-21
  68. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 245: 154-160
  69. Rye HS, Glazer AN (1995) Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 23:1215-1222
  70. Schurch S, Lee M, Gehr P (1992) Pulmonary surfactant: Surface properties and function of alveolar and airway surfactant. *Pure & App/ Chern.* 64:1745-1750
  71. Sheweita SA (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Matab.1:* 107-132
  72. Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (2007) *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins: Metal Ions in Life Science*. John Wiley, New York
  73. Silverman RB (2004) *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Elsevier Academic Press, New York
  74. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
  75. Stolić I, Mišković K, Piantanida I, Baus Lončar M, Glavaš-Obrovac LJ, Bajić M (2011) Synthesis, DNA/RNA affinity and antitumour activity of new aromatic diamidines linked by 3,4-ethylenedioxythiophene. *E.J. Med.Chem.* 46:743-755
  76. Talmage JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A (2007) Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *The American Journal of Pathology* 170:793-804
  77. Tsutomu S, Yuki K, Kanokwan J, Nebuo N (2009) Sex Difference of Drug-metabolizing Enzyme: Female Predominant Expression of Human and Mouse Cytochrome P450 3A Isoforms. *Jurnal of Health Science* 55:325-337
  78. Urbach AR (2011) DNA complexes: Durable binders. *Nature Chemistry* 3:836–837

79. Urnysheva VV, Smotryaeva MA, Shishina LN (2004) The Dynamics of Physiological and Biochemical Parameters of Mouse Status as a Function of Concentration of Chemical Toxicants in Drinking Water Extracts. *BIOLOGY BULLETIN* 31:633-637
80. Waring MJ (2006) Sequence-specific DNA Binding Agents. Royal Society of Chemistry, Cambridge
81. Westman G, Karlsson J (2008) Synthesis And Evaluation Of New Cyanine Dyes As Minor Groove Of [POLY(dA-dT)].sub.2 Binders - Patent 7378240
82. Wojcik K, Dobrucki JW (2008) Interaction of a DNA Intercalator DRAQ5, and a Minor Groove Binder SYTO17, with Chromatin in Live Cells: Influence on Chromatin Organization and Histone—DNA Interactions. *Cytometry Part A* 73A: 555-562
83. Yamori T, Matsunaga A, Sato S, Yamazaki K, Komi A, Ishizu K, Mita I, Edatsugi H, Matsuba Y, Takezawa K, Nakanishi O, Kohno H, Nakajima Y, Komatsu H, Andoh T, Tsuruo T (1999) Potent Antitumor Activity of MS-247, a Novel DNA Minor Groove Binder, Evaluated by an *in Vitro* and *in Vivo* Human Cancer Cell Line Panel. *CANCER RESEARCH* 59:4042–4049
84. Yoshioka S, Takahashi S, Hori H, Ishimori K, Morishima I (2001) Proximal cysteine residue is essential for the enzymatic activities of cytochrome P450cam. *Eur. J. Biochem.* 268:252-259
85. Zhang HY, Gu YY, Li ZG, Jia YH, Yuan L, Li SY, An GS, Ni JH, Jia HT (2004) Exposure of Human Lung Cancer Cells to 8-Chloro-Adenosine Induces G2/M Arrest and Mitotic Catastrophe. *Neoplasia* 6: 802 – 812
86. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32: e103
87. [www.flowbook.denovosoftware.com/Flow\\_Book/Chapter\\_6%3a\\_DNA\\_Analysis](http://www.flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_6%3a_DNA_Analysis)
88. [www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox\\_docs/udpProc/udpfin01/append/App03.pdf](http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/udpProc/udpfin01/append/App03.pdf)
89. [www.jaxmice.jax.org/strain/000664.html](http://www.jaxmice.jax.org/strain/000664.html)
90. [www.jaxmice.jax.org/strain/002448.html](http://www.jaxmice.jax.org/strain/002448.html)
91. [www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cell\\_cycle.html](http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cell_cycle.html)
92. [www.jax.org/imr/controls.html](http://www.jax.org/imr/controls.html)
93. [www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf](http://www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf)
94. [www.acnp.org/g4/gn401000086/ch085.html](http://www.acnp.org/g4/gn401000086/ch085.html) Preskorn SH, Harvey AT Cytochrome P450 Enzymes and Psychopharmacology

## **Kratice**

4T1 – mišji mamarni karcinom

Å - angstrom

AGS – adenokarcinom želuca

ALT – alanin amino transferaza

AP – alkalna fosfataza

AST – aspartat amino transferaza

AT – adenin- timin

BJ – humani normalni fibroblasti

DAPI – 4/6-diamidino-2-phenylindol

DMEM – Dulbecco modificirani Eagle medij

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

E – eritrociti

EDTA – etilen diamino tetra octena kiselina

FACS – protočni citometar eng. fluorescence activated cell sorter

FBS – fetalni goveđi serum

GC – gvanidin-citozin

GGT – gama glutamil transferaza

HAEC – humane endotelne stanice aorte

Hb- hemoglobin

HE – hematokrit

HeLa – humani adenokarcinom vrata maternice

HEp-2 – humani karcinom ždrijela

HEPES – natrijeva sol 4-(2-hidroksietil)piperazin -1-etanol sulfatne kisleline



HNO<sub>3</sub> – nitratna kiselina

HT-29, CaCo-2 –humani karcinom debelog crijeva

HuT-78 – humani limfom T – stanica

IC<sub>50</sub> – koncentracija koja inhibira rast 50% stanica

JURKAT – humana leukemija T – stanica

K – kalij

K562 – humana kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi

KCl – kalij klorid

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – kalij dihidrogen fosfat

L – leukociti

LD50 – koncentracija koja ubija 50% životinja pokusne skupine

LDH –laktat dehidrogenaza

MCD –monometinski cijaninski derivati

MCH – prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitima

MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima

MCV – prosječni volumen eritrocita

MDCK- pseće normalne bubrežne stanice

MIAPaCa-2 – humani karcinom gušterače

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid

Na – natrij

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – natrij dihidrogen fosfat

NaCl – natrij klorid

NCI-H358 – humani bronhioalveolarni karcinom

NK – nukleinske kiseline

PAS – per jodična kiselina – Schiffov reagens

PBS –fosfatni pufer

PFA – para formaldehid

PI – propidij jodid

RNK – ribonukleinska kiselina

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute medij

RT – sobna temperatura eng. room temperature

SDS – Natrij dodecil sulfat

SW-620 – humani metastazirani karcinom debelog crijeva

TAE – tris acetatni pufer

TO –tiazol narančasta eng.thiazole orange

TRC – trombociti

UV – ultraljubičasto svjetlo

YO –oksazol žuta eng. oxazole yellow