

Utjecaj derivata primakina na modulaciju aktivnosti transportera ABCG2

Carević, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:896695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Karla Carević

**Utjecaj derivata primakina na modulaciju aktivnosti
transportera ABCG2**

DIPLOMSKI RAD
Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Marijete Kralj, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem dr. sc. Marijeti Kralj što mi je dala priliku da odradim laboratorijsku stručnu praksu i diplomski rad izradim u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju. Uz njeno vodstvo i podršku stekla sam vrijedno znanje i iskustvo u radu u laboratoriju te u metodici pisanja znanstvenog rada.

Veliko hvala doktorandici Mariji Mioč što me nadzirala tijekom rada u laboratoriju, uz nju sam naučila razne vještine i „cake“ prilikom planiranja eksperimenta, i što mi je pružala veselo društvo i bodrila tijekom rada. Također, čestitam Mariji i njezinom mužu na rođenju sina Lea!

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Maji Matulić na savjetima i strpljenju prilikom pisanja diplomskog rada.

Hvala mojim divnim prijateljima, najboljim cimericama Moniki i Antoniji, te majci Jasminki i bratu Aljoši na moralnoj podršci prilikom studiranja te izrada i pisanja diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ DERIVATA PRIMAKINA NA MODULACIJU AKTIVNOSTI TRANSPORTERA ABCG2

Karla Carević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Otpornost tumorskih stanica na kemoterapiju velik je problem u liječenju tumora. Najviše istražen mehanizam otpornosti jest povećano izbacivanje lijeka iz stanica pomoću transportera ABC. Oni normalno sudjeluju u izbacivanju različitih toksina i ksenobiotika te na taj način štite stanicu od štetnih utjecaja. Međutim, njihova prekomjerna ekspresija na površini tumorskih stanica vodi do otpornosti te smanjenog odgovora na liječenje. ABCG2 je protein veličine 72 kDa iz obitelji transportera ABC koji ima širok raspon supstrata, među kojima su i mnogi lijekovi. S obzirom da ABCG2 može značajno modulirati učinkovitost liječenja, važno je istražiti njegove interakcije sa spojevima. U ovome radu ispitivali smo djelovanje šest derivata primakina iz skupine fumardiamida primakina i halogenanilina i *bis*-urea derivata primakina, sintetiziranih kao potencijalni antimalarici i/ili protutumorski lijekovi na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, na aktivnost transportera ABCG2. Kao model koristili smo staničnu liniju akutne mijeloidne leukemije ljudi bez (PLB) i s povećanom ekspresijom ABCG2 (PLB-G2), koja pokazuje otpornost prema različitim supstratima ove pumpe, poput mitoksantrona. Ispitivali smo antiproliferativna svojstva spojeva testom MTT, dok smo inhibiciju ABCG2 ispitali metodom nakupljanja supstrata Hoechst 33342 i testom vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3, protočnom citometrijom, uz korištenje Ko143 kao pozitivne kontrole. Spojeve s najjačom aktivnosti testirali smo kombiniranim tretmanom s mitoksantronom, prateći eventualno pojačanje djelovanja mitoksantrona u otpornim stanicama.

(50 stranica, 16 slika, 6 tablica, 66 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: derivati primakina, transporter ABCG2, inhibicija, rak

Voditelj: dr. sc. Marijeta Kralj, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, IRB

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 7. 1. 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Diploma thesis

THE INFLUENCE OF PRIMAQUINE DERIVATIVES ON THE MODULATION OF TRANSPORTER ABCG2 ACTIVITY

Karla Carević

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

The resistance of tumor cells to chemotherapy is a major problem in the treatment of tumors. The most investigated mechanism of resistance is the increased excretion of the drug from cells by the ABC transporter. They normally participate in the excretion of various toxins and xenobiotics, thus protecting the cell from adverse effects. However, their overexpression on the surface of the tumor cells leads to resistance and a reduced response to treatment. ABCG2 is a 72 kDa protein from the ABC transporter family that has a wide variety of substrates, including many known drugs. Given that ABCG2 can significantly modulate treatment efficacy, it is important to investigate its interactions with compounds. In this study, we investigated the effects of six primaquine derivatives (primaquine and halogenaniline fumardiamides and *bis-urea* primaquine derivatives), synthesized as potential antimalarials and/or anticancer drugs at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry in Zagreb, on ABCG2 transporter activity. As a model, we used a cell line of acute myeloid leukemia without (PLB) and with increased expression of ABCG2 (PLB-G2), which shows resistance to various substrates of this pump, such as mitoxantrone. We tested the antiproliferative properties of the compounds using the MTT assay, while the inhibition of ABCG2 was tested with the Hoechst 33342 substrate accumulation assay and with 5D3 shift assay, by flow cytometry, using Ko143 as a positive control. The compounds with the strongest activity were tested with a combination treatment with mitoxantrone, to verify possible enhancement of mitoxantrone activity in resistant cells.

(50 pages, 16 images, 6 tables, 66 literary citations, original in: Croatian)

Keywords: primaquine derivatives, ABCG2 transporter, inhibition, cancer

Supervisor: Dr. Marijeta Kralj, Senior scientist tenured, Ruđer Bošković Institute

Cosupervisor: Associate Professor Maja Matulić

Reviewers: Associate Professor Maja Matulić

Professor Mirna Ćurković Perica

Professor Dubravka Hranilović

Thesis accepted: 7. 1. 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Liječenje oboljelih od malignih bolesti	1
1.2 Otpornost tumorskih stanica	3
1.3 Obitelj transportera ABC	4
1.4 Transporter ABCG2	7
1.5 Inhibicija transportera ABCG2	9
1.6 Derivati antimalarika	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1 Materijali	17
3.1.1 Stanične linije	17
3.1.2. Testirani spojevi	17
3.2. Metode	19
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi	19
3.2.2. Ispitivanje antiproliferativnog učinka primakina <i>in vitro</i>	19
3.2.3. Test metil tiazolil tetrazolija	20
3.2.4. Test osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik	21
3.2.5. Test nakupljanja supstrata (Hoechst 33342)	21
3.2.6. Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3	22
3.2.7. Određivanje ekspresije proteina metodom <i>Western Blot</i>	22
3.2.8. Statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI	26
4.1 Karakterizacija modelnih staničnih linija	26
4.2 Ispitivanje antiproliferativnog učinka derivata primakina <i>in vitro</i>	28
4.3 Ispitivanje inhibitiornog potencijala derivata primakina na transporter ABCG2 testom nakupljanja supstrata	31
4.4 Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3	33
4.5 Test osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik	35
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČAK	44
7. LITERATURA	45

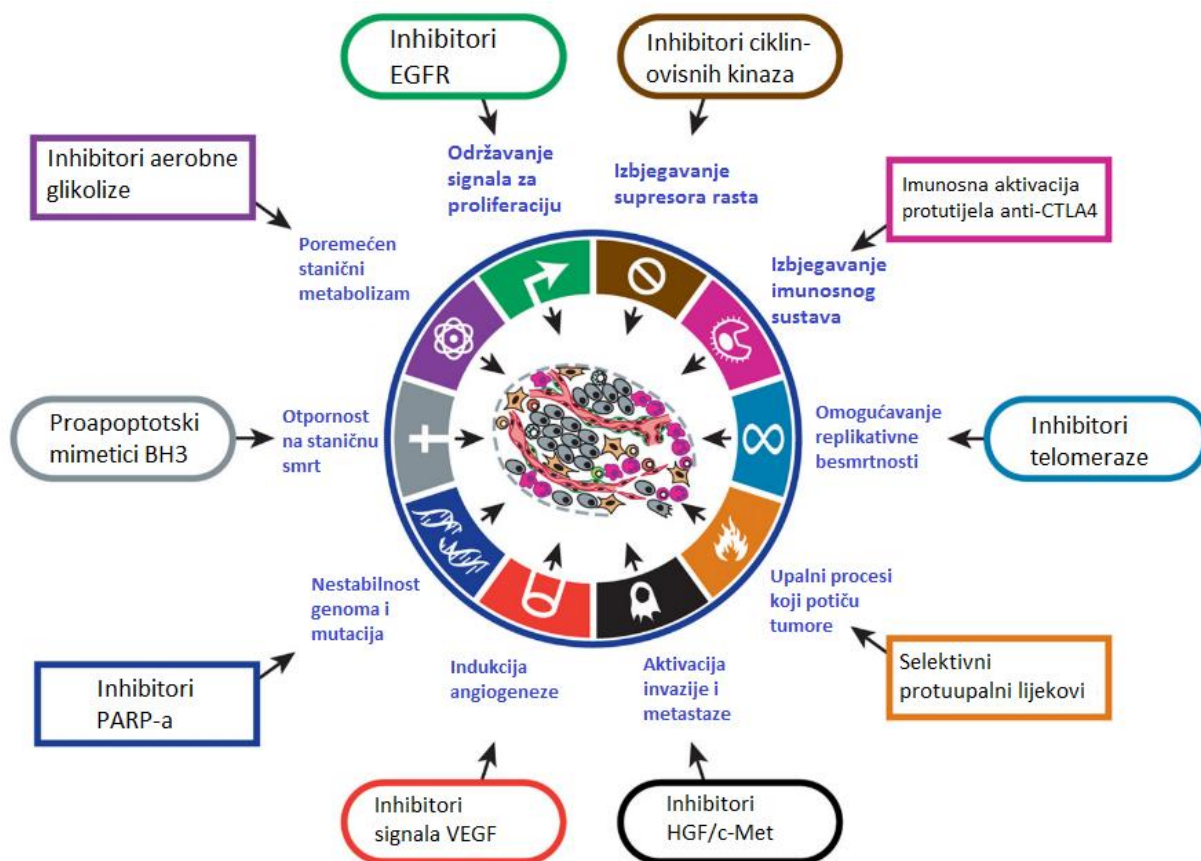
1. UVOD

1.1 Liječenje oboljelih od malignih bolesti

Rak je vodeći uzrok smrti u ekonomski razvijenim državama i drugi vodeći uzrok smrti u državama u razvoju. Pojavnost tumorskih bolesti raste u državama u ekonomskom razvoju kao rezultat starenja populacije kao i usvajanje životnih stilova povezanih uz rak uključujući pušenje, fizička neaktivnost i „zapadnjačka“ prehrana. Primjerice, rak pluća najčešća je vrsta raka i vodeći uzrok smrti među muškarcima, a slijede ga rak prostate i rak kolorektalnog sustava. Među ženama, rak dojke je najčešće dijagnosticirani oblik raka i vodeći uzrok smrti, nakon čega slijede rak kolorektalnog sustava i rak pluća. Najčešće dijagnosticirani rak i vodeći uzrok smrti, međutim, varira od države do države i unutar države ovisno o ekonomskom razvoju te povezanim društvenim čimbenicima i čimbenicima životnog stila (Bray *i sur.*, 2018.).

Rak je skupina bolesti karakterizirana nereguliranom diobom stanica te invazijom i širenjem stanica iz primarnog mjesta na druge točke u tijelu. Tumori raznih podrijetla imaju različite značajke. Uz to, postoje i razlike u molekularnim mehanizmima uključenim u karcinogenezu unutar svakog staničnog tipa i načinu širenja stanica iz primarnog mjesta (Pecorino, 2012.). Neki od tih mehanizama su održavanje proliferativnih signala, inhibicija tumor supresora, opiranje staničnoj smrti, omogućavanje replikativne besmrtnosti, invazivnosti, poticanje angiogeneze, i stvaranje metastaza. Za sve te karakteristike zaslužna je nestabilnost genoma, zbog čega nastaje genetička raznovrsnost koja ubrzava stjecanje i razvitak mehanizama otpornosti (Hanahan i Weinberg, 2011.).

Karcinogeneza je proces koji se najčešće odvija u više koraka i zahtijeva nakupljanje više mutacija. Međutim, postoje dokazi da u malom postotku tumora, jedan događaj u stanici može voditi do mnogih mutacija i uzrokovati rak. Geni koji su uključeni u rast, diferencijaciju ili staničnu smrt, poput aktivacije onkogeni i/ili inaktivacije tumor supresora, kada su disfunkcionalni mogu voditi do pojave fenotipa raka (Slika 1.).



Slika 1. Obilježja raka i potencijalni lijekovi. Preuzeto iz Hanahan i Weinberg, 2011.

Najranija terapijska strategija korištena protiv tumora bila je kirurško odstranjivanje što većeg dijela tumora. Ova metoda je relativno jednostavna kod nekih vrsta tumora, ali s druge strane nemoguća kod drugih tipova. Osim toga, metoda nije precizna na staničnoj razini i ne rješava pitanje stanica koje su se proširile s primarnih mjesta (metastazirane stanice). Stoga se koriste kemoterapija i radioterapija za inhibiciju i uklanjanje metastaziranih stanica (Pecorino, 2012.)

Neke vrste tumora, međutim, pokazuju otpornost na terapiju s jednim kemoterapeutikom, poput limfoma, raka dojke i raka testisa, zbog čega se prešlo na kombiniranu kemoterapiju koja je pokazivala odlične rezultate. Ovakva metoda omogućivala je mijenjanje trajanja kemoterapije i primijenjene doze, te je došlo do razvitka kompleksnih tretmana. Nakon 50 godina, uspjesi postignuti kombiniranom kemoterapijom počeli su stagnirati. Kirurgija, radioterapija i kombinirana kemoterapiju nisu više bili dovoljni za liječenje mnogih tipova tumora. Kao rezultat, počele su se razvijati nove terapijske strategije usmjerene na ciljanje osnovne karakteristike tumorskih stanica, tj. one koje transformiraju normalne stanice i tkiva u maligne tvorevine (Vasan i sur., 2019.).

1.2 Otpornost tumorskih stanica

Postoje lijekovi sa svojstvima potrebnim za usporavanje diobe tumorskih stanica, kao i njegovog širenja. Mnogi su odobreni za kliničku upotrebu u liječenju nekih oblika raka ili su u kliničkim ispitivanjima. Svaki od njih djeluje na neko od svojstava tumorskih stanica i prikazani su u Slici 1. Kemoterapeutici mogu biti neuspješni u ubijanju tumorskih stanica zbog raznih razloga. Lijekovi su često sustavno primijenjeni i stoga skloni varijacijama u apsorpciji, metabolizmu i dostavi u ciljna tkiva koja su specifična za pojedine pacijente. Tumori se mogu nalaziti u dijelovima tijela do kojih lijekovi ne mogu lako prodrijeti, ili mogu biti zaštićeni lokalnim okolišnim faktorima, kao što su povišeni tkivni hidrostatski tlak ili promijenjena vaskulatura tumora (Szakács *i sur.*, 2006.). Osim toga, postoji više staničnih mehanizama otpornosti na lijekove, te su razvijeni mnogi eksperimentalni modeli otpornih stanica. Tumorske stanice u kulturi mogu postati otporne na jedan lijek, ili na klasu lijekova sa sličnim mehanizmom djelovanja mijenjanjem stanične mete lijeka ili povećavanjem popravka lijekom inducirane štete, često na DNA. Nakon probira za otpornost na jedan lijek, stanice mogu pokazivati otpornost i na druge strukturne i mehanistički nepovezane lijekove – to je fenomen poznat kao višestruka otpornost na lijekove. Ovime se može objasniti zašto tretmani s kombinacijom kemoterapeutika koji imaju različite mete više nisu djelotvorni (Gottesman *i sur.*, 2002a.). Općenito treba naglasiti da je jedan od glavnih razloga lošeg djelovanja kemoterapije upravo otpornost na lijekove protiv raka.

Posebno važan razlog otpornosti tumorskih stanica na lijekove jest prekomjerna ekspresija transportera ABC (od engl. *ATP-binding cassette*), koji doprinose razvitku tzv. višestruke otpornosti na lijekove. Istražuje se više načina sprječavanja ovog fenomena. Jedan od načina jest razvoj inhibitora transportera ABC kako bi tumorske stanice postale osjetljivije na kemoterapiju. Uz to, koriste se microRNA i druge epigenetičke metode za modulaciju ekspresije transportera i njegove funkcije (Liu i Pan, 2019.). Jedan od načina pronalaženja inhibitora transportera ABC je prenamjena postojećih lijekova poput antiparazitika, antibiotika i antimalarika. Na primjer, neke vrste antimalarika pokazuju ili izravno ili adjuvantno djelovanje protiv tumora, senzitiviraju tumorske stanice na lijekove, odn. inhibiraju razvitak otpornosti na lijekove ili djeluju sinergistički s drugim kemoterapeuticima. Radi se i na različitim derivatima poznatih lijekova u potrazi za novim biološki aktivnim agensima s raznim biološkim profilima (Zorc *i sur.*, 2019.).

1.3 Obitelj transportera ABC

Transporteri ABC jedni su od najvećih obitelji aktivnih transportnih molekula. Ovi transporteri su sveprisutni u genomima svih organizama te su gotovo uvijek pumpe za unos, kod prokariotskih stanica, i uključeni u izbacivanje kod eukariotskih stanica (Davidson i Chen, 2004.; Dean *i sur.*, 2001.; Higgins, 1992.). Dobro okarakterizirani eukariotski transporteri svi prenose tvari iz citoplazme ili stanične membrane iz stanice, ili u organele poput peroksisoma, endoplazmatske mrežice i lizosoma. Uz to, četiri transportera su lokalizirana u mitohondriju. Osim proteina CFTR (od engl. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), koji je kloridni ionski kanal, za sve transportere ABC se smatra da izbacuju molekule energetski ovisnim procesom koji uključuje vezanje i hidrolizu ATP-a (Robey *i sur.*, 2009.). Transporteri ABC sadrže par ATP-veznih domena, također poznati kao nukleotid vezujući nabor (od engl. *nucleotide binding fold, NBF*), i dva seta transmembranskih domena, koje tipično sadrže šest transmembranskih α -zavojnica.

Transporteri ABC su konstitutivno eksprimirani u normalnim stanicama u probavnom sustavu uključujući tanko crijevo, debelo crijevo, jetru i gušteraču; epitelne stanice u bubrezima, nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu i testisima; i u endotelnim stanicama (Tablica 1.). Postoji 48 različitih ljudskih transportera ABC koji pripadaju raznim potporodicama. Za većinu se smatra da su eksporter i neki od njih su specifični za raznovrsne supstrate. Endogeni i egzogeni supstrati sažeti su u Tablici 1. Neki ljudski transporteri ABC imaju druge funkcije osim translokacije produkata, npr. SUR1 i SUR2 reguliraju kalijeve kanale, dok je CFTR ATP-vezani kloridni kanal. Mnogi ljudski transporteri ABC su biomedicinski i klinički značajni: transporter antigenskih peptida (TAP, heterodimer ABCB2 i ABCB3) ima važnu ulogu u adaptivnom imunosnom odgovoru. Transporteri lijekova poput ABCB1, ABCG2 i ABCC1 štite razne organe od toksičnog utjecaja, ali također doprinose otpornosti tumorskih stanica na kemoterapiju. U jetri, niz transportera ABC (ABCB11, ABCB4 i ABCG5-ABCG8) kataliziraju nastanak žuči i njihova disfunkcija vodi k bolestima jetre (Gottesman *i sur.*, 2002b.; Locher, 2016.). Od tih 48 gena za ljudske transportere ABC, zasad ih je 17 povezano s patogeneom bolesti, kao što je na primjer Tangierova bolest (ABCA1), Stargardtova bolest (ABCA4), Dubin-Johnsonov sindrom (ABCC2/MRP2), pseudoxanthoma elasticum (ABCC6), sitosterolaemia (ABCG5/ABCG8) i cistična fibroza (ABCC7/CFTR), najčešći autosomalni recesivni poremećaj u bijelaca (Polgar *i sur.*, 2008a.).

Transporteri ABC otkriveni su 1970-ih, kada su klinički onkolozi istraživali otpornost na kemoterapiju. Uočili su kako određeni tumori pokazuju karakterističan uzorak otpornosti, dok ostali razviju otpornost tijekom tretmana visokoefikasnim kemoterapeutima (Danø, 1973.; Juliano i Ling, 1976.). Već dugi niz godina, znanstvenici su usredotočeni na članove ABC obitelji sa sposobnošću izbacivanja lijekova da bi odredili razloge iza neuspjeha tretmana kemoterapijom. Većina istraživanja bila su usmjerena na gen ili ekspresiju proteina samo malog broja transportera u uzorcima tumora dobivenih od pacijenata prilikom dijagnoze, te su korelirani podatci o ekspresiji s kliničkim karakteristikama. Premda su istraživanja potvrdila kliničku značajnost ABCB1 u nekoliko rakova, klinička značajnost ostalih transportera ostaje nesigurna. Međutim, inhibicija transportera ABC i dalje ostaje kao privlačni potencijalni adjuvant u kemoterapiji (Fletcher *i sur.*, 2010.).

Unatoč početnom optimizmu, rezultati kliničkih ispitivanja koristeći modulare transportera ABC bili su razočaravajući. Početna klinička ispitivanja 1980-ih koristila su spojeve poput verapamila i ciklosporina A koji su već bili odobreni za kliničku uporabu za stanja koja nisu rak i za koje je pokazano da inhibiraju ABCB1. Nažalost, ti inhibitori prve generacije imala su neprihvatljivu razinu toksičnosti. Inhibitori ABCB1 druge generacije, npr. valspodar (poznat i kao PSC 833), razvijeni su kasnije i imala su povišenu potentnost i smanjenu toksičnost. Međutim, ti isti spojevi imali su razočaravajuće rezultate u klinici. Na primjer, jedno istraživanje treće faze kod pacijenata s rakom jajnika ili s rakom peritoneuma, koji su bili tretirani s paklitakselom i karboplatinom kao kemoterapijom, nije pokazalo značajnu korist uključivanja valspodara (Lhommé *i sur.*, 2008.). Slična opažanja dogodila su se i kod istraživanja inhibitora ABCB1 treće generacije. Na primjer, jedno istraživanje druge faze kod žena s metastatskim ili lokalno povratnim rakom dojke nije pokazalo dodatnu korist u dodavanju zosukvidara u terapiju (Ruff *i sur.*, 2009.).

Nedavno su se istraživanja također usmjerila k proučavanju djelovanja prirodnih ionofora na inhibiciju transportera P-gp, poput salinomicina i nigericina, te je uočeno kako primjenom ovih spojeva dolazi do senzitivizacije stanica leukemije na različite kemoterapeutike poput adriamicina, docetaksela i vinblastina (Boesch *i sur.*, 2016.; Fuchs *i sur.*, 2010.; Huczynski, 2012.). Na temelju istraživanja prirodnih ionofora, osmišljeni su računalni modeli kojima se mogu sintetizirati ostali spojevi za koje se smatra da bi mogli usporiti rast tumorskih stanica. Ovim načinom su razvijeni krunasti eteri s različitim funkcionalnim skupinama, za koje je pokazano da su uspješniji u senzitivizaciji stanične linije karcinoma jajnika na paklitaksel i adriamicin od verapamila, poznatog inhibitora transportera P-gp (Guberović *i sur.*, 2018.).

Zaključno, zbog vrlo kompleksne uloge transportera ABC te, još uvijek nedovoljno uspješne kliničke primjene njihovih inhibitora, potrebno je pojašnjenje strukture i funkcije svakog transportera ABC za razumijevanje kako ti transporteri rade, a kako bi se spriječila višestruka otpornost na lijekove (Choi, 2005.).

Tablica 1. Lokalizacija i funkcija ABC transportera. Preuzeto iz Choi, 2005.

IME	LOKALIZACIJA	ENDOGENI SUPSTRAT	EGZOGENI CITOTOKSIČNI SUPSTRAT
ABCB1, P-GP	Crijeva, jetra, bubrezi, krvno-moždana barijera, testisi, posteljica	Konjugati estrogen glukuronida (estradiol, estriol), endorfin, glutamat, steroidi (kortizol, aldosteron, kortikosteron), beta-amiloid, 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfokolin (faktor aktivacije trombocita, PAF)	Antraciklini (doksorubicin, daunorubicin, epirubicin), aktinomicin D, kolhicin, podofilotoksin (etopozid, tenipozid), metotreksat, mitomicin C, mitoksantron, taksani (paklitaksel, docetaksel), vinca alkaloidi (vinkristin, vinblastin)
ABCC1	Mnoga tkiva (mozak i sl.)	Estradiol-17- β (β -D-glukuronid) glutation, glutation S- c konjugate leukoetrien C4, glukuronozil bilirubin	Antraciklini, kolhicin, etopozid, teški metali (arsenit, arsenat, antimon), vinkristin, vinblastin, paklitaksel
ABCC2, cMOAT	Jetra, crijeva, posteljica, bubrezi	Estradiol-17- β (β -D-glukuronid) glutation, glutation S- c konjugate leukoetrien C4, glukuronozil bilirubin	Cisplatina, CPT-11, doksorubicin, etopozid, metotreksat, SN-38, vinkristin, vinblastin
ABCC3	Jetra, crijeva, kora nadbubrežne žlijezde, posteljica	S-(2,4-dinitrofenil) glutation	Cisplatina, doksorubicin, etopozid, metotreksat, tenipozid, vinkristin
ABCC4	Mnoga tkiva	Glukuronid i konjugati glutaciona	Metotreksat, analozi nukleotida, PMEAs*
ABCC5	Mnoga tkiva (mozak i sl.)	Glutamat i konjugati fosfata	Doksorubicin, metotreksat, analozi nukleotida, topotekan

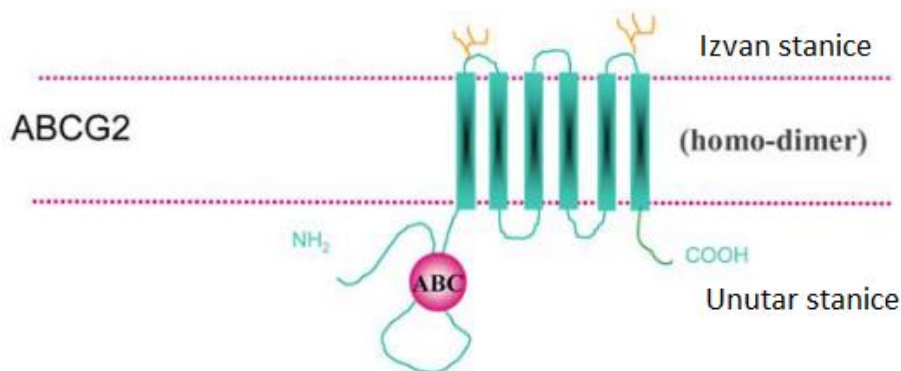
ABCC6	Jetra, bubrezi	Ciklički nukleotidi (cAMP, cGMP), konjugati glutationa	Doksorubicin, etopozid, tenipozid
ABCC10	Mnoga tkiva	?	?
ABCC11	Dojke, testisi	17- β -estradiol-(17-beta-D-glucuronide), leukotriene C4, ciklički nukleotidi	5'-Fluorouracil, 5'-fluoro-2'-deoksiuridin, 5'-fluoro-5'deoksiuridin, PMEA
ABCG2, MXR1, ABCP	Posteljica, epitel crijeva, jetra, dojke, endometrij	Hem ili porfirin	Antraciklini, bisantren, kamptotecin, epirubicin, flavopiridol, mitoksantron, S-38, topotekan

* PMEA, 2', 3'-dideoksicitidin 9'-(2'-fosfonilmetoksinil)-adenin

1.4 Transporter ABCG2

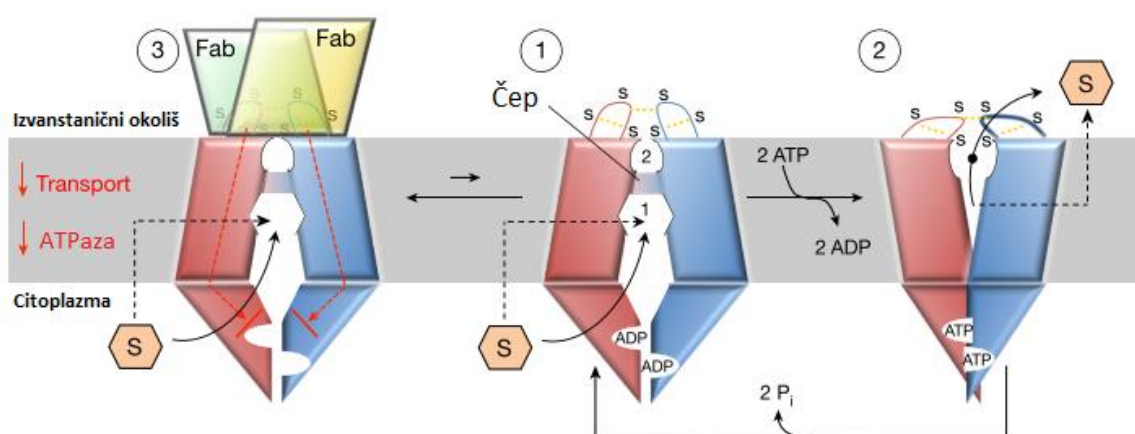
Ljudski transporter ABCG2, također poznat i kao ABCP, MXR (od engl. *mitoxantrone resistance protein*) i BCRP (od engl. *breast cancer resistance protein*), protein je veličine 72 kDa i sastoji se od 665 aminokiselina. Pripada obitelji transportera ABC koji su odgovorni za prijenos lipida, žučnih soli, toksičnih spojeva i peptida za predstavljanje antigena (Borst i Elferink, 2002.). ABCG2 pokreće izbacivanje transportiranih spojeva u izvanstanični prostor procesom u kojem energija dolazi putem hidrolize ATP-a (Nakagawa *i sur.*, 2002.).

ABCG2 je tzv. „polu-transporter“, jer nosi samo jednu od karakterističnih domena ABC obitelji (ATP-veznu domenu i transmembransku domenu). Stoga, ABCG2 mora tvoriti dimer ili homooligomer da bi postigao funkcionalnu aktivnost (Slika 2.). Homodimer ABCG2 je kovalentno vezan disulfidnom vezom koju tvore cisteini na poziciji 603, lokalizirani u velikoj trećoj izvanstaničnoj petlji proteina (od engl. *third extracellular loop*, ECL3) (Kage *i sur.*, 2005.; Özvegy *i sur.*, 2001.).



Slika 2. Membranska topologija transportera ABCG2, preuzeto iz Sarkadi *i sur.*, 2004.

Tek je nedavno, krio-elektronskom mikroskopijom (Krio-EM), razjašnjena struktura transportera ABCG2 te predložen mehanizam transporta njegovih supstrata. Transport supstrata pokrenut hidrolizom ATP-a događa se između stanja 1 i 2. Supstrat ulazi u šupljinu 1 iz citoplazme ili iz unutarnjeg listića membrane, ali ne može ući u šupljinu 2 zbog leucinskog čepa. Zatvaranje domene NBF pretvara stanje 1 u stanje 2 koje može otpustiti supstrat u izvanstaničnu okolinu. Otpuštanjem anorganskog fosfata ABCG2 prelazi iz stanja 2 u stanje 1. Stanje 3 predstavlja ABCG2 na kojemu su vezana dva fragmenta 5D3-Fab koji inhibiraju prijenos i ATPaznu aktivnost (Slika 3.) (Taylor *i sur.*, 2017.). Strukture krio-EM ljudskog transportera ABCG2 vezanog za Ko143 pokazuju kako se spoj veže za središnju šupljinu ABCG2 okrenutu prema unutrašnjosti, čime je onemogućen pristup supstratima i spriječene su konformacijske promjene potrebne za hidrolizu ATP-a (Jackson *i sur.*, 2018.).



Slika 3. Predloženi mehanizam transporta, preuzeto iz Taylor *i sur.*, 2017.

Transporter ABCG2 se nalazi u pneumocitima alveola, lojnim žlijezdama, prijelaznom epitelu mjehura, intersticijskim stanicama testisa, epitelu prostate, endocervikalnim stanicama maternice, pločastom epitelu grlića maternice, sluznici tankog i debelog crijeva, otočnim i acinarnim stanicama gušterače, u sloju *zona reticularis* nadbubrežne žlijezde, kortikalnim tubulima bubrega i hepatocitima. Nalazi se i u placentarnom sinciciotrofoblastu. Njegova lokalizacija ukazuje na ulogu transportera ABCG2 u zaštiti organa i fetusa od citotoksina i ksenobiotika (Fetsch *i sur.*, 2006.; Maliepaard *i sur.*, 2001.).

Ljudski protein ABCG2 očito je svestran transporter jer ima važne uloge u nizu fizioloških i patoloških funkcija. Zaštita naših tkiva, uključujući matičnih stanica, protiv ksenobiotika i hipoksije, modulacija apsorpcije lijeka i distribucija, pozitivne su strane ekspresije ABCG2 (Sarkadi *i sur.*, 2004.). Međutim, prekomjerna ekspresija vodi do pojave fenotipa višestruke otpornosti na lijekove kod tumorskih stanica. ABCG2 pruža otpornost na razne, klinički relevantne spojeve poput mitoksantrona, metotreksata i SN38 (Kawabata *i sur.*, 2001.; Volk *i sur.*, 2002.).

Mnogo istraživanja posvećeno je transporteru ABCG2 upravo zbog njegove uloge u otpornosti na kemoterapiju. Jedan od smjerova istraživanja jest proučavanje polimorfizama i mutacija kod ABCG2 koji mogu utjecati na specifičnost za supstrate i antagoniste. Naime, protočnom citometrijom je otkriveno kako su mitoksantron i Hoechst 33342 supstrati svih transportera ABCG2, dok su rodamin 123 i daunorubicin prenešeni jedino mutiranim ABCG2. Uz to, svi proteini ABCG2 su otporni na mitoksantron, SN-38 i topotekan, dok je mutirani ABCG2 pružao još veću otpornost na mitoksantron (Robey *i sur.*, 2003.). Također se ispituju spojevi koji bi mogli inhibirati protein i time povećati bioraspoloživost kemoterapeutika, no još uvijek se ne zna veza između strukture i funkcije koji bi definirali zahtjeve za supstrat ili inhibitor (Robey *i sur.*, 2009.).

1.5 Inhibicija transportera ABCG2

Transporter ABCG2 djeluje kao ispusna pumpa za širok raspon kemoterapeutika, antibiotika, prirodnih spojeva i toksina te fluorescentnih boja. Unatoč prepoznavanju uloge ABCG2 u višestrukoj otpornosti na lijekove u stanicama tumora, nije bilo moguće zaobići otpornost na lijekove korištenjem inhibitora ABCG2. Farmakolozi se trude modulirati funkciju ABCG2 da bi senzitivizirali stanice tumora na kemoterapiju. U Tablici 2. sažeti su do sada otkriveni inhibitori ABCG2 (Hasanabady i Kalalinia, 2016.).

Tablica 2. Inhibitori transportera ABCG2, preuzeto iz Hasanabady i Kalalinia, 2016.

Mehanizam inhibicije		Mehanizam	Agensi
Inhibicija ekspresije ABCG2	Epigenetičke modifikacije Transkripcijska regulacija Posttranskripcijska regulacija	Metilacija promotora ABCG2 Regulacija transkripcijskih faktora Inhibicija translacije i/ili cijepanje mRNA Razgradnja proteina ABCG2	Kombinacija melatonina s temozolomidom Inhibicija ekspresije Sp1 ili Sp3 MicroRNA-328 Derlin-1, PZ-39
Inhibicija funkcije ABCG2		Povećanje biodostupnosti citotoksičnih protutumorskih lijekova	GF120918 Fumitremorgin C Ko143 PZ-39 Ortataksel Imatinib Nilotinib Dasatinib Ponatinib Lapatinib Telatinib Sunitinib Motesanib

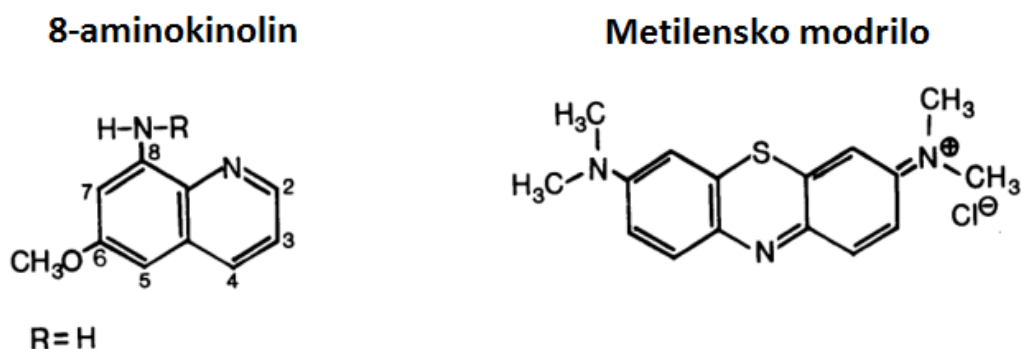
Fumitremorgin C (FTC) je diketopiperazin, gljivični toksin koji djeluje kao snažni i specifični inhibitor ABCG2. FTC je vratio otpornost na mitoksantron, doksorubicin i topotekan, ali ne i na paklitaksel. Pri koncentraciji od 5 μ M pojačava toksičnost mitoksantrona, doksorubicina i topotekana, tako da u potpunosti poništava otpornost potpomognutu ABCG2 u uvjetima *in vitro* (Rabindran *i sur.*, 2000.). Nažalost, njegova neurotoksičnost onemogućava primjenu u uvjetima *in vivo*, zbog čega se pristupilo ispitivanju njegovog tetracikličkog analoga, Ko143. Ko143 se pokazao 10 puta potentnijim od FTC-a u inhibiciji funkcije ABCG2 i netoksičan je u uvjetima *in vitro* pri aktivnim koncentracijama. Ko143 smatra se jednim od „općih“ inhibitora ABCG2 jer inhibira ATPaznu aktivnost ABCG2 (Allen *i sur.*, 2002.).

Elakridar (GF120918) je snažan inhibitor transportera P-gp i transportera ABCG2. Povećava biodostupnost citotoksičnih protutumorskih lijekova, poput inhibitora tirozinskih kinaza vemurafeniba. Također im povećava biodostupnost u mozgu i u središnjem živčanom sustavu, čime se mogla poboljšati terapijska djelotvornost kod metastaza u mozgu (Durmus *i sur.*, 2012.). GF120918 također povećava oralnu biodostupnost topotekana, koji je inače supstrat ABCG2, s 30% na 90% (Kruijtzter *i sur.*, 2002.).

Nedavno se pristupilo istraživanju inhibicije transportera P-gp i transportera ABCG2 antimalaricima poput klorokinona, artemisina, atovakona i meflokinona. Uočeno je kako je atovakon inhibirao transportnu aktivnost ABCG2 pri IC_{50} od 0.23 μM , dok je kinin inhibirao transportnu aktivnost transportera P-gp pri IC_{50} od 6.8 μM . Zbog ovih rezultata došlo se do zaključka kako bi ti antimalarici mogli povećati biodostupnost kemoterapeutika koji su supstrati ovih transportera (Rijpmma *i sur.*, 2014.). Istraživanja su pokazala kako primakin i klorokin senzitiviziraju stanice karcinoma usta s prekomjernom ekspresijom transportera P-gp na agense koji ciljaju mikrotubule poput paklitaksela i vinkristina. Isti učinak postignut je i na staničnoj liniji kolorektalnog adenokarcinoma, gdje su antimalarici amodiakin, klorokin, flavon i genistein inhibirali izbacivanje radioaktivno obilježenog taksola (Choi *i sur.*, 2016.; Hayeshi *i sur.*, 2006.).

1.6 Derivati antimalarika

Primakin je antimalarik koji pripada skupini 8-aminokinolina. 8-aminokinolini nastali su 1891. godine kada su Guttman i Ehrlich ispitali protumalarijska svojstva metilenskog modrila, događaj koji se smatra začetkom kemoterapije kakvu danas znamo. Metilensko modrilo modificirano je dodatkom dialkil-aminoalkilne skupine, čime se mu se pojačala protumalarijska aktivnost. 8-aminokinolini smatraju se derivatima 6-metoksi-8-aminokinolina. Klasificiraju se po sastavu u alifatske dialkilaminoalkilne skupine, koja mijenja jedan od vodikovih atoma na 8-amino dušiku. Nadalje, 8-aminokinolini klasificiraju se po broju metilenskih skupina koje odvajaju terminalnu amino skupinu od 8-amino dušika i po tome je li terminalna amino skupina primarna, sekundarna ili tercijarna. Varijacije u djelotvornosti protiv malarije i u toksičnosti velikim su dijelom određene prirodom tih alifatskih bočnih lanaca (Slika 4.) (Carson, 1984a.).



Slika 4. 8-aminokinolin i metilensko modrilo

Primakin je N-supstituirani diamin koji je pentan-1,4-diamin supstituiran 6-metoksikinolin-8-il skupinom na N4 poziciji (Slika 5.). Primakin može brzo izliječiti infekcije truskovcem *Plasmodium vivax* djelujući na stadije gametocita i hipnozoita. Smatra se da se u jetri pretvori u aktivni kinonski metabolit. Liječenje primakinom uzrokuje oticanje i zadebljanje mitohondrija parazita u tkivnom stadiju, sugerirajući da vrši svoju aktivnost interferirajući s djelovanjem mitohondrija (Foley i Tilley, 1998.). Primakin se brzo apsorbira u probavnom sustavu i koncentrira u jetri, mozgu, bubregu, plućima i mišićima. Dosegne vrhunac u plazmi unutar 1 do 3 sata, pri ~70 mg/mL. Brzo se izluči u urin, s plazmatskim poluživotom od 4 do 9 sata (Baird i Hoffman, 2004.).

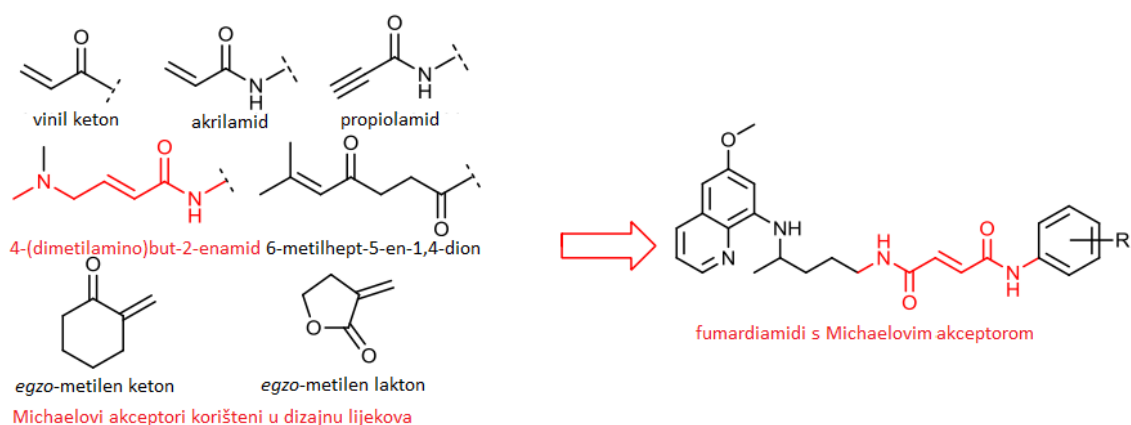


Slika 5. Struktura primakina

Sedam desetljeća nakon njegovog otkrića, primakin je i dalje jedini klinički dostupan antimalarik, koji pokazuje snažnu aktivnost protiv gametocita svih vrsta ljudske malarije, uključujući višestruko otporne sojeve truskovca *Plasmodium falciparum*. Primakin je također djelotvoran protiv svih izvaneritrocitnih obilka parazita i koristi se zajedno s drugim antimalaricima za liječenje raznih oblika malarije. Međutim, primakin je često asociran s

ozbiljnim nuspojavama, kao posljedica njegovih toksičnih metabolita. Smatra se da su njegovi metaboliti izravno odgovorni za komplikacije poput hemolitičke anemije. Uz to, toksičnost mu je pojačana kod ljudi koji pate od nedostatka glukoza-6-fosfat dehidrogenaze ili glutation sintetaze. Nuspojave mu se pojačavaju zbog činjenice da se primakin mora učestalo primjenjivati pri visokim dozama zbog njegove ograničene oralne biodostupnosti (Vale *i sur.*, 2009.). Još jedan od nedostataka primakina je njegov brz metabolizam, razgradnja u inaktivni karboksiprimakin i izmjena ishoda liječenja ovisno o aktivnosti enzima CYP 2D6 (Pybus *i sur.*, 2013.). Kako bi se poboljšala biodostupnost antimalarika, smanjila toksičnost i/ili produljila aktivnost, rade se izmjene strukture primakina, i kod kinolinskog heterocikla i kod primarne amino skupine. Takvi derivati testiraju se uglavnom na protumalarijska svojstva, ali se također provode i ispitivanja antifungalnih svojstava, kao i protutumorskih svojstava.

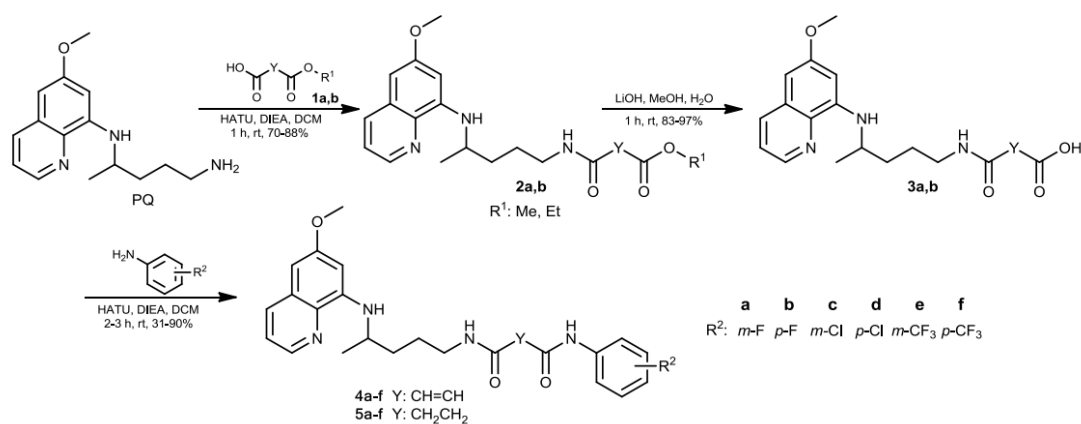
Prilikom dizajna protutumorskih lijekova, često se biraju spojevi koji nose α , β -nezasićene karbonilne skupine koji su Michaelovi akceptori, što znači da su sposobni za konjugiranu adiciju, također poznato kao Michaelova adicija. Najjednostavniji i najbolji Michaelovi akceptori su α , β -nezasićeni karbonilni spojevi s izloženim nezasićenim β -ugljikovim atomom, poput egzometilenskih ketona i laktona ili vinil ketona. Ti fragmenti osiguravaju nepovratno kovalentno vezanje za cisteinski ostatak specifičnog proteina i mogu modulirati selektivnost i snagu lijeka (Slika 6.). Na ovaj način dizajnirani su derivati primakina čija su protutumorska svojstva ispitivana u ovom radu (Rajić *i sur.*, 2018.).



Slika 6. Dizajn novih fumardiamida, preuzeto iz Rajić *i sur.*, 2018.

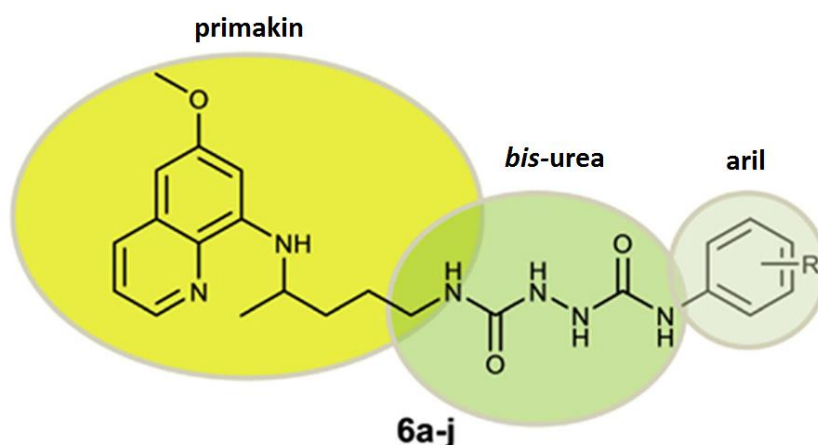
Beus i suradnici (Beus *i sur.*, 2019.) ispitivali su djelovanje asimetričnih primakina i halogenanilin fumardiamida, te derivata analoga klorokina protiv jetrenih i eritrocitnih stadija *Plasmodium* parazita. Njihovi rezultati pokazali su kako primakinski fumardiamidi imaju višu aktivnost protiv jetrenih stadija truskovca *Plasmodium berghei* i nižu toksičnost protiv stanične linije ljudskog hepatoma od izvornog lijeka i derivata klorokina. Povoljna citotoksična svojstva najaktivnijih spojeva ispitivala su se dalje na ljudskim staničnim linijama adenokarcinoma dojke i stanicama bubrega embrija, čak i s inhibiranom glukoza-6-fosfat dehidrogenazom. Aktivnost kinonskih fumardiamida na eritrocitnim stadijima truskovca *Plasmodium falciparum* bila je viša od aktivnosti derivata primakina, ali jačina im je varirala između sojeva.

Osim za protumalarijska svojstva, derivati primakina ispituju se za antibakterijska, antimikobakterijska, antiviralna i citostatička svojstva. Rajić i suradnici sintetizirali su jedan od setova derivata primakina korištenih u ovom radu reakcijom karboksilnih kiselina s 3-kloroanilinom (1786, 4c), 4-kloroanilinom (1787, 4d), 3-trifluoroanilinom (1788, 4e) i 4-trifluoroanilinom (1789, 4f) (Slika 7.). U svim biološkim testovima, fumardiamidi su se pokazali djelotvornima protiv većine mikroorganizama, poput bakterija *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, te gljive *Candida albicans*. Uz to, djeluju i na mikobakterije *Mycobacterium marinum* i *Mycobacterium tuberculosis*. Smatra se da je za njihovu aktivnost zaslužna dvostruka veza konjugirana za karbonilnu skupinu. Konačno, stanična linija akutne limfoblastične leukemije je osobito podložna m-supstituiranim derivatima 1786 i 1788 (u radu 4c, odnosno 4e). Smatra se da su p-supstituirani derivati 1787 i 1789 (u radu 4d, odnosno 4f) odlične baze za razvoj lijekova protiv bakterijskih infekcija, dok su m-supstituirani derivati 1786 i 1788 potencijalne baze za razvoj antitumorskih lijekova (Rajić *i sur.*, 2018.).



Slika 7. Sinteza derivata primakina, preuzeto iz Rajić *i sur.*, 2018.

Drugi set derivata primakina, *bis*-urea primakini, sintetizirali su i ispitivali Perković i suradnici (Perković *i sur.*, 2016.). Spojevi 1790 i 1791 (u radu, 6f i 6i) sintetizirani su reakcijom semikarbazida primakina s odgovarajućim 1-(N-arilkarbamoil) benzotriazola (Slika 8.). Spoj 1790 sadrži halogeni atom, dok spoj 1791 sadrži trifluorometilnu skupinu. Od dva spoja, samo spoj 1790 pokazao je visoku selektivnost protiv stanične linije karcinoma dojke.



Slika 8. Struktura *bis*-urea primakina, preuzeto iz Perković *i sur.*, 2016.

Navedeni derivati primakina sintetizirani su na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a u ovom ćemo radu ispitati njihova citotoksična svojstva na staničnoj liniji akutne mijeloidne leukemije divljeg tipa i s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2 te potencijalnu inhibiciju transportera ABCG2.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je ispitati dvije skupine derivata primakina na njihovo potencijalno inhibitorno djelovanje na aktivnost transportera ABCG2. Rezultati ovih istraživanja trebali bi, s jedne strane pridonjeti razumijevanju mogućih utjecaja na učinkovitost liječenja potencijalnim antimalaricima, kao i moguć utjecaj na liječenje drugim lijekovima te, s druge strane pridonjeti smanjenju otpornosti na kemoterapiju uzrokovanoj pojačanom aktivnošću transportera ABCG2, čime bi se mogli postići bolji rezultati protutumorske terapije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

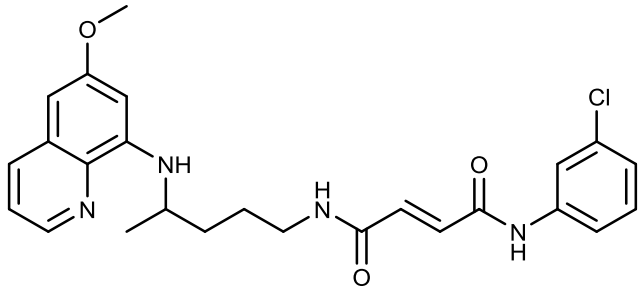
3.1.1 Stanične linije

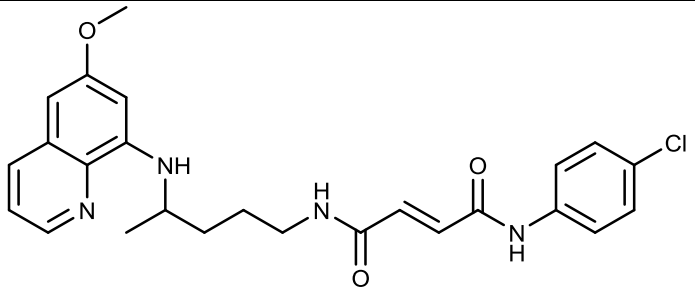
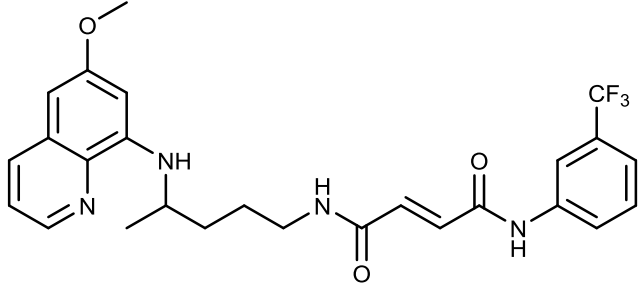
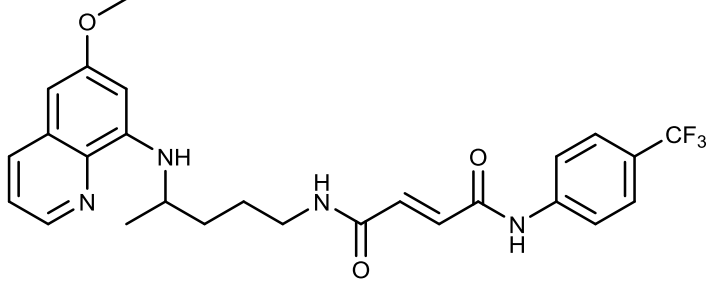
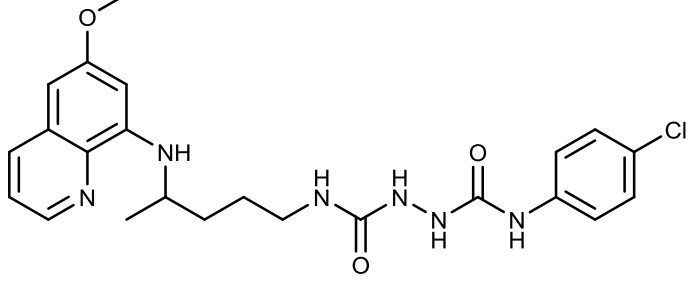
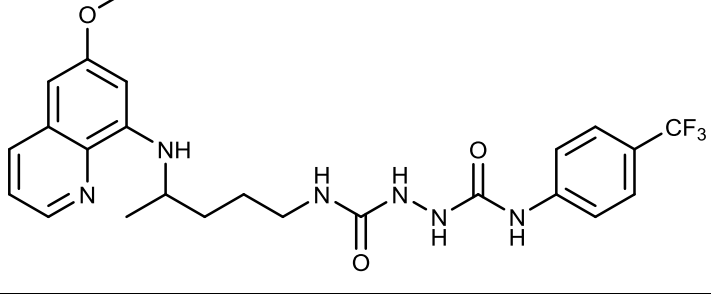
U ovom smo istraživanju koristili staničnu liniju akutne mijeloidne leukemije ljudi PLB (parentalne stanice) te stanice PLB-G2 s prekomjernom ekspresijom humanog transportera ABCG2, nastale transdukcijom pomoću retrovirusa i selekcijom s mitoksantronom (Özvegy-Laczka *i sur.*, 2005.). Također smo koristili i imortalizirane stanice epitela distalnog dijela bubrega MDCKII (*Madin-Darby canine kidney epithelial cell*) s bazalnom i povećanom ekspresijom transportera ABCG2 koje pojačano eksprimiraju humani transporter ABCG2 uz parentalnu liniju MDCKII (Xiao *i sur.*, 2006.).

3.1.2. Testirani spojevi

U radu su korišteni derivati primakina sintetizirani u Zavodu za medicinsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Spojevi su označeni sa šifrom prema nazivlju preuzetom iz baze spojeva Laboratorija za eksperimentalnu terapiju, IRB-a. Svi spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 1×10^{-2} (Tablica 3.).

Tablica 3. Strukture derivata primakina

Struktura	Šifra	Relativna molekulska masa
	1786	466.96

	1787	466.96
	1788	500.51
	1789	500.51
	1790	470.96
	1791	504.51

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice smo uzgajali u sterilnim bocama za uzgoj stanica (T75, TPP), u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, 5% CO₂ i na visokoj vlažnosti. Za uzgoj smo koristili hranjivi medij RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) kompletiran s 10% fetalnim goveđim serumom (eng. fetal bovine serum, FBS; Sigma, SAD), 2 mM L-glutaminom (Sigma-Aldrich), 100 jedinica/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Lonza, Švicarska). Stanice smo promatrali pod invertnim mikroskopom (Olympus CKX41, Japan) te provjerili postojanje zagađenja (npr. bakterije, gljive, kvasci). Kad bi dosegnule oko 75% konfluentnosti stanice smo presađivali. Prilikom svakog presađivanja stanice smo brojali uz pomoć svjetlosnog mikroskopa i 0,03%-tnog tripanskog modrila (Sigma, SAD). U tu svrhu staničnu suspenziju smo razrijedili pet puta s otopinom tripanskog modrila te nanijeli alikvot suspenzije na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Neubauerova komorica, dubine 0,1 mm, podijeljena je u 9 većih kvadrata dimenzije 1 mm × 1 mm × 0,1 mm. Žive i mrtve stanice se broje u 4 veća vršna kvadrata, podijeljena u 16 identičnih manjih kvadrata. Konačan broj stanica se izračuna prema formuli:

$$\text{broj stanica/mL} = (n/4) \times 5 \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

gdje „n“ predstavlja broj stanica izbrojanih pomoću Neubauerove komorice.

3.2.2. Ispitivanje antiproliferativnog učinka primakina *in vitro*

Antiproliferativni učinak spojeva u uvjetima *in vitro* ispitivali smo prema modificiranom postupku kakav se koristi na Nacionalnom institutu za rak (National Cancer Institute - <https://ntp.cancer.gov/>). Na mikrotitratske pločice od 96 jažica u tetraplikatu nasadili smo parentalne stanice PLB i stanice PLB-G2 s prekomjernom ekspresijom ABCG2 u koncentraciji od 10 000 stanica po jažici u konačnom volumenu od 150 µL po jažici i inkubirali 24 sata. Idući dan smo dodali spojeve u konačnim koncentracijama 100, 10, 1, 0.1 i 0.01 µM u volumenu od 50 µL, dok je u negativnu kontrolu dodan medij RPMI 1640 s 10%-tnim FBS-om u volumenu od 50 µL. Rast stanica provjeren je nakon 72 sata testom MTT.

3.2.3. Test metil tiazolil tetrazolija

Test metil tiazolil tetrazolija (MTT) je metabolički test pomoću kojeg se određuje vijabilnost stanica mjerenjem aktivnosti enzima dehidrogenaze. Dehidrogenaze reduciraju žuti, u vodi topljivi spoj 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT), u formazanske kristale koji su ljubičasto obojeni i u vodi netopljivi. Nastali kristali se otapaju u dimetil sulfoksidu (DMSO) kako bi se nastali produkt mogao izmjeriti te kvantificirati. Kvantifikacija se provodi spektrofotometrijski i dobivene vrijednosti su izravno proporcionalne broju živih stanica.

Prije mjerenja, nakon uklanjanja medija sa stanica, dodali smo 40 μL MTT reagensa (Sigma) u konačnoj koncentraciji 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Reagens se dodaje i u praznu jažicu - tzv. slijepu probu. Nakon završene inkubacije na 37 °C, tijekom 4 sata, nastale kristale smo otopili u DMSO uz tresenje. Apsorbanciju (OD, optička gustoća) mjerili smo na spektrofotometru za mikrotitarske pločice Multiskan EX (*Thermo Labsystems*, Austrija) na valnoj duljini 570 nm.

Postotak rasta stanične linije izračunali smo prema izrazu:

- ako je $(\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) \geq 0$, kemijski spoj pokazuje citotoksični učinak i onda je:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times (\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) / (\text{srednja OD}_{\text{ctrl}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}})$$

- ako je $(\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) < 0$, kemijski spoj pokazuje citotoksični učinak i onda je:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times (\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) / (\text{srednja OD}_{\text{tzero}})$$

gdje je:

- srednja OD_{test} – srednja vrijednost optičkih gustoća tretiranih stanica nakon 72 sata
- srednja OD_{tzero} – srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica, na „nulti dan“
- srednja OD_{ctrl} – srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica nakon 72 sata

Od svih vrijednosti optičkih gustoća (OD_{test} , OD_{tzero} , OD_{ctrl}) oduzeta je izmjerena vrijednost OD „slijepe probe“.

3.2.4. Test osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik

Stanice PLB i stanice PLB-G2 nasadili smo na mikrotitarske pločice od 96 jažica u koncentraciji od 10 000 stanica po jažici u konačnom volumenu od 150 μ L po jažici, u tetraplikatu te su inkubirane naredna 24 sata. Idući dan su istovremeno dodani spojevi, odnosno referentni inhibitor Ko143 u konačnoj koncentraciji od 5 μ M te mitoksantron u konačnim koncentracijama 100, 10, 1, 0.1 i 0.01 μ M u volumenima od 25 μ L. U određene jažice dodan je samo mitoksantron u volumenu od 50 μ L, a kao negativna kontrola dodano je 50 μ L medija RPMI 1640 s 10%-tnim FBS-om. Vijabilnost stanica je izmjerena nakon 72 sata testom MTT.

3.2.5. Test nakupljanja supstrata (Hoechst 33342)

Test nakupljanja supstrata koristi se za ispitivanje inhibitornog potencijala spojeva na transporteru ABCG2. Hoechst 33342 je supstrat transportera ABCG2 koji unosom u stanicu i vezanjem za DNA postaje fluorescentan, što omogućuje njegovu kvantifikaciju unutar stanice, mjerenjem njegove fluorescencije. Ukoliko neki spoj ima inhibitorno djelovanje, količina fluorescencije u stanici će se povećati jer spoj neće biti izbačen iz stanice. Inhibitorni potencijal pojedinog spoja uspoređuje se s inhibitornim potencijalom Ko143, koji je specifični inhibitor transportera ABCG2.

Stanice smo nasadili u mikrotitarske pločice od 96 jažica u koncentraciji od $2,5 \times 10^4$ stanica po jažici u 100 μ L RPMI-a s 10% FBS. Idući dan smo stanice oprali istim volumenom PBS-a (od eng. *phosphate buffered saline*, bez Mg^{2+} i Ca^{2+} ; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4) i dodali 100 μ L svježeg RPMI-a bez FBS-a. Pripremili smo inhibitore i supstrat (Hoechst) te istovremeno u jažice dodali 50 μ L inhibitora i 50 μ L supstrata. Konačna koncentracija supstrata bila je 0.5 μ M, a konačne koncentracije ispitivanih spojeva i referentnog inhibitora bile su 10 μ M. Stanice smo inkubirali 60 minuta na 37°C u mraku, nakon čega su isprane s 200 μ L PBS-a te im je izmjerena fluorescencija na fluorimetru (Tecan, ekscitacija/emisija: 360/465 nm). Normalizirana jedinica fluorescencije postavljena je tako da smo prvo izračunali srednju vrijednost svih dobivenih apsorbancija, te smo apsorbancije za svaki spoj podijelili s dobivenom srednjom vrijednošću.

3.2.6. Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3

Monoklonsko protutijelo 5D3 nastalo je imunizacijom miševa netaknutm mišjim fibroblastima koje izražavaju ljudski transporter ABCG2. Ono se veže za izvanstanični epitop ABCG2 i snaga vezanja mu ovisi o konformaciji ABCG2. Naime, inhibicija funkcije proteina sa spojem Ko143, supstratima ABCG2 pri visokim/inhibitornim koncentracijama kao i iscrpljenje staničnog ATP-a, uvelike povećava vezanje 5D3 što je poznato kao „pomak 5D3“ (od engl. "5D3 shift"). Pomoću ove metode možemo jednostavno ispitati prirodu interakcije testiranog spoja i transportera (Özvegy-Laczka i sur., 2005.).

Stanice smo izbrojali i razrijedili do 2×10^5 stanica po uzorku, nakon čega smo ih centrifugirali 4 minute pri 1500 rpm i resuspendirali u 5.5 mM otopini glukoze. Dodali smo neobilježeno primarno protutijelo u 1%-tnoj otopini BSA (albumin goveđeg seruma, od eng. *bovine serum albumin*) 0.5 µg po uzorku. Ispitivane spojeve smo pripremili u konačnim koncentracijama od 1, 5 i 10 µM u otopini glukoze. U uzorke stanica smo dodali 25 µL ispitivanih spojeva i 50 µL primarnog protutijela CD338 (*affymetrix, eBioscience, California, USA*, kataloški broj 14-8888) i inkubirali 45 minuta pri 37 °C u vodenoj kupelji. Reakcija je zaustavljena s 1 mL hladnog fosfatnog pufera te su uzorci centrifugirani 4 minute pri 1500 rpm. Na talog smo potom dodali 50 µL sekundarnog protutijela, fluorescentno obilježenog s Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes, Invitrogene, Eugene, Oregon, USA*, kataloški broj A21042) 0.25 µg po uzorku u 0.5%-tnoj otopini BSA i inkubirano 30 minuta pri 37 °C u vodenoj kupelji. Reakcija je zaustavljena s hladnim fosfatnim puferom te su uzorci centrifugirani 4 minute pri 1500 rpm. Talog smo resuspendirali u 400 µL hladnog fosfatnog pufera i mjerili metodom protočne citometrije u protočnom citometru BD FACSCalibur (*Becton Dickinson*), korišten je FL-1 filter. Normalizirana jedinica fluorescencije postavljena je tako da smo prvo izračunali srednju vrijednost svih dobivenih apsorbancija, te smo apsorbancije za svaki spoj podijelili s dobivenom srednjom vrijednošću.

3.2.7. Određivanje ekspresije proteina metodom *Western Blot*

Stanice smo uzgojili u Petrijevcu promjera 6 cm (gustoća nasađivanja: 1×10^6 st/mL) i inkubirali dva dana pri 37 °C do konfluentnosti. Nakon inkubacije, medij smo uklonili te smo stanice isprali dva puta s fosfatnim puferom. Dodali smo 250 µL pufera RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) kojem su dodani inhibitori

proteaza (NaF i Na_3VO_4) te smo stanice ručno strugali i skupili u označene Eppendorf epruvete, nakon čega smo ih inkubirali 30 minuta na ledu. Stanice smo potom razbili pomoću ultrazvučnog homogenizatora za stanice (Microson™ *ultrasonic cell disruptor*, Misonix, SAD) u 7 ciklusa (30 sekundi razbijanja, 30 sekundi pauza), nakon čega slijedi centrifugiranje na najvećoj brzini 45 minuta, na 4 °C. Supernatant smo prebacili u nove epruvete od 1.5 ml koje su spremljene na -80 °C do kvantifikacije proteina.

3.2.7.1. Određivanje koncentracije proteina u staničom lizatu

Koncentraciju proteina odredili smo pomoću fluorimetra Qubit 3 (*Invitrogen*) i njemu pripadajućeg protokola. Fluorimetar Qubit™ 3.0 nova je generacija stolnih fluorimetra koji precizno mjere DNA, RNA i proteine koristeći osjetljiv kvantitativni test Qubit. Koncentracije ciljane molekule u uzorku određuje se pomoću fluorescentne boje koja emitira signal samo kada se veže na ciljnu molekulu, što smanjuje učinke onečišćenja-pozadinskog signala, kao što su degradirana RNA, DNA, na rezultate mjerenja. Ovaj sustav je osjetljiviji od kvantifikacije UV apsorpcije jer detektira ciljno specifičnu fluorescenciju, što ga čini dobrim za uzorke u niskim koncentracijama. Za potrebe mjerenja uzorke smo razrijedili s dH_2O u omjeru 1:10. Pripremili smo radnu otopinu razrjeđivanjem Qubit ® Protein Reagent u Qubit ® Protein puferu u omjeru 1:200. Prije mjerenja uzorke smo kratko i snažno pomiješali (vorteksirali). Nakon inkubacije od 15 min pri sobnoj temperaturi izmjerili smo koncentraciju proteina.

3.2.7.2. Denaturirajuća elektorforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteine smo razdvojili na temelju njihove molekulske mase denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (Mini-PROTEAN Tetra cell system, BIO-RAD, SAD). Elektroforezu smo proveli u puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8,3). Koristili smo 5%-tni gel za sabijanje i 8%-tni gel za razdvajanje. U jažice smo nanijeli 30 µg proteina svakog uzorka zajedno s bojom za nanošenje uzoraka na gel (LB, od eng. *loading buffer*; 4% SDS 10% 2- β-merkaptioetanol, 20% glicerol 0.004% Bromophenol Blue 0,125 M Tris HCl pH 6,8). Koristili smo proteinski standard poznate molekulske mase PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, SAD), prema kojemu smo odredili gdje se na membrani nakon transfera nalazi protein od interesa. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 150 V 25 minuta.

Tablica 4. Sastav gela za razdvajanje (10 mL)

Kemikalije	V/mL
H ₂ O	4,6
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	2,6
1,5 M Tris (pH = 8,8)	2,6
10%-tni SDS	0,1
10%-tni APS	0,1
TEMED	0,01

Tablica 5. Sastav gela za sabijanje (5 mL)

Kemikalije	V/mL
H ₂ O	2,975
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	0,67
1,5 M Tris (pH = 6,8)	1,250
10%-tni SDS	0,05
10%-tni APS	0,05
TEMED	0,005

3.2.7.3. Prijenos proteina na membranu i vezanje protutijela

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE elektroforezom proteine iz gela smo prenijeli na PDVF membranu prethodno aktiviranu 1 minutu u metanolu (Roti®Fluoro PVDF, Carl Roth, Njemačka). Aktivacija membrane metanolom radi se kako bi se umanjila hidrofobnost membrana i omogućio prijenos i vezanje proteina za membranu. Gel i na njemu prislonjenu membranu složili smo između sloja spužvica i filter papira u kazetu za prijenos, prema uputama proizvođača sustava BIO-RAD. Filter papire i spužvice namočili smo u pufer za prijenos (od eng. *transfer buffer* pH 8,1 – 8,4; 10% metanol, 24 mM Tris, 194 mM glicin) neposredno prije slaganja u kazetu za prijenos. Prijenos proteina na membranu trajao je 150 minuta pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA uz hlađenje umetnutim zaleđenim uloškom. Po završetku prijenosa, membranu smo obojali otopinom naftol plave (0.1% naftol plave u 40% metanolu i 7% octene kiseline; Kemika, Hrvatska) kako bismo se uvjerali u uspješnost prijenosa. Membranu smo odbojali puferom za odbojavanje (7% octena kiselina i 50% metanol) te smo octenu kiselinu uklonili puferom za ispiranje TBST (od eng. *Tris Buffered Saline with Tween*, 2.4 g Tris baza, 8.8 g NaCl, 1 mL Tween-20).

Kako bismo spriječili nespecifično vezanje protutijela za membranu, inkubirali smo membranu 30 minuta u 5%-tnom nemasnom mlijeku (Carl Roth, Njemačka) otopljenom u TBST puferu. Membranu smo inkubirali s primarnim protutijelom u 5%-tnom nemasnom mlijeku u TBST puferu preko noći, na +4 °C uz konstantno njihanje. Korišteno je primarno protutijelo BXP-21 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA*, kataloški broj sc-58222) u razrijeđenju 1:100. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu, membranu smo isprali tri puta u puferu TBST po 10 minuta. Potom smo membranu inkubirali sa sekundarnim protutijelom u 5%-tnom nemasnom mlijeku u TBST puferu 120 minuta na sobnoj temperaturi. Korišteno je sekundarno protutijelo *sheep anti-mouse IgG HRP-linked* (*GE Healthcare Life Sciences, UK*, kataloški broj NA931) obilježeno peroksidazom hrena, u razrijeđenju 1:4000.

Sekundarna protutijela vezana na membranu detektirali smo pomoću kemiluminiscentnog reagensa (*Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, SAD*). Otopinu (oksidirajući reagens i pojačavajući reagens u omjeru 1:1) smo izravno nanijeli na membranu i ostavili 5 minuta u mraku na njihalici. Membrane smo zatim osušili papirom i stavili u aparat za kemiluminiscentno snimanje pomoću CCD kamere (*UVItec, Cambridge, UK*). Dužina ekspozicije i parameter slikanja podešavane su pomoću programa Alliance (*UVItec, Cambridge, UK*). Slike smo potom obradili u računalnom programu Photoshop CS2 (verzija 9.0, *Adobe, SAD*).

3.2.8. Statistička obrada podataka

Na svim grafovima prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije. Kako bi odredili statističku značajnost između uzoraka, koristili smo *one-way ANOVA* s Dunnettovim *post-hoc* testom ili Tukeyevim *post-hoc* testom. Statističke izračune i izradu grafova smo proveli u programskom paketu GraphPad Prism i u Microsoft Excelu. Značajnost razlike predstavljena je kod p-vrijednosti ($p < 0.05$, $p < 0.01$ i $p < 0.001$).

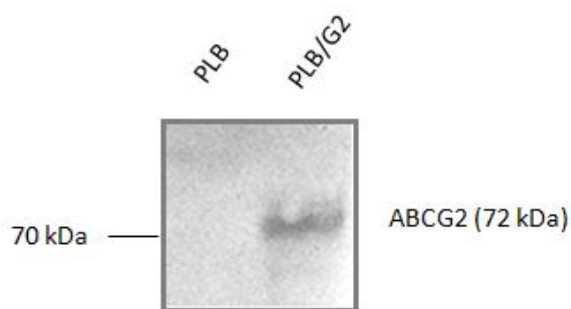
4. REZULTATI

U ovom smo radu ispitali šest derivata koji sadrže primakin; konkretno 4 derivata fumaramida primakina i halogenanilina (1786-1789, (Beus *i sur.*, 2019.; Rajić *i sur.*, 2018.)) i dva derivata bis-urea primakina (1790-1791, (Perković *i sur.*, 2016.)) na potencijalno inhibitorno djelovanje na aktivnost transportera ABCG2. Koristili smo modelnu staničnu liniju akutne mijeloidne leukemije ljudi PLB-G2, s povećanom ekspresijom transportera ABCG2 te parentalnu liniju (PLB) bez njegove ekspresije. Povećana ekspresija ABCG2 dobivena je transfekcijom stanične linije PLB supernatantom stanične linije PG13 koja proizvodi virus SFFV (*spleen focus-forming virus*). U retrovirus je prethodno ugrađena sekvenca cDNA koja sadrži gen za transporter ABCG2 (Özvegy-Laczka *i sur.*, 2005.). Također, dio pokusa napravili smo i na drugom staničnom modelu - staničnoj liniji bubrega psa (MDCKII-ABCG2 te parentalnoj liniji MDCKII-WT). Slično prethodnoj, stanična linija MDCKII-ABCG2 dobivena je transfekcijom parentalne stanične linije ekspresijskim vektorom TOPO-TA u kojeg je uklonirana cDNA transportera ABCG2 (Xiao *i sur.*, 2006.). Ovim načinom stanice postaju otporne na mnoge poznate kemoterapeutike, poput mitoksantrona.

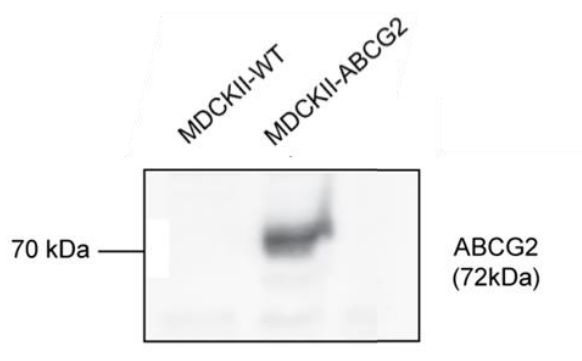
4.1 Karakterizacija modelnih staničnih linija

Prije provođenja pokusa, a kako bismo bili sigurni da imamo ispravan stanični model za pokuse utjecaja spojeva na aktivnost transportera ABCG2, testirali smo ekspresiju proteina ABCG2 u modelnim stanicama metodom *Western blot*. Analiza *Western blot* potvrdila je povećanu ekspresiju ABCG2 u staničnoj liniji PLB-G2, kao i u MDCKII-G2 za razliku od parentalnih stanica PLB, odnosno MDCKII-WT koje nemaju mjerljivu razinu ovog proteina (Slika 9.).

A)

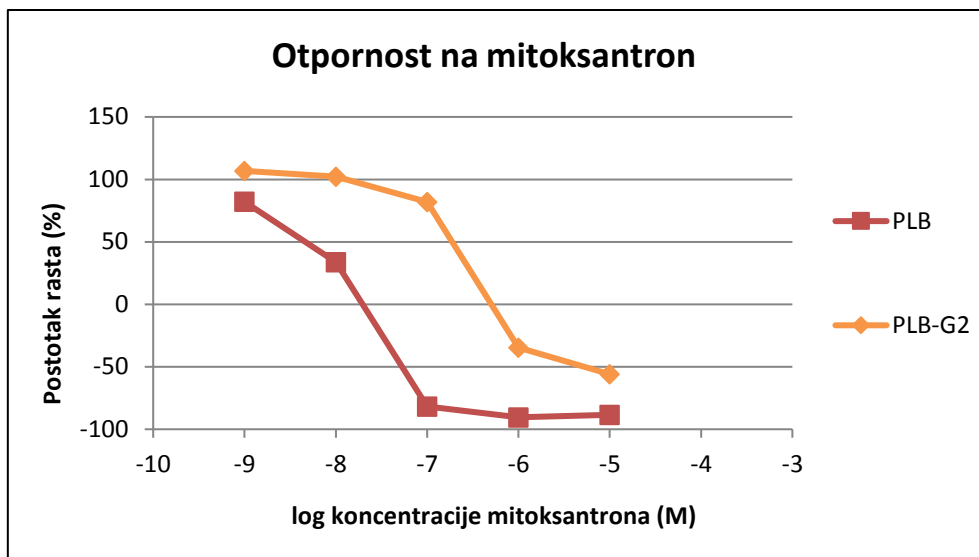


B)



Slika 9. Ekspresija proteina transportera ABCG2 u stanicama PLB, s bazalnom ekspresijom ABCG2 i PLB/G2, s prekomjernom ekspresijom ABCG2 (A) te u stanicama MDCKII-WT, s bazalnom ekspresijom ABCG2 i MDCKII-ABCG2, s prekomjernom ekspresijom ABCG2 (B), prikazana metodom Western Blot.

Nadalje, željeli smo provjeriti jesu li stanice s povećanom ekspresijom transportera ABCG2 otpornije na kemoterapeutik mitoksantron, koji je ujedno i kanonski supstrat ove proteinske pumpe. Na slici 10. i tablici 6 prikazana je ovisnost postotka živih stanica (postotka rasta) o koncentraciji testiranog spoja (tzv. *krivulja ovisnosti o koncentraciji*) te je vidljivo da stanice PLB umiru pri znatno nižim koncentracijama testiranih spojeva. Ovime smo potvrdili da su stanice PLB-G2 značajno otpornije na kemoterapeutik mitoksantron.

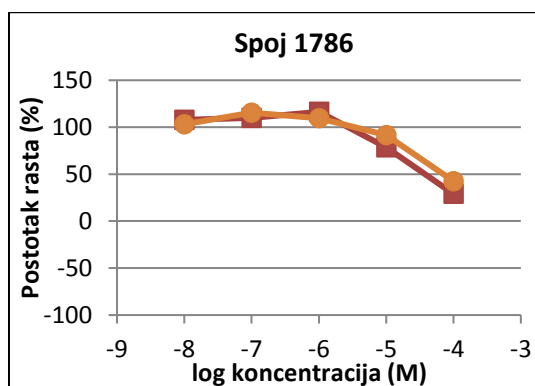


Slika 10. Krivulja preživljenja parentalne stanične linije PLB i stanične linije s prekomjernom ekspresijom ABCG2 PLB-G2, u odnosu na koncentraciju testiranog spoja (mitoksantron). Pokusi su rađeni u tetraplikatu, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri pokusa.

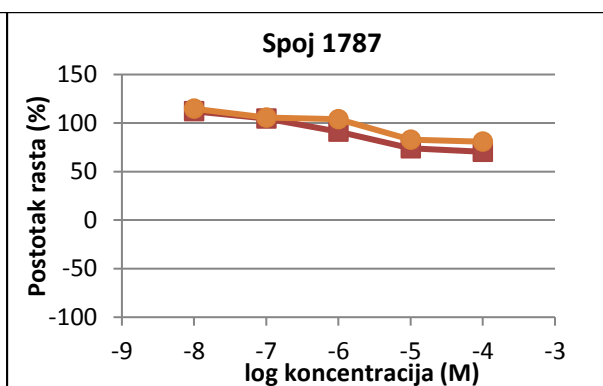
4.2 Ispitivanje antiproliferativnog učinka derivata primakina *in vitro*

Testirali smo antiproliferativni utjecaj spojeva 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 na PLB i PLB-G2 staničnim linijama MTT testom. Stanice smo nasadili na pločice sa 96 jažica na dan 0. Nakon 24 sata tretirali smo ih sa svježim otopinama spojeva te nakon 72 sata napravili test MTT i izmjerili fluorescenciju. Rezultati su prikazani na slici 11 u obliku krivulja ovisnosti o koncentraciji te u tablici 6, kao vrijednosti IC_{50} , koja označava koncentraciju spoja potrebnu za 50%-tnu inhibiciju rasta u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama. Niža IC_{50} koncentracija upućuje u snažnije djelovanje spoja. Na slici 11 i u tablici 6 prikazan je utjecaj testiranih spojeva na rast staničnih linija PLB i PLB-G2 u uvjetima *in vitro*. Što je koncentracija testiranih spojeva viša, to je smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica veće. Od svih testiranih spojeva, jedino spojevi 1786 i 1791 inhibiraju rast tumorskih stanica pri koncentracijama višim od 1 μM . Na grafovima je vidljivo kako je djelovanje podjednako u obje stanične linije, te su vrijednosti IC_{50} za spojeve 1786 i 1791 podjednake u obje stanične linije (38 μM , odnosno 69 μM za 1786 te 9 μM , odnosno 12 μM za 1791). Spojevi 1787 i 1789 inhibiraju rast za maksimalno 20% u najvišoj korištenoj koncentraciji. Mogući uzrok tomu je izrazita precipitacija navedenih spojeva, zbog čega ne mogu djelovati na stanice *in vitro*. Spojevi 1788 i 1790 pokazuju inhibicijsko djelovanje pri 10 μM odnosno 100 μM te se vidi nešto veća osjetljivost tumorske linije PLB na djelovanje oba spoja u odnosu na liniju PLB-G2. Razlika u djelovanju na tumorsku liniju PLB i PLB-G2 mogla bi upućivati da su spojevi potencijalni supstrati transportera ABCG2.

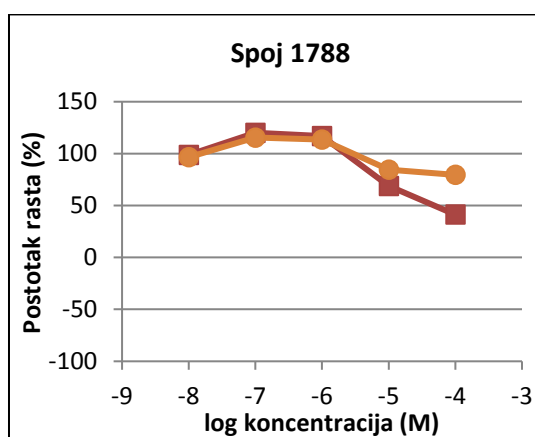
A)



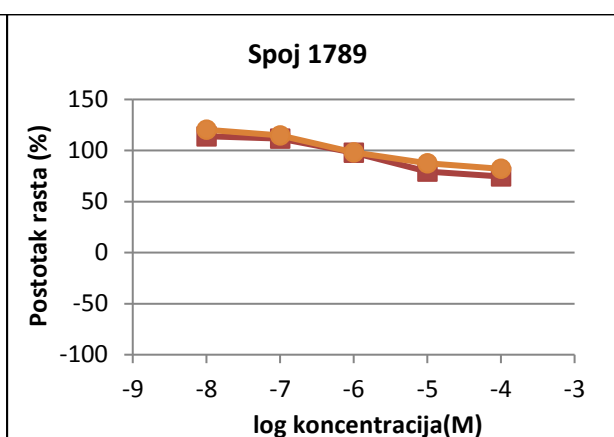
B)



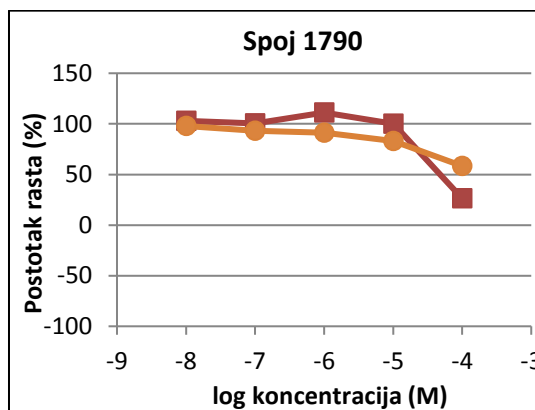
C)



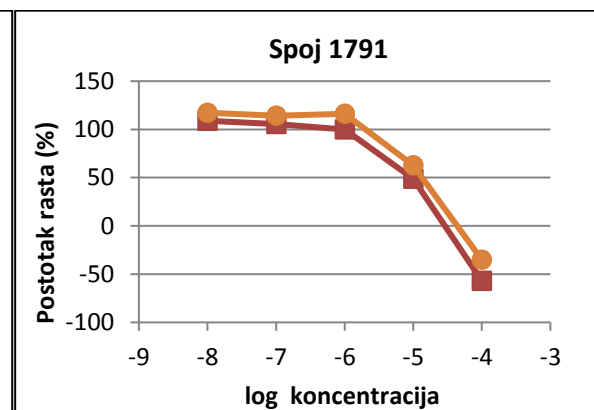
D)



E)



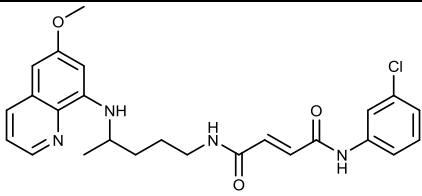
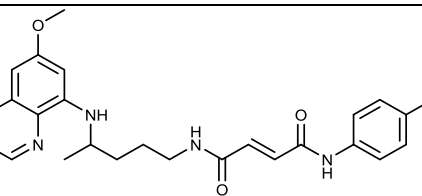
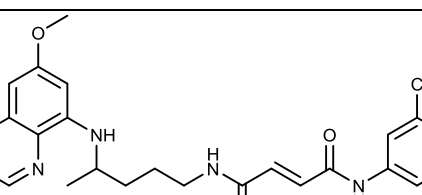
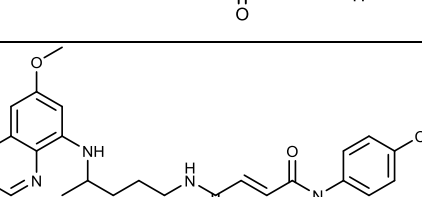
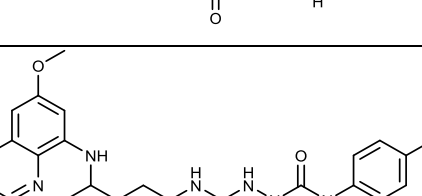
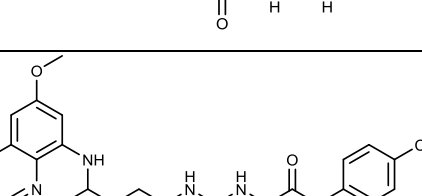
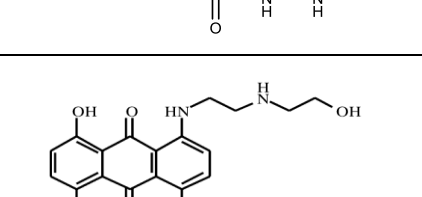
F)



Slika 11. Krivljulja preživljenja stanica PLB i PLB-G2 nakon tretmana spojevima A) 1786, B) 1787, C) 1788, D) 1789, E) 1790 i F) 1791, mjereno testom MTT. Stanice su tretirane različitim koncentracijama spojeva. Pokusi su rađeni u tetraplikatu, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri pokusa.

■ PLB ● PLB-G2

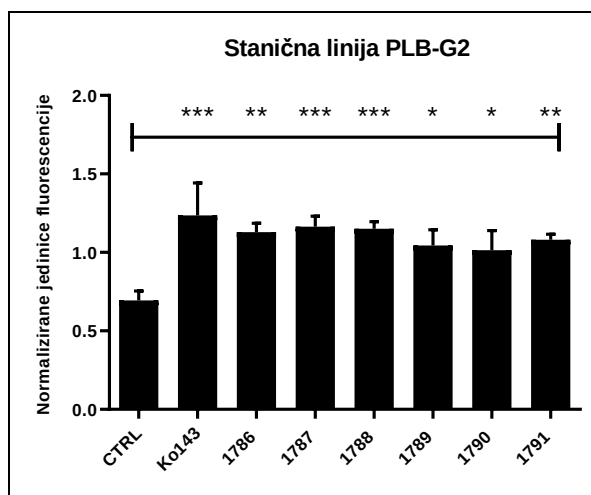
Tablica 6. Inhibicija rasta stanica PLB i PLB-G2 derivatima primakina i mitoksantronom, prikazana kao koncentracija koja izaziva 50%-tnu inhibiciju rasta (IC_{50}) određenu testom MTT (koncentracije su izražene u μM).

Oznaka spoja	Struktura spoja	IC_{50} (μM)	
		PLB	PLB-G2
LET-1786		$37,7 \pm 0,7$	$68,6 \pm 9,8$
LET-1787		≥ 100	≥ 100
LET-1788		$47,7 \pm 14,9$	≥ 100
LET-1789		≥ 100	≥ 100
LET-1790		$43,8 \pm 5,3$	≥ 100
LET-1791		$9,37 \pm 1,09$	$12,1 \pm 6,1$
Mitoksantron		$0,005 \pm 0,0005$	$0,2 \pm 0,09$

4.3 Ispitivanje inhibitiornog potencijala derivata primakina na transporter ABCG2 testom nakupljanja supstrata

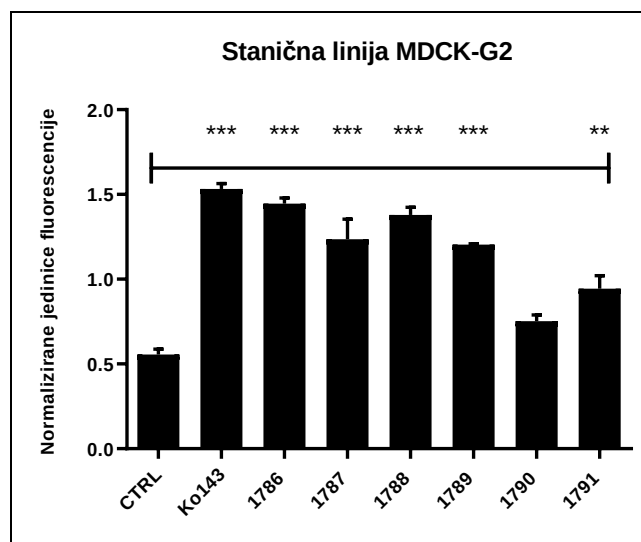
Kako bismo testirali inhibitorski potencijal spojeva na transporter ABCG2, potrebno je odabrati koncentracije spojeva koje nemaju toksični efekt na stanice. Stoga smo temeljem dobivenih rezultata o antiproliferativnom učinku spojeva, odabrali koncentraciju od 10 μ M svih spojeva, jer pri toj koncentraciji niti jedan spoj ne pokazuje značajnu toksičnost niti nakon 72 sata. S obzirom da se ovaj test provodi tijekom jednog sata, mogućnost toksičnog učinka još je manja. Vijabilnost stanica promatrali smo i pod mikroskopom, neposredno prije mjerenja na fluorimetru. Također, u istoj koncentraciji koristili smo i kontrolni spoj Ko143, što je u skladu s prethodno objavljenim podacima za referentni inhibitor Ko143 (Weidner *i sur.*, 2015.).

Stanicama smo dodali fluorescentni supstrat Hoechst 33342 te smo izmjerili fluorescenciju zaostalog supstrata u stanici testom nakupljanja supstrata. Ukoliko spojevi djeluju kao inhibitori pumpe ABCG2, supstrat se neće izbaciti iz stanica te će doći do njegovog pojačanog nakupljanja. Učinci testiranih spojeva u odnosu na kontrolni inhibitor, Ko143 prikazani su na slici 12. Kao što je vidljivo, svi su spojevi pokazali statistički značajno povišeno nakupljanje fluorescentnog supstrata Hoechst 33342. Spojevi 1786 - 1788 te 1791 pokazali su inhibitorsku aktivnost statističke značajnosti usporedive s Ko143 ($0.001 < p < 0.0001$), dok su spojevi 1789 i 1790 pokazali najslabiju inhibitorsku aktivnost ($0.01 < p < 0.05$).



Slika 12. Razina fluorescencije Hoechst H33342 supstrata nakon izlaganja stanične linije s prekomjernom ekspresijom ABCG2, PLB-G2 testiranim spojevima Ko143, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 u koncentraciji od 10 μ M mjereno fluorimetrom. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost 3 eksperimenta. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. CTRL - negativna kontrola; Ko143 – pozitivna kontrola.

Kako bismo potvrdili dobivene rezultate, istražili smo nakupljanje supstrata Hoechst 33342 u drugom staničnom modelu - MDCKII-G2 s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2. Rezultati su prikazani u slici 13. Spojevi od 1786 do 1789 pokazali su inhibitornu aktivnost statističke značajnosti usporediva s Ko143, dok je spoj 1791 pokazao nešto slabiju inhibitornu aktivnost. Spoj 1790 nije pokazao značajnu inhibitornu aktivnost.



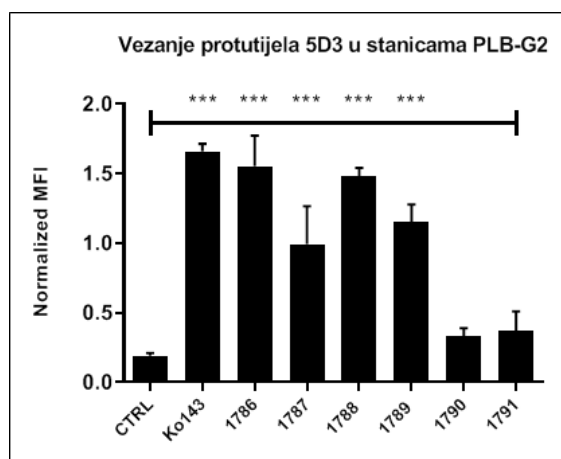
Slika 13. Razina fluorescencije Hoechst H33342 supstrata nakon izlaganja stanične linije s prekomjernom ekspresijom ABCG2, MDCK-G2 testiranim spojevima Ko143, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 u koncentraciji od 10 μ M mjereno fluorimetrom. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost 3 eksperimenta. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. CTRL - negativna kontrola; Ko143 – pozitivna kontrola.

4.4 Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3

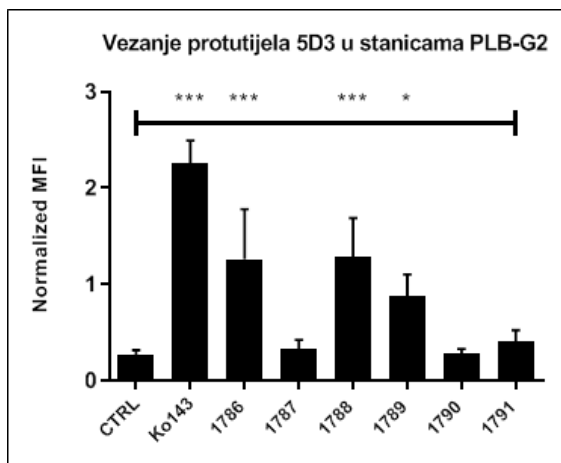
Nakon što smo u prethodnim pokusima primjetili inhibitorno djelovanje derivata primakina na aktivnost transportera ABCG2, odlučili smo dodatno provjeriti inhibični potencijal spojeva testom koji se temelji na vezanju konformacijski osjetljivog antitijela (5D3) na vanjski epitop ABCG2, mjereno protočnom citometrijom. Ovaj test omogućava određivanje prirode interakcije testiranog spoja i transportera, tj. vezanje protutijela ovisi o konformaciji u kojoj se nalazi transporter, a u u kojoj se nalazi upravo uslijed vezanja inhibitora, ali ne i supstrata (osim u izrazito visokim/inhibičnim koncentracijama). Tako na primjer, stanice tretirane poznatim inhibitorom ABCG2 transportera Ko143 pokazuju povišeno vezanje 5D3, dobiveno mjerenjem fluorescencije obilježenog protutijela protočnom citometrijom.

Iz rezultata prikazanih na slici 14. vidi se da je došlo do pojačanog vezanja 5D3 protutijela na protein ABCG2 nakon dodatka Ko143 u obje koncentracije. Također, spojevi 1786, 1787, 1788 i 1789 pri koncentraciji od 5 μM uzrokovali su pojačano vezanje 5D3 protutijela koja je bila usporediva s reakcijom nakon dodatka Ko143 u koncentraciji 1 μM (Slika 14A). S druge strane, u koncentraciji od 1 μM , jedino su spojevi 1786 i 1788 uzrokovali reakciju usporedivu s Ko143 u koncentraciji 1 μM (Slika 14B). Spoj 1789 uzrokuje slabiju reakciju pri nižoj koncentraciji, dok reakcija 1787 izostaje. Kako spojevi 1790 i 1791 nisu uzrokovali reakciju u obje koncentracije, odlučili smo ih testirati u maksimalnoj koncentraciji od 10 μM . Pri maksimalnoj koncentraciji oba spoja uzrokuju pojačano vezanje 5D3 protutijela (Slika 14C).

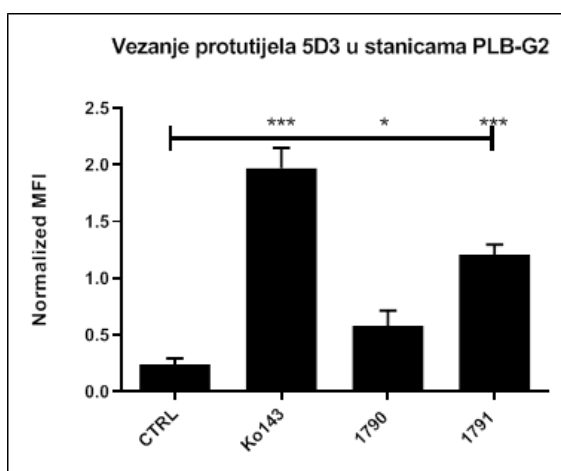
A



B

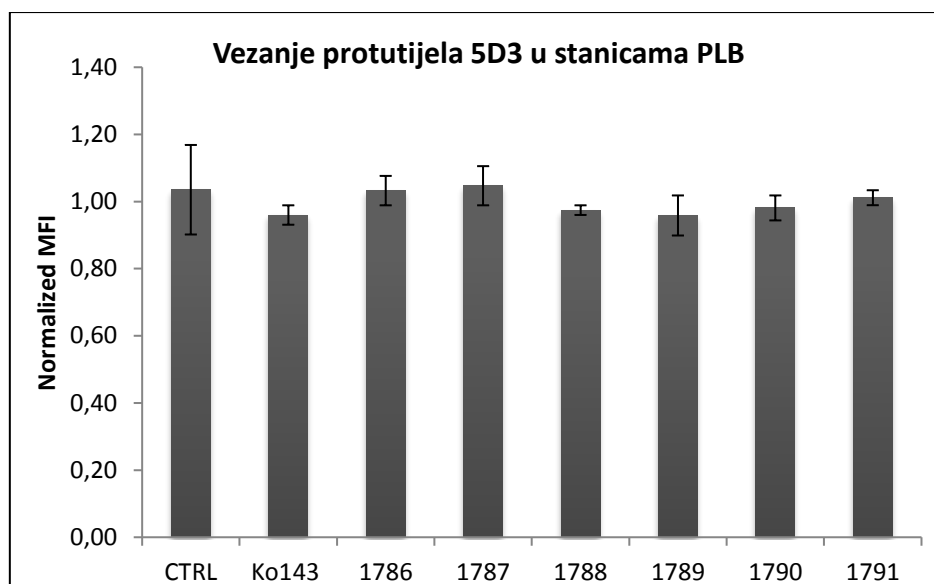


C



Slika 14. Rezultati testa vezanja konformacijski osjetljivog antitijela 5D3 nakon izlaganja stanične linije s prekomjernom ekspresijom ABCG2, PLB-G2 testiranim spojevima 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 u koncentracijama od 5 µM (A), 1 µM (B) i 10 µM (C), mjereni protočnom citometrijom. Koncentracija Ko143 (pozitivna kontrola) bila je 1 µM. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri eksperimenta. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. MFI – srednja vrijednost jačine fluorescencije (od engl. *median fluorescence intensity*). CTRL - negativna kontrola.

Isti smo test proveli na parentalnoj staničnoj liniji PLB kako bismo se uvjerali da se protutijelo 5D3 veže samo na inhibirani transporter ABCG2, tj. da ne dolazi do nespecifične reakcije. Rezultati su prikazani na slici 15. Vidljivo je kako je reakcija kod svih spojeva jednaka, tj. da ne dolazi do vezanja protutijela.



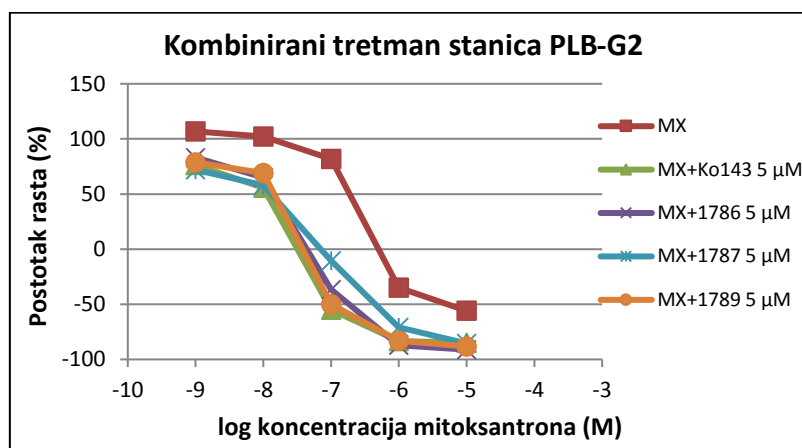
Slika 15. Rezultati testa vezanja konformacijski osjetljivog antitijela 5D3 nakon izlaganja stanične linije s bazalnom ekspresijom ABCG2, PLB spojevima 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 u koncentraciji od 5 μ M i mjereni protočnom citometrijom. Koncentracija Ko143 bila je 1 μ M. Pokusi su rađeni u duplikatima, a svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri eksperimenta. MFI – srednja vrijednost jačine fluorescencije (od engl. *median fluorescence intensity*). CTRL - negativna kontrola.

4.5 Test osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik

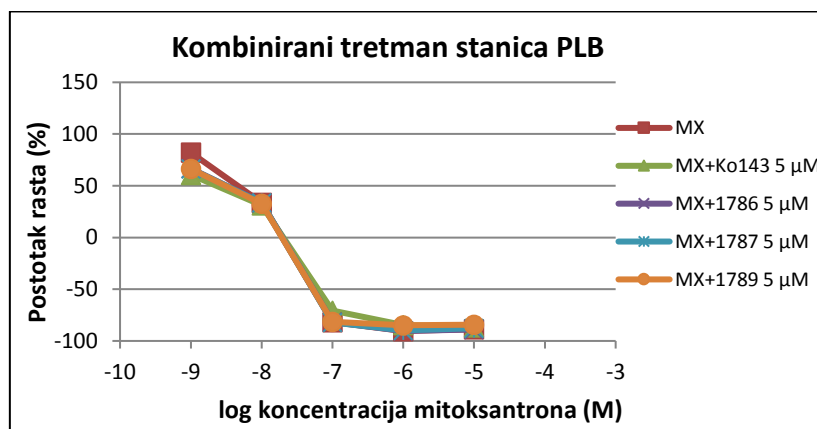
Na temelju rezultata testa vijabilnosti, testa nakupljanja supstrata i testa vezanja konformacijski osjetljivog protutijela, zaključili smo da spojevi 1786, 1787 i 1789 imaju svojstva potencijalnih inhibitora transportera ABCG2. Kako bismo dokazali da ovi spojevi zaista inhibiraju transporter ABCG2 u samim stanicama proveli smo pokuse kombiniranog tretmana rezistentnih stanica supstratom ABCG2 - kemoterapeutikom mitoksantronom i testnim spojevima. U tu svrhu stanice PLB-G2 tretirali smo kombinacijom mitoksantrona u određenom koncentracijskom rasponu i derivata primakina u koncentraciji koja se pokazala netoksična za stanice, tijekom 72 sata. Povećanje osjetljivosti stanica na mitoksantron upućuje na činjenicu da su spojevi svojim inhibitorynim djelovanjem na ABCG2 spriječili izbacivanje kemoterapeutika iz stanice te tako povećali njegovu koncentraciju unutar stanica.

Na slici 16. A prikazani su rezultati kombiniranog tretmana PLB-G2 s mitoksantronom, referentnim spojem Ko143 te spojevima 1786, 1787 i 1789. Koncentracija mitoksantrona bila je u serijskim razrjeđenjima 0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM i 10 μM , dok su Ko143 i izabrani spojevi dodani u koncentraciji od 5 μM , za koju smo prethodno dokazali da nije toksična za stanice. Na taj način se pojačano djelovanje može pripisati isključivo inhibiciji ABCG2.

A



B



Slika 16. Krivuljula preživljenja stanica s prekomjernom ekspresijom ABCG2, PLB-G2 (A) i bazalnom ekspresijom ABCG2, PLB (B). Svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje triju pokusa.

Na slici je vidljivo da spojevi 1786 i 1789 značajno pojačavaju učinak mitoksantrona, dok spoj 1787 ima najslabiji učinak senzitivizacije u otpornim stanicama (PLB-G2), slično kao i kontrolni spoj Ko143 (Slika 15. A). Rezultati su u skladu s rezultatima testa nakupljanja supstrata i testa vezanja konformacijski osjetljivog protutijela zbog čega možemo zaključiti da je inhibitorno djelovanje ovih spojeva dovoljno da inhibira rad transportera ABCG2 kako bi se pojačao učinak kemoterapeutika mitoksantrona. Nasuprot tome, učinak mitoksantrona na parentalne stanice PLB bio je očekivano jak te ga spojevi nisu dodatno pojačali.

5. RASPRAVA

Globalni teret raka nastavlja rasti zbog starenja i rasta svjetske populacije uz usvajanje ponašanja koje uzrokuje nastanak tumora, pogotovo pušenja, u ekonomski razvijenim državama. Oko 50% pacijenata koji idu na preglede mogu biti izliječeni kirurškim odstranjivanjem tumora i terapijom zračenja. Od preostalih 50%, njih 10% je moguće izliječiti kemoterapijom, poput sarkoma ili leukemije. Međutim, većina metastaziranih tumora ili ne reagira na kemoterapiju ili stekne otpornost na primijenjenu kemoterapiju (Gottesman, 1993.). Također, stanice tumora u kulturi mogu postati otporne na jedan lijek, ili skupinu lijekova sa sličnim mehanizmom – fenomen koji je poznat kao višestruka otpornost na lijekove. Otpornost mogu steći pomoću nekoliko mehanizama: izbacivanjem lijekova iz stanica, smanjenim unosom lijeka u stanicu, aktivacijom detoksificirajućih proteina, aktivacijom mehanizama popravka DNA te izbjegavanjem apoptoze (Gottesman *i sur.*, 2002b.). Za izbacivanje lijekova iz stanica odgovorni su transporter ABC. Od 48 poznatih transportera ABC, oni koji su prvenstveno povezani s višestrukom otpornošću na lijekove su P-glikoprotein (ABCB1, P-gp) i transporter ABCG2 (Polgar *i sur.*, 2008b.). U ovom smo radu istraživali učinak prekomjerne ekspresije transportera ABCG2 na djelovanje lijeka mitoksantrona te potencijalnu inhibiciju istog pomoću spojeva koji su derivati primakina, lijeka protiv malarije. Smatramo kako bi se ispitivanjem derivata primakina moglo doći do dizajna spoja koji bi bio idealan inhibitor transportera ABCG2, čime bi se vratila osjetljivost stanica tumora na kemoterapiju. Osim toga, s obzirom da su navedeni derivati testirani i na njihovo potencijalno antimalarijsko djelovanje, dobiveni rezultati pomoći će u oređivanju i prilagodbi njihovih AMDETox svojstava (od eng. "*absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*").

Primakin je sintetički derivat 8-aminokinolina sa svojstvima antimalarika. Premda mu mehanizam djelovanja nije jasan, primakin se veže i mijenja svojstva DNA parazita. Eliminira tkivnu infekciju malarije, sprječavajući razvoj eritrocitnih oblika parazita koji su odgovorni za recidive u malariji uzrokovane vrstama *Plasmodium vivax* i *Plasmodium ovale*. Primakin je aktivan i protiv kasnih jetrenih stadija. Primakin se dobro apsorbira u probavnom sustavu. Nakon oralne primjene, najvišu koncentraciju u krvnoj plazmi dosegne unutar 6 sati, nakon 24 sata, koncentracija u krvnoj plazmi je zanemariva. Glavni metabolit primakina je karboksiprimakin i njegova koncentracija u krvnoj plazmi uvelike premašuje koncentraciju neizmjenjenog primakina (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Primaquine>). Do registracije tafenokinona 2018. godine, bio je jedini lijek dostupan po cijelom svijetu protiv

latentnih jetrenih oblika malarije. Unatoč tomu što je primakin najsigurniji dostupni 8-aminokinolin ima značajne toksične efekte, među kojima je najpoznatija indukcija hemolitičke anemije kod pojedinaca s nedostatkom glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Nadalje, brzo izlječenje malarije zahtijeva primjenu primakina u periodu od najmanje par dana, čak i kod djelomično imunih ljudi (Carson, 1984b.).

Primakini su našli svoju primjenu i u protutumorskoj terapiji. Jedna od strategija istraživanja i razvoja lijekova je prenamjena postojećih lijekova ili njihovih analoga, što rezultira nižom cijenom razvoja, manjim rizikom od neuspjeha te kraćim vremenom dolaska na tržište. Na primjer, neki od antimalarika mogu se koristiti kao antibiotici i antiparazitici, ali najzanimljivije otkriće je njihova prenamjena u kemoterapeutike jer je pokazano kako različite vrste antimalarika djeluju ili izravno ili adjuvantno na tumore. Uz to, mogu povratiti osjetljivost stanica tumora na kemoterapiju. Primjerice, Hayeshi i suradnici testirali su niz antimalarika za inhibicijska svojstva na P-glikoprotein u staničnoj liniji kolorektalnog adenokarcinoma. Koristili su koncentracije od 4 μM do 1000 μM te uočili kako se kinin pokazao najpotentnijim inhibitorom prilikom praćenja efluksa radioaktivno obilježenog taksola. Ostali kinolinski spojevi, poput klorokina, amodiakina i primakina pokazali su slabiju inhibitornu aktivnost, što možda znači da je aromatska skupina spojeva važna u modulaciji aktivnosti P-glikoproteina (Hayeshi *i sur.*, 2006.). Međutim, i dalje preostaje problem toksičnog metabolita primakina, karboksiprimakina te uzrokovanja hemolitičke anemije tako da je sljedeći korak izmjena funkcionalnih skupina na primakinu ili promjena na kinolinskom prstenu. Postoje dvije glavne rute izravne izmjene primakina, na temelju najreprezentativnijih metaboličkih transformacija. Jedna je uvođenje supstituenata na pozicijama 2, 3, 4, 5 i 7 kinolinskog prstena, što je rezultiralo nastankom skoro 200 derivata primakina. Primjerice, 4-metilprimakin bio je dvostruko aktivniji od izvornog primakina prilikom ispitivanja na životinjama i nešto manje toksičan od istog. 2-*tert*-butilprimakin bio je prvi derivat 8-aminokinolina koji nije uzrokovao hemolitičku anemiju te je imao još višu antimalarijsku aktivnost od prethodnih derivata (Vale *i sur.*, 2009.). Druga ruta je modifikacija terminalne amino skupine koja je pokazala ogromno poboljšanje biodostupnosti primakina, jer značajno smanjuje pretvorbu u karboksiprimakin.

U našem smo istraživanju koristili spojeve 1790 i 1791, koji su *bis*-urea derivati primakina te imaju veliku udaljenost između primakina i alkilnih/arilnih supstituenata. Uz to, višak kisikovih i dušikovih atoma u razmaknici čini ih hidrofilnijima (Perković *i sur.*, 2016.). S druge strane, fumardiamidi su nastali kao Michaelovi akceptor i iz *bis*-urea derivata, koji je čest motiv u dizajnu lijekova zbog nepovratne kovalentne veze koju spojevi tvore s cisteinima ciljnog

proteina. Pavić i suradnici ispitivali su antimalarijska svojstva *bis*-urea derivata, s primakinom kao pozitivnom kontrolom, protiv jetrenih stadija *Plasmodium berghei*. Derivat s klorom 1790 pokazao se najaktivnijim spojem pri koncentraciji IC_{50} 42 nM, nakon čega slijedi derivat s trifluorometilom pri koncentraciji IC_{50} 74.9 nM. Oba derivata dijele istu razmaknicu u središnjem dijelu molekule, primakin i *para*-supstituirane benzenske dijelove, s različitim supstituentima. Spojevi su bili slabo aktivni u eritrocitnim stadijima, što nije iznenađujuće jer je i sam primakin slabo aktivan u tom stadiju (Pavić *i sur.*, 2018.). Kao i *bis*-urea derivati, i fumardiamidi 1786, 1787, 1788 i 1789 su bili slabo aktivni protiv eritrocitnih stadija vrste *Plasmodium falciparum*. Smatra se da je to zato što je osnovni alifatski amin potreban za aktivnost protiv eritrocitnih stadija maskiran amidnom vezom s fumardiamidom. Testirala im se potom aktivnost protiv jetrenih stadija *Plasmodium berghei* i citotoksičnost na staničnog liniji ljudskog hepatoma. Svi fumardiamidi su se pokazali izrazito aktivnima, s IC_{50} između 0,11 i 0,39 μ M, ali i netoksičnima za stanice jetre. Citotoksičnost najaktivnijih spojeva 1788 i 1789 dodatno se provjerila na staničnim linijama adenokarcinoma dojke i ljudskog embrionskog tumora s normalnom aktivnošću enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i u inhibiranim uvjetima. Nije bilo razlike u inhibiciji rasta kod staničnih linija s normalnim enzimom i inhibiranim enzimom, što vodi do zaključka da su spojevi 1788 i 1789 odlični temelji za daljnji dizajn lijekova antimalarika (Beus *i sur.*, 2019.).

U našim istraživanjima, od svih testiranih fumardiamida, jedino je spoj 1786 pokazao inhibitoran učinak na rast staničnih linija PLB i PLB-G2 u uvjetima *in vitro*. Vidljiv je nešto jači učinak na parentalnu staničnu liniju PLB (IC_{50} = 37,7 μ M), dok je učinak na staničnu liniju s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2 PLB-G2 bio slabiji (IC_{50} = 68,6 μ M). Spojevi 1787 i 1789 pokazuju slab inhibitoran učinak na obje stanične linije, čak i u najvišoj korištenoj koncentraciji. Mogući uzrok tomu je izrazita precipitacija navedenih spojeva, zbog čega ne mogu djelovati na stanice *in vitro*. Na kraju, kod spoja 1788 postoji razlika u inhibiciji rasta između staničnih linija. Do sličnih rezultata došli su Rajić i suradnici koji su ispitivali citotoksična svojstva na različitim staničnim linijama raka. Naime, spojevi 1786 i 1789 pokazali su snažan inhibitoran učinak na staničnoj liniji akutne limfoblastične leukemije, s koncentracijom IC_{50} između 8,4 μ M i 8,9 μ M. Ostali spojevi imali su slab ili nikakav učinak na testiranim staničnim linijama. Razlog tomu može biti položaj supstituenata na benzenskom prstenu fumardiamida. Kod spojeva 1786 i 1788 klor odnosno trifluorometil nalaze se u *meta* poziciji benzenskog prstena, dok se kod spojeva 1787 i 1789 klor odnosno trifluorometil se nalaze u *para* poziciji (Rajić *i sur.*, 2018.).

Bis-urea derivat 1790 pokazuje razliku u toksičnosti između staničnih linija, gdje je parentalna stanična linija osjetljivija od stanične linije s povećanom ekspresijom transportera ABCG2. Za razliku od spoja 1790, spoj 1791 izrazito inhibira rast tumorskih stanica pri koncentraciji višoj od 1 μM i vrijednosti IC_{50} su podjednake, 9,37 μM za PLB i 12,1 μM za PLB-G2. Perković i suradnici istraživali su ove derivate, te im ispitivali antimikrobna i citotoksična svojstva. *Bis*-urea derivati pokazali su se kao slabi antibiotici, ali su najvišu citotoksičnu aktivnost pokazali na staničnoj liniji karcinoma dojke, s vrijednostima IC_{50} između 0,1 μM i 2,6 μM . I ovdje se vidi kako je *meta* izomer učinkovitiji od *para* izomera (Perković i sur., 2016.).

Nadalje smo testirali inhibitorna svojstva derivata primakina na aktivnost transportera ABCG2, u koncentracijama koje nisu bile toksične za same stanice. Ta smo ispitivanja proveli testom nakupljanja supstrata Hoechst 33342. Hoechst 33342 je supstrat transportera ABCG2 koji unosom u stanicu i vezanjem za DNA postaje fluorescentan, što omogućuje njegovu kvantifikaciju unutar stanice, mjerenjem njegove fluorescencije. Jačina fluorescencije pokazuje jakost transportera ABCG2, tj. njegovu sposobnost da iz stanice izbacuje Hoechst 33342. Stanice bez prekomjerne ekspresije transportera ABCG2 PLB ne mogu izbaciti Hoechst 33342 jednako kao i stanice PLB-G2 zbog čega imaju najveću izmjerenu fluorescenciju Hoechst 33342. Stanice s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2 će ubrzo izbaciti sav Hoechst 33342 iz stanica zbog čega će fluorescencija biti niska (Scharenberg i sur., 2002.). Ukoliko neki spoj ima inhibitorno djelovanje, količina fluorescencije u stanici će se povećati jer spoj neće biti izbačen iz stanice. Kao pozitivnu kontrolu, koristili smo spoj Ko143, koji je specifični inhibitor transportera ABCG2.

Spojevi 1786, 1787 i 1788 pokazali su inhibitornu aktivnost statističke značajnosti usporedive s Ko143. Spojevi 1789, 1790 i 1791 pokazali su nešto slabiju inhibitornu aktivnost od Ko143, dok pri čemu je spoj 1790 pokazao najslabiju inhibitornu aktivnost. Kako bismo potvrdili dobivene rezultate, istražili smo nakupljanje supstrata Hoechst 33342 u drugom staničnom modelu - MDCKII-G2 s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2. Spojevi od 1786 do 1789 pokazali su inhibitornu aktivnost statističke značajnosti usporedive s Ko143, dok je spoj 1791 pokazao nešto slabiju inhibitornu aktivnost. Spoj 1790 nije pokazao značajnu inhibitornu aktivnost, čime su se potvrdili rezultati dobiveni u stanicama PLB-G2. Manje razlike u značajnosti primjećene u dvije stanične linije su očekivane (Guberović i sur., 2018.)

Nakon što smo u prethodnim pokusima primjetili inhibitorno djelovanje derivata primakina na aktivnost transportera ABCG2, odlučili smo dodatno provjeriti inhibitorni potencijal spojeva testom koji se temelji na vezanju konformacijski osjetljivog antitijela (5D3) na vanjski epitop ABCG2. 5D3 je konformacijski osjetljivo monoklonalno protutijelo koje prepoznaje vanstanični epitop ljudskog transportera ABCG2. Vezanje protutijela za vanstaničnu petlju transportera znatno se povećava u određenim konformacijama proteina, ovisno o vezanju supstrata/inhibitora ili hidrolize ATP. Tako na primjer, stanice tretirane poznatim inhibitorom transportera ABCG2 Ko143 pokazuju povišeno vezanje 5D3 (Özvegy-Laczka *i sur.*, 2005.).

Spojevi 1786, 1787, 1788 i 1789 pri koncentraciji od 5 μM uzrokovali su pojačano vezanje 5D3 protutijela koja je bila usporediva s reakcijom nakon dodatka Ko143 u koncentraciji 1 μM . S druge strane, u koncentraciji od 1 μM , jedino su spojevi 1786 i 1788 uzrokovali reakciju usporedivu s Ko143 u koncentraciji 1 μM . Spoj 1789 uzrokuje slabiju reakciju pri nižoj koncentraciji, dok reakcija 1787 izostaje. Kako spojevi 1790 i 1791 nisu uzrokovali reakciju u obje koncentracije, odlučili smo ih testirati u maksimalnoj koncentraciji od 10 μM . Pri maksimalnoj koncentraciji oba spoja uzrokuju pojačano vezanje 5D3 protutijela. Iako ova metoda omogućuje ispitivanje interakcija između lijeka i transportera na temelju sposobnosti lijeka da poveća vezanje protutijela 5D3 na transporter, nije moguće saznati točnu korelaciju između povećanog vezanja protutijela i prirode interakcije. Može se samo pretpostaviti je li lijek inhibitor ili supstrat na temelju snage vezanja; naime, inhibitori ABCG2 potiču relativno snažnije vezanje protutijela u usporedbi sa supstratima. Glavni problem ove metode je da pri nižim koncentracijama isti spojevi mogu biti supstrati, dok se pri višoj koncentraciji ponašaju kao inhibitori transportera. Kako bi se moglo zaključiti je li neki spoj inhibitor ili supstrat, potrebno je uz ovaj test primjeniti i druge testove poput testa citotoksičnosti, testa izbacivanja fluorescentnih boja ili ponoviti test s mutantnim transporterom ABCG2 (Telbisz *i sur.*, 2012.).

Na temelju dobivenih rezultata, sa sigurnošću možemo zaključiti da su spojevi 1786, 1788 i 1789 inhibitori. Pri tome, spoj 1786 i 1788 uzrokuju snažno vezanje protutijela 5D3 i u koncentraciji od 1 μM . Spojevi 1787 i 1789 uzrokuju snažno vezanje protutijela 5D3 od koncentracije 5 μM . Na kraju, spojevi 1790 i 1791 vjerojatno nisu perspektivni inhibitori jer su toksični za obje stanične linije te uzrokuju vezanje protutijela 5D3 tek od koncentracije 10 μM što ih čini slabim inhibitorima. Za spoj 1790 možemo zaključiti da je supstrat transportera ABCG2 zbog različitog djelovanja na parentalnoj staničnoj liniji i staničnoj liniji s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2, a pri koncentraciji od 10 μM postaje inhibitor zbog prezasićenja proteina.

Za spoj 1788 smatramo da postoji interakcija s transporterom ABCG2 i test vezanja protutijela pokazuje da je spoj inhibitoran pri višim koncentracijama. No ne možemo isključiti mogućnost da se spoj izbacuje pri nižim koncentracijama. U nekim slučajevima, samo izravno označavanje spoja te test ATPaze mogu pokazati stvarnu interakciju.

S obzirom na obećavajuće učinke spojeva 1786, 1787 i 1789, odlučili smo provesti kombinirani tretman otpornih stanica supstratom ABCG2 – kemoterapeutikom mitoksantronom i testnim spojevima. U tu svrhu stanice PLB-G2 tretirali smo kombinacijom mitoksantrona u određenom koncentracijskom rasponu i derivata primakina u koncentraciji koja se pokazala netoksična za stanice. Ukoliko spojevi značajno inhibiraju transport mitoksantrona transporterom ABCG2, primjetit ćemo pojačan inhibitorni učinak kemoterapeutika na stanice. Doista, spojevi 1786 i 1789 značajno pojačavaju učinak mitoksantrona, dok spoj 1787 ima nešto slabiji učinak senzitivacije u otpornim stanicama. Svi spojevi postigli su učinak senzitivacije u razini sličnoj onoj od Ko143. Rezultati su u skladu s rezultatima testa nakupljanja supstrata i testa vezanja konformacijski osjetljivog protutijela zbog čega možemo zaključiti da je inhibitorno djelovanje ovih spojeva dovoljno da inhibira rad transportera ABCG2 kako bi se pojačao učinak kemoterapeutika mitoksantrona.

Na temelju našeg i dosadašnjih istraživanja, možemo sa sigurnošću reći kako su fumardiamidi jaki inhibitori, jači u odnosu na *bis*-uree. Nadalje, među testiranim fumardiamidima spoj 1786 pokazao se najjačim inhibitorom, što znači da i male varijacije u strukturi utječu na aktivnost spoja. Bitan je položaj supstituenta na benzenskom prstenu derivata jer se kod spoja 1786 klor nalazi u *meta* položaju, dok se kod spojeva 1787 i 1789 klor odnosno trifluorometil nalaze u *para* položaju na benzenskom prstenu. Uz to, razmaknica derivata primakina sadrži atome kisika i dušika koji ih čine hidrofilnima, no njihove funkcionalne skupine su lipofilne što kompenzira njihovu hidrofilnost. Lipofilnost, kao i supstituenti, utječu na aktivnost spoja. Kako bi se utvrdila važnost strukture potencijalnog inhibitora, potrebno je provesti molekulsko modeliranje pomoću strukture proteina. Na primjer, Aller i suradnici su rentgenskom difrakcijom na kristalu opisali strukturu mišjeg transportera P-gp u obliku apoproteina i vezanog s cikličkim peptidnim inhibitorima. Struktura s inhibitorima pokazala je dva različita vezna mjesta za lijekove u unutarnjoj šupljini sposobne za stereoselektivnost na temelju hidrofobnih i aromatskih interakcija (Aller *i sur.*, 2009.). Otkrićem strukture proteina otvaraju se nove mogućnosti istraživanja, poput važnosti lipofilnosti u vezanju inhibitora i mjestu gdje se veže inhibitor pomoću molekuskog modeliranja (Jabeen *i sur.*, 2012.). Uz to, moguće je

istražiti koje su interakcije bitne za aktivnost inhibitora izmjenom aminokiselina koje su važne za hidrolizu ATP-a i onda ispitati vezanje inhibitora (Chufan *i sur.*, 2016.).

Jackson i suradnici proučavali su krio-elektronsku strukturu transportera ABCG2 i smatraju da se supstrati vežu u šupljinu 1 transportera ABCG2 prije kretanja prema šupljini 2 kako bi bili transportirani iz stanice, dok se inhibitori čvrsto vežu u šupljini 1 bez transporta. Nakon kretanja supstrata i zatvaranja šupljine 1, transmembranska domena transportera prelazi u zatvorenu konformaciju i dolazi do zatvaranja dimera nukleotid-vezne domene. Zatvaranje nukleotid-vezne domene uzrokuje prelazak konformacije transportera iz unutrašnje zatvorene u vanjsku okrenutu konformaciju, nakon čega slijedi hidroliza ATP-a i otpuštanje supstrata. Stoga, inhibitori mogu ili u potpunosti zauzeti volumen šupljine 1, čime se ponašaju kao kompetitivni inhibitori, ili se pak mogu kretati ili klizati unutar šupljine, što je slučaj sa slabijim inhibitorima. U skladu s navedenim, a temeljem naših rezultata, pretpostavljamo da se spojevi 1786 i 1789, kao jači inhibitori vjerojatno vežu unutar šupljine, dok se slabiji inhibitor – spoj 1787 može micati unutar šupljine (Jackson *i sur.*, 2018.). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja ovisnosti aktivnosti spoja o njegovoj strukturi, osobito sada kad je poznata struktura ljudskog transportera ABCG2 te mehanizam izbacivanja supstrata i inhibicije.

6. ZAKLJUČAK

- Tumorske stanične linije PLB i PLB-G2 pokazuju različitu osjetljivost na fumardiamidne i *bis*-urea derivate primakina u uvjetima *in vitro*
- Spojevi 1786 i 1791 inhibiraju rast tumorskih stanica pri koncentracijama višim od 1 μ M, pri čemu je djelovanje podjednako u obje stanične linije
- Spojevi 1787 - 1789 pokazuju slabu inhibiciju rasta, čak i u najvišoj korištenoj koncentraciji, pri čemu spojevi 1788 i 1790 jače inhibiraju rast tumorske linije PLB, u odnosu na liniju PLB-G2. Razlika u djelovanju na tumorsku liniju PLB i PLB-G2 upućuje na to da su spojevi potencijalni supstrati ABCG2 transportera.
- Test izbacivanja supstrata Hoechst 33342 u dvama staničnim modelima (PLB-G2 i MDCKII-G2) ukazuje da svi testirani spojevi pokazuju inhibiciju transportera ABCG2
- Fumardiamidi primakina i halogenanilina (1786 – 1789) pokazali inhibitornu aktivnost usporedivu sa spojem Ko143 (pozitivnom kontrolom), dok su *bis*-urea derivati primakina pokazali slabu inhibiciju transportera ABCG2
- Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 potvrdio je navedene rezultate, pri čemu su spojevi 1786 i 1788 uzrokovali vezanje protutijela već pri koncentraciji od 1 μ M.
- U kombiniranom testu MTT spojevi 1786, 1787 i 1789 postigli su učinak senzitivizacije u razini sličnoj onoj od Ko143. Rezultati su u skladu s rezultatima testa nakupljanja supstrata i testa vezanja konformacijski osjetljivog protutijela zbog čega možemo zaključiti da je inhibitorno djelovanje ovih spojeva dovoljno da inhibira rad ABCG2 transportera kako bi se pojačao učinak kemoterapeutika mitoksantrona.

7. LITERATURA

1. Allen JD, Loevezijn A Van, Lakhai JM, Valk M Van Der, Tellingens O Van, Reid G, i sur. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* **1**: 417–425.
2. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, i sur. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* (80-) **323**: 1718–1722.
3. Baird JK, Hoffman SL (2004). Primaquine Therapy for Malaria. *Clin Infect Dis* **39**: 1336–1345.
4. Beus, Fontinha, Held, Rajić, Uzelac, Kralj, i sur. (2019). Primaquine and Chloroquine Fumardiamides as Promising Antiplasmodial Agents. *Molecules* **24**: 2812.
5. Boesch M, Sopper S, Wolf D (2016). Ionophore Antibiotics as Cancer Stem Cell-Selective Drugs: Open Questions. *Oncologist* **21**: 1291–1293.
6. Borst P, Elferink RO (2002). Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu Rev Biochem* **71**: 537–592.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**: 394–424.
8. Carson PE (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1984a). *Antimalarial Drug II: 8-Aminoquinolines* **68 / 2**: .
9. Carson PE (1984b). 8-Aminoquinolines. 83–121doi:10.1007/978-3-642-69254-3_3.
10. Choi AR, Kim JH, Woo YH, Kim HS, Yoon S (2016). Anti-malarial drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells. *Anticancer Res* **36**: 1641–1648.
11. Choi CH (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* **5**: 30.
12. Chufan EE, Kapoor K, Ambudkar S V (2016). Drug-protein hydrogen bonds govern the inhibition of the ATP hydrolysis of the multidrug transporter P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* **101**: 40–53.
13. Danø K (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *BBA - Biomembr* **323**: 466–483.

14. Davidson AL, Chen J (2004). ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241–268.
15. Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007–1017.
16. Durmus S, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH (2012). Oral availability and brain penetration of the B-RAFV600E inhibitor vemurafenib can be enhanced by the p-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Mol Pharm* **9**: 3236–3245.
17. Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, i sur. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* **235**: 84–92.
18. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD (2010). ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* **10**: 147–156.
19. Foley M, Tilley L (1998). Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther* **79**: 55–87.
20. Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, Opelz G, Naujokat C (2010). Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 1098–1104.
21. Gottesman MM (1993). How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* **53**: 747–754.
22. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002a). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**: 48–58.
23. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002b). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**: 48–58.
24. Guberović I, Marjanović M, Mioč M, Ester K, Martin-Kleiner I, Šumanovac Ramljak T, i sur. (2018). Crown ethers reverse P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Sci Rep* **8**: .
25. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646–674.
26. Hasanabady MH, Kalalinia F (2016). ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J Biosci* **41**: 313–324.
27. Hayeshi R, Masimirembwa C, Mukanganyama S, Ungell ALB (2006). The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux. *Eur J Pharm Sci* **29**: 70–81.

28. Higgins CF (1992). ABC Transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67–113.
29. Huczynski A (2012). Salinomycin - A New Cancer Drug Candidate. *Chem Biol Drug Des* **79**: 235–238.
30. Jabeen I, Pleban K, Rinner U, Chiba P, Ecker GF (2012). Structure-activity relationships, ligand efficiency, and lipophilic efficiency profiles of benzophenone-type inhibitors of the multidrug transporter P-glycoprotein. *J Med Chem* **55**: 3261–3273.
31. Jackson SM, Manolaridis I, Kowal J, Zechner M, Taylor NMI, Bause M, i sur. (2018). Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nat Struct Mol Biol* **25**: 333–340.
32. Juliano RL, Ling V (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr* **455**: 152–162.
33. Kage K, Fujita T, Sugimoto Y (2005). Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer Sci* **96**: 866–872.
34. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, Tsukamoto K, Nakatomi K, Soda H, i sur. (2001). Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1216–1223.
35. Kruijtz CMF, Beijnen JH, Rosing H, Bokkel Huinink WW ten, Schot M, Jewell RC, i sur. (2002). Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* **20**: 2943–2950.
36. Lhommé C, Joly F, Walker JL, Lissoni AA, Nicoletto MO, Manikhas GM, i sur. (2008). Phase III study of valspodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 2674–2682.
37. Liu X, Pan G (Springer, Singapore: 2019). *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity* **1141**: .
38. Locher KP (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* **23**: 487–493.
39. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, Gastelen MA Van, Pijnenborg ACLM, Schinkel AH, i sur. (2001). Subcellular localization and distribution of the Breast Resistance Protein Transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**: 3458–3464.

40. Nakagawa R, Hara Y, Arakawa H, Nishimura S, Komatani H (2002). ABCG2 confers resistance to indolocarbazole compounds by ATP-dependent transport. *Biochem Biophys Res Commun* **299**: 669–675.
41. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Primaquine, CID=4908, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Primaquine> (pristupljeno 30. prosinca, 2019)
42. Özvegy-Laczka C, Várady G, Köblös G, Ujhelly O, Cervenak J, Schuetz JD, i sur. (2005). Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. *J Biol Chem* **280**: 4219–4227.
43. Özvegy C, Litman T, Szakács G, Nagy Z, Bates S, Váradi A, i sur. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 111–117.
44. Pavić K, Perković I, Pospíšilová Š, Machado M, Fontinha D, Prudêncio M, i sur. (2018). Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents. *Eur J Med Chem* **143**: 769–779.
45. Pecorino L (2012). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*, Oxford University Press, str. 2-4
46. Perković I, Antunović M, Marijanović I, Pavić K, Ester K, Kralj M, i sur. (2016). Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl or halogenphenyl substituents: Synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem* **124**: 622–636.
47. Polgar O, Robey RW, Bates SE (2008a). ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**: 1–15.
48. Polgar O, Robey RW, Bates SE (2008b). ABCG2: Structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**: 1–5.
49. Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, i sur. (2013). The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J* **12**: 212.
50. Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* **60**: 47–50.
51. Rajić Z, Beus M, Michnová H, Vlainić J, Persoons L, Kosalec I, i sur. (2018). Asymmetric Primaquine and Halogenaniline Fumardiamides as Novel Biologically Active Michael Acceptors. *Molecules* **23**: .

52. Rijpma SR, Heuvel JJMW Van Den, Velden M Van Der, Sauerwein RW, Russel FGM, Koenderink JB (2014). Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity. *Malar J* **13**: .
53. Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, i sur. (2003). Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* **89**: 1971–1978.
54. Robey RW, To KKK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, i sur. (2009). ABCG2: A perspective. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 3–13.
55. Ruff P, Vorobiof DA, Jordaan JP, Demetriou GS, Moodley SD, Nosworthy AL, i sur. (2009). A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**: 763–768.
56. Sarkadi B, Özvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A (2004). ABCG2 - A transporter for all seasons. *FEBS Lett* **567**: 116–120.
57. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**: 507–512.
58. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 219–234.
59. Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature* **546**: 504–509.
60. Telbisz Á, Hegedüs C, Özvegy-Laczka C, Goda K, Várady G, Takáts Z, i sur. (2012). Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. *Eur J Pharm Sci* **45**: 101–109.
61. Vale N, Moreira R, Gomes P (2009). Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* **44**: 937–953.
62. Vasan N, Baselga J, Hyman DM (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature* **575**: 299–309.
63. Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E (2002). Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* **62**: 5035–5040.
64. Weidner LD, Zoghbi SS, Lu S, Shukla S, Ambudkar S V., Pike VW, i sur. (2015). The inhibitor Ko143 is not specific for ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther* **354**: 384–393.

65. Xiao Y, Davidson R, Smith A, Pereira D, Zhao S, Soglia J, i sur. (2006). A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCK II cell line. *Mol Pharm* **3**: 45–54.
66. Zorc B, Perković I, Pavić K, Rajić Z, Beus M (2019). Primaquine derivatives: Modifications of the terminal amino group. *Eur J Med Chem* **182**: 111640.

ŽIVOTOPIS

Ime **Karla Carević**
Datum rođenja **10. listopada 1995.**
Adresa **Trg narodnih učitelja 2, Petrinja, Hrvatska**
E-Mail **kcarevic@stud.biol.pmf.hr**
Broj mobitela **+ 385 92 363 3196**

Obrazovanje:

2017. – 2020. **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb (Hrvatska)
2014. – 2017. **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb (Hrvatska)
2010. – 2014. **Srednja škola Petrinja – Opća gimnazija**

Iskustvo:

veljača 2019. – lipanj 2019. **Izrada diplomskog rada**
Institut Ruđer Bošković
Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za
eksperimentalnu terapiju
Tema: Utjecaj derivata primakina na modulaciju
aktivnosti transportera ABCG2
Mentorice: dr. sc. Marijeta Kralj, znanstvena
savjetnica u trajnom zvanju IRB,
izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

veljača 2018. – svibanj 2018. **Laboratorijska stručna praksa**
Institut Ruđer Bošković
Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za
eksperimentalnu terapiju
Voditeljica: dr. sc. Marijeta Kralj, znanstvena
savjetnica u trajnom zvanju IRB

ožujak 2017. – lipanj 2017.

Laboratorijska stručna praksa

Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij
za molekularnu ekotoksikologiju
Voditelj: dr. sc. Tvrtko Smital, znanstveni
savjetnik u trajnom zvanju

listopad 2016. – siječanj 2017.

Demonstratorica (kolegij Mikrobiologija ekosustava)

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Botanički zavod

Ostalo:

2014.- volonterstvo na Znanstvenom pikniku

2015. - voditelj radionice „Noći biologije“, PMF

2016. – hostesiranje na „Noći biologije“, PMF; voditelj radionice „Summer School of Science“ u Požegi

2017. – voditelj radionice na Danu znanosti i tehnologije („Da, ZnaTe!“), FER

2018. – sudjelovanje na radionici „Uvod u molekulsko modeliranje“, IRB