

Učinci fluorescentnih derivata indola na regulaciju staničnog ciklusa i preživljavanje stanica adenokarcinoma i fibroblasta pluća čovjeka

Puzić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:715724>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Puzić

**Učinci fluorescentnih derivata indola na
regulaciju staničnog ciklusa i preživljavanje
stanica adenokarcinoma i fibroblasta pluća
čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Jelena Puzić

**Effects of fluorescent indole derivates on the
cell cycle regulation and survival of human
adenocarcinoma cells and lung fibroblast
cells**

Master thesis

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Dragomire Majhen, te komentorice prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinci fluorescentnih derivata indola na regulaciju staničnog ciklusa i preživljavanje stanica adenokarcinoma i fibroblasta pluća čovjeka

Jelena Puzić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fluorescentni indolni kationi zanimljivi su za terapijsku upotrebu jer pokazuju jaku fluorescenciju i lokalizaciju u mitohondrijima. Modifikacijom indolnog prstena ovih spojeva, moguće je poboljšati njihova svojstva, poput fotostabilnosti i protutumorske aktivnosti, čime se povećava njihova učinkovitost u terapijama. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati učinak novo sintetiziranih derivata indola na bazi vinil piridina na stanični ciklus, preživljenje, ekspresiju proteina uključenih u preživljavanje i regulaciju staničnog ciklusa te ispitati sposobnost lokalizacije spojeva u mitohondrijima stanica adenokarcinoma (A549) i fibroblasta pluća čovjeka (WI-38). Tretman stanica A549 i WI-38 spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 uzrokuje smanjenje preživljenja stanica. Smanjeno preživljenje stanica nakon tretmana spojevima nije uzrokovano aktivacijom apoptoze. Nadalje, spojevi FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 pokazuju značajnu lokalizaciju u mitohondrijima stanica A549 i WI-38. Tretman stanica A549 spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 uzrokuje zastoje u G0/G1 fazi staničnog ciklusa koji je vjerojatno posljedica povećane ekspresije proteina p21.

Ključne riječi: fluorescentni derivati indola, stanični ciklus, apoptoza
(43 stranica, 14 slika, 7 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Dragomira Majhen, znanstvena savjetnica

Komentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, Prof. dr. sc. Biljana Balen, Izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 16.01.2025

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Effects of fluorescent indole derivatives on the cell cycle regulation and survival of human adenocarcinoma cells and lung fibroblast cells

Jelena Puzić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Fluorescent indole cations are of great interest for therapeutic use because they show strong fluorescence and localization in mitochondria. By modifying the indole ring of these compounds, it is possible to improve their properties, such as photostability and antitumor activity and therefore increase their effectiveness in therapies. The aim of this thesis was to examine the effect of newly synthesized indole derivatives based on vinyl pyridine on the cell cycle, survival, expression of proteins involved in survival and regulation of the cell cycle, and to examine the ability of the compounds to localize in the mitochondria of adenocarcinoma cells (A549) and human lung fibroblasts (WI-38). Treatment of A549 and WI-38 cells with compounds FB404, FB411, FB414 and FB417 causes a decrease in cell survival. Decreased cell survival after compound treatment was not caused by activation of apoptosis. Furthermore, the compounds FB404, FB406, FB411, FB414 and FB417 show significant localization in the mitochondria of A549 and WI-38 cells. Treatment of A549 cells with compounds FB404, FB411, FB414 and FB417 causes arrest in the G₀/G₁ phase of the cell cycle, which is probably due to increased expression of the p21 protein.

Keywords: fluorescent indole derivatives, cell cycle, apoptosis
(43 pages, 14 figures, 7 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. Dragomira Majhen, Senior Research Associate

Co-mentor: Dr. Nada Oršolić, Full Professor

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Full Professor; Dr. Biljana Balen, Prof.; Dr. Nenad Malenica, Assoc. Prof

Replacment: Dr. Tomislav Ivanković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 16.01.2025.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori	1
1.2. Stanični ciklus	3
1.2.1. Regulacija staničnog ciklusa	4
1.3. Stanična smrt	6
1.3.1. Apoptoza	6
1.3.2. Alternativni oblici stanične smrti.....	7
1.4. Indoli	8
1.4.1. Fluorescentni derivati indola	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Stanične linije	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.1.3. Spojevi.....	13
3.1.4. Uređaji i laboratorijski pribor	14
3.1.5. Antitijela.....	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Kultura stanica	17
3.2.2. Određivanje preživljenja stanica.....	17
3.2.3. Provjera staničnog ciklusa.....	18
3.2.4. Provjera lokalizacije ispitivanih spojeva u mitohondrijima	19
3.2.5. Analiza ekspresije proteina.....	20
4. REZULTATI	22

4.1. Djelovanje novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola na preživljenje stanica adenokarcinoma pluća i fibroblasta pluća čovjeka	22
4.2. Analiza staničnog ciklusa nakon tretmana novo sintetiziranim fluorescentnim derivatima indola	25
4.3. Lokalizacija novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola u mitohondrijima.....	28
4.4. Određivanje mehanizma djelovanja ispitivanih novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola	30
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČCI	39
7. LITERATURA	40
8. ŽIVOTOPIS.....	43

Korištene kratice

Apaf-1 - faktor 1 aktivacije proteaza apoptoze (engl. *apoptotic protease activating factor-1*)

ATP - adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

ATCC - engl. *American type culture collection*

Bcl-2 - B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

CDK – kinaza ovisna o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase*)

CKI - inhibitor kinaze ovisne o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*)

DD - domena smrti (engl. *death domain*)

DISC - signalni kompleks koji inducira smrt (engl. *death inducing signaling complex*)

DMEM – Dulbeccova modifikacija Eaglova medija (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO - dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

dsDNA – dvolančana molekula DNA (engl. *double-stranded DNA*)

dsRNA – dvolančana molekula RNA (engl. *duble-stranded RNA*)

EMEM - Eaglov minimalni esencijalni medij (engl. *Eagle's minimal essential medium*)

FADD - protein s domenom smrti pridruženoj receptoru Fas (engl. *Fas-associated death domain protein*)

FSB - fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serume*)

HIF - faktor hipoksije (engl. *hypoxia-inducible factor*)

IC₅₀ - koncentracija spoja pri kojoj se promatrani biološki efekt smanji za pola (engl. *50% inhibitory concentration*)

mRNA - glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

MTT - 3-(4,5-metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. *(3-(4, 5-dimethylthiazolyl 2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*)

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

PI - propidij jodid (engl. *propidium iodide*)

RNaza A - ribonukleaza A (engl. *ribonuclease A*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)

TNF - čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TRADD – protein s domenom smrti pridruženoj receptoru TNFR1 (engl. *TNFR1-associated death domain protein*)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

1. UVOD

1.1. Tumori

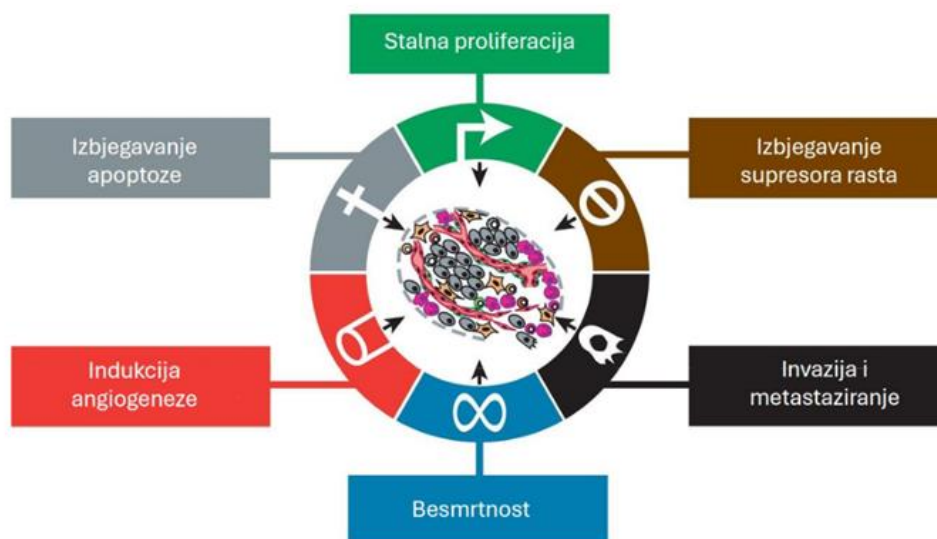
Tumor je naziv za svaku nakupinu promijenjenih stanica koje nekontrolirano rastu i proliferiraju (Cooper i Husman, 2010). Tumori mogu biti benigni (dobročudni) ili maligni (zloćudni). Benigni tumori se ne šire po organizmu, već su ograničeni na mjesto svojeg nastanka. Iako ovakvi tumori ne izazivaju značajnije poteškoće te su uglavnom mogu ukloniti kirurškim putem, ponekad zbog svoje lokalizacije i veličine mogu predstavljati problem za okolna tkiva i organe (Pecorino, 2012). S druge strane, maligni tumori su oni koji su stekli sposobnost širenja po organizmu putem direktne invazije u susjedna tkiva i metastaziranjem u druga tkiva preko krvožilnog ili limfnog sustava. S obzirom na vrstu stanica iz kojih je tumor nastao razlikuju se karcinomi (tumori epitelnih stanica), sarkomi (tumori mezodermalnih stanica) te leukemije i limfomi (tumori hematopoetskih stanica i stanica imunološkog sustava) (Cooper i Hausman, 2010; Weinberg, 2014).

Tumor može nastati kao posljedica raznih mutacija odnosno promjena u sekvenci molekule DNA. Uglavnom se radi o mutacijama somatskih stanica koje se, za razliku od mutacija na spolnim stanicama, ne prenose na potomstvo (Pecorino, 2012). Veliki broj mutacija gena nastaje pod utjecajem vanjskih karcinogenih faktora, kao što su zračenje (ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje), kemijske karcinogene tvari (poput aflatoksina i komponenti duhanskog dima) te različiti tumorski virusi. Mutacije mogu biti i posljedica unutarstaničnih faktora poput grešaka u staničnoj signalizaciji i grešaka koje se javljaju tijekom replikacije DNA (Stratton i sur., 2009; Koya i Ibrahim, 2024). Tumori su monoklonalnog podrijetla što znači da nastaju iz jedne stanice koja je pretrpjela genetske ili epigenetske promjene. Te promjene omogućuju stanici nekontroliranu proliferaciju, što postaje osnova za klonalno širenje. Za prelazak normalne stanice u tumorsku mora doći do većeg broja mutacija koje se akumuliraju tijekom godina, zbog čega se tumori nerijetko opisuju kao bolesti starije dobi (Cooper i Hausman, 2010).

Postoje tri vrste gena čije mutacije čine osnovu karcinogeneze, a to su onkogeni, tumor-supresorski geni te mikroRNA geni (Croce, 2008). U normalnim stanicama, protoonkogeni kodiraju za proteine koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i stanične proliferacije. Nepravilna eksprimiranost ili mutacija protoonkogeni rezultira njegovom transformacijom u onkogen. Oni mogu nastati kao posljedica točkastih mutacija te raznih kromosomskih aberacija

poput translokacija, duplikacija i delecija (Cooper i Hausman, 2010). Mutacije protoonkogeni su dominantnog tipa što znači da je dovoljna mutacija na samo jednom alelu kako bi došlo do aktivacije odgovarajućeg onkogeni (Pecorino, 2012). Onkogeni potiču pojačanu ekspresiju gena i pretjeranu aktivaciju onkogenih proteina što dovodi do poremećaja u staničnoj proliferaciji. Osim toga, narušavaju proces diferencijacije stanica i omogućavaju izbjegavanje programirane stanične smrti (Cooper i Hausman, 2010). Njima suprotno djelovanje imaju tumor-supresorski geni koji kodiraju za proteine koji inhibiraju stanični rast i proliferaciju. Gubitak funkcije ovih gena rezultira uklanjanjem negativne regulacije stanične proliferacije. Mutacije koje se javljaju na tumor-supresorskim genima su recesivne te u tom slučaju oba alela moraju biti zahvaćena mutacijom kako bi došlo do gubitka funkcije gena (Pecorino, 2012). Treću skupinu gena čine mikroRNA geni koji ne kodiraju proteine. Njihov je produkt jednolančana molekula RNA (duga 21 do 23 nukleotida) koja regulira ekspresiju gena. Takve kratke RNA se komplementarno vezuju za mRNA čime onemogućavaju translaciju proteina te degradiraju mRNA. Djelovanje mikroRNA ovisi o njihovoj genskoj ekspresiji u tumorskim stanicama. Naime, ako je ekspresija tih gena povećana onda mikroRNA djeluju kao onkogeni, a ako je njihova ekspresija smanjena djelovati će kako tumor-supresorski geni (Croce 2008).

Hanahan i Weinberg (2011) definirali su šest ključnih karakteristika koje omogućavaju transformaciju normalne stanice u tumorsku te su opisali način na koji stanica stječe sposobnost rasta i metastaziranja (Slika 1).



Slika 1. Glavne karakteristike koje omogućuju pretvorbu normalnih stanica u tumorsku (preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011)

Jedna od glavnih karakteristika tumora je njihova sposobnost održavanja kronične proliferacije. Dok normalne stanice reguliraju sintezu i otpuštanje faktora rasta, kod tumora je ta regulacije izgubljena. Naime, tumori imaju smanjenu potrebu za izvanstaničnim signalima i faktorima rasta ili, u neki slučajevima, stvaraju vlastite faktore rasta (Cooper i Hasuman, 2010; Hanahan i Weinberg, 2011). To je posljedica aktivacije komponenata koje imaju ključnu ulogu u proliferacijskim putevima poput aktivacije onkogeni. Proliferacija tumorskih stanica potaknuta je i izbjegavanjem tumor-supresora, poput p53 i pRb, koji imaju važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Protein p53 može zaustaviti stanični ciklus u slučajevima kada je stanica izložena staničnom stresu ili u slučaju javljanja abnormalnosti stanice. Ukoliko su oštećenja prevelika, p53 aktivira programiranu staničnu smrt odnosno apoptozu. To je jedan od ključnih mehanizama kojima stanice pokušavaju spriječiti razvoj tumora, ali tumorske stanice često izbjegavaju ovaj proces zbog oštećenja proteina p53 i drugih komponenata apoptotičkog puta koji uključuje pro-apoptotske i anti-apoptotske proteine. Svaka normalna stanica ima ograničeni broj dioba nakon čega ireverzibilno odlazi u senescenciju (stanično starenje), a zatim slijedi apoptoza. Nakon svake diobe, dolazi do postepenog skraćivanja telomera. Kratke telomere stanica prepoznaje kao oštećenje DNA, što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa. S druge strane, tumorske stanice imaju stalno aktivnu telomerazu koja produljuje telomere, što tumorskim stanicama omogućuje neograničeno dijeljenje. Za rast i razvoj svakoj stanici, pa tako i tumorskoj, potrebna je određena količina kisika i hranjivih tvari koje dobivaju difuzijom preko krvnih žila. Nedostatak kisika u tumorima dovodi do aktivacije faktora HIF (engl. *hypoxia inducible factor*), koji potiče ekspresiju krvožilnog endotelnog faktora (VEGF). Ovaj se faktor veže za receptore koji se nalaze na stijenkama endotelnih stanica čime pokreće angiogenezu, odnosno proces nastajanja novih krvnih žila iz već postojećih. Maligni tumori imaju sposobnost invazije i metastaziranja. Ključni korak ovog procesa uključuje epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) i lučenje metaloproteinaza koje razgrađuju izvanstanični matriks, omogućujući tumorima neometan prijelaz kroz bazalnu membranu i prelazak kroz krve žile (Hanahan i Weinberg, 2011).

1.2. Stanični ciklus

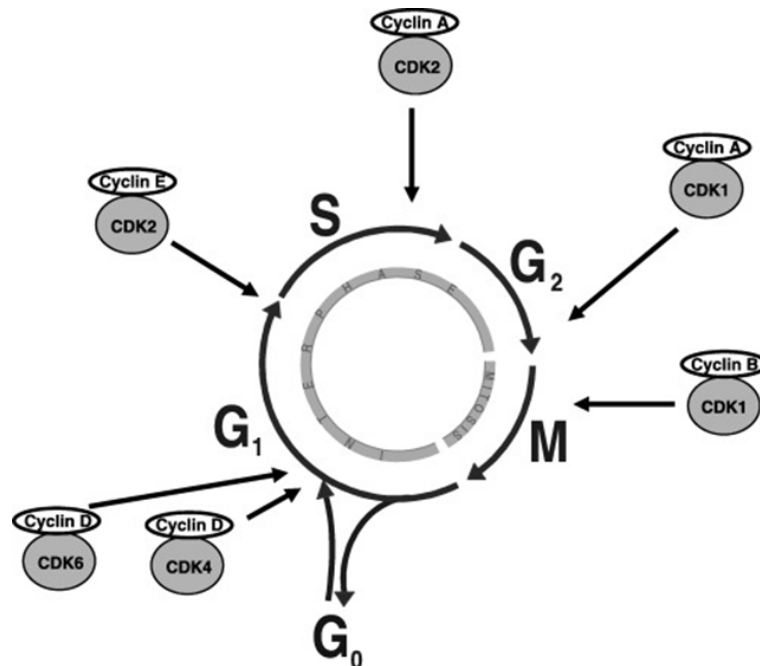
Stanični ciklus je proces koji obuhvaća stanični rast, replikaciju DNA, prijenos kromosoma u stanice kćeri te podjelu stanice. Stanični ciklus kod čovjeka traje otprilike 24 sata, a najveći dio vremena stanica provodi u interfazi koju čine faze G1 (engl. *gap*), S (engl.

synthesis) i G2 (Cooper i Hausman, 2010). U G1 fazi stanica intenzivno raste te sintetizira proteine i enzime potrebne za replikaciju DNA. Ova faza ima ključnu ulogu u odluci hoće li stanica dalje napredovati kroz stanični ciklus ili će ući u G0 fazu. To je faza mirovanja u kojoj nema rasta ni proliferacije, ali stanica ostaje metabolički aktivna. U S fazi dolazi do replikacije DNA te je ova faza ključna za osiguravanje genetske stabilnosti organizama. Dovršavanjem sinteze DNA započinje G2 faza, u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu te se provjerava kvaliteta replikacije DNA (Alberts i sur., 2002; Vermeulen i sur., 2003). Nakon interfaze slijedi M faza (engl. *mitosis*), za vrijeme koje dolazi do odvajanja sestrinskih kromatida, a proces završava citokinezom (podjela citoplazme) (Cooper i Hausman, 2010).

1.2.1. Regulacija staničnog ciklusa

Stanični ciklus je proces strogo reguliran nizom izvanstaničnih i unutarstaničnih signala te je precizna koordinacija svih faza važna za održavanje genetske stabilnosti i sprječavanje nastanka bolesti (Diaz-Moralli i sur., 2013). Glavni regulatori ovog procesa su ciklin-ovisne kinaze (CDK) i ciklini. CDK je obitelj serin/treonin protein kinaza koje se aktiviraju stvaranjem kompleksa s ciklinima u određenim fazama staničnog ciklusa. Nastali kompleksi fosforiliraju ciljne proteine koji imaju ključnu ulogu u procesima poput replikacije DNA i mitoze. Ciklini su proteini odgovorni za redoslijed pojedinih faza staničnog ciklusa. Njihove razine osciliraju tijekom ciklusa što periodički aktivira CDK i tako omogućavaju prijelaz i jedne faze u drugu (Barnum i O'Connell, 2014). Tako primjerice, ciklini D stvaraju komplekse s CDK4 i CDK6 koji onda omogućavaju prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Važnu ulogu u tom prijelazu ima i protein pRb. Tijekom G1 faze, kinaza CDK4/6 u kompleksu s ciklinom D fosforilira pRb, što dovodi do oslobađanja transkripcijskih faktora koji onda aktiviraju gene nužne za ulazak u S fazu (Alberts i sur., 2002; Vermeulen i sur., 2003). Različiti kompleksi CDK i ciklina ključni su za daljnje napredovanje kroz stanični ciklus (Slika 2). Ciklin E u kombinaciji s CDK2, omogućava prijelaz iz kasne G1 u S fazu. Taj kompleks također održava pRb u hiperfosforiliranom stanju čime se osigurava stalna aktivacija potrebnih gena. Ciklin A zajedno s CDK2 omogućava napredovanje kroz S fazu. Na kraju, ciklin B zajedno s CDK1 omogućuje prijelaz iz G2 faze u M fazu, čime završava priprema za diobu stanice. Osim aktivacije, CDK mogu biti inhibirane putem inhibitora ciklin-ovisnih kinaza (CKI). Vezujući se na CDK ili na

kompleks CDK-ciklin, CKI osiguravaju da stanica ne napreduje dalje kroz stanični ciklus ukoliko uvjeti nisu zadovoljeni (Alberts i sur., 2002; Vermeulen i sur., 2003).



Slika 2. Prikaz djelovanja kompleksa CDK-ciklina u pojedinim fazama staničnog ciklusa (preuzeto i prilagođeno iz Vermulen i sur., 2003)

Dodatnu regulaciju staničnog ciklusa omogućuju kontrolne točke. To su mehanizmi koji osiguravaju zaustavljanje staničnog ciklusa ukoliko prethodni procesi nisu uspješno dovršeni. Kontrolna točka G₁/S provjerava cjelovitost DNA prije same replikacije. U kontrolnoj točki G₂/M osigurava se završetak replikacije DNA te se provjerava postoje li oštećenja prije ulaska u mitozu. Tijekom M faze postoji specifična kontrolna točka koja nadzire vezanje kromosoma za diobeno vreteno kako bi se spriječilo njihovo pogrešno odvajanje (Alberts i sur., 2002; Diaz-Moralli i sur., 2013). S faza je posebno osjetljiva jer su replikacijski kompleksi izloženi različitim vrsta stresova koje mogu onemogućiti replikaciju. Poremećaji u regulaciji, poput mutacija u genu *p53* i *pRb*, mogu dovesti do gubitka kontrole staničnog ciklusa, što dovodi do nekontrolirane proliferacije te razvoja malignih tumora. Protein p53 ključni je regulator koji nadzire oštećenja DNA. U slučaju oštećenja, p53 pokreće proizvodnju proteina p21, koji zaustavlja stanični ciklus kako bi omogućio popravak DNA ili inducirao apoptozu u slučajevima kada su oštećenja nepovratna. Gubitak kontrole ciklina i CDK također može izazvati neravnotežu u staničnoj podjeli, što je česta pojava u tumorskim stanicama (Vermeulen i sur., 2003; Barnum i O'Connell, 2014).

1.3. Stanična smrt

Broj stanica u organizmu reguliran je procesima proliferacije, diferencijacije i staničnom smrti. U odraslom organizmu, stanična smrt uvijek mora biti u ravnoteži sa staničnom obnovom jer svaka nepravilnost i ovom odnosu može dovesti do razvoja neurodegenerativnih i autoimunih bolesti, kao i do nastanka tumora (Cooper i Hausman, 2010). Stanična smrt može biti kontrolirana ili nekontrolirana. Nekontrolirana smrt stanice, poznata kao nekroza, javlja se kao odgovor na akutne ozljede, a sam proces nije ovisan o energiji stanice (Elmore, 2007). U tom slučaju, stanica se povećava i na kraju dolazi do njezinog pucanja, pri čemu se sadržaj izlijeva u okolna tkiva, što izaziva upalu (Alberts i sur., 2002). Kontrolirana stanična smrt najčešće se odnosi na apoptozu iako postoje i drugi oblici. Apoptoza je ključna za uklanjanje stanica zaraženih virusima jer se na taj način sprječava širenje infekcije. Isto vrijedi i za oštećene stanice koje se uklanjaju kako bi se spriječilo širenje mutacija i štetnih promjena (Copper i Hausman, 2010; Tait i sur., 2014).

1.3.1. Apoptoza

Apoptoza je jedan od glavnih oblika programirane stanične smrti. Tijekom apoptoze, molekula DNA se fragmentira, kromatin postaje kondenziran, a jezgra se raspada na manje dijelove. Na kraju, stanica se smanjuje i razdvaja u dijelove obavijene membranom koji se nazivaju apoptotičkim tjelešcima. Apoptotička tjelešca se fagocitiraju i uklanjaju iz organizma pri čemu se ne izaziva upalna reakcija (Cooper i Hausman, 2010). Apoptoza može nastati uslijed smanjenja ili potpune odsutnosti pozitivnih signala potrebnih za preživljenje stanice ili kao rezultat primanja negativnih signala. Ključni enzimi u cjelokupnom procesu apoptoze su kaspaze koje se nalaze u citoplazmi u inaktivnom obliku kao prokaspaze. To je obitelj proteaza koje imaju cistein na svom aktivnom mjestu te cijepaju ciljane proteinske supstrate iza aspartata (Alberts i sur., 2002; Tait i sur., 2014).

Vanjski apoptotički put temelji se na interakcijama između transmembranskih receptora iz TNF (engl. *tumor necrosis factor*) obitelji receptora, poput Fas i TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*). Ovi receptori sadrže vanjske domene bogate cisteinom i citoplazmatske domene poznate kao „domene smrti“ (engl. *death domain*, DD). U mehanizmima koji uključuju receptore FasL/FasR i TNF- α /TNFR1 dolazi do nakupljanja receptora i njihovog vezivanja s ligandima čime se novače adapter proteini FADD (engl. *Fas-associated death domain protein*)

i TRADD (engl. *TNFR1-associated death domain protein*). Ovi adapteri aktiviraju prokaspazu-8 formiranjem kompleksa DISC (engl. *death-inducing signaling complex*). Aktivacija prokaspaze-8 pokreće fazu izvršavanja apoptoze, koja uključuje kaskadu kaspaza što posljedično dovodi do proteolitičkog cijepanja ključnih staničnih proteina. Regulacija ovog procesa uključuje protein c-FLIP koji inhibira aktivaciju proteina FADD i prokaspaze-8 (Alberts i sur., 2002; Elmore, 2007).

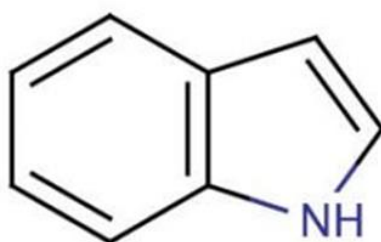
Unutarnji put apoptoze ne ovisi o ligandima, već se aktivira kao odgovor na oštećenje DNA, oksidacijski stres ili druge oblike staničnog stresa (Elmore, 2007). Ključnu ulogu u ovom procesu imaju proteini iz obitelji Bcl-2 unutar koje se razlikuju pro-apoptotski i anti-apoptotski proteini. Omjer između ovih proteina, poput Bcl-2, Bcl-xL (anti-apoptotski) i Bax, Bak (pro-apoptotski), određuje osjetljivost stanice na apoptozu. Proteini Bcl-2 reguliraju broj i funkciju ionskih kanala na unutrašnjoj membrani mitohondrija kroz koje izlazi citokrom c i druge molekule ključne za pokretanje apoptoze. Kada citokrom c izađe iz mitohondrija, veže se za protein Apaf-1, što aktivira kaspazu-9 i dovodi do formiranja kompleksa poznatog kao apoptosom. Apoptosom zatim aktivira kaskadu kaspaza, što rezultira razgradnjom staničnih komponenata i dovodi do aktivacije programirane stanične smrti (Alberts i sur., 2002; Mustafa i sur, 2024).

1.3.2. Alternativni oblici stanične smrti

Osim apoptoze, postoji niz drugih oblika stanične smrti, poput autofagije, nekroze, mitotske katastrofe, anoikis, paraptoze, piroptoze, pironekroze i druge. Svaki od ovih oblika stanične smrti ima specifične mehanizme i funkcije u odgovoru na različite stresne uvjete, oštećenja ili patološke procese (Tait i sur., 2014). Nekroza, za razliku od apoptoze, predstavlja oblik nekontrolirane stanične smrti koja je obično uzrokovana fizičkim ili kemijskim oštećenjima. Oštećenje stanične membrane dovodi do izlivanja staničnog sadržaja, što aktivira upalni odgovor i može rezultirati daljnjim oštećenjem okolnih stanica (Cooper i Hausman, 2010). Autofagija je alternativni put kontrolirane stanične smrti koji nije ovisan o kaspazama. Mehanizam autofagije uključuje razgradnju nepotrebnih ili oštećenih staničnih komponenata u lizosomima koji su ispunjeni hidrolitičkim enzimima (Elmore, 2007). Tijekom autofagije, u citoplazmi se formira izolacijska membrana koje obuhvaća citosolne komponente, stvarajući autofagosom. Zreli autofagosomi spajaju se s lizosomima, što omogućuje razgradnju unesenih komponenata (Cooper i Hausman, 2010).

1.4. Indoli

Heterociklički spojevi u svojoj strukturi sadrže jedan ili više heteroatoma poput sumpora (S), dušika (N) ili kisika (O), što im omogućava da budu donori i akceptori vodikovih veza. Zbog takve strukture mogu se uspješno vezati za različite molekule te posljedično uzrokovati i razne biološke učinke. Takva svojstva čine heterocikličke spojeve zanimljivima za znanstvena istraživanja posebno zbog njihovih farmakoloških učinaka. Indoli su važni predstavnici heterocikličkih spojeva koji sadrže dušik kao heteroatom i sastoje se od benzenskog i pirolonog prstena (Slika 3). Pirolni prsten je bogat elektronima zbog čega je podložniji elektrofilnim reakcijama supstitucije u usporedbi s benzenskim prstenom. Zbog ovih kemijskih svojstava, indoli i srodni spojevi mogu promijeniti topljivost molekula u vodi i lipidima, što poboljšava njihovu biološku dostupnost i omogućuje različite farmakološke učinke. Zbog toga se indoli često koriste kao osnovni sastojci u mnogim lijekovima jer, osim što mogu djelovati kao inhibitori enzima, mogu pokazivati i antitumorska i protuupalna svojstva (Dhiman i sur., 2022; Salerno i sur., 2023).



Slika 3. Strukturna formula indola sastavljenih od pirolnog i benzenskog prstena

1.4.1. Fluorescentni derivati indola

Mitochondriji su organeli ključni za proizvodnju energije u stanicama, regulaciju metabolizma i odgovor na stres. Oni stvaraju ATP kroz oksidativnu fosforilaciju, ali u ovom procesu mogu nastati i reaktivni kisikovi radikali (ROS), koji oštećuju mitohondrijsku DNA, proteine i lipide. Disfunkcija mitohondrija povezana je sa starenjem i različitim bolestima,

poput neurodegenerativnih poremećaja i dijabetesa (Brand i sur., 2013). Stoga su mitohondriji moguće mete za terapijske intervencije.

Skupina spojeva koji su od interesa za istraživanje, a čiju osnovu strukture čini indolni prsten su fluorescentni lipofilni kationi koji se selektivno nakupljaju u mitohondrijima. Ovi spojevi se koriste u pristupima liječenju mitohondrijske disfunkcije. Lipofilni kationi zbog svojeg pozitivnog naboja i svojstva topivosti u mastima, mogu se selektivno nakupljati unutar mitohondrija pod utjecajem njihovog membranskog potencijala (Brand i sur., 2013). Lipofilni kationi se više nakupljaju u mitohondrijima stanica tumora nego u mitohondrijima normalnih stanica zbog prirodnih razlika u mitohondrijskom membranskom potencijalu između tih dvaju tipova stanica. Derivati ovih spojeva pokazuju razliku u apsorbanciji, fluorescenciji i fotostabilnosti, što je posljedica različitih supstituenata na indolnom prstenu. *In vitro* istraživanja pokazuju da različiti supstituenti mogu utjecati na citotoksičnost tih spojeva (Chen i sur., 2019).

Jedan od najpoznatijih primjera fluorescentnih derivata indola je rodamin 123 (Rh123), lipofilni kation koji se koristi za mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala. Iako Rh123 pokazuje selektivnu antitumorsku aktivnost, njegova primjena u kliničkim ispitivanjima je ograničena zbog citotoksičnosti pri visokim dozama. Rodamin 19 (Rh19) je derivat Rh123 koji nudi bolju ciljanu aktivnost u mitohondrijima, manju citotoksičnost i omogućuje praćenje u stvarnom vremenu putem intrinzične fluorescencije (Wang i sur., 2021).

Lipofilni kationi imaju široku primjenu u istraživanjima mitohondrija zbog sposobnosti da prodiru kroz unutarnju mitohondrijsku membranu i selektivno se nakupljaju unutar samog mitohondrija. Takva svojstva čine ih izuzetno korisnima za mjerenje mitohondrijskog potencijala, koji je ključni pokazatelj zdravlja mitohondrija. Osim u snimanju, lipofilni kationu se istražuju i u kontekstu dostave lijekova jer njihova sposobnost nakupljanja u mitohondrijima omogućuje izravnu dostavu terapijskih tvari u sam mitohondriji, što otvara nove mogućnosti u liječenju (Khan i sur., 2022). Ovi spojevi također imaju veliku važnost u istraživanjima malignih tumora jer selektivno ciljaju tumorske stanice. Fluorescentni indolni kationi, poput derivata F16, posebno su značajni jer pokazuju jaku fluorescenciju i mogu se lokalizirati u mitohondrijima. Modifikacijom indolnog prstena ovih spojeva, moguće je poboljšati njihova svojstva, poput fotostabilnosti i protutumorske aktivnosti, čime se povećava njihova učinkovitost u terapijama (Chen i sur., 2019).

U ovom radu korišteni su novo sintetizirani derivati indola na bazi vinil piridina, radnih naziva FB404, FB406, FB11, FB414 i FB417. Navedeni spojevi, kemijski su okarakterizirani u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković gdje je pokazano da imaju podjednako srednje izražen afinitet vezanja na dsDNA/dsRNA (engl. *double-stranded DNA/duble-stranded RNA*), pri čemu dolazi do porasta intenziteta fluorescencije. Spektar fluorescencije je u području 450 – 550 nm. Kontrolni spoj bez indolnog prstena ne pokazuje afinitet vezanja za dsDNA/dsRNA što ukazuje na ključnu ulogu indolne podjedinice u spektroskopskim istraživanjima s ispitanim polinukleotidima. Biološka aktivnost navedenih spojeva nije poznata.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Spojevi koji se u isto vrijeme mogu koristiti kao citotoksični spojevi i spojevi za obilježavanje mitohondrija u svrhu terapije i dijagnostike tumora (engl. *theranostic*) vrlo su atraktivni. Stoga su sintetizirani novi derivati F16 sa željom povećanja njihovog citotoksičnog djelovanja. U skladu s tim, cilj istraživanja ovog diplomskog rada je ispitati učinak novo sintetiziranih derivata indola na bazi vinil piridina na stanični ciklus, preživljenje, ekspresiju proteina uključenih u preživljavanje i regulaciju staničnog ciklusa te ispitati sposobnost lokalizacije spojeva u mitohondrijima stanica adenokarcinoma i fibroblasta pluća čovjeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Stanične linije

U ovom radu koristila sam adherentne stanice adenokarcinoma pluća A549 (ATCC CCL-185) i stanice fibroblasta pluća čovjeka WI-38 (ATCC CCL-75) Obje stanične linije su komercijalno dostupne.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 1. Osnovne kemikalije korištene u radu

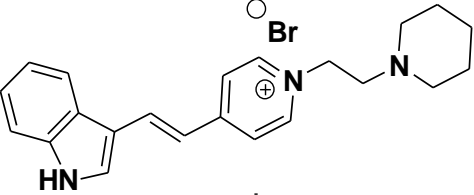
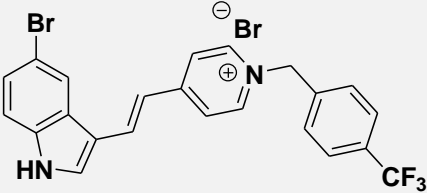
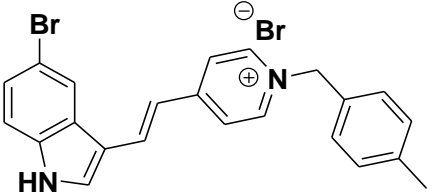
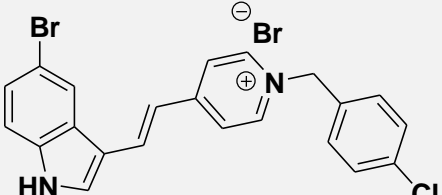
NAZIV	PROIZVOĐAČ
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolij bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, SAD
Akrilamid (C ₃ H ₅ NO)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Amidocrno (engl. <i>amidoblack</i>)	Kemika, Hrvatska
Amonijev persulfat, APS (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Serva, Njemačka
Dimetilsulfoksid, DMSO	Gram Mol, Hrvatska
DMEM (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)	Sigma-Aldrich, SAD
EMEM (engl. <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>)	Sigma-Aldrich, SAD
Etanol	Gram Mol, Hrvatska
Goveđi serumski albumin, BSA (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)	Carl Roth, Njemačka
<i>MitoTracker</i> boja	Thermo Fisher Scientific, SAD
N,N,N,N-tetrametiletilediamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich, SAD

Natrij-dodecil sulfat, SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	Sigma-Aldrich, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Cell Signaling Technology, SAD
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> , proteinski marker za SDS elektroforezu	Thermo Scientific, SAD
<i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i> , kemiluminiscentni reagens za Westernsku analizu	Thermo Fisher Scientific, SAD
Propidij jodid, PI ($\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{N}_4$)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Pufer PBS	Sigma-Aldrich, Njemačka
RNaza A	Sigma-Aldrich, Njemačka
Serum fetusa goveda, FBS (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Sigma-Aldrich, SAD
Tripsin	Sigma-Aldrich, SAD
Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Sigma, Njemačka
Tween-20® ($\text{C}_{56}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Spojevi

Tablica 2. Oznake i strukturne formule derivata indola korištenih u radu

OZNAKA SPOJA	STRUKTURNA FORMULA
FB404	

FB406	
FB411	
FB414	
FB417	

Navedeni spojevi su novo sintetizirani derivati indola na bazi vinil piridina te su kemijski okarakterizirani u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković.

3.1.4. Uređaji i laboratorijski pribor

Tablica 3. Korišteni uređaji

NAZIV	PROIZVOĐAČ
Centrifuga <i>Heraeus Functionale Labofuge 400</i>	Thermo Fischer Scientific, SAD

Inkubator <i>HeraCell 150</i>	Thermo Fisher Scientific, SAD
Izvor napona <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad, SAD
Konfokalni laserski pretražni mikroskop	Leica Microsystems, Njemačka
Protočni citometar <i>Guava Muse Cell Analyzer</i>	Luminex Corporation, SAD
Spektrofotometar <i>Stat Fax - 2100</i>	Awareness Technology Inc., SAD
Svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
Termoblok <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf, Njemačka
Uređaj <i>Uvitec Alliance Q9 mini</i>	St John's Innovation Centre, U.K.
Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom <i>Ultrasonic Processor</i>	Cole Palmer, SAD
Vrtložna mješalica EV 102	Tehtnica, Slovenija

Tablica 4. Laboratorijski pribor i pomagala korišteni u radu

NAZIV	PROIZVOĐAČ
Aparatura za izlivanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina <i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems</i>	Bio-Rad, SAD
Kadica za elektroforezu i transfer proteina	Bio-Rad, SAD
Hamilton igla	Hamilton, Švicarska
Ibidi μ -Dish s 4 komorice promjera 35 mm	Ibidi, Njemačka
Mikroepuvete	Eppendorf, Njemačka
Mikropipete	Eppendorf, Njemačka

Nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon Becton Dickinson, SAD
Plastične epruvete (15 i 50 mL)	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj adherentnih stanica sa 6 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
Strugač za stanice	TPP Techno Plastic Products AG,

3.1.5. Antitijela

Tablica 5. Korištena antitijela

	Specifičnost	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Primarna antitijela	casp 8	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD	9746
	casp 9	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD	9520
	ciklin D	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-246
	p21	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-397
	pRb	1:1000	Cell Signaling Technology	554136

Sekundarna antitijela	anti-zečje IgG-HRP	1:5000	Thermo Scientific	Fisher	Pierce 21446
	anti-mišje IgG-HRP	1:10 000	Santa Cruz Biotechnology		sc-516102

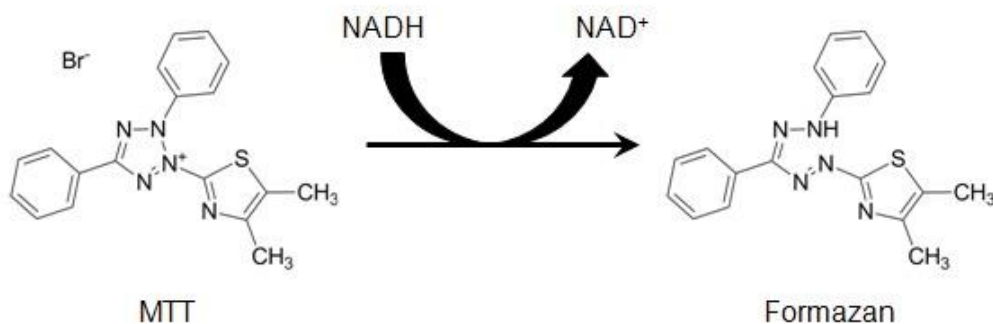
3.2. Metode

3.2.1. Kultura stanica

Stanice A549 sam uzgajala u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s dodatkom 10%-tnog FSB-a (engl. *fetal bovine serume*). Stanice WI-38 uzgajala sam u hranjivom mediju EMEM (engl. *Eagle's minimum essential medium*) također s dodatkom 10%-tnog FSB-a. Kako bih održala njihov rast i preživljavanje, obje stanične linije držala sam u Petrijevim zdjelicama za uzgoj stanica u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i uz 5%-tni CO₂ u smjesi zraka. Rasađivanje stanica radila sam dva do tri puta tjedno ovisno o postignutoj konfluentnosti stanica i to na način da bih uklonila hranjivi mediji, isprala bih stanice puferom PBS te dodala 1 mL tripsina zagrijanog na 37 °C. Uz pomoć svjetlosnog mikroskopa pratila sam odvajanje stanica od podloge te njihovo međusobno odvajanje nakon čega sam zaustavila djelovanje tripsina dodatkom četiri puta veće količine odgovarajućeg hranjivog medija. Dio suspenzije stanica bih koristila za daljnje eksperimente, a dio bih vratila u inkubator uz dodatak svježeg medija.

3.2.2. Određivanje preživljenja stanica

Citotoksičnost novo sintetiziranih derivata indola odredila sam pomoću MTT testa. Glavna komponenta ovog testa je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid odnosno MTT reagens koji se reducira u netopive, ljubičaste kristale formazana (Slika 4). Ova reakcija redukcije moguća je isključivo u metabolički aktivnim stanicama te je posredovana djelovanjem enzima sukcinat dehidrogenaze. Intenzitet ljubičastog obojenja proporcionalan je preživljenju stanica.



Slika 4. Reakcija redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) u formazan (preuzeto iz Riss i sur., 2013)

Stanice sam nasadila na pločice za uzgoj stanica s 96 bunarića (5×10^3 stanica/100 μL odgovarajućeg medija po bunariću) te sam ih preko noći ostavila u inkubatoru. Idući dan pripremila sam otopine spojeva različitih koncentracija kojima sam tretirala stanice. Za potrebe jednog eksperimenta pripremila sam otopine koncentracija od 0,1, 1, i 10 μM te sam tretmane provodila u kvadrilikatima. Kako bih preciznije uočila razlike u učinku ovih spojeva na preživljavanje različitih tipova stanica, primijenila sam i finiju gradaciju koncentracija (0,25, 0,5 i 0,75 μM). Nakon 72 sata inkubacije na 37 °C i uz 5%-tni CO₂, uklonila sam medij iz bunarića te sam u svaki dodala po 40 μL MTT otopine i ponovno sam inkubirala 3 sata. Za to vrijeme enzim sukcinat dehidrogenaza reducira MTT u kristale formazana koje sam otopila dodavajući 170 μL DMSO-a po bunariću. Kako bih pospješila otapanje formazana, pločice sam stavila na treslicu 15 minuta. Za određivanje intenziteta obojenja, mjerila sam apsorbanciju na spektrofotometru sa čitačem za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 600 nm.

3.2.3. Provjera staničnog ciklusa

Kako bih odredila stanični ciklus, stanice sam nasadila na pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića (2×10^5 stanica/2 mL odgovarajućeg medija) te sam ih inkubirala preko noći. Idući dan stanice sam tretirala pripremljenim otopinama spojeva koncentracije 1 μM . Kao kontrolne skupine koristila sam stanice tretirane s DMSO i stanice tretirane s H₂O₂ koji uzrokuje oštećenje stanica i zaustavljanje staničnog ciklusa. Nakon 24 sata inkubacije sa ispitivanjem

spojevima, uklonila sam medij sa stanica, isprala sam ih puferom PBS te ih tripsinizirala s 300 μL tripsina. Stanice sam zatim sakupila u mikroeprevetama od 5 mL te sam ih centrifugiranjem tijekom 5 min na 1200 okretaja po minuti sakupila u talog. Uklonila sam supernatant te sam talog resuspendirala u PBS-u i ponovno centrifugirala 5 min na 1200 okretaja po minuti. Nakon što sam ponovno uklonila supernatant, dodavala sam kap po kap 1 mL ledeno hladnog 96%-tnog etanola uz lagano vorteksiranje kako bih fiksirala stanice. Uzorke sam pohranila na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći.

Na dan analize uzoraka, pripremila sam otopine RNaze A ($0,1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i propidij jodida, PI ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) u PBS puferu. RNaza A razgrađuje RNA čime omogućava bolju vizualizaciju molekule DNA kada se koristi fluorescentna boja PI koja se veže za DNA. Uzorke sam izvadila iz zamrzivača i prebacila sve stanice u etanolu u mikroeprevete od 1,5 mL. Zatim sam ih centrifugiranjem tijekom 5 min na 1200 okretaja po minuti sakupila u talog. Uklonila sam supernatant, stanice sam isprala PBS-om te ih ponovno centrifugirala u istim uvjetima. Nakon ponovnog uklanjanja supernatanta, resuspendirala sam stanice u 150-200 μL otopine RNaze A te sam uzorke inkubirala 15 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga, u svaki sam uzorak dodala jednaki volumen otopine PI te sam uzorke inkubirala 30 min na ledu tako da budu zaštićeni od svjetla. Uzorke sam analizirala protočnim citometrom *Muse Cell Analyzer*.

3.2.4. Provjera lokalizacije ispitivanih spojeva u mitohondrijima

Provjeravala sam lokalizaciju spojeva u mitohondrijima tako da sam stanicama odredila kolokalizaciju spojeva s bojom *MitoTracker* koja specifično boji unutrašnju membranu mitohondrija. Stanice sam nasadila u Ibidi zdjelice sa 4 komorice u koncentraciji 7×10^4 stanica/ $500\text{ }\mu\text{L}$ odgovarajućeg medija. Nakon 24 sata inkubacije, stanice sam tretirala pripremljenim otopinama spojeva koncentracije $1\text{ }\mu\text{M}$. Prvo sam uklonila mediji te sam stanice isprala PBS-om nakon čega sam stanicama dodala po $500\text{ }\mu\text{L}$ medija sa spojem pa inkubirala 90 min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon završene inkubacije, uklonila sam mediji sa spojem te sam dodala po $500\text{ }\mu\text{L}$ pripremljenog *Mitotracker*-a (100 nm) u svaku komoricu. Nakon 30 min inkubacije, uklonila sam *Mitotracker*, stanice sam isprala PBS-om te sam dodala po $500\text{ }\mu\text{L}$ svježeg medija u svaku komoricu. Vizualizacija kolokalizacije napravljena je konfokalnim mikroskopom.

3.2.5. Analiza ekspresije proteina

Za detekciju i analizu ekspresije proteina koji sudjeluju u preživljenju stanica i staničnom ciklusu koristila sam metode SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) i westernska metoda otiska.

3.2.5.1. SDS-PAGE

Za pripremu uzorka za ovu metodu nasadila sam stanice na pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića u koncentraciji 5×10^5 stanica/2 mL odgovarajućeg medija. Nakon 24 sata inkubacije napravila sam tretman spojevima koje sam pripremila u koncentraciji 1 μ M te sam tretirane stanice inkubirala preko noći na 37 °C. Stanične lizate sakupljala sam metodom vrućeg pufera. Metoda uključuje uklanjanje medija s primijenjenim spojem sa stanica te sam ih dva puta isprala PBS-om kako bih osigurala potpuno uklanjanje zaostalih spojeva. Uklonila sam PBS i u svaki sam bunarić dodala 90 μ L 1 \times SB (engl. *sample buffer*) kojeg sam prethodno pripremila i zagrijala na termobloku na 96 °C. Pomoću strugalice, stanične lizate sam odvojila od podloge te ih sakupila u mikroeprovete od 1,5 mL. Lizate sam potom sonicirala tri puta po 5 sekundi te ih zagrijala 5 min na 96 °C. Prije samog nanošenja na gelove uzorke sam ohladila kratko na ledu.

Gelove za elektroforezu pripremila sam prema Tablici 6. Gelove sam pripremala u Falcon epruvetama. Najprije sam pripremila smjesu za donji gel za razdvajanje, koju sam izlila u kalup te pričekala da se u potpunosti polimerizira. Nakon toga, na polimerizirani donji gel nanijela sam smjesu za gornji gel za sabijanje. Nakon pripreme potrebne aparature za elektroforezu, pripremila sam 1 \times SDS elektroforetski pufer razrjeđujući 80 mL 10 \times SDS s 720 mL destilirane vode. U pojedine jažice gela dodala sam 20 μ L uzorka, dok sam u jednu od jažica uključila 1,5 μ L proteinskog biljega radi određivanja veličine proteina. Elektroforezu sam započela pri naponu od 80 V kako bih omogućila pravilnu migraciju uzoraka kroz gel. Nakon što su uzorci dostigli donji dio gela, prebacila sam napon na 100 V kako bih poboljšala razdvajanje proteina. Na kraju, elektroforeza je završila kada su proteini postigli optimalno razdvajanje.

3.2.5.2. Westernska metoda otiska

Nakon završetka SDS-PAGE, radila sam mokri prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu. Sustav za prijenos napravila sam po redoslijedu: spužvica, filter papir, membrana, gel, filter papir i spužvica pazeći da je membrana na strani pozitivno nabijene katode, a gel na strani negativno nabijene anode zbog putovanja proteina. Prijenos sam radila u kadici za prijenos proteina koju sam do vrha ispunila transfer puferom pri uvjetima jakosti struje 400 mA tijekom 90 min. Nakon završenog prijenosa, membranu sam isprala u pufer TBST te sam bojala membranu otopinom amidocrne boje 2 min. Boju sam isprala u otopini za odbojavanje do pojave jasno vidljivih vrpca na membrani. Membranu sam ponovno isprala u TBST-u te blokirala u 5%-tnom mlijeku pripremljenog u puferu TBST. Blokiranje je trajalo 1 h, nakon čega sam membrane preko noći inkubirala specifičnim primarnim antitijelima na 4 °C (Tablica 5). Idući dan, membrane sam isprala u puferu TBST – jedan put po 15 min i tri puta po 3 min. Nakon toga sam membrane inkubirala odgovarajućim sekundarnim antitijelom 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja membrane vizualizaciju proteina na membrani napravila sam pomoću ECL kemiluminiscentnog reagensa i na uređaju *Uvitec Alliance Q9 mini*.

Tablica 6. Priprema gelova za SDS-PAGE

Komponente	Donji gel (mL)	Gornji gel (mL)
	10%	5%
H ₂ O	2,1	4
30% smjesa akrilamid-bisakrilamid	0,5	3,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,38
10% SDS	0,03	0,1
10% APS	0,03	0,1
TEMED	0,004	0,004

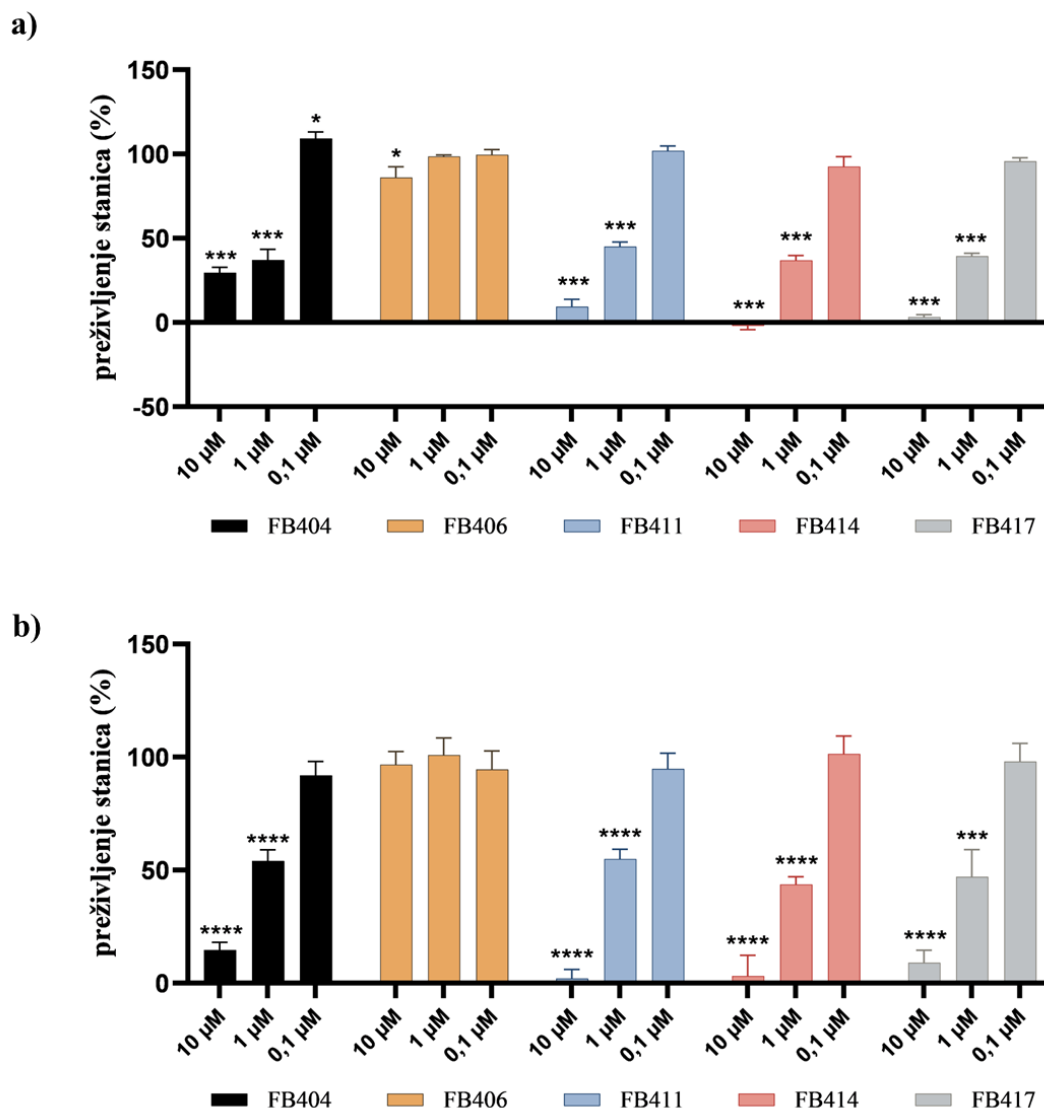
4. REZULTATI

4.1. Djelovanje novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola na preživljenje stanica adenokarcinoma pluća i fibroblasta pluća čovjeka

Da bi se koristili u medicinske svrhe novo sintetiziranim spojevima potrebno je odrediti biološku kompatibilnost. Iz literature je poznato da derivati F16 indola imaju antitumorsko djelovanje te da mogu utjecati na preživljenje stanica. Određivanjem preživljenja stanica korištenjem MTT testa u ovom je diplomskom radu ispitana citotoksičnost novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola: FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417. Citotoksičnost je određena na adherentnim stanicama adenokarcinoma pluća A549 i stanicama fibroblasta pluća čovjeka WI-38 (Slika 5). Stanice su tretirane spojevima pripremljenim u različitim koncentracijama i to 10, 1 i 0,1 μM . Kao kontrola korišten je DMSO u odgovarajućim razrjeđenjima. Spoj FB406 nije imao utjecaja na preživljenje stanica, dok su spojevi FB404, FB411, FB414 i FB417 pokazali izrazitu citotoksičnost pri koncentracijama od 10 i 1 μM . Isti trend se pokazao u obje stanične linije. IC_{50} vrijednosti ispitivanih spojeva, odnosno koncentracija spoja pri kojoj se postiže 50% preživljenja stanica, navedene su u Tablici 7.

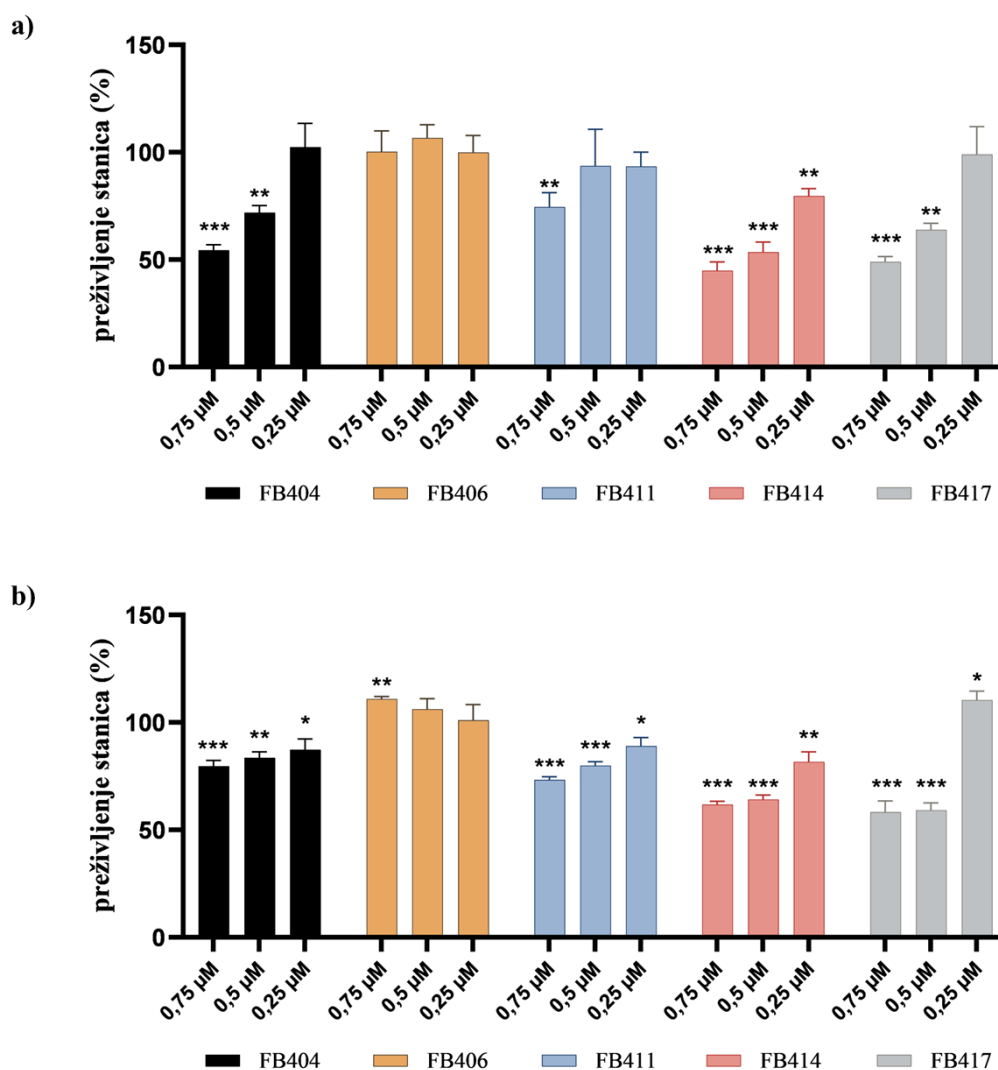
Tablica 7. Citotoksičnost novo sintetiziranih derivata indola na stanicama A549 i WI-38 izražena kao vrijednost IC_{50}

Spoj	IC_{50} (μM)	
	A549	WI-38
FB404	0,5	1,3
FB411	0,8	0,9
FB414	0,9	0,9
FB417	0,8	1,1



Slika 5. Preživljenje stanica A549 (a) i WI-38 (b) nakon tretmana ispitanim spojevima. Stanice su 24 sata nakon nasađivanja tretirane spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u različitim koncentracijama (10, 1 i 0,1 μM). Nakon 72 sata, preživljenje stanica je određeno korištenjem MTT testa. Kao kontrolna skupina koristile su se stanice tretirane samo s DMSO u istim koncentracijama kao i spojevi. Prikazana je jedna replika od dvije biološke replike u kojima su dobiveni usporedivi rezultati. Podaci su prikazani u odnosu na kontrolne uzorke, ± vrijednost standardne devijacije (SD), izrađeni u kvadrilikatima. Vrijednost p je dobivena korištenjem Student t -testa ($*p < 0,05$; $*** p < 0,001$; $**** p < 0,0001$).

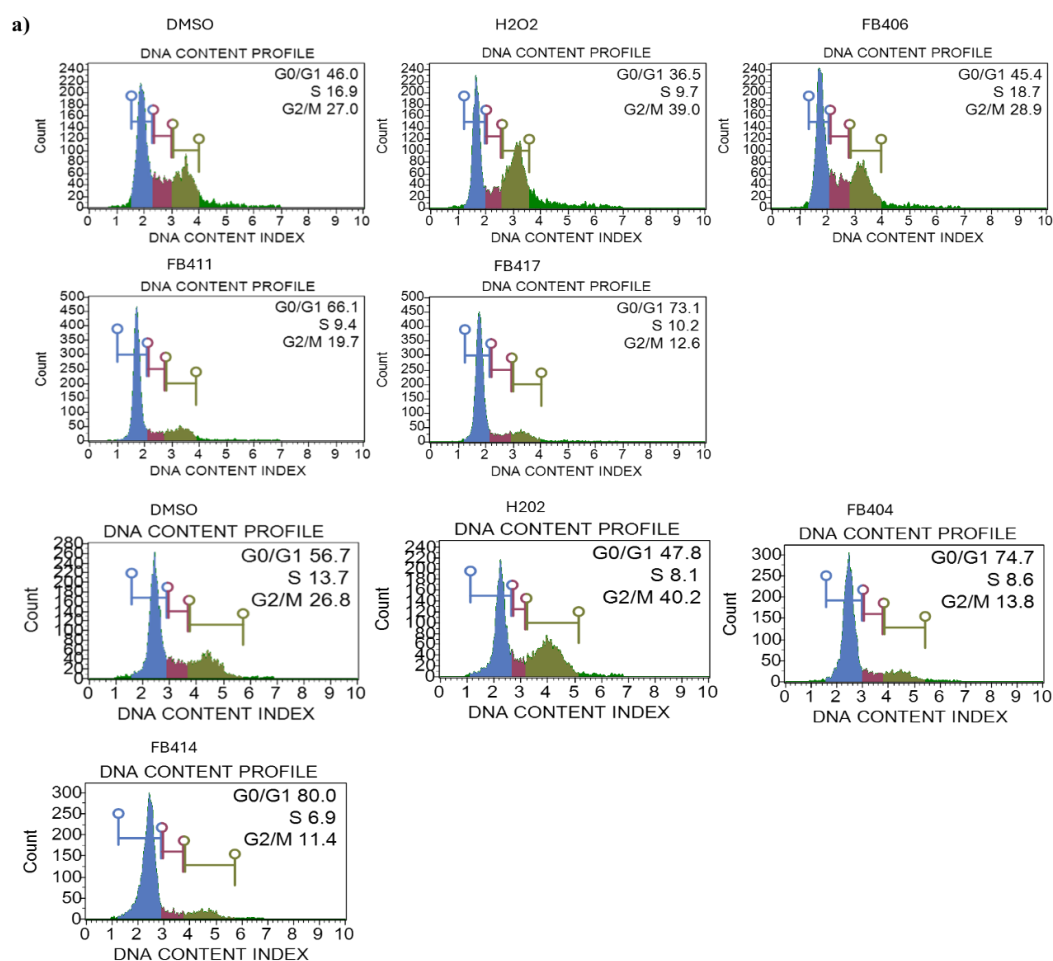
Nadalje, kako bi se preciznije procijenila razlika u učinku ovih spojeva na preživljenje različitih tipova stanica, stanične linije A549 i WI-38 tretirane su spojevima pripremljenim u finijoj gradaciji koncentracija (0,25, 0,5 i 0,75 μM) (Slika 6). Rezultati MTT testa pokazuju da nema značajne razlike u utjecaju ispitivanih spojeva na preživljenje između dviju staničnih linija, osim u slučaju stanica tretiranih spojem FB404 pri čemu A549 stanice tretirane ovim spojem pokazuju manje preživljenje u usporedbi sa WI-38.



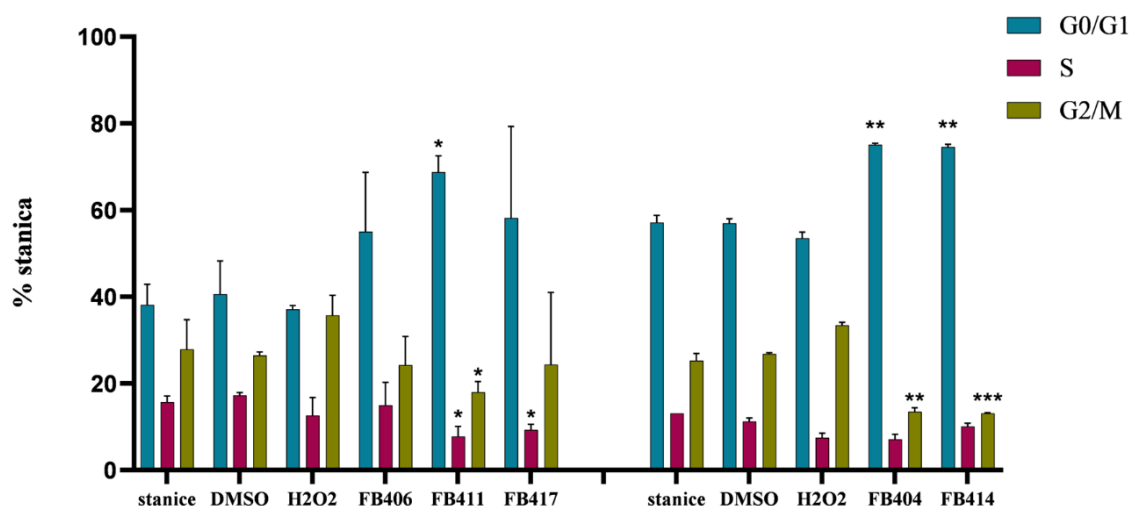
Slika 6. Usporedba preživljenja stanica A549 (a) i WI-38 (b) nakon tretmana spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentracijama 0,75, 0,5 i 0,25 μM . Kao kontrolna skupina koristile su se stanice tretirane samo s DMSO u istoj koncentraciji kao i spojevi. Prikazana je jedna replika od dvije biološke replike u kojima su dobiveni usporedivi rezultati. Podatci su prikazani u odnosu na kontrolne uzorke \pm vrijednost standardne devijacije, izrađeni u kvadrilikatima. Vrijednost p je dobivena korištenjem Student t -testa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2. Analiza staničnog ciklusa nakon tretmana novo sintetiziranim fluorescentnim derivatima indola

Stres potaknut vanjskim faktorima, uključujući tretman novo sintetiziranim spojevima, može uzrokovati promjene u staničnom ciklusu. Stoga je, nakon analize citotoksičnosti spojeva FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417, protočnom citometrijom analiziran stanični ciklus A549 i WI-38 stanica tretiranih navedenim spojevima. Spojevi su pripremljeni u koncentraciji 1 μM koja odgovara prosječnoj IC_{50} vrijednosti dobivenoj iz MTT testa citotoksičnosti za sve spojeve osim FB406 u obje stanične linije (Tablica 7). Sam ciklus stanica analiziran je mjerenjem fluorescencije PI-a protočnom citometrijom. Kao pozitivna kontrola korištene su stanice tretirane s H_2O_2 koji uzrokuje oštećenje stanica i uzrokuje zastoje u staničnom ciklusu. Dobiveni rezultati pokazuju da FB406 nema utjecaja na stanični ciklus A549 stanica. S druge strane, tretman A549 stanica spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 dovodi do zastoja u G0/G1 fazi staničnog ciklusa (Slika 7).

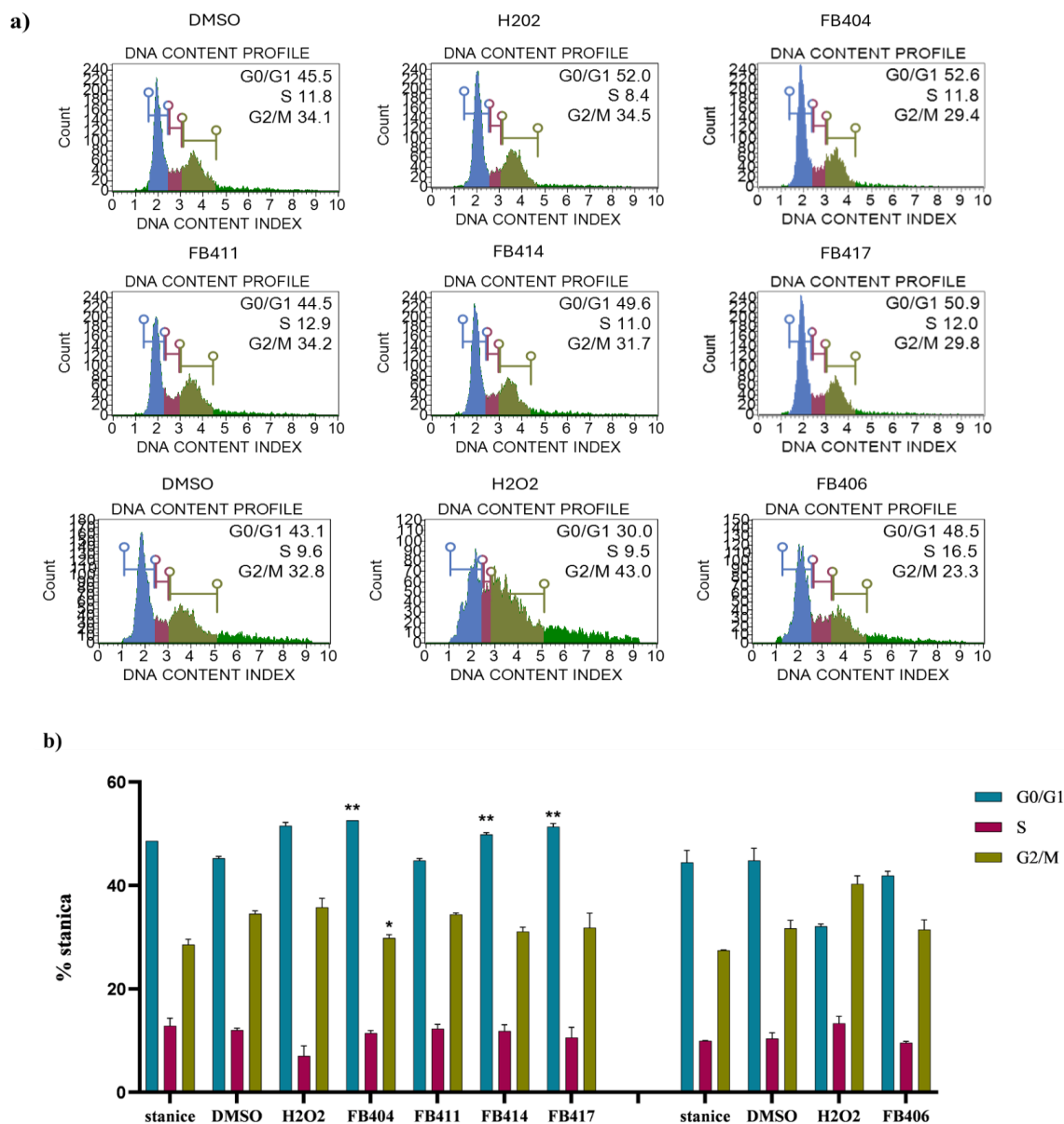


b)



Slika 7. Analiza staničnog ciklusa A549 stanica. (a) Grafički prikaz faza staničnog ciklusa dobiven na protočnom citometru. (b) Grafički prikaz zastupljenosti A549 stanica u pojedinim fazama staničnoga ciklusa nakon tretmana spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 koncentracije 1 μM . Kao kontrolne skupine koristile su se stanice tretirane samo s DMSO u istoj koncentraciji kao i spojevi te stanice tretirane sa 100 μM H_2O_2 . Rezultati su prikazani kao jedna replika od dvije biološke replike u kojima su dobiveni usporedivi rezultati. Podaci su prikazani u odnosu na kontrolne uzorke, \pm vrijednost standardne devijacije, izrađeni u duplikatima. Vrijednost p je dobivena korištenjem Student t -testa ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

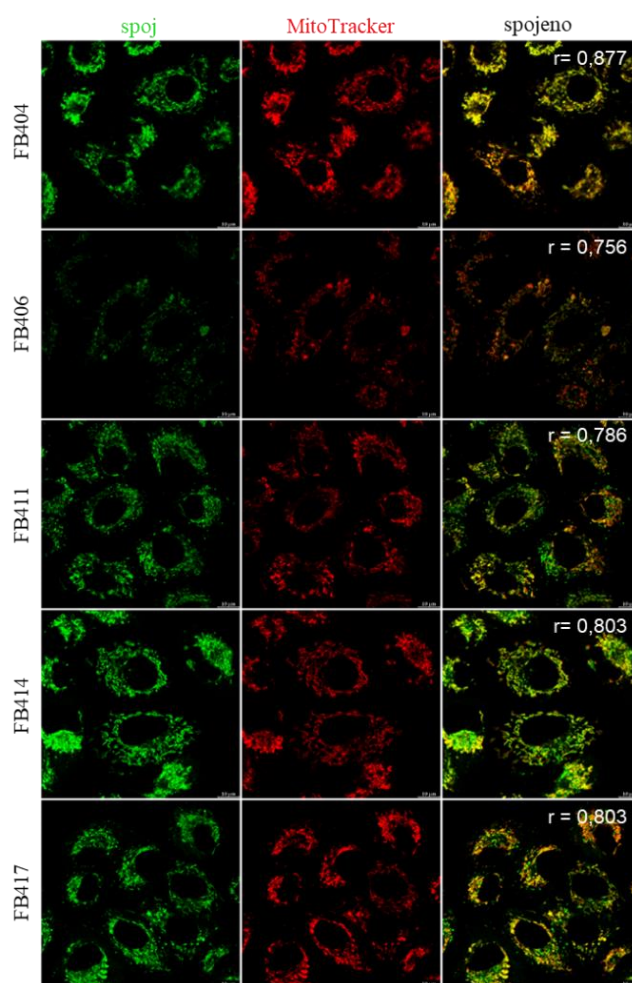
Za razliku od A549 stanica, tretman stanica WI-38 spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 ne dovodi do zastoja u G₀/G₁ fazi staničnog ciklusa te nema utjecaja na stanični ciklus (Slika 8).



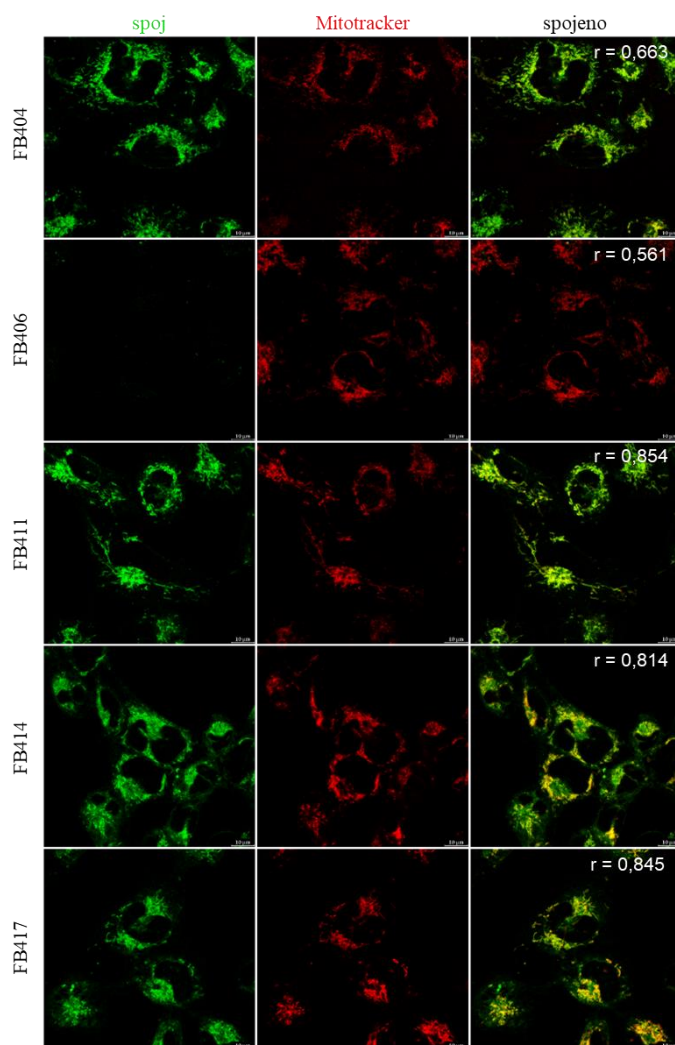
Slika 8. Analiza staničnog ciklusa WI-38 stanica. (a) Grafički prikaz faza staničnog ciklusa dobiven na protočnom citometru. (b) Grafički prikaz zastupljenosti WI-38 stanica u pojedinim fazama staničnoga ciklusa nakon tretmana spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 koncentracije 1 μ M. Kao kontrolne skupine koristile su se stanice tretirane samo s DMSO u istoj koncentraciji kao i spojevi te stanice tretirane sa 100 μ M H₂O₂. Rezultati su prikazani kao jedna replika od dvije biološke replike u kojima su dobiveni usporedivi rezultati. Podaci su prikazani u odnosu na kontrolne uzorke, \pm vrijednost standardne devijacije, izrađeni u duplikatima. Vrijednost p je dobivena korištenjem Student t -testa (* p < 0,05; ** p < 0,01).

4.3. Lokalizacija novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola u mitohondrijima

Iz literature je poznato da se fluorescentni lipofilni kationi selektivno nakupljaju u mitohondrijima te je stoga u ovom radu ispitano imaju li spojevi FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 slično ponašanje. U svrhu toga, u stanicama A549 (Slika 9) i WI-38 (Slika 10) određena je kolokalizacija navedenih spojeva s bojom *Mitotracker* koja specifično boji unutrašnju membranu mitohondrija. Vizualizacija kolokalizacije napravljena je konfokalnom mikroskopijom. Dobiveni rezultati pokazuju da navedeni spojevi značajno lokaliziraju u mitohondrije stanica i to u obje stanične linije, A549 i WI-38.



Slika 9. Lokalizacija spojeva FB404, FB404, FB411, FB414 i FB417 u mitohondrijima stanica A549. Prije same vizualizacije konfokalnom mikroskopijom, stanice su tretirane spojevima ($1 \mu\text{M}$) tijekom 90 minuta pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ pa zatim s *Mitotracker* bojom (100 nM) tijekom 30 min pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Značajnost kolokalizacije spojeva i *Mitotracker* boje je opisana Pearsonovim koeficijentom korelacije (oznaka r).



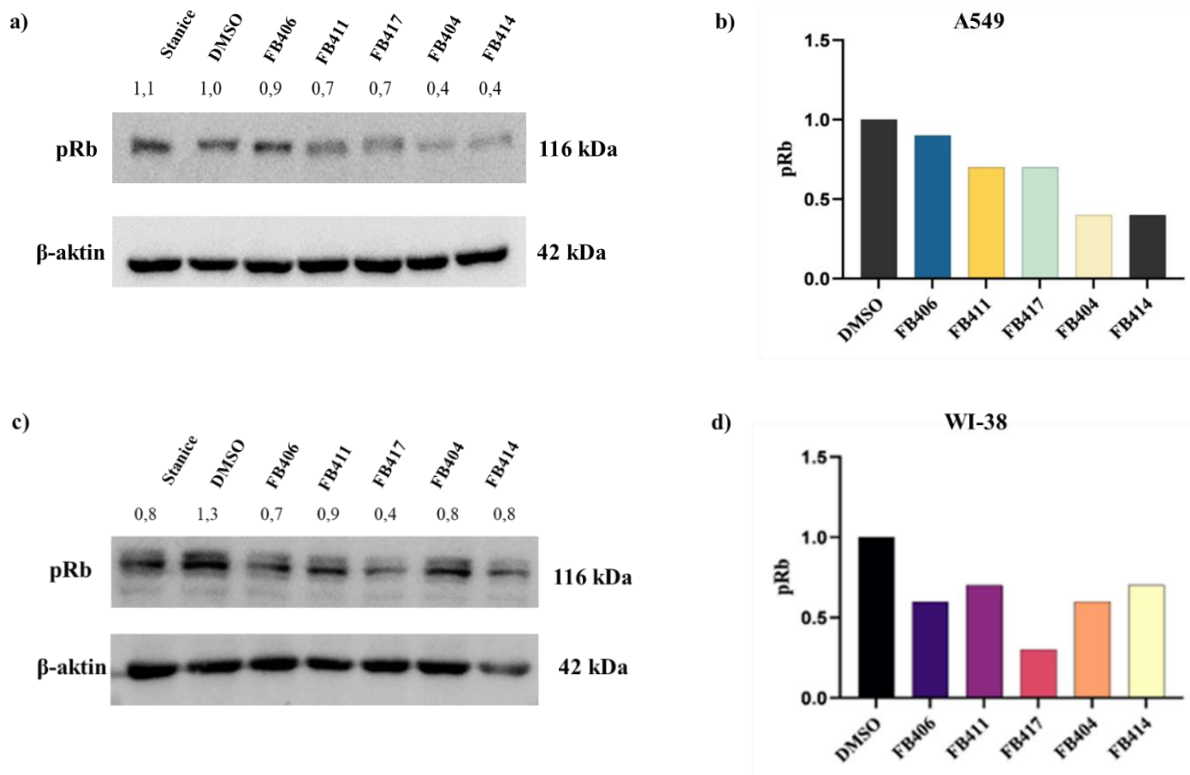
Slika 10. Lokalizacija spojeva FB404, FB404, FB411, FB414 i FB417 u mitohondrijima stanica WI-38. Prije same vizualizacije konfokalnom mikroskopijom, stanice su tretirane spojevima (1 μ M) tijekom 90 minuta pri 37 °C pa zatim s *Mitotracker* bojom (100 nM) tijekom 30 min pri 37 °C. Značajnost kolokalizacije spojeva i *Mitotracker* boje je opisana Pearsonovim koeficijentom korelacije (oznaka r).

Značajnost korelacije prikazana je Pearsonovim koeficijentom korelacije (oznaka r). Vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije kreće se od +1 (savršena pozitivna korelacija) do -1 (savršena negativna korelacija). Raspon Pearsonovog koeficijenta za lokalizaciju ispitivanih spojeva u mitohondrijima kod A549 stanica je od 0,756 do 0,877, a kod WI-38 stanica od 0,561 do 0,854. Kod obje stanične linije Pearsonov koeficijent ukazuje na pozitivnu i značaju korelaciju.

4.4. Određivanje mehanizma djelovanja ispitivanih novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola

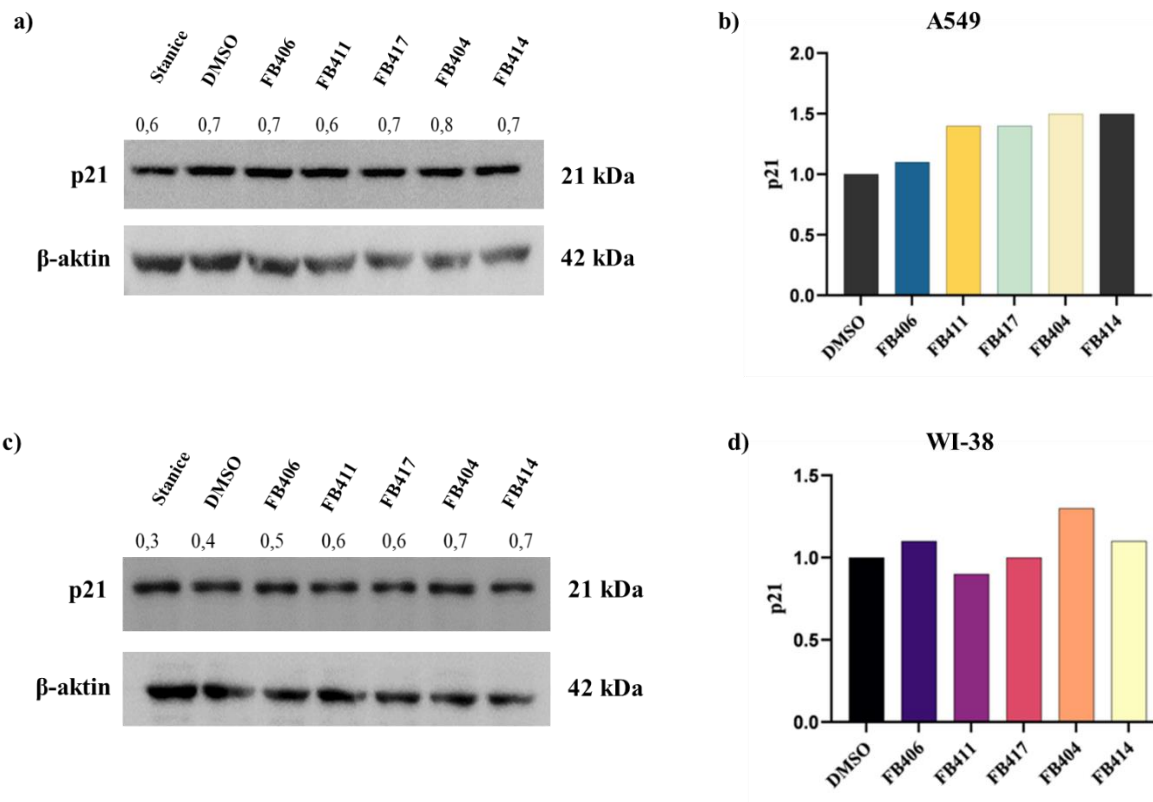
Određivanjem preživljenja stanica nakon tretmana ispitivanim spojevima u mikromolarnim koncentracijama, uočili smo da svi ispitivani spojevi pokazuju značajnu citotoksičnost odnosno da tretman ispitivanim spojevima uzrokuje smanjenje preživljenja stanica (Slika 5). Stoga je u nastavku ovog diplomskog rada istražen mogući mehanizam djelovanja spojeva FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417. Za detekciju i analizu ekspresije proteina koji sudjeluju u preživljenju stanica i staničnom ciklusu, koristila se westernska metoda otiska. Stanice A549 i WI-38 tretirane su spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentraciji IC_{50} (1 μ M) što je odgovaralo uvjetima određivanja staničnog ciklusa.

Prvi od analiziranih proteina je pRb koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa posebice pri prijelazu iz G1 u S fazu. Rezultati analize ukazuju na smanjenju ekspresiju pRb u stanicama A549 koje je najviše izraženo nakon tretmana spojevima FB404 i FB414 (Slika 11, a i b). Do smanjenja ekspresije dolazi i kod WI-38 stanica, pri čemu je to najizraženije nakon tretmana spojem FB417, dok ostali spojevi pokazuju manje izraženo smanjenje ekspresije pRb (Slika 11, c i d). S obzirom da su kod obje stanične linije uočene smanjene količine pRb proteina nakon tretmana stanica ispitivanim spojevima, može se pretpostaviti da mehanizam djelovanja FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 uključuje pRb posredovanu promjenu staničnog ciklusa.



Slika 11. Relativna ekspresija proteina pRb u odnosu na β -aktin u stanicama A549 (a) i WI-38 (c) nakon tretmana stanica spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentraciji od 1 μ M. Nakon tretmana, stanice su sakupljene metodom vrućeg pufera te proteini razdvojeni metodom SDS-PAGE. Protein je detektiran westernskom metodom otiska koristeći odgovarajuće primarno i sekundirano antitijelo. Prikazani su i rezultati denzitometrijske analize westernske metode otiska u stanicama A549 (b) i WI-38 (d). Prikazani omjer je u odnosu na kontrolnu skupinu odnosno stanice tretirane samo s DMSO.

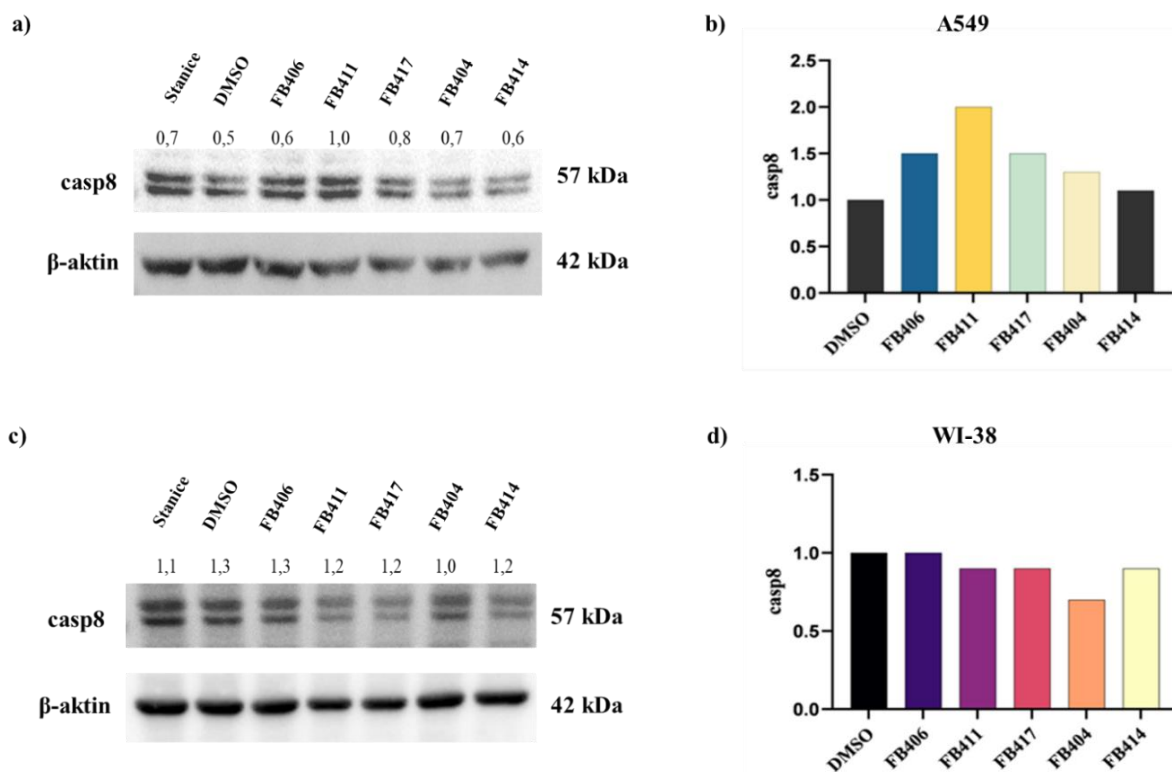
Nadalje, analiziran je ciklin-ovisan inhibitor p21 koji regulira stanični ciklus, a često se inducira kao odgovor na oštećenje DNA. Analiza količine proteina p21 nakon tretmana spojevima pokazuje da ekspresija p21 raste u svim tretmanima, osobito kod spoja FB404 (Slika 11). U A549 stanicama, tretman svim spojevima, osim FB406, dovodi do povećanja ekspresije p21, pri čemu je povećanje najveće nakon tretmana s FB404 i FB414 (Slika 12, a i b). Kod WI-38 najveće povećanje ekspresije p21 je uočeno nakon tretmana spojem FB404 (Slika 12, c i d). Moguće je zaključiti da je p21 uključen u mehanizam djelovanja spojeva FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417. Westernskom metodom otiska pokušana je detekcija proteina ciklin D, no njegova vizualizacija nije bila uspješna u obje stanične linije.



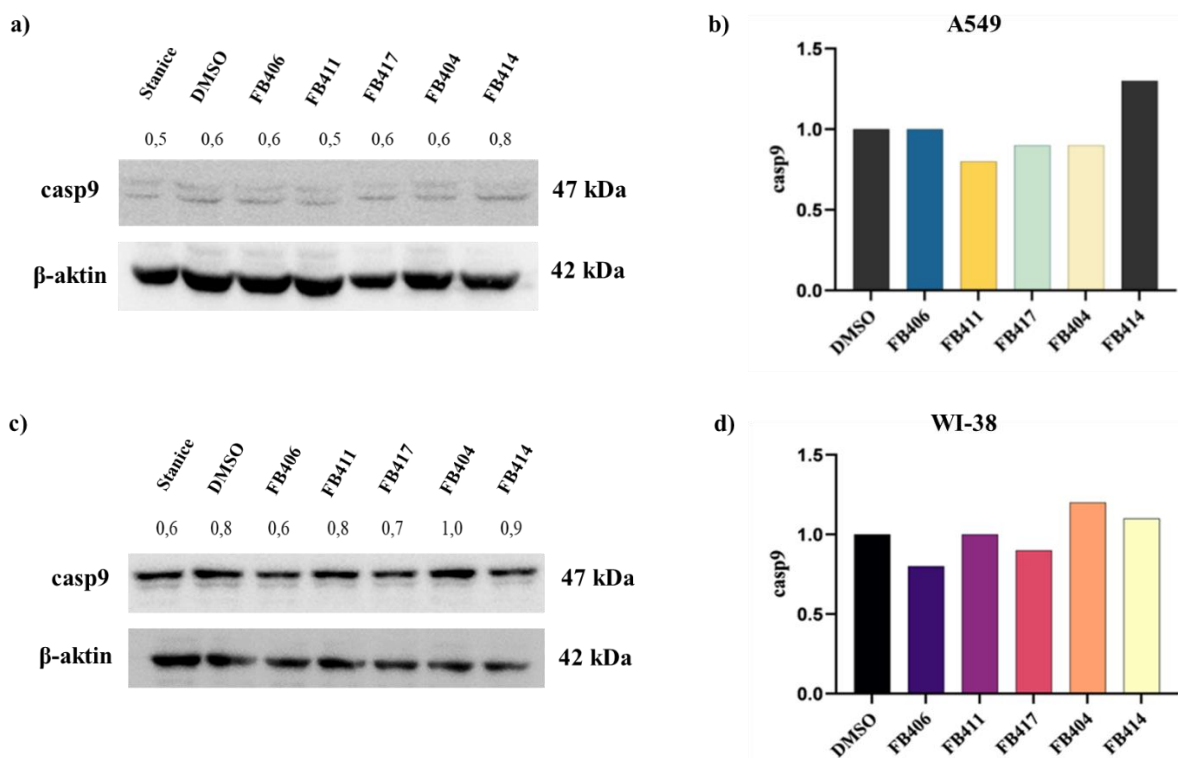
Slika 12. Relativna ekspresija proteina p21 u odnosu na β -aktin u stanicama A549 (a) i WI-38 (c) nakon tretmana stanica spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentraciji od 1 μ M. Nakon tretmana, stanice su sakupljene metodom vrućeg pufera te proteini razdvojeni metodom SDS-PAGE. Protein je detektiran westernskom metodom otiska koristeći odgovarajuće primarno i sekundirano antitijelo. Prikazani su i rezultati denzitometrijske analize westernske metode otiska u stanicama A549 (b) i WI-38 (d). Prikazani omjer je u odnosu na kontrolnu skupinu odnosno stanice tretirane samo s DMSO.

Analizirani su i proteini koji sudjeluju u staničnoj smrti, kaspaza-8 (casp8) kao ključni pokretač vanjskog puta apoptoze, i kaspaza-9 (casp9) kao ključni pokretač unutarnjeg puta apoptoze. Nakon tretmana spojevima u A549 stanicama uočeno je da dolazi do povećanja ekspresije casp8, pri čemu je to najizraženije nakon tretmana spojem FB411 (Slika 13, a i b). S druge strane, u WI-38 stanicama ekspresija ovog proteina se ne mijenja ili je neznatno smanjena (Slika 13, c i d). Protein casp9 u A549 stanicama pokazuje povećanu ekspresiju nakon tretmana spojem FB414, dok je ekspresija tog proteina neznatno promijenjena nakon tretmana ostalim spojevima (Slika 14, a i b). Kod WI-38 stanica, dolazi do malog povećanja u

ekspresiji nakon tretmana spojem FB404 (Slika 14, c i d). Osim promjene u ekspresiji proteina casp8 i casp9 nisu uočene promjene u veličini proteinskih vrpce odnosno nisu detektirani pocijepani oblici ovih proteina što ukazuje na to da nije došlo do aktivacije apoptoze.



Slika 13. Relativna ekspresija proteina casp8 u odnosu na β -aktin u stanicama A549 (a) i WI-38 (c) nakon tretmana stanica spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentraciji od 1 μ M. Nakon tretmana, stanice su sakupljene metodom vrućeg pufera te proteini razdvojeni metodom SDS-PAGE. Protein je detektiran westernskom metodom otiska koristeći odgovarajuće primarno i sekundirano antitijelo. Prikazani su i rezultati denzitometrijske analize westernske metode otiska u stanicama A549 (b) i WI-38 (d). Prikazani omjer je u odnosu na kontrolnu skupinu odnosno stanice tretirane samo s DMSO.



Slika 14. Relativna ekspresija proteina casp9 u odnosu na β -aktin u stanicama A549 (a) i WI-38 (c) nakon tretmana stanica spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 u koncentraciji od 1 μ M. Nakon tretmana, stanice su sakupljene metodom vrućeg pufera te proteini razdvojeni metodom SDS-PAGE. Protein je detektiran westernskom metodom otiska koristeći odgovarajuće primarno i sekundirano antitijelo. Prikazani su i rezultati denzitometrijske analize westernske metode otiska u stanicama A549 (b) i WI-38 (d). Prikazani omjer je u odnosu na kontrolnu skupinu odnosno stanice tretirane samo s DMSO.

5. RASPRAVA

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), 2022. godine tumori su uzrokovali 9,7 milijuna smrtnih slučajeva, čineći ih jednim od glavnih uzroka smrtnosti na svijetu. Danas postoje razni pristupi liječenju koji se biraju s obzirom na prirodu samog tumora, a neki od najčešćih pristupa uključuju kirurško odstranjivanje, kemoterapiju, radioterapiju te hormonsku terapiju. Posljednjih godina, ciljanje mitohondrija postalo je jedna od atraktivnih terapijskih pristupa za liječenje tumora; poremećaj njihove funkcije povezan je s razvojem bolesti i nastankom tumora (Khan i sur., 2022; Mukherjee i sur., 2023). Od velikog su interesa spojevi koji se istovremeno mogu koristiti kao citotoksični spojevi i spojevi za obilježavanje mitohondrija u svrhu terapije i dijagnostike tumora (engl. *theranostic*), kao što su fluorescentni lipofilni kationi koji se selektivno nakupljaju u mitohondrijima. Osnovu strukture ovih spojeva čini indolni prsten koji zbog svojih kemijskih svojstava poboljšava biološku dostupnost molekula i omogućava razne farmakološke učinke (Dhiman i sur., 2022). Iako se pokazalo da se F16 selektivno nakuplja u mitohondrijima, isti se pokazao kao neučinkovit u terapiji protiv tumora jer mu je antitumorsko djelovanje ograničeno. Zbog toga su sintetizirani novi derivati F16 s ciljem povećanja njihovog citotoksičnog djelovanja (Chen i sur., 2019).

Prilikom izrade ovog diplomskog rada ispitivana su biološka svojstva pet novo sintetiziranih fluorescentnih derivata indola na bazi vinil piridina, FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 (Tablica 2). Navedeni spojevi, kemijski su okarakterizirani u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković. Citotoksičnost navedenih spojeva ispitana je na stanicama A549 i WI-38, koje su se pokazale kao dobar eksperimentalni model za probir novih spojeva (Das Mukherjee i sur., 2016). Dobiveni rezultati pokazali su da četiri spoja, od ispitanih pet, pokazuju značajnu citotoksičnost s vrijednostima IC_{50} od otprilike 1 μ M (Tablica 7). Izuzetak je spoj FB406 koji ne utječe na preživljenje stanica te je isti trend pokazan u obje stanične linije (Slika 5). *In vitro* istraživanja pokazuju da različiti supstituenti na indolnom prstenu mogu utjecati na citotoksičnost lipofilnih kationa, čime se može poboljšati učinkovitost spojeva u terapijama i dijagnostici (Kurtoglu i Lampidis, 2009; Chen i sur., 2019). Pokazalo se da ispitivani spojevi pokazuju sličnu citotoksičnost i u finijoj gradaciji koncentracija, osim spoja FB404, koji je pokazao veći utjecaj na preživljenje stanica A549 u odnosu na stanice WI-38 (Slika 6).

Poznato je da se fluorescentni lipofilni kationi nakupljaju u mitohondrijima zbog razlike u membranskom potencijalu između tumorskih i normalnih stanica (Kurtogul i Lampidis, 2009; Chen i sur., 2019). U ovom radu ispitano je imaju li novo sintetizirani derivati indola slično ponašanje. Utvrđena je kolokalizacija spojeva FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 s bojom *Mitotracker* u stanicama A549 (Slika 9) i WI-38 (Slika 10). Konfokalnom mikroskopijom uočeno je da ispitivani spojevi značajno lokaliziraju u mitohondrijima obje stanične linije, što upućuje na mogućnost njihovog korištenja u dijagnostičke svrhe. Međutim, nakupljanje spojeva u normalnim (WI-38) i tumorskim (A549), stanicama ukazuje na nedostatak selektivnog učinka. Suprotno tome, literaturni podaci pokazuju da spojevi poput Rh123 imaju 100 puta veću selektivnost prema tumorskim stanicama nego prema normalnim stanicama (Chen i sur., 2019). Iako u ovom istraživanju nije uočena razlika u učinku na mitohondrije između normalnih i tumorskih stanica, ovi spojevi mogli bi se koristiti za obilježavanje mitohondrija u svrhu otkrivanja njihove disfunkcionalnosti prilikom razvoja bolesti kao što su, na primjer, neurodegenerativne bolesti (Wang i sur., 2023).

Stanični ciklus i stanična smrt usko su povezani procesi te imaju značajnu ulogu u osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapije (Shah i Schwartz, 2001). Učinak spojeva FB404, FB411, FB414 i FB417 na stanični ciklus stanica A549 vidljiv je u porastu broja stanica u G0/G1 fazi, što znači da navedeni spojevi dovode do zastoja staničnog ciklusa (Slika 7). S druge strane, isti spojevi ne dovode do promjena u staničnom ciklusu stanica WI-38 (Slika 8). Nadalje, spoj FB406 ne izaziva zastoj u G0/G1 fazi staničnog ciklusa što znači da ovaj spoj nema utjecaja ni na preživljenje ni stanični ciklus stanica A549 i WI-38. Iz dobivenih rezultata pokazalo se da spojevi FB404, FB411, FB414 i FB417 imaju sličan utjecaj na preživljenje stanica A549 i WI-38, no različito utječu na stanični ciklus stanica A549 i WI-38, što navodi na zaključak da postoje razlike u mehanizmima djelovanja ispitivanih spojeva u ove dvije stanične linije. U svrhu toga, analizirana je ekspresija nekih od proteina koji sudjeluju u preživljenju stanica i staničnom ciklusu. Dobiveni rezultati westernske metode otiska pokazuju da nakon tretmana spojevima, obje stanične linije imaju smanjenju ekspresiju proteina pRb (Slika 11). Može se pretpostaviti da mehanizam djelovanja FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 uključuje promjenu staničnog ciklusa posredovanu proteinom pRb. Protein pRb ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. On se vezuje i inhibira transkripcijske faktore E2F koji su važni za napredak staničnog ciklusa odnosno prijelaz iz G1 u S fazu. Na taj način se onemogućavaju transkripcija gena nužnih za napredak staničnog ciklusa i proliferacija (Vermeulen i sur., 2003). Kod tumora, pRb je često inaktiviran čime transkripcijski faktori E2F

ostaju aktivni, što dovodi do prekomjerne progresije staničnog ciklusa (Mandigo i sur., 2022). S obzirom da sam u ovom radu uočila smanjeno preživljenje stanica nakon tretmana ispitanim spojevima, nije bilo očekivano utvrditi smanjenu ekspresiju proteina pRb. No potrebno je naglasiti da u ovom radu nisam istražila status fosforilacije proteina pRb. Još jedan važan regulator staničnog ciklusa je ciklin-ovisan inhibitor p21. Dobiveni rezultati pokazuju da nakon tretmana spojevima dolazi do povećane ekspresije p21 u stanicama A549 i WI-38 (Slika 12). U normalnim stanicama, p21 dovodi do zastoja staničnog ciklusa kako bi omogućio popravak DNA, a njegovu sintezu regulira p53 koji detektira ta oštećenja (Abbas i Dutta, 2010). Iz analize staničnog ciklusa stanica WI-38, uočeno je da nema promjene u staničnome ciklusu nakon tretmana spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417, što ukazuju na to da p21 nije uključen u mehanizam djelovanja tih spojeva. U tumorskim A549 stanicama uočila sam povećanu ekspresiju proteina p21 nakon tretmana svim spojevima osim spojem FB406 koji nema citotoksično djelovanje. S obzirom da tretman spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 uzrokuje zastoj u G0/G1 fazi staničnog ciklusa, može se pretpostaviti da je razlog tom zastoju povećana ekspresija proteina p21.

Zna se da prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa regulira ciklin D i to vezanjem na CDK (Vermeulen i sur., 2003). U ovo diplomskom radu pokušala sam detektirati protein ciklin D, no njegova vizualizacija na žalost nije bila uspješna u obje stanične linije.

Poznato je da spojevi na bazi indola, kao što je F16, mogu uzrokovati apoptozu ili nekrozu tumorskih stanica (Chen i sur., 2019). Također, u literaturi je pokazano da bi u stanicama koje su zaustavljene u G0/G1 fazi staničnog ciklusa gubitak pRb mogao narušiti zaustavljanje i time pospješiti apoptozu (Ianari i sur., 2009). Stoga su u ovom radu analizirani i proteini koji imaju ključnu ulogu u pokretanju apoptoze. Protein casp8 glavni je pokretač vanjskog apoptotičkog puta ovisnog o ligandima. Rezultati pokazuju da je nakon tretmana spojevima FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417, ekspresija casp8 povećana u stanicama A549, dok se u stanicama WI-38 ekspresija casp8 nije mijenjala ili je bila neznatno smanjena (Slika 13). Također, nije detektiran pocijepani oblik ovog proteina. Slično je i s proteinom casp9, koji je važan dio unutrašnjeg apoptotičkog puta. Dobiveni rezultati pokazuju da casp9 u stanicama A549 ima povećanu ekspresiju, dok je u stanicama WI-38 ekspresija casp9 neznatno promijenjena nakon tretmana ispitanim spojevima (Slika 14). Povećana ekspresija casp8 i casp9 sugerira na to da su tumorske stanice spremne na signalizaciju apoptoze, ali izostanak pocijepanih oblika ovih proteina sugerira da ipak nisu aktivni. Iako se casp8 i casp9 nalaze u stanicama tumora, nemaju

ulogu u inicijaciji apoptoze, što može biti posljedica otpornosti tumorskih stanica na signale apoptoze (Olsson i Zhivotovsky, 2011).

Djelovanje ispitivanih spojeva na stanični ciklus, posebno zaustavljanje u G0/G1 fazi nakon tretmana, moglo bi biti učinkovit pristup za inhibiciju prekomjerne proliferacije stanica tumora. S obzirom da spojevi FB404 i FB414 pokazuju povećanu toksičnost u stanicama adenokarcinoma pluća može se zamisliti njihova upotreba kao protutumorskih lijekova no prije toga potrebno je detaljno opisati njihov mehanizam djelovanja.

6. ZAKLJUČCI

1. Tretman stanica A549 i WI-38 spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 uzrokuje smanjenje preživljenja stanica. Smanjeno preživljenje stanica nakon tretmana spojevima nije uzrokovano aktivacijom apoptoze.
2. Spojevi FB404, FB406, FB411, FB414 i FB417 pokazuju značajnu lokalizaciju u mitohondrijima stanica A549 i WI-38.
3. Tretman stanica A549 spojevima FB404, FB411, FB414 i FB417 uzrokuje zastoj u G0/G1 fazi staničnog ciklusa koji je vjerojatno posljedica povećane ekspresije proteina p21.

7. LITERATURA

Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400–414. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th edition, Garland Science, New York

Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2

Brand, M. D., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., & Quinlan, C. L. (2013). The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *British Journal of Dermatology*, 169, 1–8. <https://doi.org/10.1111/bjd.12208>

Chen, H., Wang, J., Feng, X., Zhu, M., Hoffmann, S., Hsu, A., Qian, K., Huang, D., Zhao, F., Liu, W., Zhang, H., & Cheng, Z. (2019). Mitochondria-targeting fluorescent molecules for high efficiency cancer growth inhibition and imaging. *Chemical Science*, 10(34), 7946–7951. <https://doi.org/10.1039/C9SC01410A>

Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010). *The cell: A molecular approach*, 5th edition, Sinauer Associates, Sunderland.

Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine* 358, 502-511

Das Mukherjee, D., Kumar, N. M., Tantak, M. P., Das, A., Ganguli, A., Datta, S., Kumar, D., & Chakrabarti, G. (2016). Development of novel bis(indolyl)-hydrazide–hydrazone derivatives as potent microtubule-targeting cytotoxic agents against A549 lung cancer cells. *Biochemistry*, 55(21), 3020–3035. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01127>

Dhiman, A., Sharma, R., & Singh, R. K. (2022). Target-based anticancer indole derivatives and insight into structure–activity relationship: A mechanistic review update (2018–2021). *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3006–3027. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.021>

Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., & Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(2), 255–271. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., & Lees, J. A. (2009). Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell*, 15(3), 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.026>

Khan, T., Waseem, R., Zehra, Z., Aiman, A., Bhardwaj, P., Ansari, J., Hassan, M. I., & Islam, A. (2022). Mitochondrial dysfunction: Pathophysiology and mitochondria-targeted drug delivery approaches. *pharmaceutics*, 14(12), 2657. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122657>

Koya, A. I., & Ibrahim, S. A. (2024). Carcinogenesis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025, PMID: 38917272.

Kurtoglu, M., & Lampidis, T. J. (2009). From delocalized lipophilic cations to hypoxia: Blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(1), 68–75. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700457>

Mandigo, A. C., Tomlins, S. A., Kelly, W. K., & Knudsen, K. E. (2022). Relevance of pRB loss in human malignancies. *Clinical Cancer Research*, 28(2), 255–264. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1565>

Mukherjee, S., Bhatti, G. K., Chhabra, R., Reddy, P. H., & Bhatti, J. S. (2023). Targeting mitochondria as a potential therapeutic strategy against chemoresistance in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, 114398. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114398>

Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I. Q., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, M. I., Habib, S., & Islam, S. (2024). Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells*, 13(22), 1838. <https://doi.org/10.3390/cells13221838>

Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2011). Caspases and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 18(9), 1441–1449. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.30>

Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*, 3rd edition, Oxford University Press, Oxford.

Weinberg, R. A. (2013). *The biology of cancer*. W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9780429258794>

Salerno, S., Barresi, E., Baglini, E., Poggetti, V., Da Settimo, F., & Taliani, S. (2023). Target-based anticancer indole derivatives for the development of anti-glioblastoma agents. *molecules*, 28(6), 2587. <https://doi.org/10.3390/molecules28062587>

Shah, M. A., Schwartz, G. K. (2001). Cell cycle-mediated drug resistance. *Clinical Cancer Research* 7: 2168-2181

Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>

Tait, S. W. G., Ichim, G., & Green, D. R. (2014). Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127(10), 2135–2144. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>

Wang, H., Fang, B., Peng, B., Wang, L., Xue, Y., Bai, H., Lu, S., Voelcker, N. H., Li, L., Fu, L., & Huang, W. (2021). Recent advances in chemical biology of mitochondria targeting. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.683220>

Wang, Y., Wang, P., & Li, C. (2023). Fluorescence microscopic platforms imaging mitochondrial abnormalities in neurodegenerative diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 197, 114841. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114841>

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30.11.2000. godine u Splitu. Nakon završene osnovne škole, 2015. godine upisala sam V. Gimnaziju „Vladimir Nazor“ u Splitu. Preddiplomski studiji Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu započela sam 2019. godine. Nakon završenog preddiplomskog studija, 2022. godine upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala. Tu sam stekla vještine rada u staničnoj kulturi, te sam se usavršila u korištenju različitih metoda molekularne biologije kao što su test citotoksičnosti (MTT) te Western blot. Volontirala sam na Danu karijera na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (WorkIn-Science, WISe) 2024. godine. Uz materinji jezik, koristim se engleskim jezikom te poznajem osnove talijanskog i mandarinskog jezika.