

Utjecaj monoaza- i heksoaza-krunastih etera na modulaciju aktivnosti P-glikoproteina

Bošnjak, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:797912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nikolina Bošnjak

Utjecaj monoaza- i heksaaza-krunastih etera na modulaciju aktivnosti
P-glikoproteina

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

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 se dr.sc. Marijeti Kralj na vodstvu tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Bez njenog strpljenja i izuzetne volje ovaj rad sasvim sigurno ne bi ugledao svijetlo dana.

Hvala doktorandici Ivi Guberović koja mi je pomogla pri izradi ovog rada.

Veliko hvala izv. prof. Maji Matulić na savjetima i strpljenu sa mojim možda ponekad i dosadnim pitanjima. ☺

Također zahvaljujem mojoj majci bez čije podrške i bezuvjetne ljubavi ovog rada, a i mog studiranja općenito, ne bi ni bilo.

Hvala svim prijateljima i ljudima koji si mi poslani kao pratnja na ovome putu i koji su obogatili moj život na toliko načina. Blagoslov vas je imati u životu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj monoaza- i heksaaza-krunastih etera na modulaciju aktivnosti P-glikoproteina

Nikolina Bošnjak

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Velik problem u liječenju tumora predstavlja otpornost stanica na kemoterapiju. Najviše istražen mehanizam otpornosti jest povećano izbacivanje lijeka iz stanice pomoću P-glikoproteina (P-gp). P-gp (MDR1, ABCB1) je protein veličine 170 kDa iz obitelji ABC transportera koji sudjeluju u izbacivanju različitih toksina i ksenobiotika te na taj način štite stanicu od štetnih utjecaja. Međutim, P-gp je često pretjerano eksprimiran na površini brojnih tumorskih stanica, uslijed čega dolazi do otpornosti na kemoterapiju i smanjenog odgovora na liječenje. Jedan od smjerova u istraživanju liječenja tumora je usmjeren na sintezu i ispitivanje spojeva koji će djelovati kao inhibitori ove pumpe. U ovome je radu ispitivano djelovanje osam spojeva iz grupe monoaza- (641, 642, 643 i 644) i heksaaza- (1188, 1189, 1191, 1192) krunastih etera, sintetiziranih u laboratoriju Instituta Ruđer Bošković, na aktivnost P-gp-a. Kao model korištene su stanične linije karcinoma ovarija čovjeka bez (A2780) te s povećanom ekspresijom P-gp-a (A2780/Adr). Korištene stanične linije pokazuju otpornost prema različitim supstratima ove pumpe, kao što su doksorubicin i paklitaksel. Ispitivana su antiproliferativna svojstva spojeva pomoću metaboličkog testa metil tiazolil tetrazolij, nakon čega je inhibitorno svojstvo na P-gp pumpu ispitano metodom efluksa rodamina protočnom citometrijom, uz korištenje verapamila, kao pozitivne kontrole. Potencijalna inhibitorna aktivnost spoja s najjačom aktivnosti (644) dodatno je testirana kombiniranim tretmanom s paklitakselom i testinim spojem, prateći eventualno pojačanje djelovanja paklitaksela u otpornim stanicama.

(46 stanice, 10 slika, 6 tablica, 45 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: krunasti eteri, P-gp pumpa, inhibicija, rak

Voditelj: dr.sc. Marijeta Kralj, znanstvena savjetnica
Suvoditelj: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
Ocjenjivači: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.
dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Rad prihvaćen: 05.listopada, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

THE INFLUENCE OF MONOAZA- AND HEXAAZA-CROWN ETHERS ON THE MODULATION OF P-GLYCOPROTEIN ACTIVITY

Nikolina Bošnjak

Rooseveltova trg 6, Zagreb, Croatia

The development of drug resistance to chemotherapeutic agents remains one of the primary obstacles in cancer treatment. One of the most studied mechanisms of resistance is the increase of drug efflux by P-glycoprotein (P-gp). P-gp (MDR1, ABCB1) is a 170 kDa protein that belongs to the ATP-binding cassette superfamily of membrane transporters. It is involved in protecting the cell against harmful xenobiotics and other cytotoxic compounds, which it expels out from the cell. However, P-gp is often overexpressed on the surface of numerous tumor cells resulting in the resistance to chemotherapy and reduced response to cancer treatment. One of the approaches in tumor therapy is the development of compounds that inhibit P-gp activity and thus reverse the resistance. The aim of this work was to test the potential P-gp inhibitory activity of eight compounds: monoaza- (641-644) and hexaaza- (1188-1192) crown ethers, synthesized at Ruđer Bošković Institute. We used human ovarian carcinoma cell line A2780 without, as well as A2780/Adr with increased expression of P-gp. The latter cell line is resistant to various P-gp substrates, such as doxorubicin and paclitaxel. The antiproliferative abilities of the compounds were tested using MTT assay, while the inhibitory capacity on the P-gp activity was tested with the rhodamin 123 efflux assay, using flow cytometry and verapamil as a positive control. The potential inhibitory capacity of the compound which showed the highest activity (644) was additionally tested with the combination of paclitaxel and the test compound to prove a potential enhancement of paclitaxel activity in the resistant cells.

(46 pages, 10 images, 6 tables, 45 literary citations, original in: Croatian)

Keywords: crown ethers, P-gp pump, inhibition, cancer

Supervisor: Dr. Marijeta Kralj, Senior scientist
Cosupervisor: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.
Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.
Dr. Nada Oršolić, Prof.

Thesis accepted: October 5th 2017

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Liječenje oboljelih od malignih bolesti	1
1.2	Otpornost tumorskih stanica	2
1.3	P-glikoprotein	3
1.4	Druge proteinske pumpe	5
1.5	Inhibicija P-gp pumpe	7
1.6	Krunasti eteri	9
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3	MATERIJALI I METODE.....	12
3.1	Stanične linije	12
3.2	Održavanje staničnih linija u kulturi	12
3.3	Brojanje stanica	13
3.4	Testirani spojevi	14
3.5	Ispitivanje inhibitorynog učinka na rast stanica	16
3.6	Test metil tiazolil tetrazolij (MTT).....	16
3.7	Protočna citometrija.....	17
3.8	Priprema stanica za test efluksa rodamina.....	18
3.9	Određivanje ekspresije proteina metodom <i>Western Blot</i>	19
3.9.1	Određivanje koncentracije proteina.....	20
3.9.2	Denaturirajuća SDS-poliakrilamid gel elektroforeza	21
3.9.3	Prijenos proteina na membranu	22
4	REZULTATI	24
4.1	Karakterizacija modelnih staničnih linija	24
4.2	Ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva	25
4.3	Ispitivanje inhibicije P-gp transportera testom efluksa rodamina	29
5	RASPRAVA.....	34
6	ZAKLJUČAK	39
7	LITERATURA:.....	40

1 UVOD

1.1 LIJEČENJE OBOLJELIH OD MALIGNIH BOLESTI

Velik problem suvremenog načina života, kojeg prati i produljenje životnog vijeka, jest porast pojavnosti teško liječivih bolesti kao što su tumorske bolesti. U zadnjih dvadesetak godina napravljen je velik iskorak u razvoju terapije tumora. Danas se rak ne smatra jednom bolešću već svaki oboljeli pacijent ima različitu vrstu oboljenja, ali sve ih povezuju zajedničke karakteristike. Nastanak tumora obilježen je nekontroliranim staničnim rastom, invazijom susjednih tkiva i metastaziranjem. Ovi procesi su posljedica deregulacije proliferacije te onemogućavanja aktivacije smrti stanica, a čija molekularna osnova se krije u mnogim mutacijama, pri čemu su najvažnije aktivacija staničnih onkogenih i/ili inaktivacija tumorsupresorskih gena. Navedene mutacije odgovorne su ne samo za tumorigenezu, već i za osjetljivost na terapiju.

Sadašnja medicinska praksa liječenja tumora ograničena je na kirurško odstranjenje, zračenje i kemoterapiju. Takvim, konvencionalnim, metodama moguće je liječiti samo oko 50% postojećih vrsta tumora, pa stoga znanstvenici ulažu goleme napore u otkrivanju novih načina liječenja ove teške bolesti. Istraživanja provedena u posljednjih dvadesetak godina dovela su do znatno boljeg razumijevanja genetske osnove nastanka zloćudnih oboljenja. Također, usporedno s razvojem medicine i novih lijekova došlo se do novih saznanja i o potencijalno novim molekularnim metama koje bi poslužile za poboljšanje postojećeg liječenja. Posebna se pažnja posvećuje povećanju specifičnosti liječenja, uz što manje neželjenih posljedica (smanjenje toksičnosti) te borbi protiv razvoja otpornosti tumorskih stanica, odnosno specifičnog ciljanja upravo onih stanica koje su već razvile otpornost na terapiju.

1.2 OTPORNOST TUMORSKIH STANICA

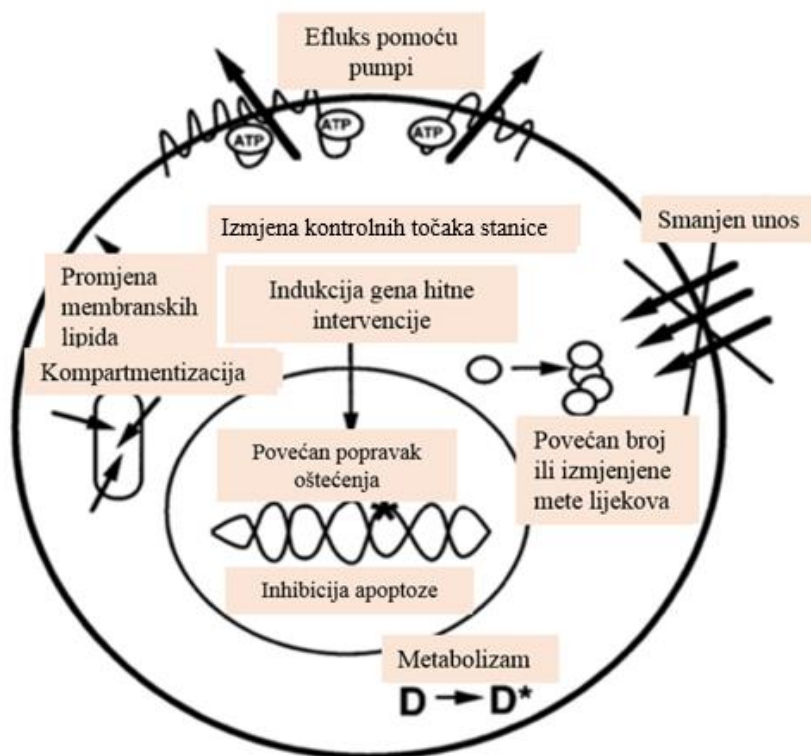
Normalne stanice u našem tijelu podjednako odgovaraju na primjenjene lijekove, za razliku od tumorskih stanice koje svaka reagiraju na svoj način. Kao što je već navedeno, svaka pojedina tumorska stanica od određenog pacijenta ima različitu genetičku podlogu, ovisno o tkivu od kojeg potječe te ovisno od aktivacije onkogeni i inaktivacije tumor supresora koje su se dogodile u pojedinoj stanici. Rezultat toga su tumorske stanice s različitom ekspresijom niza gena koji su odgovorni za osjetljivost na protutumorski lijek te stanice istog tumora, koje iako su klonalno nastale, imaju veliku heterogenost kada je u pitanju otpornost na lijek. Osim toga, čak i ukoliko neki tumori ne pokazuju otpornost na određeni lijek, ova genetska i epigenetska heterogenost uzrokuje selekciju i preživljavanje stanica otpornih na lijekove te na taj način brzu prilagodbu i nastanak otpornosti kod brojnih tumora (Gottesman, 2002).

Zadnjih 40-ak godina novi smjer u poboljšanju liječenja tumora predstavlja svakako smanjenje i upravo opisane otpornosti na protutumorske lijekove koja se razvija kod skoro svih pacijenata nakon određenog vremena pod terapijom te na taj način smanjuje učinkovitost samog liječenja.

Otkriveno je nekoliko mehanizama koji sudjeluju u nastanku otpornosti tumorskih stanica na kemoterapeutike (Slika 1), kao što su: gubitak površinskih staničnih receptora ili transportera za lijek, promjena metabolizma lijeka, mutacijske izmjene specifičnih meta lijeka, povećana stopa popravka DNA, promjene staničnih lipida, povećan broj membranskih pumpa koje izbacuju lijek (Longo-Sorbello i Bertino, 2001). Ovaj problem se nastoji zaobići korištenjem lijekova s različitim mehanizmima djelovanja.

Nerijetko se razvija rezistencija na skupinu lijekova koje su međusobno strukturno i funkcionalno nepovezane. Taj fenomen je poznat pod imenom višestruka rezistencija na lijekove (Gottesman i sur., 1994). Upravo ta višestruka rezistencija dovodi do smanjenja količine lijeka unutar stanice te na taj način smanjenog odgovora na samo liječenje protutumorskim lijekovima. Količina lijeka unutar stanice se smanji jer dolazi do smanjenja unosa, zatim povećanog izbacivanja lijeka te promjenom membranskih lipida poput ceramida (Liu i sur., 2001). Sve te promjene mogu dovesti i do blokade programirane stanične smrti-apoptoze koja predstavlja važan štit organizma prema oštećenjima na DNA (Lowe i sur., 1993). Osim navedenih promjena može doći i do promjene unutar samog staničnog ciklusa, te aktivacije izmjenjenih mehanizama koji sudjeluju u detoksifikaciji lijeka i povećanog popravka DNA (Synold i sur., 2001).

Od svih navedenih mehanizama najviše je istražen mehanizam kod kojeg se mijenja razina akumulacije lijeka unutar stanice. U navedenom radu naglasak će se dati upravo na povećanom izbacivanju lijeka iz stanice i to pomoću prekomjerne ekspresije P glikoproteina (P-gp) na staničnoj membrani (Borst i sur., 2000).

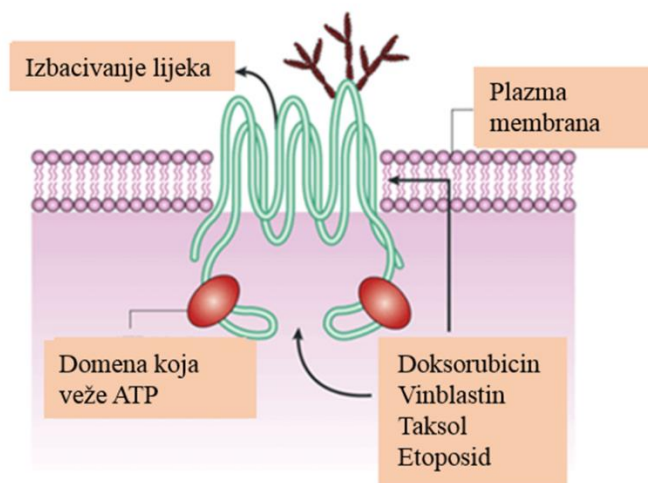


Slika 1. Mehanizmi otpornosti tumorske stanice na lijekove (Preuzeto i prilagođeno iz Gottesman, 2002)

1.3 P-GLIKOPROTEIN

P-glikoprotein, također poznat i kao protein MDR1 (od engl. *multidrug resistance 1*) ili ABCB1 (od engl. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*) protein je veličine 170 kDa iz obitelji ABC transportera koji predstavljaju svojevrsnu barijeru stanice u našem tijelu sudjelujući u izbacivanju raznih toksina i ksenobiotika te na taj način štiti stanicu od štetnih utjecaja (Tablica 1) (Srivalli i Lakshmi, 2012; Sharom, 2011). ABC obitelj proteina, što dolazi od engleske kratice „*ATP-binding cassetts*“, radi po principu pumpe ovisne o ATP-u, kao što im i samo ime kaže (Doige i Ames, 1993; Higgins, 1992). Kao i svaki protein iz te skupine, tako i P-gp, sastoji se od četiri dijela: dvije domene koje se vežu za membranu, od kojih svaka ima šest transmembranskih dijelova i dvije domene koje vežu nukleotide te su odgovorne za vezanje i hidrolizu ATP-a (Slika 2) (Higgins, 1992). P-gp protein kod ljudi je prisutan u dvije izoforme:

izoforma klase I (MDR1/ABCB1) koji je transporter lijekova i izoforma klase II (MDR2/3/ABCB4) koja je uključena u izbacivanju fosfatidilkolina u žuči (Ruetz i Gros, 1994; Srivalli i Lakshmi, 2012).



Slika 2. Djelovanje P-gp pumpe (Preuzeto i prilagođeno iz Sharom, 1997)

P-gp protein primarno nalazimo u epitelnim stanicama koje imaju sekrecijsku ulogu, uključujući apikalnu stranu epitelnih stanica debelog crijeva, tankog crijeva, gušteračnih i žučnih vodova, proksimalnih kanala bubrega i nadbubrežne žlijezde (Beaulieu i sur., 1997; Edwards, 2005) i endotelnim stanicama krvno-moždane barijere (Ma i sur., 2010). Upravo najveća prisutnost u navedenim stanicama dokazuje važnu fiziološku funkciju u obrani organizma od štetnih endobiotika i ksenobiotika.

Gore opisani transporter, osim svoje važne fiziološke uloge u obrani oraganizma od štetnih utjecaja, jedan je od krivaca za nastanak otpornosti stanica raka na protutumorsku terapiju. P-gp pumpa je pretjerano eksprimirana na staničnoj površini brojnih neoplastičnih stanica budući da joj je uloga spriječiti unos toksina u citoplazmu i povećati njihovo izbacivanje izvan stanice (Srivalli i Lakshmi, 2012). Na taj se način povećava izlučivanje navedenih spojeva u žuč, urin i lumen gastrointestinalnog trakta te van iz organizma kako bi se smanjila izloženost određenom toksinu (Fortuna, 2011).

Budući da zbog pretjerane ekspresije P-gp proteina na površini tumorskih stanica dolazi do otpornosti na kemoterapiju i smanjenog odgovora na liječenje, jedan od smjerova u istraživanju novih metoda liječenja tumora je ispitivanje skupina spojeva koji će djelovati upravo kao inhibitori te iste pumpe. Cilj je postići poboljšanu bioraspoloživost lijeka, njegov unos u ciljani

organ i efikasniju kemoterapiju kroz sposobnost selektivnog blokiranja P-gp pumpe (Sharom, 1997).

1.4 DRUGE PROTEINSKE PUMPE

Budući da nije svaka rezistencija na antitumorsku terapiju povezana s P-gp pumpom, krenulo se u potragu za drugim pumpama s kojima bi se mogao objasniti mehanizam nastale rezistencije. Prvi rezultat te potrage je bio MRP1 (engl. *multidrug-resistance-associated protein 1*), odnosno ABCC1 (Cole i sur., 1993). MRP1 strukturno je sličan P-gp-u, s razlikom u aminoterminalnom kraju koji sadrži pet transmembranskih domena pričvršćenih na jezgru sličnu P-gpu. Supstrati MRP1 su neutralni i anionski hidrofobni spojevi te konjugati glutationa (Loe, 1998).

Otkriće proteina MRP1 pokrenulo je daljnja istraživanja i dovelo do otkrića osam dodatnih članova porodice ABCC. Slično kao i njihov predhodnik MRP1, neki od proteina iz obitelji MRP također u svojoj strukturi imaju amino terminalno područje s pet transmembranskih regija. Navedeni proteini su ABCC2, ABCC3 i ABCC6 nazvani MRP2, 3 i 6. Mnogi članovi obitelji MRP prenose spojeve na sličan način kao i proteini iz obitelji MRP1 te bi također mogli sudjelovati u nastanku rezistencije na lijekove (Borst i sur., 2000).

Primjer lijeka koji je slab supstrat za proteine iz obitelji MDR1 i MRP1 je antitumorski lijek mitoksantron. S druge strane, proteini koji sudjeluju u nastanku rezistencije na ovu vrstu terapije su proteini iz obitelji ABCG2 poznatiji kao MXR (engl. *mitoxantrone-resistance gene*), BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*) ili ABC-P (engl. *ABC transporter in placenta*) (Tablica 1) (Miyake i sur., 1999). Navedeni transporter je homodimer koji sadrži dva transportera, od kojih svaki sadrži domena koja veže ATP na amino-terminalnom kraju molekule i šest transmembranskih domena (Komatani i sur., 2001).

Drugi članovi obitelji ABC koji su također povezani sa rezistencijom na antitumorsku terapiju jesu BSEP, MDR3 i ABCA2. BSEP je protein koji u tijelu sudjeluje u eksportu soli žučnih kiselina. Nazvan je „sestom PGP-a“ i nalazimo ga u velikim količinama u stanicama jetre (Childs i sur., 1998). MDR3 je fosfatidilkolinska flipaza koja obično prenosi fosfolipide u žuč, ali može transportirati i paklitaksel i vinblastin ukoliko nije mutirana (Smit i sur., 1993). ABCA2 je prekomjerno eksprimiran u stanicama rezistentnima na estramustin. Prisutan je unutarstanično u endosomalnim / lizosomalnim vezikulama te bi mu fiziološka uloga mogla biti u steroidnom transportu (Laing i sur., 1998).

Iako nije ABC transporter, protein LRP (engl. *lung resistance protein*) je često uključen u rezistenciju tumorskih stanica na lijekove pošto je naveliko prisutan u staničnim linijama rezistentnim na lijekove i nekim tumorima. LRP je protein koji spada u velike ribonukleoproteine koji su prisutni u svim eukariotskim stanicama. Njihova uloga u normalnoj fiziologiji još nije točno utvrđena, ali bi jedna od mogućih uloga bila redistribucija lijeka od intracelularnih ciljeva te na taj način sudjeluje u nastanku rezistencija (Vulevic i sur., 2001).

Tablica 1. Lokalizacija i funkcija ABC transportera*

Uobičajeni naziv	Sistematski naziv	Tkivo	Supstrati	supstrati - kemoterapeutici
PGP/MDR1	ABCB1	Crijeva, jetra, bubreg, posteljica, krvno-moždana barijera	Neutralni i kationski organski spojevi	Doksorubicin, daunorubicin, vinkristin, vinblastin, aktinomycin-D, paklitaksel, docetaksel, etopozid
MRP2	ABCC2	Jetra, bubreg, crijeva	Glutation, organski anioni, leukotrien C4	Metotreksat, etopozid, doksorubicin, cisplatin, vinkristin, mitoksantron
MRP3	ABCC3	Gušterača, bubreg, crijevo, jetra, nadbubrežna žlijezda	Konjugati glukuronata i glutaciona, soli žučne kiseline	Etopozid, tenopozid, metotreksat, cisplatin, vinkristin, doksorubicin
MRP6	ABCC6	Jetra, bubrezi	Ciklički anionski pentapeptid	Nepoznato
MXR BCRP ABC-P	ABCG2	Posteljica, crijeva, dojka, jetra	Prazosin	Doksorubicin, daunorubicin, mitoksantron, topotekan,
BSEP	ABCB11	Jetra	Soli žučne kiseline	Paklitaksel
ABCA2	ABCA2	Mozak, monociti	Steroidni derivati, lipidi	Estramustin

*Preuzeto i prilagođeno iz Gottesman (2002).

Kao što je vidljivo iz tablice 1, svaki od navedenih proteinskih transportera ima za supstrat danas uveliko korištene antitumorske lijekove. Upravo iz navedenog razloga, zbog mogućnosti nastanka rezistencije, potrebno je usmjeriti daljnja istraživanja u potragu potentnih inhibitora tih proteinskih pumpi (Gottesman i sur., 2002).

1.5 INHIBICIJA P-GP PUMPE

Mehanizam inhibicije P-gp pumpe može se provesti na tri razine: sprječavanje vezanja lijeka na pumpu, bilo kompetitivno, nekompetitivno ili alosterički, interferencija s hidrolizom ATP-a i promjena integriteta lipida stanične membrane (Shapiro i Ling, 1997; Varma i sur., 2003; Srivalli i Lakshmi, 2012).

Danas dostupni i ispitivani inhibitori P-gp-a klasificirani su u tri generacije, i to s obzirom na njihovu specifičnost, afinitet i toksičnost (Tablica 2).

Tablica 2. Klasifikacija inhibitora P-gp pumpe*

GENERACIJA LIJEKA	LIJEKOVI	SPECIFIČNOST	OGRANIČENJA
PRVA GENERACIJA	Verapamil, ciklosporin A, kinidin, tamoksifen, toremifen	Neselektivni, posjeduju nizak afinitet vezanja	Supstrati su i drugih transportera i enzimskih sustava, farmakološki su aktivni, unose se s P glikoproteinom u stanicu
DRUGA GENERACIJA	Deksverapamil, deksniguldipin, valspodar, dofekvidar fumarat	Veća specifičnost u odnosu na prvu generaciju, stupaju u interakcije	Supstrati su za CYP 3A4 i druge ABC transportere
TREĆA GENERACIJA	Ciklopropildibenzosubaran zosukvidar, lanikvidar, mitotan, birikodar, elakridar, tarikvidar	Visoka specifičnost koja potentno inhibira funkciju P glikoproteina	Nemaju ograničenja kao prva i druga generacija

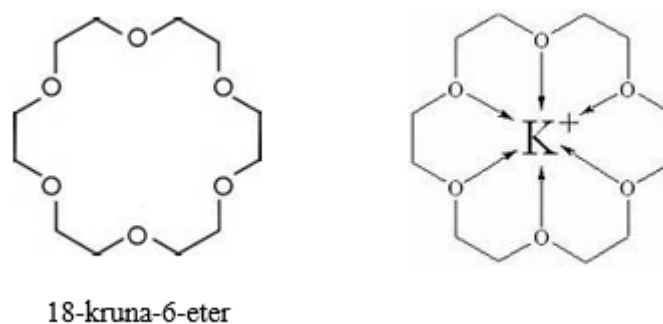
*Preuzeto i prilagođeno iz Amin (2013).

U prvu generaciju spadaju farmakološki aktivni spojevi koje imaju svoju kliničku primjenu za specifične bolesti, ali uz to imaju sposobnost inhibicije P-gp-a. Ovdje spadaju lijekovi kao što su verapamil, ciklosporin A, reserpin, kinidin, tamoksifen i toremifen. Upotreba ovih supstancija je ograničena zbog potrebne visoke serumske koncentracije i vezano s tim potencijalne toksičnosti (Lomovskaya i Bostian, 2006; Lomovskaya, 2007). Spojevi kao što su: deksverapamil, deksniguldipin, valspodar i dofekidar fumarate spadaju u drugu generaciju koja je puno specifičnija od prve, ali budući da su navedeni spojevi inhibitori CYP 3A4 i drugih ABC transportera, također nisu za širu kliničku upotrebu zbog brojnih interakcija koje se javljaju kod upotrebe drugih lijekova. Treća generacija, u koju spadaju spojevi kao što su tarikidar i elakidar, razvijani su uz pomoć strategije odnosa između strukture spoja i njegove biološke aktivnosti (SAR, od engl. *structure-activity relationship*), te je konačni ishod velika specifičnost uz minimalnu toksičnost (Pusztai i sur., 2005; Kuppens i sur., 2007).

Vodeći se upravo ovom strategijom odnosa između strukture spoja i njegove biološke aktivnosti, sintetizira se velik broj spojeva koji se ispituju kao potencijalni inhibitori P-gp pumpe. Skupina spojeva o kojoj će biti govora u ovome radu, a koja podliježe navedenim isitivanjima jesu krunasti eteri (Amin, 2013).

1.6 KRUNASTI ETERI

Krunasti eteri ili krune su makrociklički kemijski spojevi koji se sastoje od prstena koji sadrži više eterskih skupina. Najčešći su krunasti eteri oligomeri etilen oksida, u kojem je ponavljajuća monomerna jedinica etilenoksidna jedinica, odnosno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)$, dok su kod krunastih spojeva atomi kiska zamijenjeni npr. dušikom, ili sumporom (npr. aza-krunasti spojevi s atomima dušika). Naziv "kruna" dobili su s obzirom na njihovu sličnosti s krunom koja se nalazi na čovjekovoj glavi i njihove strukture kada je na njih vezan kation. Nazivi krunastih etera prema nomenklturnim pravilima IUPAC-a su složeni i zato se ti spojevi imenuju prema dodanim supstituentima, broju atoma u prstenu (veličina prstena), obliku prstena i broju kisikovih atoma u njemu. Tako se prvi broj u imenu odnosi se na broj atoma u prstenu, a drugi broj na broj atoma kisika (Slika 3) (Pedersen, 1988).



Slika 3. Primjer krune i koordiniranog atoma kalija (Preuzeto sa www.angelo.edu)

Prsten građen od etilenskih skupina je hidrofoban dok je šupljina, sastavljena od kisika, hidrofilna. Krunasti eteri posjeduju izrazito velik afinitet za alkalijske i zemnoalkalijske katione te s njima grade komplekse. Šupljina krunastih etera bogata je elektronima koji potječu od atoma donora koji mogu biti kisik ili dušik. Na Slici 3 je prikazan 18-kruna-6-eter koji sadrži šest atoma kisika koji predstavljaju donore elektrona. Kada nema kationa zauzimaju oblik paralelograma dok nakon vezanja kationa (gore prikazanog kalija) dolazi do konformacijske reorganizacije i nastaje kompleks u kojem je kalij u centru (Gokel i sur., 2004). Iz priloženog se može vidjeti kako u kompleksu s krunastim eterima navedeni hidrofilni ioni dobivaju lipofilno svojstvo te ih na taj način možemo ekstrahirati organskim otapalom. Navedeno svojstvo je iskorišteno kod kompleksiranja kojim se može povećavati topljivost soli metala i njihova reaktivnost u lipofilnim otapalima. Upravo to omogućava njihovu široku upotrebu u studijama o prirodi transporta iona, za razdvajanje otopljenih tvari te u katalizi posredovanoj anionima, a

zbog ionofornih svojstava koriste se također za proučavanje procesa koji se događaju prilikom transporta iona u staničnim membranama, naročito natrija i kalija (Lamb i sur., 1981).

Najpoznatiji prirodno prisutan ionofor je valinomycin koji je dobiven iz stanica vrste *Streptomyces*. Prema modelu valinomicina sintetiziran je velik broj krunastih etera gdje je prilikom sinteze dan naglasak na sintezi spojeva koji posjeduju selektivnost prema različitim kemijskim vrstama. Uvidjelo se da se selektivnost u vezanju spojeva može postići prilagodbom dimenzija makrocikličke šupljine kod krunastog etera, te u varijacijama u obliku i topologiji i mijenjanjem broja i prirode supstituiranih skupina na makrocikličkom prstenu (kao što su primjerice benzen i piridin) i mijenjanjem broja, vrste i rasporeda atoma donora kao što su primjerice kisik, dušik, sumpor i fosfor (Kralj i sur., 2008).

Kod ispitivanja krunastih etera otkriveno je kako imaju širok spektar biološkog djelovanja, pa tako pokazuju antimikrobna, antiparazitska, antivirusna te citotoksična svojstva. Određeni spojevi su čak pokazali i potencijalno herbicidno te antiinflamatorno djelovanje. Unatoč velikom kliničkom potencijalu, navedeni spojevi su pokazali i svoje toksično djelovanje, i to naročito kardiotoksično. Kardiotoksičnost nastaje zbog poremećaja koncentracije ioni Ca^{2+} do koje dolazi zbog formiranja kompleksa ili depolarizacije membranskog potencijala koja dovodi do promjene koncentracije iona H^+ unutar mitohondrija (Dion i sur., 2009).

Biološka svojstva, koja pokazuju navedeni spojevi, posljedica su njihovog ionofornog djelovanja na staničnoj membrani specifičnog za Na^+/K^+ pumpu. Ionofor ima sposobnost transporta iona na obje strane što mijenja osmotsku ravnotežu koja posljedično dovodi do stanične smrti (Alfonso i Quesada, 2013).

Također je poznato da neki prirodni i sintetski polieterski ionofori, kao što su salinomycin, monensin, nigericin i drugi posjeduju antiproliferativnu aktivnost na stanicama s MDR fenotipom (Huczynski, 2012), te da neki krunasti eteri inhibiraju aktivnost P-glikoproteina (Borrel i sur., 1995). Također, u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju, u kojem je izrađen ovaj rad, testirana je serija krunastih etera iz skupine diaza-krunastih etera (Supek i sur., 2011) te je pokazana aktivnost nekoliko njih, pri čemu je aktivnost jednog od njih pokazao značajnu inhibicijsku aktivnost, usporedivu ili čak jaču od one poznatog inhibitora verapamila (Kralj, neobjavljeni rezultati). Stoga je testiranje aktivnosti strukturno sličnih spojeva jedan od zanimljivih pravaca istraživanja novih inhibitora P-gp pumpe.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Kod liječenja bolesnika oboljelih od malignih bolesti veliki izazov predstavlja pojava otpornosti tumorskih stanica na korištene protutumorske lijekove te posljedično s tim neučinkovitost same terapije. Različiti su mehanizmi koji uzrokuju otpornosti tumorskih stanica. Na primjer, otpornost može izazvati gubitak površinskih staničnih receptora ili transportera za unos lijeka, promjena metabolizma lijeka, promjene specifičnih meta lijeka, povećana stopa popravka DNA, promjene staničnih lipida te povećan broj membranskih proteinskih pumpa koje izbacuju lijek iz stanice. Najviše istražen mehanizam otpornosti je promjena stope akumulacije lijeka unutar stanice pomoću prekomjerne ekspresije P-glikoproteina (P-gp) na staničnoj membrani, koja dovodi do pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice. Upravo je ovaj mehanizam, odnosno njegova inhibicija istraživana u ovom radu.

Konkretno, cilj istraživanja bio je ispitati dvije skupine spojeva iz grupe krunastih etera na njihovo potencijalno inhibitorno djelovanje na aktivnost P-glikoproteina, polazeći od pretpostavke kako bi se u kliničkoj praksi inhibicijom P-ovog transportera i prevladavanjem rezistencije postigao bolji odgovor na protutumorsku terapiju.

Ispitali smo derivate monoaza- (641, 642, 643 i 644) i heksaaza- krunastih etera (1188, 1189, 1191, 1192) na staničnoj liniji humanog karcinoma ovarija s prekomjernom ekspresijom P-gp proteina - A2780/Adr, koja je ujedno i otporna na protutumorske lijekove kao što su doksorubicin i paklitaksel te parentalnoj liniji koja ne eksprimira P-gp – A2780. Testirali smo antiproliferativna svojstva ovih spojeva testom MTT, kao i njihovo svojstvo inhibicije P-gp transportera testom efluksa rodamina.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 STANIČNE LINIJE

Stanična linija predstavlja kulturu stanica prilagođene rastu *in vitro* u specifičnoj hranidbenoj podlozi. Stanične linije mogu rasti pričvršćene na podlogu ili u suspenziji.

Stanice tumora odlikuje nekontrolirani rast, besmrtnost, gubitak kontaktne inhibicije, izbjegavanje programirane stanične smrti i imunosnog odgovora organizma. Karakteristika bitna za staničnu kulturu su besmrtnost, koja nam omogućuje dugotrajno upotrebu staničnih kultura, ali svakako nezanemariva odlika je gubitak kontakne inhibicije zbog koje se stanice moraju redovito presađivati kako ne bi prerasle zdjelicu u kojoj se uzgajaju.

U izradi ovog diplomskog rada korištena je ljudska stanična linija A2780, epitelne stanice karcinoma ovarija, koje spadaju u skupinu adherentnih staničnih linija. Uz navedene parentalne stanice korištene su i stanice A2780/Adr - stanice karcinoma ovarija s prekomjernom ekspresijom P-gp pumpe na staničnoj membrani koja je postignuta dugoročnim tretmanom citostatikom adriamicinom. A2780 stanice nabavljene su preko tvrtke Sigma iz europske baze autentificiranih staničnih linija (EACC, od engl. European Authenticated Cell Cultures).

3.2 ODRŽAVANJE STANIČNIH LINIJA U KULTURI

Kao što je već rečeno, tumorske stanice se, zbog gubitka kontakne inhibicije, moraju redovito presađivati kako ne bi prerasle petrijevu zdjelicu. Stanice A2780 spadaju u adherentne stanične linije što znači da se vežu za površinu zdjelice. Svaka stanična linija zahtjeva točno definirani medij kako bi mogli rasti u kulturi. Medij korišten za uzgoj A2780 stanica je RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*, prema institutu gdje proizveden, Sigma, Njemačka). Medij sadrži potrebne aminokiseline, vitamine, soli koje održavaju osmotsku ravnotežu, pufere, glukozu, te indikatore za pH (u ovom slučaju fenolno crvenilo).

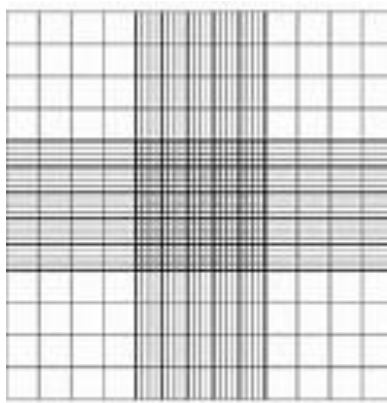
U medij se dodaje serum koji sadrži faktore rasta, hormone, fibronektin, inhibitor proteaza. U medij sa serumom dodaju se antibiotici kako bi se spriječilo zagađenje kulture koja se uzgaja u sterilnim uvjetima.

Stanice se uzgajaju u sterilnim bocama u inkubatorima na temperaturi od 37 °C, 5% CO₂ i visoke vlažnosti. Stanicama je potrebno mijenjati medij te ih je potrebno presaditi svakih nekoliko dana kada dostignu određenu konfluentnost. Medij je potrebno mijenjati i potrebna je presađnja budući da stanice prilikom rasta troše hranjive tvari, te je s vremenom sve više otpadnih tvari koje zakiseljuju medij koji poprima žutu boju zbog fenol crvenila. Prilikom presađnje adherentne kulture potrebno je pokidati veze s kojima se stanica drži za podlogu. To se postiže sa serinskom proteazom, tripsinom. Stanična kultura koja se presađuje inkubira se s tripsinom te se nakon uspješnog odljepljivanja isperu sa medijem kako bi se inhibirao tripsin budući da je u mediju serum koji sadrži inhibitor serinske proteaze. Stanice kroz nekoliko sati stvore privremene veze sa podlogom, dok se unutar 24 sata potpuno vežu za podlogu.

U izradi ovog diplomskog rada stanice karcinoma ovarija A2780 uzgajane su u plastičnim polistirenskim bocama od 75 mL (Falcon, SAD), te u Petrijevim zdjelicama od 6 mL (Falcon, SAD). Uzgajane su u mediju RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) kompletiran sa 10% fetalnim goveđim serumom (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), 100 jedinica/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Lonza, Švicarska). Stanice su uzgajane u inkubatoru za stanice (Mettler, Njemačka). Presađivane su uz konfluentnost od 75%, što je vremenski svakih 4 dana. Prilikom presađnje provjeravali smo moguće zagađenje invertnim mikroskopom CKX 41 (Olympus, Japan). Nakon uklanjanja medija, dodan je 0,25% tripsin (Sigma, SAD) kako bi se stanice odljepile od podloge. Stanice su nakon inkubacije isprane i skupljene u novi medij.

3.3 BROJANJE STANICA

Prilikom svake presađnje stanice su brojane uz pomoć svjetlosnog mikroskopa i tripanskog modrila (Sigma, SAD). Tripansko modrilo ulazi u mrtve stanice i boja ih te se na taj način razlikuju mrtve od živih stanica. Stanična suspenzija se razjređuje pet puta s tripanskim modrilom, npr. 20 µL stanične suspenzije i 80 µL 0,03% tripanskog modrila. U Neubaeurovu komoricu se nanosi određeni alikvot suspenzije za brojanje.



Slika 4. Neubaurova komorica koja služi za brojanje stanica pod mikroskopom

Neubaurova 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 Neubaurove komorice

„5“ predstavlja razrjeđenje koncentracije stanica koje se nanosilo na Neubaurovu komoricu

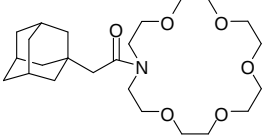
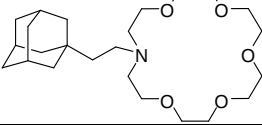
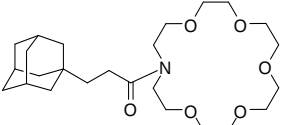
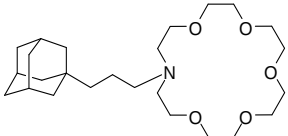
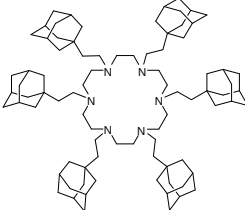
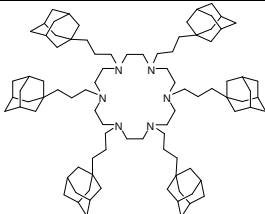
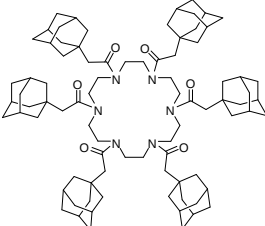
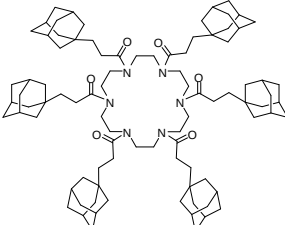
„10⁴“ predstavlja pretvorbu L u mL

3.4 TESTIRANI SPOJEVI

U radu su korišteni makrociklički spojevi, krunasti eteri sintetizirani u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Instituta Ruđer Bošković. Spojevi su označeni sa šifrom „LET“ prema nazivlju preuzetom iz baze spojeva Laboratorija za eksperimentalnu terapiju, IRB-a. Svi spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji $2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

Makrociklički spojevi s kojima su tretirane stanice prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Strukture ispitivanih derivata krunastih etera.

Oznaka	Struktura	Koncentracija matične otopine (DMSO)
LET-641		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-642		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-643		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-644		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-1188		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-1189		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-1191		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$
LET-1192		$2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$

3.5 ISPITIVANJE INHIBITORNOG UČINKA NA RAST STANICA

Inhibitorni (antiproliferativni) učinak makrocikličkih spojeva u uvjetima *in vitro* ispitivani su prema modificiranom postupku kakav se koristi na Nacionalnom institutu za rak (National Cancer Institute - <https://dtp.cancer.gov/>). Svaki test ponovljen je u minimalno dva neovisna pokusa. Na mikrotitarske pločice od 96 jažica u tetraplikatu nasadili smo parentalne stanice A2780 i stanice A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom P-gp pumpe. Izračunali smo volumene stanične suspenzije i medija koje smo pomiješali kako bi se dobio točno određeni broj stanica u konačnom volumenu od 150 μL za jednu jažicu. Za parentalne stanice on iznosi 2000/jažici, a za A2780/Adr stanice 4000 stanica/jažici budući da se parentalne stanice dijele brže u odnosu na stanice A2780/Adr. Prvo je nasadena kontrolna pločica za tzv. „nulti dan“, odnosno početnu kontrolu, na kojoj su nasadene obje stanične linije te je ostavljena jedna prazna kolona kao slijepa proba. Paralelno smo nasadili pločice sa svakom staničnom linijom zasebno gdje je zadnja kolona također ostavljena prazna kao slijepa proba. Nakon inkubacije od 24 sata, unutar kojih su se stanice prihvatile za podlogu te započele rast, pločica s početnom kontrolom podvrgnuta je testu MTT. Ostale stanice tretirali smo spojevima razrijeđenim medijem RPMI u koncentracijama 4×10^{-4} , 4×10^{-5} , 4×10^{-6} , 4×10^{-7} i $4 \times 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$. U svaku jažicu dodano je 50 μL razrijeđenog spoja te su, uz konačni volumen u jažici od 200 μL , konačno ispitivane koncentracije bile: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} M . Kontrolnim stanicama u zadnjoj koloni dodali smo 50 μL medija. U pokusima ispitivanja kombiniranog učinka poznatog P-gp supstrata paklitaksela i krunastih etera koncentracija ispitivanog spoja uvijek je bila konstantna ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) dok se razrijeđenje paklitaksela mijenjalo od 10^{-7} do 10^{-11} . Nakon 72 sata inkubacije stanice su podvrgnute testu MTT.

3.6 TEST METIL TIAZOLIL TETRAZOLIJ (MTT)

Test MTT je metabolički test s kojim se određuje vijabilnost stanice mjerenjem aktivnosti enzima dehidrogenaze. Degidrogenaze 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 lipofilnom otapalu (na primjer dimetil sulfoksidu (DMSO)) kako bi se mogli izmjeriti te kvantificirati nastali produkt. Kvantifikacija se provodi spektrofotometrijski i dobivene vrijednosti su direktno proporcionalne broju živih stanica.

Kako bi se dobili što točniji podaci mjeri se rast stanica prije tretmana s određenim spojem (tzv. „nulti dan“, odn. početna kontrola) i 72 sata nakon tretmana sa spojem. Prije mjerenja, nakon uklanjanja medija sa stanica, dodaje se 40 μ L MTT reagensa (Sigma) u konačnoj koncentraciji 0,5 μ g/ μ L. Reagens se dodaje i u praznu jažicu - tzv. slijepu probu. Nakon završene inkubacije na 37 °C, tijekom 4 sata, nastali kristali se otapaju u DMSO uz tresenje. Apsorbancija (OD, optička gustoća) mjeri se na spektrofotometru mikrotitarskih pločica Multiskan EX (Thermo Labsystems, Austrija) na valnoj duljini 570 nm.

Postotak rasta stanične linije izračunava se prema izrazu:

- ako je $(\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) \geq 0$, kemijski spoj pokazuje citostatički 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 (3 dana)

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

3.7 PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočnom citometrijom mjere se i analiziraju stanice u struji tekućine koje pojedinačno prolaze kroz lasersku zraku. Kako bismo što bolje proučili svojstva stanice bojamo ih fluorescentnim bojama koje se vežu za točno određene stanične molekule, npr. DNA ili se vežu za antitijela omogućujući detekciju specifičnog proteina. Stanice prolaskom kroz lasersku zraku raspršuju

svjetlost, a fluorescentne boje se pobuđuju u više stanje te prilikom povratka u osnovno emitiraju svjetlo u obliku fluorescencije koje se pri tome mjeri.

Kod protočnog citometra specifične biljege na stanicama razlikujemo analizom raspodjele stanica prema veličini (engl. *forward scatter*, FSC) i znatosti (engl. *side scatter*, SC). FSC predstavlja intenzitet raspršenog svjetla sa stanice koja je u istom smjeru sa upadnom laserskom zakom. FSC je proporcionalan veličini česice. Znatost (SC) je raspršena svjetlost koja se mjeri pod kutem od 90 °C s obzirom na upadnu svjetlost. SC daje informacije o unutarnjoj kompleksnosti stanice. Fluorescencija koja se mjeri daje informacije o molekulama za koje su vezani fluorokromi. Signal koji se dobije ima tri mjerljive veličine: visinu (najveći intenzitet fluorescencije), širinu (vrijeme prolaska stanice kroz zraku svjetlosti) i površinu (ukupna fluorescencija stanice).

U ovom diplomskom radu metoda protočne citometrije korištena je za analizu inhibitora P-gp pumpe pomoću testa efluksa rodamina (od engl. *rodamin efflux test*).

3.8 PRIPREMA STANICA ZA TEST EFLUKSA RODAMINA

Rodamin 123 je fluorescentna boja, koja je ujedno i supstrat za P-gp pumpu. Na taj način možemo pratiti razinu rodamina u stanicama, pri čemu će njegova razina biti visoka u stanicama s niskom ekspresijom P-gp pumpe (A2780), odnosno vrlo niska u stanicama s njenom povećanom ekspresijom (A2780/Adr). Nakon inkubacije s rodaminom slijedi inkubacija stanica sa spojevima koji su potencijalni inhibitori. Kod spojeva koji posjeduju inhibitornu aktivnost, rodamin će se u većoj mjeri zadržati unutar stanice i posljedično s tim će stanice pokazivati jaču fluorescenciju, dok će kod spojeva sa slabijim inhibitornim djelovanjem ostati manja količina rodamina unutar stanica te će i sama fluorescencija biti slabija, kao i u netretiranim stanicama gdje će fluorescencija biti najslabija. S druge strane, fluorescencija rodamina u stanicama koje nemaju visoku ekspresiju P-gp pumpe će, nakon inkubacije, biti izrazito visoka.

Testirane spojeve smo prije samog testa inkubirali u ultrazvučnoj kupelji kako bi se olakšala topljivost. Stanice (200 000 stanica / 1 mL) smo pripremili u ependorf epruvetama (Eppendorf, Njemačka) u duplikatima. Kao pozitivnu kontrolu, koristili smo poznati inhibitor P-gp pumpe, verapamil (koncentracije 10×10^{-6} mol/dm³).

Zbog fotosenzitivnih svojstava rodamina epruveta se tijekom cijelog postupka držala zaštićenom od svjetlosti kako bi se smanjila razgradnja spoja. Stanice smo centrifugirali na 1500 rpm, 5 minuta na sobnoj temperaturi te uklonili medij s njih. U sve uzorke dodali smo medij s rodaminom (Sigma, Njemačka) u konačnoj koncentraciji 20 ng/mL, osim u kontrole gdje je dodavan sam medij bez rodamina. Stanice su inkubirane u mraku 30 minuta na 37 °C u mješalici (Eppendorf, Njemačka) na 300 rpm. Tijekom inkubacije stanica priredili smo razrijeđenja poznatog inhibitora verapamila i testiranih spojeva s medijem u koncentraciji 10×10^{-6} M. Nakon završetka inkubacije stanice smo centrifugirali na 1500 rpm, 5 minuta na 4 °C. Medij smo uklonili te smo na ledu dodavali PBS pufer (engl. *phosphate buffered saline*, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) ohlađen na 4 °C. Nakon resuspendiranja stanica ponovno su centrifugirane na 1500 rpm 5 minuta na 4 °C. Odlili smo medij te dodali ispitivane spojeve. Nakon inkubacije u mješalici u mraku 45 minuta na 37 °C na 300 rpm, stanice smo centrifugirali na 1500 rpm, 5 minuta na 4 °C, te ih, nakon odlijevanja medija, isprali PBS-om. Postupak ispiranja je ponovljen dva puta. Nakon ispiranja stanica dodali smo 400 µL PBS (4 °C) te mjerili fluorescenciju stanica uz pomoć protočnog citometra FACScalibur (Becton Dickinson, SAD) uz filter za zeleno FL1-H u logaritamskoj skali. Analizirali smo u svakom uzorku minimalno 10000 stanica. Mjerenja smo analizirali u računalnom programu FlowJo (verzija 7.2.5 za Windows OS, TreeStar Inc, SAD) i Excel (MS Office 2010, Microsoft, SAD). Napravljena su minimalno tri zasebna pokusa.

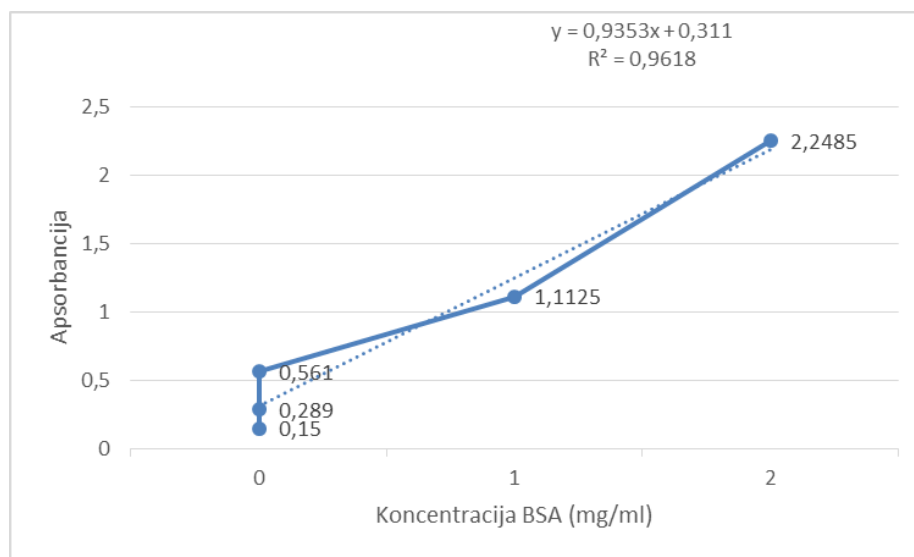
3.9 ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA METODOM *WESTERN BLOT*

Kako bismo odredili ekspresiju P-gp proteina u modelnim stanicama, uzgojili smo stanice A2780 i A2780/Adr u Petrijevim zdjelicama promjera 6 cm. Petrijevu zdjelicu sa stanicama smo stavili na led te odsisali medij i isprali PBS-om. Nakon ispiranja s PBS-om dodali smo pufer za lizu (50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100) uz dodatak inhibitora proteaza (tablete Cocktail Protease Inhibitor, Mini, EDTA-free, Roche, Švicarska), sastrugali stanice i skupili u mikro epruvetu. Nakon 10 minuta na ledu stanice smo ultrazvučno razbijali tri puta po 10 sekundi na ultrazvučnom homogenizatoru za stanice (Microson™ ultrasonic cell disruptor, Misonix, SAD), a potom centrifugirali pri 16000 g, 20 min, na 4 °C. Supernatant smo prebacili u nove mikro epruvete od 1,5 mL i spremili na -80 °C do kvantifikacije proteina.

3.9.1 Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina koristili smo reagens BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific™, SAD). Koncentracija proteina (mg/mL) se određuje prema baždarnom pravcu (Slika 5), tj. jednadžbi baždarnog pravca, koji je dobiven iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije BSA (engl. *bovine serum albumin*) standarda (Albumin Fraktion V, Carl Roth, Njemačka). Za izračunavanje baždarnog pravca koristili smo 5 razrjeđenja BSA i izvornu koncentraciju od 2 mg/mL: 2; 1; 0,75; 0,5; 0,25 i 0,125 mg/mL.

Na pločice s 96 bunarića (Greiner Bio-One, SAD) nanijeli smo 5 µL proteinskog lizata razrijeđenog u 20 µL pufera za lizu stanica i 200 µL Pierce™ BCA reagensa (A:B u omjeru 1:50) prema uputi proizvođača. Također, na pločice smo nanijeli i razrjeđenja BSA u triplikatu. Pločice smo potom inkubirali 30 minuta na 37 °C u tami. Nakon inkubacije, očitali smo apsorbanciju na 570 nm (Multiskan EX, ThermoScientific, SAD) i pomoću baždarnog pravca (Slika 5) izračunali koncentraciju, a time i potreban volumen lizata proteina da bi na gel nanijeli 25 µg ukupnih staničnih proteina. Koncentracija proteina u stanicama A2780 iznosila je 3,2 mg/mL, a u A2780/Adr 2,4 mg/mL. Lizat proteina smo pomiješali s odgovarajućim volumenom 4 × pufera za nanošenje na gel (engl. *protein loading dye*; 6 mL glicerola, 1,2 g SDS, 0,31 g DTT, 1,25 mL 0,5 mol/dm³ Tris-HCl pH 6,8, boja brom-fenol plavo, dH₂O do 10 mL) te smo pripremljene uzorke dodatno denaturirali inkubacijom na 95 °C 5 min.



Slika 5. Ovisnost apsorbancije o koncentracije BSA (mg/mL). BSA: *Bovine serum albumin*.

3.9.2 Denaturirajuća SDS-poliakrilamid gel elektroforeza

Proteine smo razdvojili na temelju njihove molekulske mase vertikalnom elektroforezom (Mini-PROTEAN Tetra cell system, BIO-RAD, SAD) u denaturirajućim uvjetima na poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% natrijev dodecil-sulfat (SDS), pH 8,3). Gornji dio gela je bio gel za sabijanje (5% mješavina akrilamida i bisakrilamida) (Talica 4), dok je donji dio, gel za razdvajanje, bio 8%-tni (Tablica 5). U jažice smo potom nanijeli 25 µg proteina svakog uzorka zajedno s bojom za nanošenje uzoraka na gel, opisanom u gornjem odlomku. 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 našeg interesa. Elektroforeza se u početku odvijala pri konstantnom naponu od 100 V. Nakon što su se uzorci sabili u gelu za sabijanje napon struje povećan je na 150 V i elektroforeza je provedena do željenog razdvajanja (uočeno prema položaju biljega).

Tablica 4. Sastav gelova za razdvajanje (10 ml)

kemikalije	6% (V/mL)	10% (V/mL)	15% (V/(mL)
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	2,0	4,0	5
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5
H ₂ O	5,3	4,0	2,3
10% SDS	0,1	0,1	0,1
APS (amonij persulfat)	0,1	0,1	0,1
TEMED (tetrametiletildiamin)	0,008	0,004	0,004

Tablica 5. Sastav gela za sabijanje (10 mL)

kemikalije	V/mL
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	1,25
1,5 M Tris (pH 6,8)	1,7
H ₂ O	6,8
10% SDS	0,1
APS (amonij persulfat)	0,1
TEMED (tetrametiletilendiamin)	0,01

3.9.3 Prijenos proteina na membranu

Razdvojene proteine prenosili smo na PDVF membranu (Poliviniliden diflorid; Roti®Fluoro PVDF, Carl Roth, Njemačka) koju smo prethodno aktivirali 1 minutu u metanolu (p.a., Carl Roth, Njemačka).

U aparaturu za prijenos smo stavili gel i na njemu prislonjenu membranu, složenu između sloja spužvica i filter papira, prema uputi proizvođača BIO-RAD sustava. Složen gel i membranu smo u držaču uronili u pufer za transfer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,1-8,4), i smjestili u posudu za transfer. Prijenos proteina na membranu trajao je 120 minuta pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA uz hlađenje umetnutim zaleđenim umetkom.

Nakon transfera membrana se boja u naftol plavom 0,1% w/v u 40% metanolu i 7% octenoj kiseline (Kemika, Hrvatska), kako bismo provjerili uspješnost prijenosa proteina na membranu. Nakon bojanja izradi se pufer za odbojavanje od 7%-tne octene kiseline i 50%-tnog metanola kako bi se odbojala membrana. Nakon odbojavanja mora se ukloniti octena kiselina u puferu za ispiranje TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Tween-20) kako ne bi došlo do smetnji prilikom blokiranja u mlijeku. Prije inkubacije s primarnim protututijelom blokirali smo nespecifično vezanje protututijela inkubacijom membrane kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi u 5%-tnom nemasnom mlijeku (Carl Roth, Njemačka) otopljenom u TBST puferu.

Blokiranje je nužno budući da membrana jako veže proteine te se na ovaj način popunjavaju sva „slobodna“ mjesta kazeinom iz mlijeka.

Potom je slijedila inkubacija membrane s primarnim protutijelom u 5%-tnom nemasnom mlijeku u TBST puferu, preko noći, na +4 °C, uz konstantno zibanje. Korišteno je primarno protutijelo mdx-1, klon G-1 (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u razrjeđenju 1:100.

Drugi dan smo membranu isprali tri puta u TBST-u i zatim inkubirali sa sekundarnim protutijelom obilježenim s peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroksidaza*, HRP) u omjeru 1:10000, 120 minuta na sobnoj temperaturi (Amersham ECL Anti-mouse IgG HRP-linked, code NA931, GE Healthcare Life Sciences, UK). Sekundarno protutijelo smo razrijedili u 5% nemasnom mlijeku u TBST puferu. Nakon inkubacije membrane sa sekundarnim protutijelom, membranu smo ponovno isprali tri puta u TBST puferu.

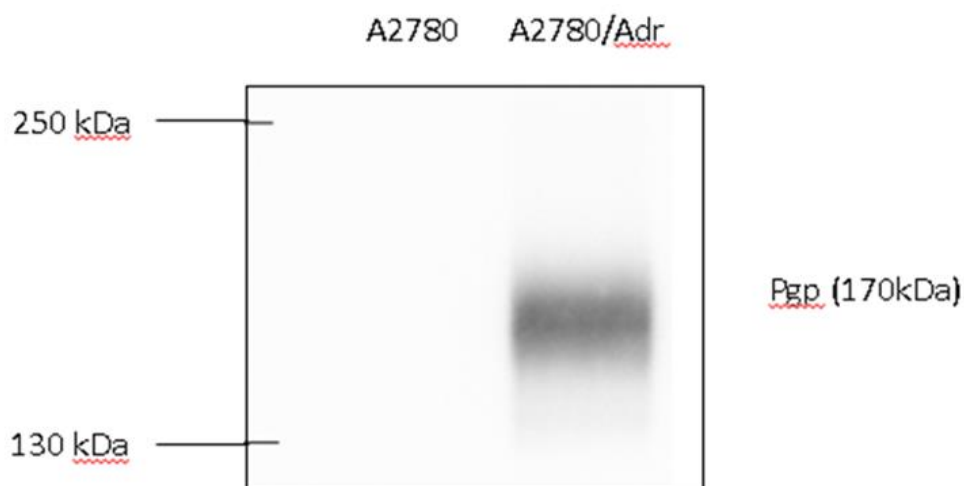
Sekundarna protutijela vezana na membranu detektirali smo uz pomoću kemiluminiscentnog reagensa (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, SAD). Otopinu (reagens A i B) u omjeru 1:1) smo izravno stavili na membranu i ostavili 3-5 minuta u mraku na zibalici. Membrane smo zatim osušili papirom i stavili u aparat za kemiluminiscentno snimanje uz pomoću CCD kamere (UVItec, Cambridge, UK). Dužinu ekspozicije i parameter slikanja podešavali smo pomoću programa Alliance (UVItec, Cambridge, UK). Slike smo potom obradili u računalnom programu Photoshop CS2 (verzija 9.0, Adobe, SAD).

4 REZULTATI

U ovom smo radu ispitali osam spojeva iz grupe monoaza- i heksaaz-a krunastih etera na inhibitorno djelovanje na aktivnost P-glikoproteina na modelnoj staničnoj liniji karcinoma ovarija čovjeka A2780 s povećanom ekspresijom P-glikoproteina te parentalnoj liniji (A2780) bez njegove ekspresije. Povećana ekspresija P-gp-a dobivena je dugotrajnim izlaganjem citostatiku doksorubicinu (adriamicinu), čime su stanice postale otporne na mnoge poznate kemoterapeutike koji su supstrati ove proteinske pumpe, prvenstveno adriamicin, paklitaksel, etopozid i druge.

4.1 KARAKTERIZACIJA MODELNIH STANIČNIH LINIJA

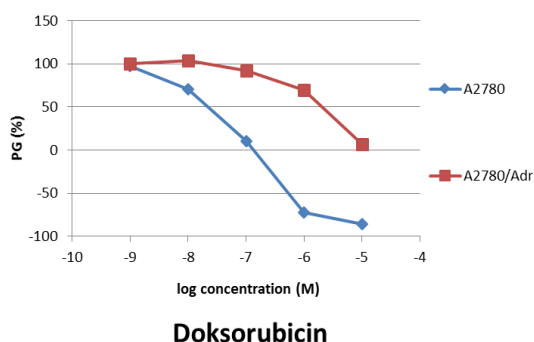
Prije izvođenja samog eksperimenta, metodom *western blot* potvrdili smo da stanice zaista imaju povećanu ekspresiju P-glikoproteina. Kao što je vidljivo na Slici 6, stanice A2780 uopće nemaju mjerljivu razinu ovog proteina, dok stanice A2780/Adr imaju izrazito povišenu ekspresiju P-gp (Mdr-1) proteina (Slika 6).



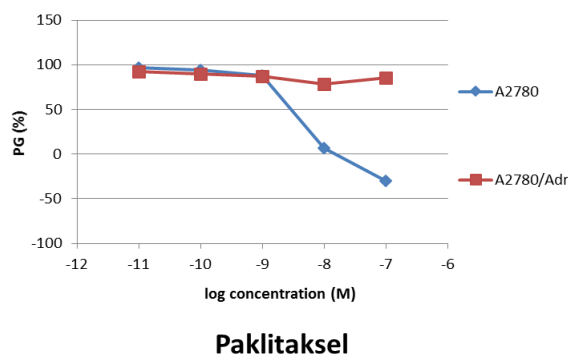
Slika 6. Ekspresija proteina Pg-p u stanicama A2780 (bez ekspresije) i A2780/Adr (s povećanom ekspresijom) prikazana metodom Western Blot. Pgp: P glikoprotein.

Također smo potvrdili da su stanice A2780/Adr izrazito otporne na kemoterapeutike doksorubicin (adriamicin) te paklitaksel, koji su ujedno i kanonski supstrati ove proteinske pumpe. Na Slici 7 prikazana je krivulja ovisnost postotka živih stanica (postotka rasta) o koncentraciji testiranog spoja (engl. *dose-response*) te je vidljivo da stanice A2780 umiru pri znatno nižim koncentracijama testiranih spojeva.

A



B



Slika 7. Krivulja preživjelih stanica (engl. *percentage of growth*, PG) A2780 i A2780/Adr, u odnosu na koncentraciju testiranog spoja (doksorubicin i paklitaksel). Stanice su nasadiivane na pločice s 96 jažica na dan 0, tretirane svježim otopinama spoja nakon 24 sata te je nakon 72 sata, testom MTT, određivan postotak preživjelih stanica u odnosu na netretirane stanice. Pokusi su rađeni u tetraplikatu, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje dvaju pokusa. PG: postotak preživjelih stanica (engl. *percentage of growth*).

4.2 ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNOG UČINKA SPOJEVA

Nakon što smo se uvjerali u kvalitetu staničnog modela, pristupili smo testiranju antiproliferativne sposobnosti krunastih etera na parentalnoj staničnoj liniji A2780 i staničnoj liniji A2780/Adr. Stanice smo nasadili na pločice sa 96 jažica na dan 0. Nakon 24 sata tretirali smo ih sa svježim otopinama spojeva te nakon 72 napravili test MTT i izmjerili fluorescenciju. Rezultate smo prikazali grafički i tablično. Grafički su prikazane krivulje ovisnosti postotka živih stanica u odnosu na koncentraciju istraživaniog spoja (Slika 8). Dodatna prednost ovakvog načina izračuna i prikaza jest da iz grafova možemo dobiti više informacija u učinku spoja. Tako na primjer:

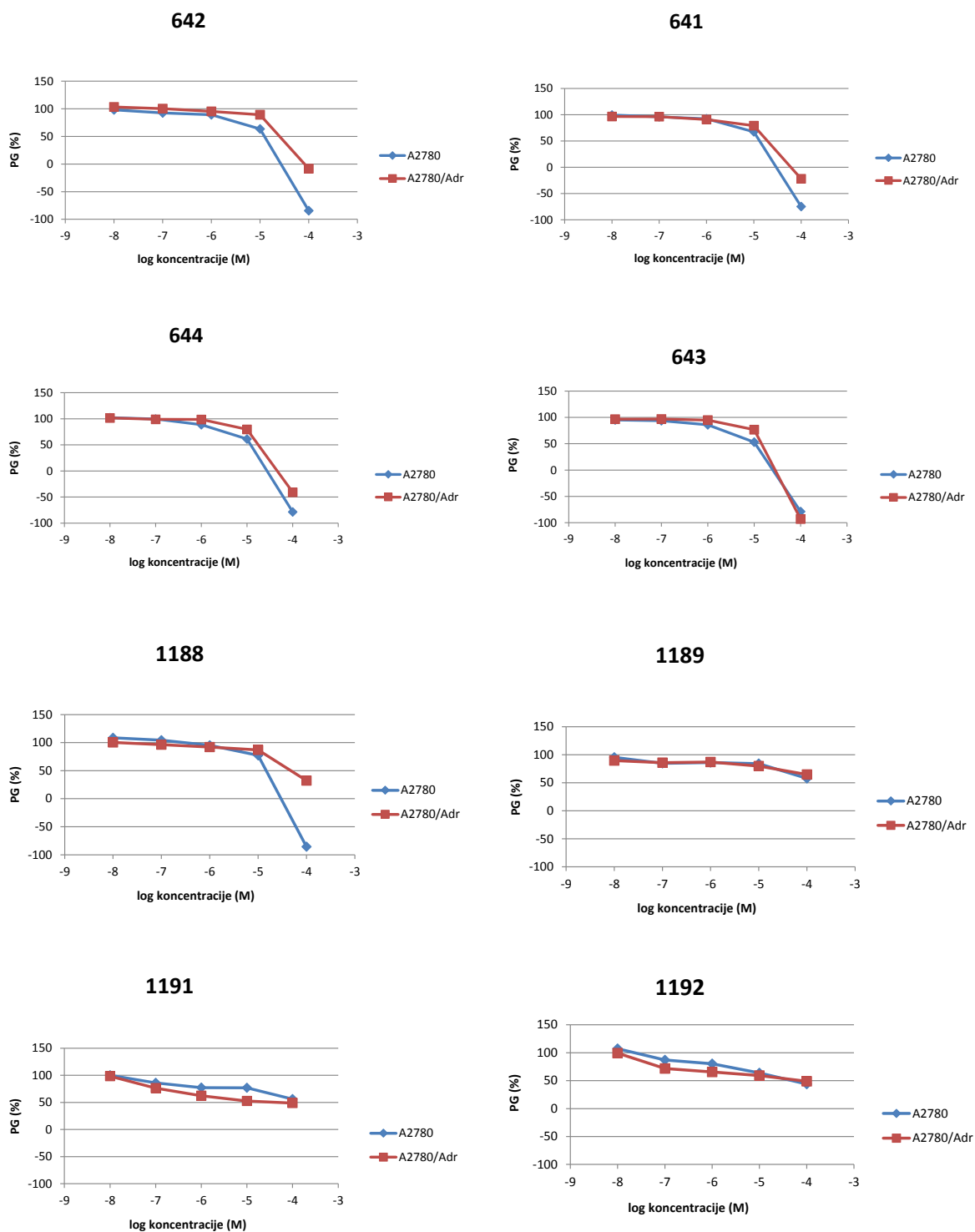
- postotak rasta od 100% odgovara vijabilnosti kontrolnih stanica nakon 72 h
- pozitivan postotak rasta od 0-100% odgovara različitom stupnju usporavanja rasta stanica izazvanim spojevima sa citostatičkim učinkom
- postotak rasta od 0% označava potpunu inhibiciju rasta i jednaka je vijabilnosti stanica prije tretmana (0. dan)
- negativni postotak rasta od 0%- 100% odgovara različitom stupnju ubijanja stanica, a njega izazivaju spojevi sa citotoksičnim učinkom
- postotak rasta od -100% označava da su sve stanice mrtve

Iz dobivenih krivulja linearnom je regresijom izračunata tzv. IC_{50} vrijednost za svaku staničnu liniju (Tablica 6). Vrijednost IC_{50} (engl. *inhibitory concentration*) predstavlja koncentraciju spoja koja je potrebna za inhibiciju 50% stanica. Niža IC_{50} koncentracija upućuje u snažnije djelovanje spoja.

Iz Slike 8 i Tablice 6 vidi se kako korišteni testirani spojevi imaju različit utjecaj na rast tumorskih staničnih linija A2780 i A2780/Adr u uvjetima *in vitro*. Općenito se iz grafova može vidjeti kako je smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica veće što je koncentracija korištenih spojeva viša.

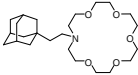
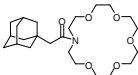
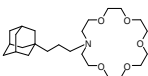
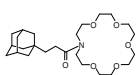
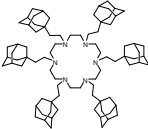
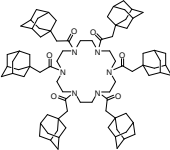
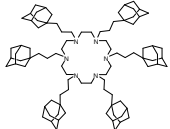
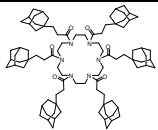
Odmah se može uočiti da spojevi iz reda monoaza- krunastih etera (641 – 644) izrazito inhibiraju rast tumorskih stanica pri koncentracijama višim od 10^{-6} . Na grafovima se uočava nešto jače djelovanje na tumorsku liniju A2780, posebno za spoj 642, što je vidljivo i iz podataka IC_{50} . S druge strane spojevi iz skupine heksaaza- krunastih etera 1189, 1191, 1192 pokazuju znatno slabiju inhibiciju rasta, čak i u najvišoj korištenoj koncentraciji, koja jedva dosiže 50%.

Izuzetak je spoj 1188 koji pokazuje inhibicijsko djelovanje pri koncentraciji 10^{-4} te je uočljiva znatno veća osjetljivost tumorske linije A2780 na djelovanje ovog spoja u odnosu na liniju A2780/Adr.



Slika 8. Krivljulja preživljenja stanica A2780 i A2780/Adr nakon tretmana testnim spojevima, mjereno testom MTT. Stanice su tretirane različitim koncentracijama spojeva 641-644 i 1188-1192. Pokusi su rađeni u tetraplikatu, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje dvaju pokusa. PG: postotak preživjelih stanica (engl. *percentage of growth*).

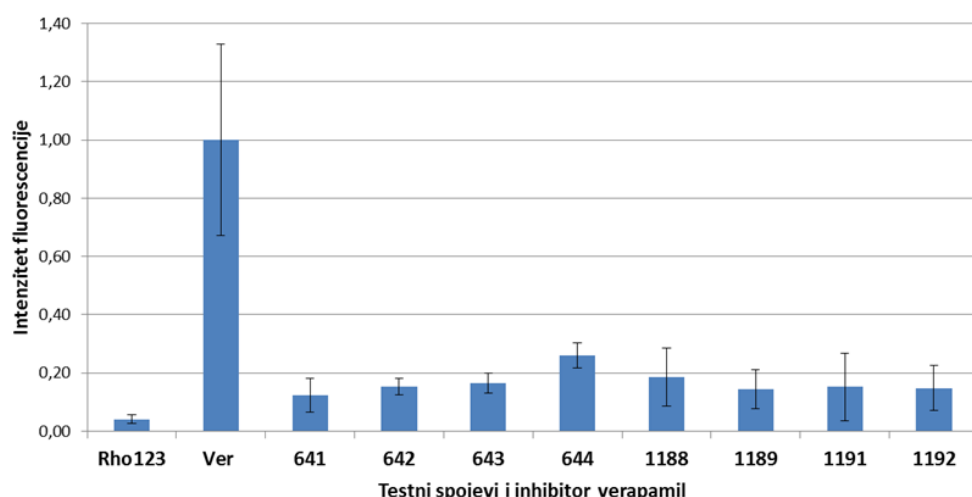
Tablica 6. Inhibicija rasta stanica A2780 i A780/Adr spojevima 641-644 i 1188-1192, prikazana kao koncentracija koja izaziva 50%-tnu inhibiciju rasta (IC_{50}) određenu testom MTT (koncentracije su izražene u μM).

Naziv spoja	Struktura spoja	Stanična linija [IC_{50} (μM)]	
		A2780	A2780/Adr
LET-642		$11,8 \pm 1,4$	$25,8 \pm 6,56$
LET-641		$12,8 \pm 1,2$	$20,1 \pm 3,8$
LET-644		$8,9 \pm 4,7$	$19,3 \pm 9,9$
LET-643		$11,3 \pm 1,4$	$14,3 \pm 0,9$
LET-1188		$14,8 \pm 2,5$	$46,0 \pm 12,3$
LET-1191		≥ 100	$50,2 \pm 22,4$
LET-1189		≥ 100	≥ 100
LET-1192		≥ 100	$72,0 \pm 8,7$

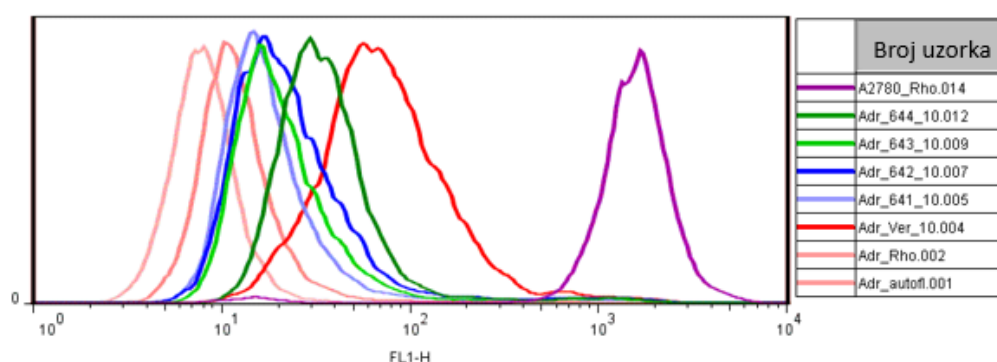
4.3 ISPITIVANJE INHIBICIJE P-GP TRANSPORTERA TESTOM EFLUKSA RODAMINA

Inhibitornu aktivnost krunastih spojeva na P-gp pumpu pratili smo koristeći tzv. test efluksa rodamina (ili rodamin 123 test). Radi se u funkcionalnom testu, koji se zasniva na činjenici da je fluorescentna boja rodamin 123 supstrat P-gp pumpe te se, pomoću protočne citometrije, može mjeriti fluorescencija akumuliranog rodamina u stanicama sa i bez dodatka spoja koji potencijalno inhibira pumpu/transport. Kao kontrolni, referentni inhibitor koristili smo verapamil, u koncentraciji koja nije bila toksična za stanice, a u skladu je i s literaturnim podacima – 10 μ M. Na Slici 9 prikazani su učinci testiranih krunastih spojeva u odnosu na kontrolni inhibitor, verapamil. Stanicama je dodan fluorescentni supstrat rodamin 123 te je mjerena količina zaostalog supstrata u stanici testom efluksa rodamina. Vrijednost fluorescencije kod stanica tretiranih sa poznatim inhibitorom verapamilom postavljena je kao vrijednost kod koje je postignuta maksimalna inhibicija pumpe te ona iznosi 1. Inhibitorni potencijali izmjerenih spojeva prikazani su u odnosu na tu vrijednost, odnosno na verapamil (Slika 9 A). Također je prikazan i reprezentativni primjer histograma fluorescencije rodamina dobiven protočnom citometrijom (Slika 9 B). Na ovoj Slici se, uz dobivene vrijednosti fluorescencije stanica A2780/Adr tretiranih verapamilom i spojevima 641 – 644, može vidjeti i vrijednosti izmjerene fluorescencije rodamina u stanicama A2780 (ljubičasta linija). Budući da ove stanice nemaju prekomjernu ekspresiju P-gp pumpe, ne mogu izbaciti rodamin 123 iz stanice jednako uspješno kao i stanice Adr/A2780 te stoga imaju najveću izmjerenu fluorescenciju rodamina.

A



B

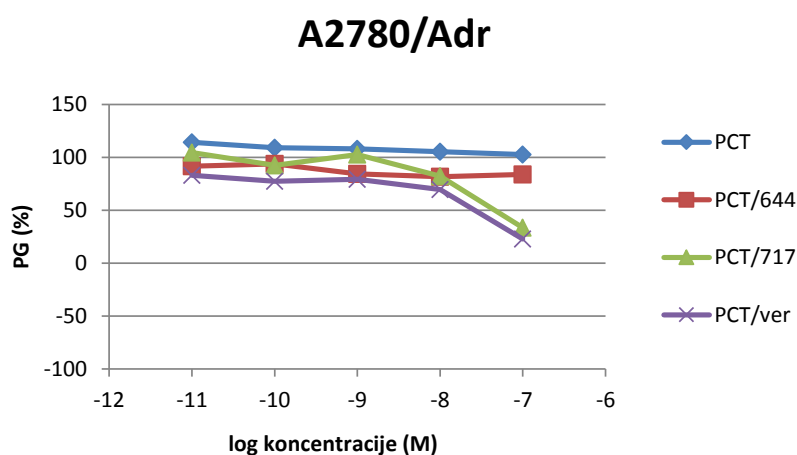


Slika 9. (A) Fluorescencija rodamina 123 u stanicama s povećanom ekspresijom Mdr-1 (P-gp) A2780/Adr sa i bez dodatka inhibitora. Dodan je inhibitor verapamil i testni spojevi te je protočnom citometrijom izmjerena srednja vrijednost fluorescencije (od engl. *Mean Fluorescence Intensity, MFI*) rodamina u stanicama nakon tretmana s prikazanim koncentracijama spojeva. Intenzitet fluorescencije rodamina u stanicama nakon tretmana verapamilom je postavljen kao vrijednost u kojoj je postignuta najveća moguća inhibicija pumpe ($MFI = 1$), a inhibitorni potencijal ostalih spojeva prikazan je u odnosu na tu vrijednost. Pokusi su rađeni u duplikatu, a svaki stupić prikazuje srednju vrijednost najmanje dva eksperimenta. (B) Reprezentativni histogrami fluorescencije rodamina u stanicama A2780 i A2780/Adr nakon tretmana spojevima 614 – 644 i verapamilom, dobiveni protočnom citometrijom. 641, 642, 643, 644, 1188, 1189, 1191, 1192: testni spojevi.

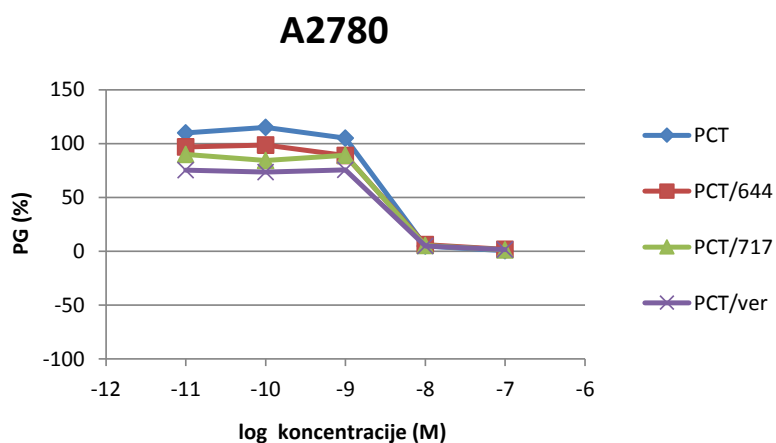
Iz prikazanih rezultata vidljivo je da svi spojevi pokazuju izuzetno slab inhibitorski učinak na P-gp pumpu, pri čemu je spoj 644 pokazao najsnažniju inhibiciju, ali je ona bila znatno slabija od kontrolnog spoja verapamila. S obzirom na ovaj, donekle obećavajući učinak spoja 644 pretpostavili smo da bi mogao imati svojstva slabog inhibitora P-gp pumpe te smo odlučili to dokazati ili opovrgnuti tretiranjem stanica A2780/Adr s kombinacijom kanonskim supstratom P-gp pumpe – paklitakselom i spojem 644. Ukoliko spoj 644 zaista signifikantno inhibira transport paklitaksela putem P-gp pumpe, primjetit ćemo pojačan inhibitorski učinak ovog citostatika na stanice.

Na Slici 10, prikazani su rezultati kombiniranog tretmana stanica A2780/Adr s paklitakselom, verapamilom, spojem 644 te spojem 717, za kojeg je već prije utvrđeno, kao što je rečeno u uvodu, da posjeduje značajno inhibitorsko djelovanje na P-gp pumpu. Koncentracija verapamila je bila 10 μM , a spojevi su testirani u koncentraciji 1,5 μM , za koju smo predhodno pokazali da nije toksična za stanice, tj. ne pokazuje inhibitorski učinak na stanice A2780/Adr, i tek blagi na stanice A2780. Na taj način se, eventualno pojačano djelovanje može pripisati isključivo inhibiciji P-gp-a.

A



B



Slika 10. Krivljulja preživljenja stanica A2780/Adr (A) i A2780 (B). Stanice su nasađene na pločice s 96 jažica na dan 0, nakon 24 sata tretirane paklitakselom u rastućim koncentracijama bez ili u kombinaciji s verapamilom (PCT/ver) i spojevima 644 (PCT/644) i 717 (PCT/717) te je nakon 72 sata, testom MTT, određen postotak preživjelih stanica u odnosu na netretirane stanice. Pokusi su rađeni u tetraplikatu, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje dvaju pokusa. PG: postotak preživjelih stanica (engl. *percentage of growth*). PCT: paklitaksel. 644, 717: testni spojevi, ver: verapamil.

Na slici (Slika 10 A) je vidljivo da je spoj 717, očekivano, značajno pojačao djelovanje paklitaksela u otpornim stanicama (A2780/Adr), slično kao i kontrolni spoj, verapamil (Slika 10 A). Nasuprot tome spoj 644 nije pokazao statistički značajno pojačanje djelovanja paklitaksela pri testiranoj koncentraciji. Rezultati su u skladu s rezultatima rodaminskog testa te možemo zaključiti da blago inhibitorno djelovanje uočeno tim testom, nije bilo dovoljno da spoj inhibira rad ovog transportera dovoljno da bi se pojačao učinak kemoterapeutika paklitaksela.

S druge strane, učinak paklitaksela na osjetljive stanice (A2780), bio je očekivano jak i spojevi ga nisu dodatno pojačali. Vidljivo je i da verapamil ima dodatno, blago inhibitorno djelovanje na obje stanične linije.

Velik izazov u liječenju tumorskih bolesti predstavlja otpornost stanica na primjenjenu terapiju. Zadnjih 40-ak godina novi smjer u unapređenju liječenja predstavlja smanjenje otpornosti na protutumorske lijekove koja se razvija kod skoro svih pacijenata nakon određenog vremena pod terapijom te na taj način smanjuje učinkovitost samog liječenja. Postoji nekoliko mehanizama koji sudjeluju u nastanku otpornosti tumorskih stanica na kemoterapeutike, kao što su: gubitak površinskih staničnih receptora ili transportera za lijek, promjena metabolizma lijeka, mutacijske izmjene specifičnih meta lijeka, povećana stopa popravka DNA, promjene staničnih lipida, povećan broj membranskih pumpa koje izbacuju lijek (Longo-Sorbelli i Bertino, 2001). Ovaj problem se nastoji zaobići korištenjem lijekova s različitim mehanizmima djelovanja. Nerijetko se unatoč tome razvija otpornost na skupine lijekova koje su međusobno strukturno i funkcionalno nepovezane. Taj fenomen je poznat pod imenom višestruka otpornost na lijekove (od engl. *multidrug resistance*, MDR) (Gottesman i sur., 1994). Upravo ta višestruka otpornost dovodi do smanjenja količine lijeka unutar stanice te na taj način smanjenog odgovora na liječenje. Najviše proučen mehanizam otpornosti je promjena stope akumulacije lijeka unutar stanice zbog prekomjerne ekspresije P-glikoproteina (P-gp) na staničnoj membrani (Borst i sur., 2000). Ovaj diplomski rad bavio se isključivo tematikom povećanog izbacivanja lijeka iz stanice i to pomoću mehanizma prekomjerne ekspresije P-glikoproteina. Naglasak je stavljen na potencijalnoj inhibiciji navedene pumpe pomoću spojeva iz skupine krunastih etera, polazeći od pretpostavke kako bi se u kliničkoj praksi inhibicijom P-gp transportera i prevladavanjem rezistencije postigao bolji odgovor na protutumorsku terapiju.

Spojevi korišteni u ovom radu su krunasti eteri ili krune. To su makrociklički polietari s različitim brojem ponavljajućih etilen-oksidnih jedinica ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). Kod određenih grupa krunastih etera atomi kisa mogu biti zamijenjeni npr. atomom dušika, ili sumpora (npr. aza-krunasti spojevi s atomima dušika). Svi se sastoje od hidrofobnog prstena etilenskih grupa koji okružuje hidrofilnu šupljinu sastavljenu od kisikovih atoma, a takva im struktura omogućuje istodobnu ugradnju u membranski lipidni dvosloj, te stvaranje stabilnih kompleksa s metalnim ionima (Marjanović i sur., 2007). Šupljina krunastih etera bogata je elektronima, zbog slobodnih elektronskih parova koji potječu od atoma donora - kisika ili drugih atoma koji ih zamjenjuju što utječe na karakteristike vezanja kationa. Također, smještaj supstituenata, odnosno bočnih lanaca, također može utjecati na selektivnost, jer makrociklički prsten i bočni lanac mogu zajedno kooperativno vezati ion. Strukturnu raznolikost i selektivnost krunastih

etera moguće je ostvariti mijenjanjem veličine makrocikličke šupljine, promjene oblika i topologije, broja i vrste supstituenta i prilagođavanjem broja, vrste i položaja donora (Kralj i sur., 2008). Otkriće krunastih etera 1967., prvih neutralnih sintetskih spojeva sa značajnom sposobnošću nekovalentnog vezanja kationa, vodilo je ka sintezi i istraživanju brojnih makrocikličkih spojeva i njihovoj primjeni u mnogim područjima.

Zbog svojih ionoforskih sposobnosti, krunasti eteri korišteni su u proučavanju procesa koji se događaju prilikom transporta iona u staničnim membranama, naročito natrija i kalija (Lamb i sur., 1981). Krunasti eteri ponašaju se vrlo slično prirodnim ionoforima, za koje je poznato da djeluju citotoksično na stanice sisavaca, uključujući tumorske stanice (Kralj i sur., 2008). Primjerice, kalijev ionofor valinomycin posjeduje antitumorsku aktivnost *in vivo* (Kleuser i sur., 1985), međutim, njegovo korištenje je ograničeno zbog prevelike toksičnosti. Sustavno istraživanje utjecaja krunastih etera na rast i smrt stanica tumora *in vitro* proveli su Marjanović i suradnici (Marjanović i sur., 2007). Autori su dokazali antiproliferativni učinak 14 analoga kruna i aza-kruna koji snažno korelira istovremeno s tipom hidrofilne šupljine (veličinom i vrstom hetero-atoma) i karakteristikama hidrofobnog prstena pri čemu je di-tert-butildicikloheksano-18-kruna-6 pokazivala izrazito snažan učinak (u submikromolarnim koncentracijama). Također je pokazano da spojevi izazivaju zaustavljanje u G1 fazi ciklusa i apoptozu, slično kao i valinomycin (Marjanović i sur., 2007). Ovo istraživanje prošireno je na analizu 18-kruna-6 etera, koji pokazuju ionoforsko djelovanje, specifično za ione kalija. To je istraživanje rezultiralo kompjuterskim modelom koji je usmjerio sintezu novih, aktivnih diaza- i monoaza- krunastih spojeva, zaštićenih patentnom prijavom (Supek i sur., 2011; US Patent No. US 8,389,505 B2).

U radu smo istraživali spojeve iz skupine monoaza- (641, 642, 643 i 644) (Tablica 3), krunastih etera, opisanih u radu Supek i sur., (2011). Ovi spojevi imaju na atomu dušika vezan adamantanski supstituent metilnom odnosno amidnom vezom na lance različite duljine.

Spojevi 1188, 1189, 1191, 1192 spadaju u skupinu heksaaza- krunastih etera (Tablica 3), što znači da imaju šest atoma dušika u makrocikličkom prstenu. Kod njih su svi atomi kisika zamjenjeni sa atomima dušika pa za razliku od gore navedenih monoaza ne spadaju u miješane makrocikličke spojeve. Na atome dušika također su vezani adamantanski supstituenti metilnom, odnosno amidnom vezom, preko pokrajnjih lanaca različite duljine. Stoga, za razliku od monoaza- spojeva, heksaaza- krunasti eteri sadrže šest supstituenata.

Važnost supstituenata leži i u povećanju hidrofobnosti spoja. Smatra se da povećana hidrofobnost spoja omogućava ugradnju u membranu i s time prijenos kationa (Marjanović i sur., 2007). Iako je povećana hidrofobnost poželjna osobina za krunaste etere zbog ugradnje u membranu, kod spojeva iz grupe heksaaza je upravo povećana hidrofobnost bila ograničavajući faktor u djelovanju navedenih spojeva. Naime, ovi su spojevi vrlo slabo inhibirali rast stanica, što se može objasniti smanjenom topivošću u vodenom (staničnom) mediju, uslijed hidrofobnosti, što je dovelo do precipitacije navedenih spojeva i prisutnosti kristala. Zbog svega opisanoga nisu bili u mogućnosti djelovati na stanice. Izuzetak je spoj 1188 koji pokazuje inhibicijsko djelovanje pri koncentraciji 10^{-4} te je uočljiva znatno veća osjetljivost tumorske linije A2780 na djelovanje ovog spoja u odnosu na liniju A2780/Adr (Tablica 6). Razlika u djelovanju na tumorsku liniju A2780 i A2780/Adr upućuje da je spoj 1188 mogući supstrat P-gp pumpe.

Za razliku od heksaaza- krunastih spojeve, monoaza- derivati pokazali su značajan inhibitorni utjecaj na rast modelnih stanica A2780 i A2780/Adr u uvjetima *in vitro*. Općenito se iz slika (Slika 8; Slika 9 A; Slika 9 B) može vidjeti kako je smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica veće što je koncentracija korištenih spojeva viša. Ovi spojevi izrazito inhibiraju rast tumorskih stanica već pri koncentracijama višim od 10^{-6} . Također se uočava nešto jače djelovanje na tumorsku liniju A2780, posebno za spoj 642, što je vidljivo i iz IC_{50} . Zaključno, rezultati pokazuju da su stanice A2780 nešto osjetljivije na sve spojeve od stanica A2780/Adr, no ne postoji značajnija razlika, osim za spoj 1188.

Iako je moguće da isti spoj bude i supstrat i inhibitor (npr. verapamil) P-gp transportera, temeljem naših predhodno dobivenih rezultata s diaza-krunastim eterima, očekivali smo da bi upravo spojevi koji nisu, ili su slabiji supstrati, mogli biti jači inhibitori P-gp pumpe. Nadalje smo istraživanje fokusirali na potencijalno inhibicijsko djelovanje ispitivanih spojeva na P-gp protein.

Mehanizmi inhibicije P-gp pumpe mogu se provesti na tri razine: sprječavanjem vezanja lijeka na pumpu, bilo kompetitivno, nekompetitivno ili alosterički, interferencija sa hidrolizom ATP-a i promjenom cjelovitosti lipida stanične membrane (Shapiro i Ling, 1997; Varma i sur., 2003; Srivalli, Lakshmi, 2012). Danas dostupni i ispitivani inhibitori Pgp-a klasificirani su u tri generacije, i to s obzirom na njihovu specifičnost, afinitet i toksičnost. U navedenom istraživanju korišten je poznati inhibitor verapamil, koji spada u prvu generaciju inhibitora P-gp pumpe. Općenito, u prvu generaciju spadaju farmakološki aktivni spojevi koje imaju svoju kliničku primjenu za specifične bolesti, ali uz to imaju sposobnost inhibicije P-gp-a. Ovdje,

osim navedenog verapamila, spadaju lijekovi kao što su ciklosporin A, reserpin, kinidin, tamoksifen i toremifen. Upotreba ovih spojeva je ograničena zbog potrebne visoke serumske koncentracije i, vezano s tim, potencijalne toksičnosti (Lomovskaya i Bostian, 2006; Lomovskaya, 2007).

Inhibitorna svojstva spojeva ispitivana su testom efluksa rodamina 123. Rodamin 123 je supstrat P-gp pumpe te se, pomoću protočne citometrije, može mjeriti fluorescencija akumuliranog rodamina u stanicama s i bez dodatka spoja koji potencijalno inhibira pumpu/transport. Fluorescenciju rodamina 123 mjerili smo kod stanica s povećanom ekspresijom P-gp pumpe, A2780/Adr, kao i parentalnih stanica, koje ne eksprimiraju ovaj protein. Jačina fluorescencije pokazuje jakost P-gp pumpe, odnosno sposobnost pumpe da iz stanice izbacuje rodamin 123. Tako stanice koje nemaju prekomjernu ekspresiju P-gp pumpe, ne mogu izbaciti rodamin 123 jednako uspješno kao i stanice Adr/A2780 te stoga imaju najveću izmjerenu fluorescenciju rodamina. Stanice pak s povećanom ekspresijom transportera, u kratkom vremenu izbace gotovo sav rodamin van stanice te je njihova fluorescencija niska. Ukoliko takve stanice dodatno inkubiramo s inhibitorom P-gp pumpe, izbacivanje boje izvan stanice će se smanjiti te će one pokazati značajno jaču fluorescenciju. Kako bismo bili sigurni da sustav dobro radi, uvijek smo koristili poznati, iako ne osobito jak, inhibitor verapamil (Fang i sur., 2007).

Vrijednost fluorescencije stanica tretiranih verapamilom postavili smo (normalizirali) kao vrijednost kod koje je postignuta maksimalna inhibicija pumpe te ona iznosi 1, a inhibitorni potencijali izmjerenih spojeva prikazani su u odnosu na ovu vrijednost. Iz prikazanih rezultata (Slika 9) vidljivo je da svi spojevi pokazuju izuzetno slab inhibitorni učinak na P-gp pumpu. Najjači učinak prikazao je 644, ali je ona bila znatno slabija od kontrolnog spoja verapamila. S obzirom da je Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju, u kojem je izrađen ovaj rad, već prije prikazana značajna aktivnost nekolicine stukturalnih derivata, iz skupine diaza- krunastih etera (analozi testiranih monoaza- spojeva, koji imaju dva identična supstituenta vezana za dva atoma dušika), pri čemu je jedan od njih pokazao usporedivu ili čak jaču inhibicijsku aktivnost od verapamila, očekivali smo da bi spojevi iz ove skupine mogli biti aktivni. Na žalost, to nije bio slučaj.

Ipak, s obzirom na ovaj, donekle obećavajući učinak spoja 644 odlučili smo provesti kombinirani tretman stanica A2780/Adr s kanonskim supstratom P-gp pumpe – paklitakselom i spojem 644 te odrediti postotak živih stanica (postotak rasta) testom MTT. Naime, ukoliko spoj 644 zaista značajno inhibira transport paklitaksela putem P-gp pumpe, primjetit ćemo

pojačan inhibitorni učinak ovog citostatika na stanice. Pri tome smo koristili netoksičnu koncentraciju spoja, kako bismo eventualno pojačano djelovanje mogli pripisati isključivo inhibiciji P-gp-a.

Ipak, rezultati ovih testiranja (Slika 10 A; Slika 10 B) su u skladu s rezultatima rodaminskog testa te možemo zaključiti da blago inhibitorno djelovanje uočeno tim testom, nije bilo dovoljno da ovaj spoj inhibira rad transportera dovoljno da bi se pojačao učinak kemoterapeutika paklitaksela. S druge strane, kombinirani tretman stanica poznatim inhibitorom verapamilom, kao i prije dokazanim novim inhibitorom, krunastim eterom 717, doveo je do značajnog pojačanja djelovanja paklitaksela. Naime, vidljivo je da paklitaksel nije uopće inhibirao rast stanica A2780/Adr pri koncentracijama 10^{-8} i 10^{-7} (Slika 10 A), a uz dodatak verapamila ili spoja 717 je došlo do značajne inhibicije. S druge strane, učinak paklitaksela na osjetljive stanice (A2780) (Slika 10 B), bio je očekivano jak te ga spojevi nisu dodatno pojačali.

6 ZAKLJUČAK

- Tumorske stanične linije A2780 i A2780/Adr pokazuju različitu osjetljivost na korištene spojeve u uvjetima *in vitro*
- Spojevi iz reda monoaza- krunastih etera (641 – 644) izrazito inhibiraju rast tumorskih stanica pri koncentracijama višim od 10^{-6} M
- Spojevi iz skupine heksaaza- krunastih etera 1189, 1191, 1192 pokazuju znatno slabiju inhibiciju rasta, čak i u najvišoj korištenoj koncentraciji. Prisutnost kristala i precipitacija ovih spojeva ukazuje na njihovu netopljivost, te s time i nemogućnost djelovanja na stanice *in vitro*
- Spoj 1188 pokazuje inhibicijsko djelovanje pri koncentraciji 10^{-4} M, uz razliku u djelovanju na tumorsku liniju A2780 i A2780/Adr, što upućuje na to da je spoj 1188 mogući supstrat P-gp pumpe
- Nakon testa efluksa rodamina spojevi su pokazivali izuzetno slab inhibitorni učinak na P-gp pumpu. Najsnažniju inhibiciju je pokazao spoj 644, no ona je i dalje bila znatno slabija od kontrolnog spoja verapamila
- U kombiniranom testu MTT spoj 644 nije pokazao statistički značajno pojačanje djelovanja paklitaksela pri testiranoj koncentraciji te uočeno djelovanje dobiveno rodaminskim testom, nije bilo dovoljno da spoj inhibira rad P-gp pumpe i tako pojača učinak kemoterapeutika paklitaksela

7 LITERATURA:

1. Alfonso I, Quesada R (2013): Biological activity of synthetic ionophores: ion transporters as prospective drugs? *Chem. Sci.* 4: 3009–3019.
2. Amin L (2013): P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights.* 7: 27-34.
3. Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Beliveau R (1997): P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J.* 2: 539–544.
4. Borrel MN, Fiallo M, Veress I, Garnier-Suilerott A (1995): The effect of crown ether, tetraalkylammonium salts, and polyoxyethylene amphiphiles on pirarubicin incorporation in KS62 resistant cells. *Biochemical Pharmacol.* 50:2069-2076.
5. Borst P, Evers R, Kool M (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1295–1301.
6. Childs S, Yeh RL, Hui D, Ling V (1998): Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 58: 4160–4167.
7. Cole SPC i sur (1993): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650–1654.
8. Dion AK, Damaris AFM, Hamann MT (2009): Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. *Expert Opin. Drug Discov.* 4: 109-146.
9. Doige CA, Ames GF (1993): ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 291–319.
10. Edwards JE, Alcorn J, Savolainen J, Anderson BD, McNamara PJ (2005): Role of P-glycoprotein in distribution of nelfinavir across the blood-mammary tissue barrier and blood-brain barrier. *Antimicrob Agents Chemother.* 4: 1626–1628.
11. Fang W, Li Y, Cai Y, Kang K, Yan F, Liu G, Huang W. (2007): Substituted tetrahydroisoquinoline compound B3 inhibited P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in-vitro and in-vivo. *J Pharm Pharmacol.* 59:1649-55.
12. Fortuna A, Alves G, Falcao A (2001): In vitro and in vivo relevance of the P-glycoprotein probe substrates in drug discovery and development: focus on rhodamine 123, digoxin and talinolol. *J Bioequiv Availab.* 2: 1-24.

13. Gokel GW, Leevy WM, Weber ME (2004): Crown ethers: sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models. *Chem. Rev* 104: 2723-2750.
14. Gottesman MM (2002): Mechanisms of cancer drug resistance, *Annu. Rev. Med.* 53: 615-627.
15. Gottesman MM, Ambudkar SV, Ni B (1994): Exploiting multidrug resistance to treat cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59: 677–683.
16. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev.* 2: 48-58.
17. Higgins CF (1992): ABC transporters: from microorganisms to man *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67–113.
18. Huczynski A. (2012) Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorg Med Chem Lett.* 22: 7002–7010.
19. Kleuser B, Rieter H, Adam G (1985): Selective effects by valinomycin on cytotoxicity and cell cycle arrest of transformed versus nontransformed rodent fibroblasts in vitro. *Cancer Res* 45: 3022-3028.
20. Komatani H, Kotani H, Hara Y, Nakagawa R, Matsumoto M, Arakawa H, Nishimura S. (2001): Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATPbinding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. *Cancer Res.* 61: 2827–2832.
21. Kralj M, Majerski K, Marjanović M, Šumanovac Ramljak T. (2011): Adamantane derivatives of aza-crown ethers and their use in treatment of tumor. US Patent No. US 8,389,505 B2.
22. Kralj M, Tusek- Bozic L, Frkanec L (2008): Biomedical potentials of crown ethers: prospective antitumor agents. *Chem Med Chem* 3: 1478-1492.
23. Kuppens IE, Witteveen EO, Jewell RC (2007): A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 13: 3276–3285.
24. Laing NM i sur (1998): Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 58: 1332–1337.
25. Lamb JD, Izatt RM, Christensen JJ (1981): Stability constants of cation macrocycle complexes and their effect on facilitated-transport rates. *Progress in Macrocyclic Chemistry* 2.

26. Liu YY, Han TY, Giuliano AE (2001): Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J.* 15: 719–730.
27. Loe DW, Deeley RG, Cole SP (1998): Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58: 5130–5136.
28. Lomovskaya O, Bostian KA (2006): Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. *Biochem Pharmacol.* 7: 910–918.
29. Lomovskaya O, Zgurskaya HI, Totrov M, Watkins WJ (2007): Waltzing transporters and ‘the dance macabre’ between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov.* 1: 56–65.
30. Longo-Sorbello GS, Bertino JR (2001) Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* 86: 121–127.
31. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T (1993): p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957–967.
32. Ma JD, Tsunoda SM, Bertino JS Jr, Trivedi M, Beale KK, Nafziger AN (2010): Evaluation of in vivo P-glycoprotein phenotyping probes: a need for validation. *Clin Pharmacokinet.* 4: 223–237.
33. Marjanović M, Kralj M, Supek F, Frkanec L, Piantanida I, Smuc T, Tusek-Bozic L (2007): Antitumor potetial of crown ethers: structure-activity relationships, cell cycle disturbance, and cell death studies of a series ionophores. *J Med Chem.* 50: 1007-1018.
34. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. (1999): Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59: 8–13.
35. Pedersen, CJ (1988): Macrocyclic Polyethers: Dibenzo-18-Crown-6 Polyether and Dicyclohexyl-18-Crown-6 Polyether. *Org. Synth.* 6: 395.
36. Pusztai L, Wagner P, Ibrahim N (2005): Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer.* 4: 682–691.
37. Ruetz S, Gros P (1994): Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell.* 77: 1071–1081.

38. Shapiro AB, Ling V (1997): Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 4: 587–596.
39. Sharom FJ (1997): The P-Glycoprotein Efflux Pump: How Does it Transport Drugs. *J. Membrane Biol.* 160: 161–175.
40. Sharom FJ (2001): The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 1: 161–178.
41. Smit JJ i sur (1993): Homozygous disruption of the murine Mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75: 451–462.
42. Srivalli KMR, Lakshmi PK (2012): Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz J Pharm Sci.* 3: 353–367.
43. Supek F, Šumanovac RT, Marjanović M, Buljubašić M, Kragol G, Ilić N, Šmuc T, Zahradka D, Mlinarić-Majerski K, Kralj M. (2011). Could LogP be a principal determinant of biological activity in 18-crown-6 ethers? Synthesis of biologically active adamantane-substituted diaza-crowns. *Eur J Med Chem.* 46:3444-3454.
44. Synold TW, Dussault I, Forman BM (2001): The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat. Med.* 7: 584–590.
45. Varma MVS, Ashokraj Y, Dey CS (2003): Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res.* 4: 347–35

European Curriculum vitae Format

Osobni podaci

Prezime i ime	BOŠNJAK, NIKOLINA
Adresa stanovanja	Franje Fanceva 47 23000 Zadar
Mobilni telefon	091 5162679
E-mail	nikolina.bosnjak89@gmail.com
Datum i mjesto rođenja	01.12.1989. Sarajevo
Državljanstvo	hrvatsko
Spol	Ž

Radno iskustvo

Datum (od-do)	17.07.2017.-
Zanimanje	Stručni suradnik u UKF-u
Glavn aktivnosti i odgovornosti	Provođenje sustava kvalitete poštivanjem zahtjeva DPP-a, upravljanje nesukladnostima, analize uzroka i procjene rizika, trendiranje podataka
Naziv i adresa poslodvca	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu Petrova 3, 10 000 Zagreb
	03.10.2016.-16.07.2017.
	Bolnički farmaceut
	Izdavanje lijekova na odjele, narudžbe lijekova, izrada magistralnih pripravaka KBC „Sestre Milosrdnice” Vinogradska cesta 29, 10 000 Zagreb
	15.08.2016.-02.10.2016.
	Magistar farmacije
	Izdavanje i narudžba lijekova, savjetovanje, izrada magistralnih pripravaka Ljekarne Ciglenečki, Rudeška cesta 246
	15.10.2015.-01.08.2016.
	Profesor stručnih predmeta
	Podučavanje i razvijanje vještina djece u farmaceutskoj tehnologiji i kozmetologiji, biokemiji i industrijskoj proizvodnji lijekova
	Medicinsko učilište Medvedgradska 55, 10 000 Zagreb
	22.5.2014.-22.5.2015.
	Magistar farmacije, pripravnik
	Izdavanje lijekove, bezreceptni lijekovi, savjetovanje, narudžba i unos robe, praćenje rokova i skladištenje lijekova
	ZU Ljekarne Filipović Jarušića 11, 10000 Zagreb

Obrazovanje	Datumi (od - do)	16.12.2011. - 15.01.2013.
	Stečeno zvanje	Asistent u farmakovigilanciji
	Obrazovna ustanova	Rad na farmakovigilanciji: unos spontanih nuspojava u bazu podataka. Agencija za lijekove i medicinske proizvode Ksaverska cesta 4, 10000 Zagreb
	Datumi (od - do)	06.05.2013. - 28.05.2013.
	Stečeno zvanje	Praktikant
	Obrazovna ustanova	Posao onkološkog ljekarnika (rad u sklopu stručne prakse). Klinički bolnički centar "Sestre milosrdnice"- Klinika za tumore Ilica 197, 10000 Zagreb
	Datumi (od - do)	09.07.2013. - 31.07.2013.
	Stečeno zvanje	Praktikant
	Obrazovna ustanova	SEP program u Barceloni, odrada prakse u vanjskoj ljekarni „Farmacia Vilas Maso“. Naručivanje lijekova i izdavanje. Farmacia Vilas Maso Avenida Republica Argentina, 270 - 51, 08023 Barcelona
	Datumi (od - do)	2014.-2017.
	Stečeno zvanje	Magistra molekularne biologije
	Obrazovna ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet
	Datumi (od - do)	2008. - 2013.
	Stečeno zvanje	Magistra farmacije
	Obrazovna ustanova	Farmaceutsko-biokemijski fakultet
	Datumi (od - do)	2004. - 2008.
Osobne vještine i kompetencije	Stečeno zvanje	Maturant gimnazije
	Obrazovna ustanova	Klasična gimnazija Ivana Pavla II, Zadar
	Strani jezici	
	Socijalne vještine i kompetencije	

Strani jezik	Razumijevanje		Govorna komunikacija		Pisanje
	Slušanje	Čitanje	Govorna komunikacija	Govorna interakcija	
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1
Nizozemski jezik	B2	B2	B2	B2	B2

Komunikativnost, timski radnik, traženje pomoći ukoliko nije jasan zadatak, pružanje pomoći kolegama u njihovim zadacima, sposobnosti prilagođivanja i pozitivnog ponašanja koje omogućuju uspješno nošenje sa zahtjevima i izazovima.

Organizacijske vještine i kompetencije	Sposobnost odlučivanja o poduzimanju akcije nakon postavljanja problema ili cilja, sposobnost usklađivanje problema po prioritetnosti, planiranje aktivnosti za sebe i druge.
Tehničke vještine i kompetencije	
Kompjutorske vještine i kompetencije	Dobro vladanje alatima Microsoft Office™ .
Umjetničke vještine i kompetencije	U slobodno vrijeme čitanje i sviranje gitare.
Ostale vještine i kompetencije	Vozačka dozvola B kategorije Dozvola za samostalan rad