

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA DEBELAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA DEBELAK

**VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI IZBRANIH ZAVIRALCEV
TOPOIZOMERAZ NA CELICAH HEP G2**

**EVALUATION OF TOPOISOMERASE INHIBITORS CYTOTOXICITY
ON HEP G2 CELLS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm., za mentorstvo.

Iskrena hvala moji družini in mojim najbližjim. Hvala, ker ste vztrajali in vztrajate z mano na vseh življenjskih poteh. Magistrsko delo posvečam v spomin dedu Jaku.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Ljubljana, 2018

Tjaša Debelak

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Članica komisije: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

VSEBINA

UVOD.....	1
Problematika raka	1
Humani hepatom.....	2
Pristopi k zdravljenju raka z vplivanjem na DNA	2
Odpornost rakavih celic na sistemsko zdravljenje.....	3
Protibakterijske učinkovine	4
Topoizomeraze.....	5
Zaviralci človeških topoizomeraz tipa II kot protitumorne učinkovine	9
Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II.....	10
NAMEN DELA	12
Vrednotenje citotoksičnosti spojin v zgodnjih fazah razvoja	12
MATERIALI IN METODE	13
Materiali.....	13
Metode	16
Vzpostavljanje celične linije in gojenje celic	16
Celična linija Hep G2.....	17
Celična linija HUVEC.....	22
Merjenje celične viabilnosti s testom MTS.....	24
Priprava celic.....	26
Priprava raztopin spojin v ustreznih koncentracijah	26
Analiza rezultatov	28
REZULTATI IN RAZPRAVA	30
Vzpostavljanje celičnih linij	30
Vzpostavljanje celične linije Hep G2.....	30
Vzpostavljanje celične linije HUVEC.....	31

Priprava spojin	33
Testiranje zaviralcev topoizomeraz na celični liniji Hep G2.....	33
Primerjava meritev po 24 in 72 urah.....	33
Presejalni testi	34
Test za določanje IC ₅₀	37
Testiranje zaviralcev topoizomeraz na celični liniji HUVEC.....	44
Primerjava meritev po 24 in 72 urah.....	44
Presejalni testi	45
Test za določanje IC ₅₀	46
Razprava	53
SKLEPI.....	60
LITERATURA	62
PRILOGE	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem delovanja topoisomerase tipa IIA. Prikazana so mesta delovanja znanih zaviralcev encima (prirejeno po (18)).	8
Slika 2: Prikaz interakcij med zaviralcem DNA giraze B in ATP-vezavnim mestom giraze B na E. coli (prirejeno po (27)).	11
Slika 3: Shema eksperimentalnega dela	12
Slika 4: Faze celične rasti (prirejeno po (30))	16
Slika 5: Pogled skozi mikroskop - štetje celic po dodatku barvila tripan modro. Žive celice svetijo, rdeče obkrožene so mrtve in je vanje prodrlo barvilo.	21
Slika 6: Prikaz pretvorbe MTS v obarvan produkt formazan (prirejeno po (39)).	25
Slika 7: Celice Hep G2 v prvih 24 h po nasaditvi na gojišče	31
Slika 8: Celice Hep G2, ko prerastejo > 80 % podlage. Rast poteka v skupkih in več plasteh	31
Sliki 9 in 10: HUVEC celice nižje (levo) in visoke gostote rasti (desno). Vidne so vretenasto oblikovane celice z jedri	32
Sliki 11 in 12: Grafa spreminjanja % viabilnosti celic, tretiranih z etopozidom, z dodatkom MTS po 24 urah (levo) in po 72 urah (desno)	33
Sliki 13 in 14: Prvi presejalni test po 24 (levo) in 72 h (desno). * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo.	34
Slika 15: Drugi presejalni test na celični liniji Hep G2. Graf prikazuje dve biološki ponovitvi. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo	35
Slika 16: Tretji presejalni test na Hep G2. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo	36
Slika 17: Poskusni test za določanje IC_{50} pri spojini 7	37
Sliki 18 in 19: Vpliv spojine 17 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	38
Slika 20: Vpliv spojine 23 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	39
Slika 21: Vpliv spojine 25 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	39
Slika 22: Vpliv spojine 8 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	40

Slika 23: Vpliv spojine 18 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	40
Slika 24: Vpliv spojine 21 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	41
Slika 25: Vpliv spojine 22 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	42
Slika 26: Vpliv spojine 2 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	42
Slika 27: Vpliv spojine 15 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	43
Slika 28: Vpliv spojine 27 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom	43
Slika 29: Primerjava učinka etopozida na zmanjšanje celične viabilnosti po 24 in 72 urah	44
Slika 30: Prvi presejalni test na celični liniji HUVEC. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo	45
Slika 31: Drugi presejalni test na celični liniji HUVEC. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo	46
Slika 32: Vpliv spojine 8 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	47
Slika 33: Vpliv spojine 13 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	47
Slika 34: Vpliv spojine 17 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	48
Slika 35: Vpliv spojine 2 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	49
Sliki 36 in 37: Vpliv spojine 5 na rast celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	49
Sliki 38 in 39: Vpliv spojine 19 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	50
Sliki 40 in 41: Vpliv spojine 21 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	50
Slika 42: Vpliv spojine 22 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	51

Slika 43: Vpliv spojine 23 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	51
Slika 44: Vpliv spojine 25 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	52
Sliki 45 in 46: Vpliv spojine 27 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Delitev topoizomeraz (prirejeno po (18) in (19)).....	6
Preglednica II: Naprave in pripomočki, uporabljeni v magistrski nalogi.....	13
Preglednica III: Kemikalije, uporabljene v magistrski nalogi.....	14
Preglednica IV: Spojine, uporabljene v testiranjih na celičnih linijah	14
Preglednica V: Celični liniji, uporabljeni v magistrski nalogi	15
Preglednica VI: Metabolični encimi, ki jih izločajo celice Hep G2 (povzeto po (32)).....	17
Preglednica VII: Sestava celičnega gojišča	18
Preglednica VIII: Shema nasaditve na testno ploščico za izvedbo presejalnega testa	25
Preglednica IX: Primer priprave testne spojine v različnih koncentracijah	27
Preglednica X: Zbrani rezultati testiranj zaviralcev človeške topoizomeraze II na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC	54
Preglednica XI: Zbrani rezultati testiranj zaviralcev DNA giraze na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC	55
Preglednica XII: Pregled rezultatov testiranja spojine 32 na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC	56
Preglednica XIII: Prikaz spojin s statistično značilnim vplivom na preživetje celic Hep G2	57
Preglednica XIV: Prikaz spojin s statistično značilnim vplivom na preživetje celic HUVEC	58

POVZETEK

Rak in razvoj bakterijske rezistence predstavljata velik zdravstveni problem. Zaviralci encimov iz družine topoizomeraz so potencialne učinkovine za zdravljenje raka, oziroma za zdravljenje bakterijskih okužb. Topoizomeraze spreminjajo topološka stanja DNA in z njihovim zaviranjem lahko povzročimo različne okvare DNA ter povzročimo smrt celic. Eden od ukrepov za omejevanje, oziroma preprečevanje nastanka odpornosti bakterij na protibakterijske učinkovine, je razvoj novih učinkovin, ki bi delovale na nove tarče v mikroorganizmih. Bakterijska DNA giraza B je validirana tarča za razvoj novih učinkovin s protibakterijskim delovanjem. Pogoj za varnost in učinkovitost protibakterijskih učinkovin je selektivna toksičnost. Pri učinkovinah za zdravljenje raka si želimo, da bi omejile širjenje raka in uničile rakave celice ter pri tem povzročile čim manj škode na zdravih celicah. Človeška topoizomeraza II α prevladuje v hitro delečih se celicah in je več v rakavih kot v zdravih celicah.

V magistrski nalogi smo na dveh celičnih linijah izvajali preliminarna testiranja citotoksičnosti zaviralcev človeške topoizomeraze tipa II kot potencialnih protitumornih učinkovin in zaviralcev DNA giraze B kot potencialnih učinkovin s protibakterijskim delovanjem. Citotoksičnost smo vrednotili s kolorimetričnim testom za določanje celične viabilnosti na rakavi celični liniji humanega hepatoma, Hep G2, in celični liniji iz človeških celic popkovnične vene, HUVEC. Zaviralci človeške topoizomeraze II morajo biti citotoksični za rakave celice in netoksični za zdrave človeške celice. Ugotovili smo, da je bila le ena od 5 testiranih spojin citotoksična za rakavo celično linijo Hep G2 in netoksična za celice HUVEC. Ostale spojine niso bile citotoksične na nobeni od uporabljenih celičnih linij. Spojine, ki so bile sintetizirane kot zaviralci DNA giraze B, bi morale biti selektivno toksične za bakterije in neaktivne na človeških celicah. Od 26 testiranih spojin jih je bilo 17 neaktivnih na obeh človeških celičnih linijah in 9 citotoksičnih na vsaj eni celični liniji.

Rezultati magistrske naloge so uporabna podlaga za nadaljnja testiranja in razvoj novih protibakterijskih in protitumornih učinkovin z delovanjem na encime iz družine topoizomeraz.

Ključne besede: topoizomeraza, bakterijska DNA giraza, rak, protibakterijske učinkovine, rezistenca, citotoksičnost, celične linije

ABSTRACT

Cancer and resistance to antibacterial drugs represent a major healthcare issue. Inhibitors from the topoisomerase enzyme family are potential substances for both cancer treatment and antibacterial therapy. Topoisomerases change topological states of the DNA and their inhibition can cause different defects in DNA structure which lead to cell death. Restriction of bacterial resistance can be managed by the development of substances which bind to new targets in microorganisms. Bacterial DNA Gyrase B is a validated target in the development of antibacterial drugs. Selectivity of antibacterial substances is crucial for their safety and efficiency. Substances in cancer therapy should limit tumor proliferation and kill cancer cells but cause minimal effect on healthy cells. Human DNA topoisomerase II α is more common in fast dividing cells as well as cancer cells, than in healthy cells.

In this thesis we ran preliminary tests for evaluation of cytotoxicity of human topoisomerase II inhibitors as potential antitumor substances and bacterial DNA Gyrase B inhibitors as potential substances with antibacterial properties. Cytotoxicity was evaluated with colorimetric assay for determining the number of viable cells on cancer cell line of human hepatoma Hep G2 and on cell line of human umbilical vein cells HUVEC. Topoisomerase II inhibitors should be cytotoxic for cancer cells and non-toxic for healthy cells. Among 5 tested substances one has shown cytotoxic effects on Hep G2 cell line and had no effect on HUVEC cell line. Other substances were not cytotoxic to either of the cell lines. Substances, synthesised as DNA Gyrase B inhibitors should show selective toxicity on bacterial cells, not on human cells. 17 out of 26 tested substances were inactive on both cell lines and 9 were cytotoxic on one or both cell lines.

Results of the thesis represent an useful base for further tests and the development of new antibacterial and antitumor substances by targeting enzymes from the topoisomerase family.

Key words: topoisomerase, DNA Gyrase B, cancer, antibacterial drugs, resistance, cytotoxicity, cell lines

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	banka celičnih kultur (angl. <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	adenozin trifosfat
CYP	citokrom P
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal bovine serum</i>)
Gyr A	A podenota bakterijske DNA giraze
Gyr B	B podenota bakterijske DNA giraze
HCC	hepatocelični karcinom
Hep G2	celice človeškega hepatoma
HUVEC	endotelijske celice popkovnične vene (angl. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, ki zavre 50 % aktivnosti encima
LAF	laminarni pretok zraka (ang. <i>laminar air flow</i>)
MEME	osnovno gojišče za gojenje celic (angl. <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
Par C	C podenota bakterijske topoizomeraze IV
Par E	E podenota bakterijske topoizomeraze IV
PBS	fosfatni pufer (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Top2 α	alfa podenota človeške topoizomeraze tipa II
Top2 β	beta podenota človeške topoizomeraze tipa II

UVOD

Problematika raka

Z besedo rak označujemo skupek različnih bolezni z različno pogostnostjo, načini zdravljenja, izidom in dejavniki tveganja. Je epidemija sodobnega časa in spada med največje javnozdravstvene probleme v Sloveniji. Ocenjuje se, da bo leta 2020 za rakom v Sloveniji zbolelo do 15.500 oseb, do 9.000 moških in do 6.500 žensk. Najpogostejše vrste raka v Sloveniji so kožni rak (brez melanoma), rak debelega črevesa in danke ter raki prostate, dojke in pljuč. Večina rakov je odkrita pri starostnikih, le tretjina na novo diagnosticiranih oseb je mlajša od 65 let. S staranjem prebivalstva, ki je značilno za naš prostor, je možnost povečanja bremena rakavih bolezni večja, saj bo večji del prebivalstva dočakal to bolezen. Nekatere vrste raka so povezane z nezdravim življenjskim slogom, ki je zaradi prehitrega tempa življenja, osebnih odločitev ali socialnega statusa med prebivalstvom močno razširjen. Dejavnike tveganja, kot so čezmerno sončenje, pomanjkanje telesne dejavnosti, neustrezna prehrana, kajenje in pretirano uživanje alkoholnih pijač, je mogoče omejiti s primarnimi preventivnimi ukrepi. Pri nekaterih vrstah raka pa to ni mogoče, zato je še bolj pomembno zgodnje odkrivanje bolezni ter učinkovito in varno zdravljenje (1).

Rakave celice so bolj ali manj diferencirane od normalnih in so sposobne neskončne celične delitve, so nesmrtni. Zaradi genetske nestabilnosti z delitvami nastajajo heterogene celice, ki sčasoma tvorijo tumor. Za nastanek rakavih celic je potrebno večje število mutacij. Rakotvorni dejavniki ali karcinogeni povzročajo spremembe v strukturi in funkciji celice, ki pripomorejo k nastanku raka. Glede na izvor so fizikalni, kemični in biološki. Na njihove učinke lahko vplivajo imunološki, hormonski in genetski faktorji občutljivosti gostitelja. Maligne celice so sposobne povečane celične obnove, izogibanja imunske kontrole in invazivnosti. Ne izkazujejo kontaktne inhibicije in niso dovzetne za kontrolo rasti (2).

Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije je oblikovalo Državni program za obvladovanje raka 2017–2021, s cilji upočasnitve povečevanja incidence raka, povečanja preživetja in izboljšanja kakovosti življenja obolelih za rakom. Ukrepi, kot so učinkovita primarna in sekundarna preventiva za zmanjšanje obvladljivih dejavnikov tveganja, zgodnejše odkrivanje, kakovostno zdravljenje, ustrezna psihosocialna in fizikalna

rehabilitacija ter večja dostopnost paliativne oskrbe, bi lahko bistveno pripomogli k manjši pojavnosti raka in boljši kakovosti življenja bolnikov (1).

Humani hepatom

Človeški hepatom ali hepatocelični karcinom (HCC) je najpogostejši rak solidnih organov na svetu. Po prevalenci je med raki na 6. mestu in je tretji najpogostejši vzrok smrti zaradi raka. Če je zgodaj odkrit, ga je mogoče zdraviti, a le kirurško, z resekcijo ali s transplantacijo jeter (3). Pri napredovalem raku je prognoza slaba, saj je primernih kemoterapevtikov malo. Eden takih je sorafenib, multikinazni zaviralec z antiproliferativnim in antiangiogenim delovanjem, ki sicer izboljša preživetje za 2–3 mesece, a izraža številne neželene stranske učinke. Učinek sistemske kemoterapije je zanemarljiv, brez večjega izboljšanja preživetja, pogosti pa so neželeni toksični učinki. Spojine, kot so tamoksifen, oktreotid in antiandrogeni, so brez učinka (4).

Jetra so v embriološkem razvoju nastala iz divertikla primitivnega črevesa, zato vsebujejo tudi mezodermalne elemente, in so tumorji, ki v njih nastajajo, epiteljski in mezoteljski. Od epiteljskih tumorjev si po pogostosti sledijo HCC, znotrajjetni holangiocelični rak (CHC) in mešani tumorji (HCC in CHC), cistadenokarcinom in nediferencirani karcinom. Mezoteljski tumorji so holangioendoteliom, hemangiopericitom, hemangiosarkom in drugi sarkomi. V Sloveniji HCC sicer še ni tako pogost kot v svetu, pojavi se pri 2–3,5/100.000 prebivalcev. V 60–90 % primerov nastane v kronično spremenjenih jetrih, npr. zaradi ciroze ali kroničnega hepatitisa. V zdravih jetrih lahko k pojavi HCC pripomorejo hormonski kontraceptivi, anabolni steroidi, nekatere kemikalije in venska obstrukcija (5).

Pristopi k zdravljenju raka z vplivanjem na DNA

Pristopi k zdravljenju raka so različni. V grobem jih delimo na lokalne, to sta kirurško zdravljenje in radioterapija, in sistemske, kamor poleg zdravljenja z biološkimi zdravili in hormonske terapije uvrščamo tudi kemoterapijo. Pri slednji za zdravljenje uporabljamo citostatike, spojine s protitumornim učinkom, ki pa niso specifične in delujejo na vse hitro

deleče celice organizma. Po ATC klasifikaciji jih uvrščamo v razred L: Zdravila z delovanjem na novotvorbe (citostatiki) (6). V magistrski nalogi bomo testirali nove spojine, ki bi bile lahko primerne za zdravljenje s kemoterapijo.

Pogoste učinkovine v terapiji raka so zaviralci podvojevanja DNA. Sintezo DNA zavirajo po dveh mehanizmih, in sicer lahko neposredno vplivajo na molekule, ki skrbijo za polimerizacijo ali začetek podvojevanja DNA, ali pa delujejo na kontrolne točke celičnega cikla, s čimer onemogočijo popravo DNA lezij, ki jih povzročajo učinkovine, in lahko sprožijo programirano celično smrt – apoptozo.

Učinkovine, ki delujejo na podvojevanje DNA, razdelimo na: zaviralce nukleotid trifosfatov, zaviralce podaljševanja verige, protivirusne učinkovine, ki blokirajo podaljševanje verige, zaviralce DNA polimeraz, učinkovine, ki poškodujejo DNA matrico (alkilirajoči agensi, platinove spojine), zaviralce od ciklina odvisnih kinaz, zaviralce kontrolnih točk celičnega cikla in zaviralce DNA topoizomeraz (7).

Odpornost rakavih celic na sistemsko zdravljenje

Pojav odpornosti bakterij na zdravljenje s protimikrobnimi učinkovinami je velik problem v zdravstvu. Odpornost na zdravljenje so sposobne razviti tudi rakave celice, s čimer se lahko zmanjša uspešnost zdravljenja raka. Pregnan X receptor je jedrni receptor, ki regulira izražanje, oziroma aktivnost encimov in proteinov, ki sodelujejo pri metabolizmu ali transportu učinkovin, v procesu celične rasti, pri vnetju, oksidativnem stresu in apoptozi. To so na primer: P-glikoprotein, beljakovine z odpornostjo na več učinkovin, CYP3A, uridin glukuroniltransferaza in glutation S-transferaza. Preko različnih mehanizmov vpliva na rast celic in tvorbo zasevkov pri raku debelega črevesja, dojke, endometrija, jajčnikov, maternice, prostate in jeter. Aktivnost receptorja pri raku jeter promovira rast tumorja in lahko povzroči odpornost na kemoterapijo (8; 9). P-glikoprotein je izlivna membranska črpalka, ki omejuje privzem ksenobiotikov in toksičnih substanc v celice. Običajno ga je več v membranah rakavih celic, kjer odstranjuje protitumorne učinkovine, preden dosežejo svoje tarče v celicah. Zaviralci P-glikoproteina so razdeljeni v tri generacije. Predstavnik tretje generacije, registriran tudi v Sloveniji, je mitotan, ki se uporablja v terapiji napredovalega raka skorje nadledvične žleze (10).

Z zaviralci pregnan X receptorja bi lahko zmanjšali rast tumorjev, sprožili celično apoptozo in povečali učinkovitost protitumornih učinkovin (na primer ciklofosfamida, tamoksifena, taksola) (8; 9). Z zaviranjem P-glikoproteina bi lahko povečali privzem protitumornih učinkovin v celice in s tem povečali uspešnost zdravljenja.

Protibakterijske učinkovine

Z izrazom antibiotiki označujemo metabolite mikroorganizmov, ki so sposobni zaustaviti rast ali ubiti druge mikroorganizme. Spadajo med kemoterapevtike in so po izvoru lahko naravni, polysintezni in sintezni. Da bi bile protibakterijske spojine učinkovite in varne, morajo izkazovati selektivno toksičnost, torej da nimajo škodljivega delovanja na človeški organizem (11).

Antibiotiki bodisi zaustavijo celično rast (delujejo bakteriostatično) bodisi ubijejo bakterije (delujejo baktericidno), oziroma izkazujejo oba načina delovanja, ki se izrazita odvisno od koncentracije. Pri nižjih odmerkih so bakteriostatiki in pri višjih baktericidi (12).

Ločimo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Poleg tega, da se različno barvajo z metilvijoličnim v procesu barvanja po Gramu, se razlikujejo tudi po zgradbi. Po Gramu pozitivne bakterije gradi razmeroma enostavna celična stena iz do 40 plasti peptidoglikana. Ker je zelo polarna, skozi jo lahko vstopajo pozitivno nabite učinkovine. Po Gramu negativne bakterije imajo celično steno iz le ene plasti peptidoglikana, ki jo obdaja zunanja membrana s porini, napolnjenimi z vodo. Vanje lahko vstopajo hidrofilne učinkovine (13).

Tarče delovanja antibiotikov so celična stena, plazmalema, zunanja membrana, delujejo tudi na metabolizem nukleotidov, bakterijski genom in na sintezo proteinov. Sintezo peptidoglikanov zavirajo β -laktami in glikopeptidi. Med zaviralce sinteze proteinov uvrščamo aminoglikozide, kloramfenikol, tetracikline, makrolide, fusidno kislino in klindamicin. Na sintezo nukleinskih kislin preko učinkovanja na topoizomeraze tipa II zaviralno delujejo fluorokinoloni. Sulfonamidi in trimetoprim učinkujejo na sintezo in razpoložljivost folata. Poznamo še zdravila proti tuberkulozi (etambutol, izoniazid, pirazinamid, rifampicin) in gobavosti (dapson, klofazimin) (14).

Bakterije so sčasoma razvile odpornost na nekatere učinkovine. Imenujemo jih rezistentni bakterijski sevi in jih označujemo s kraticami, na primer MRSA – *Methicillin*

resistant Staphylococcus aureus (na meticilin odporni *S. aureus*) (13). Do razvoja odpornosti lahko pride zaradi nepravilne rabe antibiotikov, če jih jemljemo z nepravim namenom, po nepravem predpisu, v nepravem odmerku ali zdravljenje traja nezadosten čas, zaradi pretirane uporabe za namene prehranske industrije in daljšanja življenjske dobe ljudi. Antibiotiki so učinkoviti proti normalno občutljivim bakterijam, na odporne pa ne delujejo in slednje se lahko nemoteno razmnožujejo, širijo in povzročajo okužbe tudi pri osebah, ki niso jemale antibiotikov, oziroma povzročajo okužbe s hujšo klinično sliko in podaljšajo čas zdravljenja. Odpornost bakterij nastane zaradi mutacij genov bakterij. Lahko je naravna ali pridobljena. Do naravne odpornosti pride zaradi neprepustnosti membrane ali spontanega izražanja genov za odpornost. Pridobljena odpornost nastane zaradi različnih mutacij osnovnih genov in jo bakterije širijo med seboj s konjugacijo, transdukcijo ali transformacijo. Mehanizmi pridobljene odpornosti so različni. Bakterije lahko spremenijo tarčno mesto, proizvajajo encime, ki inaktivirajo protibakterijske učinkovine, črpajo učinkovine v zunanje okolje ali razvijejo poti, s katerimi obidejo njihovo delovanje (15). Bakterijsko rezistenco lahko omejimo in preprečimo njen nadaljnji razvoj s pravilnim predpisovanjem in dosledno rabo antibiotikov, z ustrezno osebno higieno (zlasti z razkuževanjem rok v bolnišničnem okolju) ter z razvojem zdravlilnih učinkovin z novim mehanizmom delovanja na obstoječe tarče ali z delovanjem na nove tarče v mikroorganizmih (16).

Topoizomeraze

Topoizomeraze so encimi, ki upravljajo topološka stanja DNA v celicah. Prehod med topoizomeri DNA je omogočen s prekinitvijo ene ali obeh verig dvojne vijačnice in s kasnejšo povezavo prekinjenih verig. Med podvojevanjem DNA se morata verigi razdružiti, med prepisovanjem in translokacijo RNA polimeraze ustvarijo napetost pri superzvitju in pred celično delitvijo se morajo podvojeni kromosomi razplesti. Vse našteto popravljajo in upravljajo encimi iz družine topoizomeraz. Pomembne vlogo imajo pri podvojevanju, prepisovanju, rekombinaciji in popravljanju DNA molekul (17).

Preglednica I: Delitev topoizomeraz (prirejeno po (18) in (19))

Družina	Ime encima	Struktura podenote
IA	Bakterijska DNA topoizomeraza I	monomer
	Bakterijska DNA topoizomeraza III	monomer
	Bakterijska in arhejska reverzna DNA giraza	monomer
	Bakterijska reverzna DNA giraza	heterodimer
	Kvasovkina DNA topoizomeraza III	monomer
	Človeška DNA topoizomeraza III α	monomer
	Človeška DNA topoizomeraza III β	monomer
IB	Bakterijska DNA topoizomeraza V	monomer
	Eukariotska DNA topoizomeraza I	monomer
	Poksivirusna topoizomeraza	monomer
IC	Arhejska DNA topoizomeraza V	
IIA	Bakterijska DNA giraza	heterotetramer
	Bakterijska DNA topoizomeraza IV	heterotertamer
	Kvasovkina DNA topoizomeraza II	homodimer
	Človeška DNA topoizomeraza II α	homodimer
	Človeška DNA topoizomeraza II β	homodimer
IIB	Arhejska DNA topoizomeraza VI	heterotetramer
	Rastlinska DNA topoizomeraza VI	

Poleg topoizomeraz, naštetih v Preglednici I, obstajajo tudi številne virusne topoizomeraze in topoizomeraze, ki jih kodirajo plazmidi.

Topoizomeraze so veliki proteini, njihova velikost se giblje med 70 in 400 kDa. Brez delovanja DNA topoizomeraz pozitivno superzvitje lahko ustavi podvojevanje in prepisovanje, pretirano negativno superzvitje pa povzroči oblikovanje nenormalnih DNA struktur, kot so D zanke, R zanke, gvanozinski kvarteti in Z-DNA, ki motijo normalni metabolizem DNA. Superzvitost sčasoma zaustavi rast replikacijskega mehurčka. Topoizomeraze sproščajo superzvite odseke, ki se ne podvajajo, v sproščeno konfiguracijo (17).

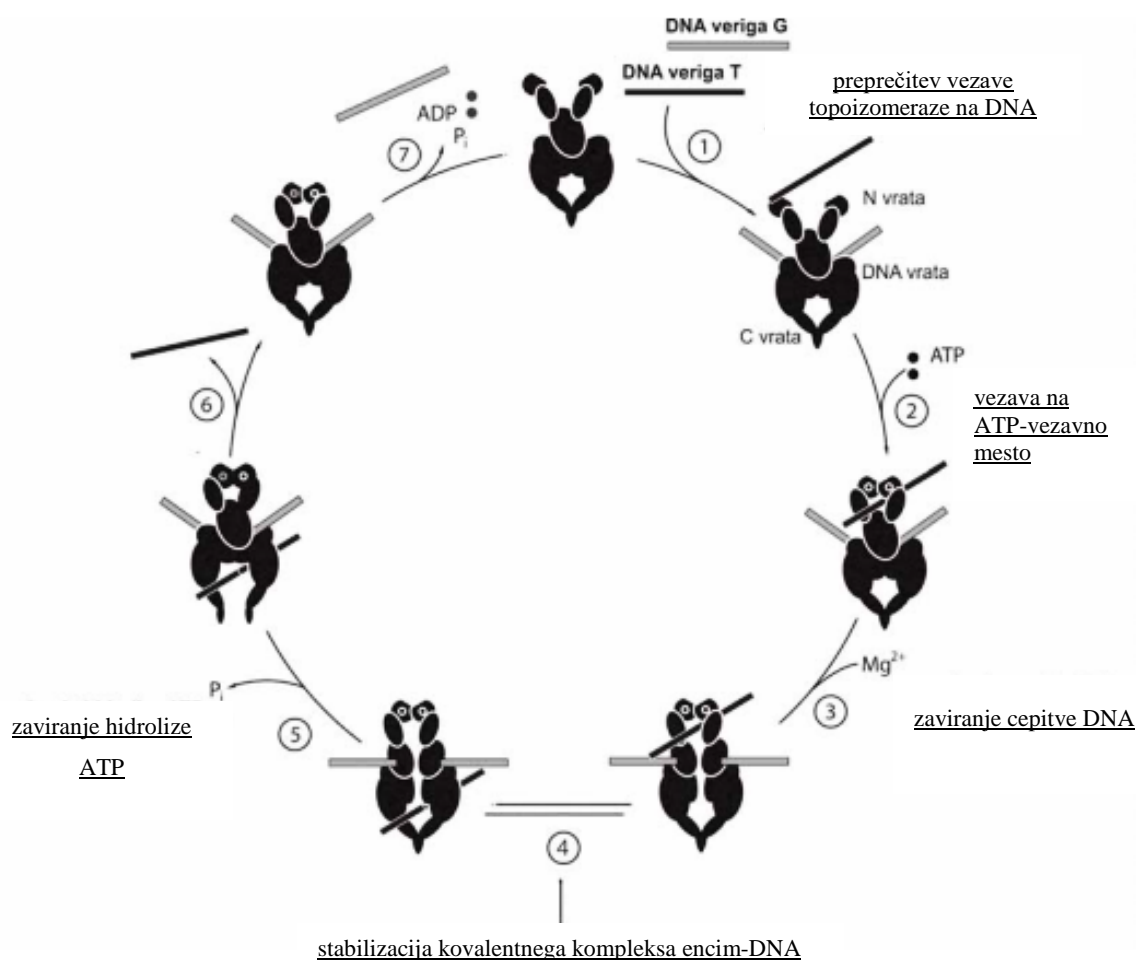
Pozitivno superzvitje nastane, če je DNA zavita v smeri dvojne vijačnice. Tedaj so si bazni pari bližje skupaj. V primeru negativnega superzvitja je DNA zavita v nasprotni smeri in bazni pari se lažje razklenijo (20). Topoizomeraze lahko razvijejo samo negativna superzvitja, negativna in pozitivna superzvitja ali uvajajo bodisi negativna (bakterijska DNA giraza) ali pozitivna (reverzna giraza) superzvitja v DNA. Poleg upravljanja superzvitja zaprte domene DNA topoizomeraze z vodenjem verig spodbujajo katenacijo in dekatencijo krožnih DNA ali razpletajo prepletene linearne krožne kromosome (19).

Vse topoizomeraze cepijo fosfodiestrsko ogrodje DNA tako, da katalitski tirozinski ostanek nukleofilno napade fosfodiestrsko vez na DNA. Reakcija je reverzibilna (17). Tekom te kovalentne vezave topoizomeraze lahko spreminjajo topologijo DNA. Ko se verigi DNA ponovno združita, se topoizomeraze sprostijo.

Topoizomeraze tipa I imajo ključno vlogo pri podpiranju gibanja podvojevalnih vilic in sproščanju superzvitja pri prepisovanju. Nivo topoizomeraz tipa I v celicah je relativno konstanten in ni odvisen od celičnega cikla. Encim izražajo vse celice, tudi nedeleče, vendar velja, da je teh encimov več v rakavih kot v zdravih tkivih (21). Prisotne so v bakterijah, arhejah in evkariontih. Njihova aktivnost ni pogojena z ATP ali drugimi energijskimi kofaktorji, energijo za delovanje črpajo iz superzvitja DNA (*torsional strain*). Izjema je reverzna giraza, ki za spreminjanje topologije DNA potrebuje hidrolizo ATP. Topoizomeraze tipa I tvorijo prehodno fosfotirozinsko kovalentno vez s 5' ali 3' koncem ene prekinjene verige dvojne vijačnice DNA. Neprekinjena veriga potuje skozi prekinjeno verigo in prekinjena konca se zopet povežeta. Topoizomeraze IA za sproščanje DNA potrebujejo dvovalentne katione. Sproščajo lahko le negativna superzvitja. Topoizomeraze tipa IB za delovanje ne potrebujejo dvovalentnih kationov in so poleg negativnih sposobne sprostiti tudi pozitivna superzvitja. Na topološko stanje DNA ne vplivajo globalno, temveč le lokalno sproščajo torzijsko napetost. Evkariontske topoizomeraze IB gradijo številne komponente, ki niso prisotne v virusih ali bakterijah, zato so obetavne tarče kemoterapevtikov (kamfotecini, indolkarbazoli, indenoizokinolini). Topoizomeraze IC sproščajo superzvitja DNA in sodelujejo v popravljanju njenih baz. Popravljalno aktivnost izkazujejo tudi topoizomeraze V (22).

Topoizomeraze tipa II so encimi, ki z vezavo na DNA cepijo obe verigi dvojne vijačnice tako, da gre druga veriga skozi prekinitev prve. Cepljena DNA se zopet poveže. Zgradba človeške topoizomeraze II še ni popolnoma znana, nanjo lahko sklepamo iz homologije drugih topoizomeraz II. Človeško topoizomerazo IIA najdemo v α in β izooblikah; α prevladuje v delečih se celicah, β pa v nedelečih, pomitotičnih, in deluje sistemsko. Top2 α uspešneje sprostí pozitivno superzvitje DNA, Top2 β pa enakovredno deluje na pozitivno in negativno superzvitje (23). Topoizomeraze II α je več v rakavih celicah kot v normalnih in hitreje sprošča dodatno zvito DNA molekulo, kar za II β obliko ne velja, zato je α oblika zanimiva s stališča načrtovanja protirakavih zdravilnih učinkovin (17).

Top2 α in 2 β sta homodimera. Za svoje delovanje potrebuje Mg^{2+} ione in ATP. Dimer se preferenčno veže na DNA regijo, kjer poteka križanje (angl. *crossover*), to so superzvitja, vozli in katenani. Na DNA sta G-odsek (vrata, angl. *gate*) in T-odsek (transportiran). G-odsek nastane, ko topozimeraza prekine verigo, skozi nato pošlje T-odsek. Po vezavi ATP gre Top2 iz odprte v zaprto obliko. V prisotnosti magnezijevih 2+ ionov tirozin iz vsakega monomera Top2 nukleofilno napade DNA fosfodiestrsko vez po 4 baze narazen in encim se poveže na 5' konec prekinjene verige. V normalnih pogojih je ta kompleks kratkotrajen (17). Mehanizem delovanja topozimeraze IIA prikazuje Slika 1. N vrata, C vrata in DNA vrata so dimerizacijske enote encima, ki s spreminjanjem svojega stanja cepijo in usmerjajo DNA molekule. Delovanje encima je večstopenjsko. Podčrtano besedilo označuje točke, v katerih lahko farmakološko vplivamo na delovanje encima.



Slika 1: Mehanizem delovanja topozimeraze tipa IIA. Prikazana so mesta delovanja znanih zaviralcev encima (prirejeno po (18)).

Bakterijske topoizomeraze tipa II, giraze in DNA topoizomeraze IV, so heterotetramerni encimi. DNA giraza sestoji iz dveh Gyr A in Gyr B podenot (A_2B_2), podobno velja za topoizomerazo IV, ki jo sestavljata dve Par C in Par E podenoti (C_2E_2). Bakterijska DNA giraza sprošča superzvitja v DNA in popravlja njene napačno zvite odseke. Kot edina v družini topoizomeraz lahko tvori tudi negativne zavoje, kar je pomembno pri podvojevanju, podaljševanju in prepisovanju DNA. Primarna funkcija topoizomeraze IV je razdruženje verige med seboj povezanih hčerinskih kromosomov v zadnjih fazah podvojitve DNA. Aktivnost obeh encimov je pogojena s hidrolizo ATP, ki jo katalizirata podenoti Gyr B pri girazi in Par E pri topoizomerazi IV (24).

Zaviralci človeških topoizomeraz tipa II kot protitumorne učinkovine

V terapiji raka so zanimive učinkovine, ki zavirajo človeško DNA topoizomerazo II, zlasti podtip II α . Glede na delovanje jih razdelimo na katalitične zaviralce in na strupe.

Strupi so kovalentni in nekovalentni. Kovalentni topoizomerazni strupi se preko redoks reakcij kovalentno vežejo na topoizomerazo. Mednje sodijo kinolonski metaboliti in bioflavonoidi, registriranih zdravil pa ni. Nekovalentni strupi se delijo na interkalatorje in na neinterkalirajoče strupe. Kovalentni kompleks, ki pri nastane cepitvi DNA med DNA in topoizomerazo, je navadno kratkotrajen, topoizomerazni strupi pa ga stabilizirajo in encim postane celični strup, ki zaradi trajnih prekinitev DNA povzroči kromosomske premestitve in nazadnje celično smrt. Interkalatorji z vrivanjem med bazne pare DNA otežujejo ponovno povezovanje verig. V Sloveniji v terapiji uporabljamo doksorubicin, epirubicin, idarubicin in mitoksantron. Neinterkalirajoče spojine se vežejo na topoizomerazo in ovirajo njeno delovanje (18). Med tovrstne spojine uvrščamo tudi etopozid, ki smo ga v testiranju uporabili za pozitivno kontrolo. Etopozid je polsintetični derivat podofilotoksina, ki zavira topoizomerazo II in nastanek mikrotubulov. Veže se na vezavni mesti za derivate podofilotoksina na topoizomerazi II in stabilizira kompleks učinkovina-encim-DNA. S kopičenjem kompleksov v celici pride do celične apoptoze. Pri koncentracijah nad 10 $\mu\text{g/mL}$ povzroči lizo celic, vstopajočih v mitozo, pri koncentracijah med 0,3 in 10 $\mu\text{g/mL}$ pa celicam prepreči vstop v profazo (25). Kljub široki učinkovitosti pa imajo topoizomerazni strupi ozko

terapevtsko okno, saj pogosto izkazujejo neželene učinke, kot sta kardiotoksičnost in pojav akutne mielogene anemije (17).

Katalitični zaviralci s svojim delovanjem preprečijo vezavo encima na DNA, zavirajo cepitev DNA, se vežejo na vezavno mesto za ATP ali zavirajo njegovo hidrolizo. Še zlasti so nanje občutljive tumorske celice z okvarjenimi kontrolnimi točkami. Edina učinkovina iz te skupine, ki je v Sloveniji v uporabi, je deksrazoksan, ki z zaviranjem hidrolize ATP prepreči začetek novega katalitičnega cikla. Uporablja se kot kardioprotektiv v terapiji z antraciklini. Potekajo številne raziskave učinkovin, ki bi se vezale na ATP-vezavno mesto topoizomeraze II α , to so npr. derivati pirazolopirimidina, triazina in triazinona ter gambojska kislina, izolirana iz rastline *Garcinia hurburyi*, ki preprečijo vezavo molekule ATP in s tem cepitev DNA (17). Bisdeoksopiperazini se vežejo v bližini vezavnega mesta ATP in z ujetjem encima v zaprti obliki zavirajo njegov katalitični cikel. Katalitični cikel topoizomeraz II zaustavijo tudi učinkovine, ki se kompetitivno vežejo v ATP-vezavni žep in preprečijo nukleofilno vezavo, na primer analogi diaminopurina (26).

Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II

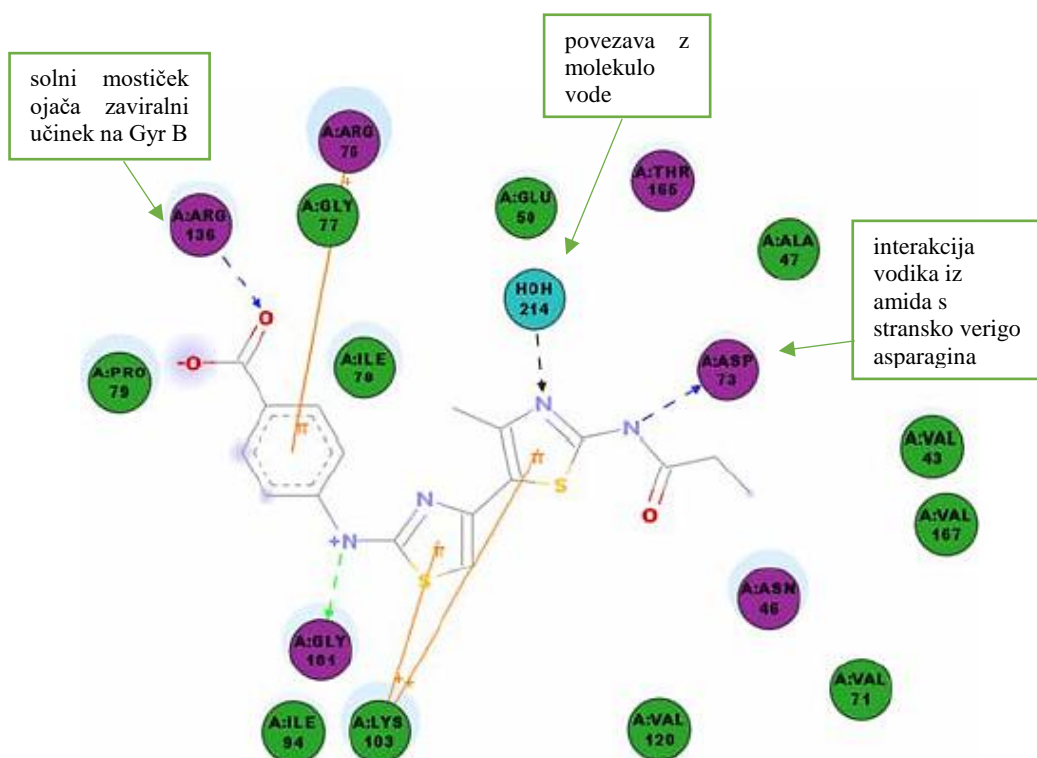
Z zaviranjem bakterijskih topoizomeraz tipa II dosežemo protibakterijsko delovanje. Ker ti encimi v evkariontih niso prisotni, lahko z delovanjem nanje dosežemo selektivno toksičnost. Zaviralci topoizomeraz tipa IIA delujejo na DNA giraze in topoizomeraze IV, vendar z različno afiniteto. Učinkovitost zaviralcev je odvisna tudi od tipa bakterij. Bakterijske topoizomeraze tipa II so tarče kinolonov in aminokumarinskih antibiotikov (17). Fluorokinoloni, na primer ciprofloksacin, gemifloksacin in moksifloksacin, z delovanjem na Gyr A, oziroma Par C podenote stabilizirajo kovalentni kompleks encim-DNA. V Gram-negativnih bakterijah zavirajo predvsem DNA girazo, v Gram-pozitivnih organizmih pa so tarče običajno topoizomeraze IV. Aminokumarini, kot sta klorobiocin in novobiocin, so protibakterijske učinkovine naravnega izvora in delujejo zaviralno na Gyr B in Par E. Vežejo se na N-končni del podenote encima in preprečijo vezavo ATP. Trenutno so v klinični uporabi le fluorokinoloni (27).

Pojav bakterijske rezistence je povzročil potrebo po razvoju novih učinkovin, ki bi z drugačnim mehanizmom delovanja ali z delovanjem na nove tarče, oziroma vezavna mesta na že obstoječih, zaobšle to odpornost in dosegle zadosten protibakterijski učinek. Nekateri

bakterijski sevi so z mutacijo regije kinolonskih odpornostnih determinant (QRDR – *quinolone resistance-determining regions*), ki kodirajo Gyr A, oziroma Par C, razvili odpornost na fluorokinolone. Odpornost na aminokumarine so bakterije razvile z mutacijami v Gyr B in Par E. Kljub možnosti za razvoj bakterijske rezistence pa ostajajo bakterijske DNA giraze in topoizomeraze IV pomembne tarče za razvoj novih učinkovin, saj njihovi zaviralci izkazujejo širokospektralno delovanje, kar podaljša čas pred nastopom rezistence (27).

Sintezne zaviralce DNA Gyr B strukturno razdelimo na aminotriazine, heterociklične N-etil sečnine, indazole, pirimidine in pirolamide. Trenutno v klinični uporabi ni nobenih zaviralcev ATP-aktivnosti DNA giraze, oziroma topoizomeraze IV (28).

Na Sliki 2 je prikazano ATP-vezavno mesto Gyr B bakterije *E. coli* in interakcije, ki jih tvori s potencialnim zaviralcem bakterijske DNA giraze B. Vijolično obarvani krogi označujejo elektrostatske interakcije, v zeleni barvi pa so prikazane van der Waalsove povezave med molekulo zaviralca in aminokislinskimi ostanki v ATP-vezavnem mestu Gyr B (27).



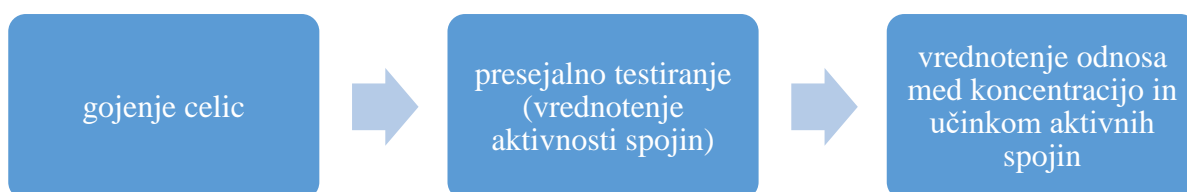
Slika 2: Prikaz interakcij med zaviralcem DNA giraze B in ATP-vezavnim mestom giraze B na *E. coli* (prirejeno po (27))

NAMEN DELA

Vrednotenje citotoksičnosti spojin v zgodnjih fazah razvoja

Ker so si bakterijske topoizomeraze tipa IIA in človeške topoizomeraze tipa II homologne, obstaja možnost za podobnost med vezavnimi mesti enih in drugih. Prav tako oboje kot vir energije izkoriščajo hidrolizo ATP. Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II morajo biti dovolj selektivni za bakterijske encime, da ne delujejo na homologne človeške topoizomeraze tipa II, oziroma na druge proteine z vezavnimi mesti za ATP.

Vrednotili bomo preliminarno citotoksičnost testnih spojin na dveh celičnih linijah. S testiranjem citotoksičnosti zaviralcev DNA giraze B na celični liniji humanega hepatoma (Hep G2) bomo vrednotili toksičnost potencialnih protibakterijskih učinkovin na evkariontskih celicah. Na tej celični liniji bomo testirali tudi aktivnost zaviralcev človeških topoizomeraz tipa II kot potencialnih protitumornih učinkovin. Varnost in ustreznost spojin bomo ovrednotili tudi s testiranjem na nerakavi celični liniji endotelijskih celic popkovnične vene (HUVEC). Načrt eksperimentalnega dela prikazuje spodnja shema (Slika 3).



Slika 3: Shema eksperimentalnega dela

Postavili smo delovni hipotezi:

- Selektivni zaviralci DNA giraze B na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC ne bodo izkazovali citotoksičnosti.
- Zaviralci človeške topoizomeraze II bodo citotoksični za rakavo celično linijo Hep G2, na celično linijo HUVEC pa ne bodo delovali citotoksično.

MATERIALI IN METODE

Materiali

Materiali in kemikalije, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu magistrske naloge, so predstavljeni v spodnjih preglednicah.

Preglednica II: Naprave in pripomočki, uporabljeni v magistrski nalogi

Naprava	Proizvajalec / model
aspirator	Integra Vacusafe
Pasteurjeve pipete	BRAND GMBH + CO KG
plastenke za gojenje celic, 75 cm ²	VWR
plastenke za gojenje celic, 25 cm ²	TPP
centrifuga	Tehtnica Centric 322A
pipete	Biohit in Eppendorf
multikanalna pipeta	BIOHIT e300
avtomatski pipetor	Integra PIPETBOY 2
invertni mikroskop	Olympus CKX41
inkubator	Sanyo MCO-18AIC
mikrotitrne ploščice	TPP
kadičke	
nastavki za pipete (tipsi)	Sartorius
serološke pipete	Corning inc., VWR
epice	BRAND GMBH + CO KG
centrifugirke, 15 in 50 mL	VWR
vibracijski stresalnik	Tehtnica Vibromix 10
brizge	HSW NORM-JECT®
igle	BRAUN
čitalec mikrotitrskih ploščic	Biotek Synergy HT
zamrzovalnik	BOSCH, Gorenje, SANYO
hladilnik	Gorenje, Candy
čase	SkyLab

Naprava	Proizvajalec / model
namizna centrifuga	neolab Mini Centrifuge GMC-060
krioviale	
hemocitometer	Assistent Germany
števec za štetje celic	infactory
LAF komora	Iskra PIO

Preglednica III: Kemikalije, uporabljene v magistrski nalogi

Kemikalije	Proizvajalec / oznaka
etanol, 96 %	KEFO d. o. o. 133124
osnovno gojišče za gojenje celic	Sigma M4655, Sigma M5650
penicilin / streptomycin	Sigma Penicillin-Streptomycin P0781
fetalni goveji serum	Gibco Fetal Bovine Serum 10270-106
L-glutamin	Gibco L-Glutamine 200 mM 25030-081
tripsin	Gibco TrypLE™ Express
PBS	Gibco DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 14190-136
CellTiter 96® AQueuous One Solution (MTS)	Promega
tripan modro	Sigma-Aldrich Trypan blue solution T8154
DMSO	Merck

Testne spojine so bile sintetizirane v okviru raziskovalnega dela diplomantov in članov Katedre za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. Ker so še v fazi razvoja in niso patentirane, strukturnih formul nismo prikazali.

Preglednica IV: Spojine, uporabljene v testiranjih na celičnih linijah

Zaviralci DNA giraze B		
• spojina <u>1</u>	• spojina <u>10</u>	• spojina <u>18</u>
• spojina <u>2</u>	• spojina <u>11</u>	• spojina <u>19</u>
• spojina <u>3</u>	• spojina <u>12</u>	• spojina <u>20</u>

Zaviralci DNA giraze B

- spojina 4
- spojina 5
- spojina 6
- spojina 7
- spojina 8
- spojina 9
- spojina 13
- spojina 14
- spojina 15
- spojina 16
- spojina 17
- spojina 21
- spojina 22
- spojina 23
- spojina 24
- spojina 25
- spojina 26

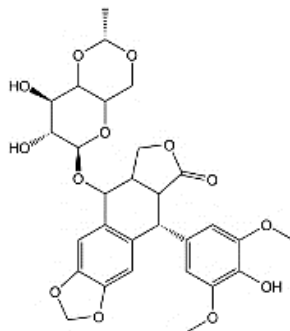
Zaviralci človeške topoizomeraze II

- spojina 27
- spojina 28
- spojina 29
- spojina 30
- spojina 31

Zaviralec izlivnih črpalk

- spojina 32

Pozitivna kontrola (etopozid)



Preglednica V: Celični liniji, uporabljeni v magistrski nalogi

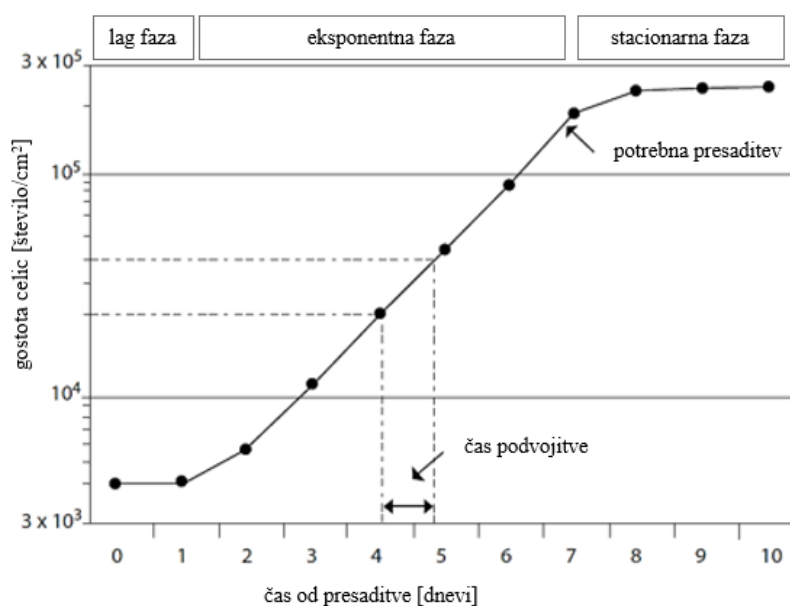
celična linija	oznaka	najnižja pasaža	izvor
Hep G2	8065	2	ATCC
HUVEC	CRL-1730	8	ATCC

Metode

Vzpostavljanje celične linije in gojenje celic

Celična rast

Celične kulture rastejo po značilnem vzorcu. Prva stopnja rasti je faza lag, v kateri celična rast poteka počasi, celice se privajajo na novo okolje in pripravljajo na hitrejšo rast in na delitev. Ta eksponentno poteka v fazi log, oziroma eksponentni fazi. Ko celice v pritrjenih celičnih kulturah zasedejo ves substrat in nimajo več prostora za širjenje, celična proliferacija upade. Da jih ohranimo pri optimalni gostoti in da imajo dovolj hranil za rast, celice presajamo (pasažiramo) in kulturi porabljeno gojišče menjamo s svežim. Celice presajamo v log fazi, preden dosežejo konfluenco (običajno, ko prerastejo 80 % površine gojišča). To ugotovimo z opazovanjem pod invertnim mikroskopom. Če celicam ne zagotovimo dovolj prostora in hranil, vstopijo v stacionarno fazo, oziroma fazo platoja. Število aktivnih celic upade na 10 % ali manj in celice so najbolj občutljive na poškodbe. Zadnja stopnja je faza propada, v kateri prevladuje celična smrt. Je naravna pot celičnega cikla in ni povzročena z zmanjšanjem količine hranil (29; 30). Sigmoidna krivulja celične rasti je prikazana na spodnjem grafu (Slika 4).



Slika 4: Faze celične rasti (prirejeno po (30))

Delo v celičnem laboratoriju

Gojenje celic, priprava spojin in priprava testnih ploščic so potekali v aseptičnih pogojih. Pred začetkom katerega koli rokovanja s celicami smo razkužili rokavice in s 70 % etanolom obrisali površine v LAF komori. Pred vnosom materiala v komoro smo le-tega prav tako obrisali s 70 % etanolom. Skrb za čistočo v laboratoriju in s tem manjšo možnost kontaminacije smo vzdrževali tudi z vsakotedenskim generalnim čiščenjem, osebno varovalno opremo (halja, rokavice, posebna obutev) in uporabo UV lučke v komori vsaj 15 minut pred začetkom in po koncu dela v komori. Po končanem delu smo kontaminirano embalažo in potrošni material odvrgli v ustrezne zabojnike. Odpadna gojišča in kemikalije smo odsesali z aspiratorjem v zbirno posodo.

Celična linija Hep G2

Hep G2 sestavljajo celice človeškega hepatoma in je najpogosteje uporabljena in preučevana celična linija človeških tumorskih celic. Potrebna je pozornost pri obdelavi rezultatov testiranja, saj v standardnih pogojih gojenja v manjši meri izražajo CYP encime. Celično linijo je leta 1972 prvi vzgojil D. P. Aden s sodelavci. Hepatociti imajo pomembno vlogo pri metabolizmu ksenobiotikov. Celice Hep G2 so primerne za teste genotoksičnosti in metabolizma ksenobiotikov, saj, za razliko od primarnih kultur hepatocitov, ohranjajo številne metabolne funkcije (Preglednica VI), zlasti izločanje velikih plazemskih proteinov (31).

Preglednica VI: Metabolični encimi, ki jih izločajo celice Hep G2 (povzeto po (32))

Encimi I. faze	Encimi II. faze
CYP1A1	glutation S-transferaza
CYP1A2	N-acetiltransferaza
CYP2B	sulfottransferaza
CYP2E1	uridin glukuronisiltransferaza

Celice človeškega hepatoma, na katerih smo izvajali testiranja, izvirajo od 15-letnega kavkazijca. Podarila nam jih je Katedra za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo

Univerze v Ljubljani. Prejeli smo drugo pasažo celic. Zanje je značilen aneuploiden kariotip, imajo 50–60 kromosomov, najpogosteje 55. Njihov delitveni čas znaša okoli 48 ur. Po morfologiji so to epiteljske celice, rastejo v pritrjeni celični kulturi. Za gojenje in testiranje so primerne do 15. pasaže, po daljšem času se lahko zmanjša nivo izražanja metabolnih encimov in celice spremenijo morfologijo. Celice izražajo aktivnost 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaze in jetrne triglicerid lipaze. Nekoliko zmanjšano je izražanje apo-I mRNA in povečano izražanje katalazne mRNA (33; 34).

Gojišče

Za gojenje celic Hep G2 smo uporabili *Minimum Essential Medium Eagle* (MEME) z dodanimi antibiotiki (penicilin, streptomycin), L-glutaminom in fetalnim govejim serumom. MEME je iznašel Harry Eagle in je med najpogosteje uporabljenimi sintetičnimi gojišči za gojenje celičnih kultur. Podrobnejša sestava je opisana v spodnji preglednici.

Preglednica VII: Sestava celičnega gojišča

Komponenta	Količina	Vloga
MEME	500 mL	osnovno gojišče
FBS	50 mL	dodatek za rast celic
L-glutamin	2 mM	esencialna aminokislina, podpira celično rast
penicilin, streptomycin	5 mL	zmanjšata možnost mikrobne kontaminacije celic

L-glutamin je esencialna aminokislina, ki jo celice potrebujejo za izgradnjo proteinov, v metabolizmu nukleinskih kislin in kot vir energije. Če ga dodamo več, kot je potrebno, se pri njegovi razgradnji tvori preveč amoniaka, ki lahko negativno vpliva na rast celic. Za profilakso pred okužbami smo v gojišče dodali mešanico streptomicina in penicilina. Gojišču smo dodali še živalski serum, in sicer FBS – fetalni goveji serum, ki je vir aminokislin, proteinov, vitaminov (zlasti lipidotopnih), ogljikovih hidratov, maščob,

hormonov, rastnih faktorjev, adhezijskih dejavnikov, mineralov in elementov v sledih. Serum služi tudi kot pufer, inaktivira proteolitične encime in gojišču poveča viskoznost, kar zmanjša strižne sile med pipetiranjem (30).

Gojišče je potrebno shranjevati v hladilniku, pri temperaturi 2–8°C. Ker temperature spremembe vplivajo na pH in s tem na kakovost gojišča, smo gojišče sprti alikvotirali v 50 mL centrifugirke. Pred vsako uporabo smo centrifugirko 15 minut prej vzeli iz hladilnika in jo na vodni kopeli segreli na približno 37°C.

Odtaljevanje celic in nasaditev v gojišče

Celice so do odmrznitve shranjene v parni fazi tekočega dušika, pri temperaturah okoli –190°C. Po prejemu smo kriovialo 2 minuti segrevali na vodni kopeli pri 37°C. V LAF komori smo v 15 mL centrifugirko odpipetirali 8,5 mL predhodno na 37°C segretega gojišča. Vanjo smo prestavili vsebino krioviale (1 mL) in slednjo sprali še z 0,5 mL gojišča. V centrifugo smo dali ustrezno protiutež in celice 4 minute centrifugirali pri 1000 obratih na minuto, da smo odstranili krioprotektant DMSO. Na dnu centrifugirke se je pojavil pelet celic. Z aspiratorjem smo odstranili supernatant in s pomočjo pipete celični pelet resuspendirali v 1 mL gojišča. Plastenko za gojenje celic smo ustrezno označili (celična linija, ime, datum, pasaža), vanjo dali 10 mL svežega gojišča in dodali še resuspendirane celice. Plastenko smo zaprli in z njo previdno krožili po podlagi, da so se celice enakomerno razporedile po vsej površini. To smo preverili z opazovanjem pod mikroskopom. Celice v gojišču smo prestavili v inkubator, kjer so rasle pri temperaturi 37°C in 5 % vsebnosti CO₂.

Menjava gojišča

V prvih 24 urah po presaditvi je celična rast najbolj intenzivna. Celice porabijo največ hranil in ustvarijo največ odpadnih snovi, zato smo naslednji dan po nasaditvi, oziroma presaditvi celic, gojišče v celoti zamenjali s svežim. Nato smo gojišče menjali na 48–72 ur. Svežino, oziroma ustreznost gojišča, lahko delno ugotovimo tudi iz njegove barve. Ena izmed njegovih sestavin je indikator fenol rdeče, ki ob spremembi pH menja barvo. Bolj svež alikvot gojišča ima oranžen odtenek, starejši pa rožnatega. Produkti celičnega metabolizma (med drugim nastaja mlečna kislina) nižajo pH gojišča, sprememba pH pa je

odvisna tudi od gostote celic, saj pri višji koncentraciji hitreje porabijo hranila. Večina sesalskih celičnih linij raste pri pH okoli 7,4, zato je spremljanje pH vrednosti koristno za optimalno rast (35).

Gojenje celic

Celice smo presajali, ko so prerasle vsaj 80 % podlage platenke za gojenje. Po začetni fazi po odmrznitvi smo celice presajali dvakrat tedensko, v razmerju 1:3. Celicam smo z aspiratorjem odstranili gojišče in površino platenke, kjer so celice rasle, sprali s 5 mL fosfatnega pufru (PBS). Odstranili smo pufer, površino gojišča prekrili z 1 mL tripsina za cepitev adhezijskih molekul in celice inkubirali 5 minut pri 37°C. Tripsin je toksičen za celice, zato jih ne smemo predolgo izpostavljati temu reagentu. Inaktivirali smo ga z dodatkom 9 mL gojišča, s katerim smo spirali notranjost platenke za gojenje. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in jo 4 minute centrifugirali pri 1000 obratih na minuto. Nastal je pelet celic, ki smo mu odstranili supernatant. Celice smo s potegi skozi iglo v brizgo resuspendirali v 1–4 mL gojišča. V epico smo pripravili 40 µL barvila tripan modro in dodali 40 µL celične suspenzije. Vsebino epice smo premešali in jo uporabili za štetje celic, opisano v nadaljevanju.

Po štetju smo preračunali ustrezen volumen celične suspenzije, potreben za novo pasažo. V platenko za gojenje celic smo prenesli 10 mL gojišča in dodali ustrezen volumen celične suspenzije. Posodo smo previdno (da ne bi tvorili preveč skupkov celic) premešali na podlagi, preverili pod mikroskopom in prestavili v inkubator, kjer so celice rasle v okolju s temperaturo 37°C in 5 % vsebnostjo CO₂.

Štetje celic

Celice smo obarvali z barvilom, da smo ugotovili njihovo viabilnost in izračunali ustrezen volumen celične suspenzije za zeleno koncentracijo nasajanja. Tripan modro je vitalno barvilo in prodre v mrtve celice. Žive celice ostanejo neobarvane in jih vidimo kot svetle pike (Slika 5). 20 µL mešanice celične suspenzije in tripan modrega v razmerju 1:1 smo nanegli v komorico hemocitometra. Pod mikroskopom je vidna mreža; gostejše črte ločujejo 4 kvadratke s površino 1 mm², v katerih smo prešteli žive celice. Zunanji robovi

kvadratkov so odebeljeni. Izbrali smo si 2 robova, po katerih smo tudi šteli celice, celic na drugih dveh robovih pa nismo upoštevali.

Pripravili smo si izračun:

preštete celice	
A	B
C	D

povprečje prešteti celic na en kvadratarek:

$$x_{povpr.} = \frac{A + B + C + D}{4}$$

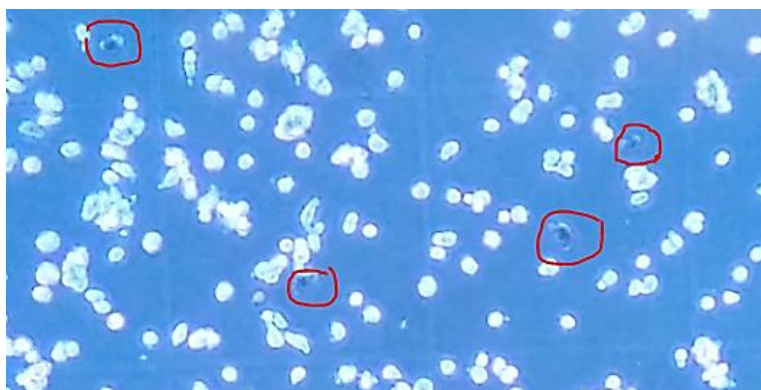
dobljeno povprečje smo množili z 2, ker smo uporabili enaka volumna barvila in celične suspenzije (faktor redčenja 2):

$$2x_{povpr.} = 2 \frac{A + B + C + D}{4}$$

rezultat smo množili z 1×10^4 , ker je volumen komorice $10 \mu\text{L}$, nas pa je zanimalo število celic v 1 mL:

$$c = 2 \frac{A + B + C + D}{4} \times 10^4 = \text{št. celic/mL}$$

Če nas je zanimalo dejansko število celic v celotnem peletu, smo dobljeno koncentracijo množili z volumnom celične suspenzije pred centrifugiranjem.



Slika 5: Pogled skozi mikroskop - štetje celic po dodatku barvila tripan modro. Žive celice svetijo, rdeče obkrožene so mrtve in je vanje prodrlo barvilo

Zamrzovanje celic

Da bi zagotovili zadostno zalogo celic z nizko pasažo za primer izgube celic med gojenjem zaradi kontaminacije ali drugega neželenega dogodka, smo celice zamrzili. V postopku presajanja smo po centrifugiranju prešteli celice in preračunali, kolikšen volumen celične suspenzije potrebujemo za presaditev in kakšnega za zamrznitev celic. V kriovialo smo dali 2–3 milijone celic. Za zamrznitev so bile primerne celice v log fazi rasti, ki so imele več kot 90-odstotno viabilnost in niso kazale znakov mikrobne kontaminacije (35).

Kriovialo smo ustrezno označili (celična linija, datum, pasaža, ime, število celic). Celični suspenziji smo za zaščito pred tvorbo ledenih kristalov dodali DMSO s končno koncentracijo 5 %. Ker smo v kriovialo dali 1 mL celične suspenzije, smo dodali 50 μ L DMSO. Napako smo zanemarili. Celice smo začasno shranili v zamrzovalniku pri temperaturi okoli -80°C .

Celična linija HUVEC

Celično linijo HUVEC sestavljajo endotelijske celice človeške popkovnične vene. Celična kultura je adherentna, celice rastejo v enem sloju. Pri njihovem gojenju moramo biti pozorni, da ne dosežejo prevelike gostote, saj zaradi kontaktne inhibicije odmrejo. HUVEC linija je kontinuirana, a ni rakava. Pričakovana življenjska doba celic je 50–60 presaditev. CRL-1730 je počasi rastoča celična linija s podvojitveno dobo 5–6 dni. Pri višjih gostotah se lahko pojavijo plavajoče celice, ki jih je s centrifugiranjem mogoče poloviti in nato nasaditi nazaj na gojišče. Da bi se izognili velikemu številu takih celic, jih presajamo, ko dosežejo 80–90 % konfluenco (36). Celice izražajo faktor VIII. Primerne so za študije normalne, abnormalne in tumorske angiogeneze, vnetja, zapletov, povezanih s krvno-žilnimi boleznimi, za preučevanje vpliva oksidativnega stresa in hipoksije ter drugo (37).

Celice HUVEC v 8. pasaži nam je poklonila Katedra za farmaceutsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Gojišče

Sestava gojišča za gojenje celične linije HUVEC je enaka kot pri celični liniji Hep G2. Uporabili smo osnovno gojišče MEME in dodali enake volumne enakih dodatkov za optimalno celično rast.

Odtaljevanje celic in nasaditev v gojišče

Po prejemu smo celice 1 minuto segrevali v vodni kopeli s temperaturo 37°C, skoraj do odtalitve. Kriovialo smo razkužili s 70 % etanolom in jo prenesli v laminarij. V 25 cm² plastenke za gojenje celic smo odpipetirali po 5 mL gojišča, nato pa v vsako dodali del vsebine krioviale. Celice smo inkubirali 24 ur pri pogojih $T = 37^{\circ}\text{C}$ in $w_{(\text{CO}_2)} = 5\%$.

Menjava gojišča

24 ur po nasaditvi v platenko za gojenje smo celicam odstranili gojišče in ga zamenjati s svežim, da smo odstranili krioprotektant DMSO in celicam zagotovili dovolj hranil za rast. Gojišče smo nato menjali na 48 ur. V primeru, da smo celice pustili preko vikenda ali ko so prerasle več kot 60 % podlage, smo jim po odstranitvi starega dodali dvojno količino svežega gojišča (38).

Gojenje celic

Celice smo presajali, ko prerasle 90 % podlage gojišča, običajno dvakrat tedensko. Za gojenje smo uporabili plastenke za gojenje s površino 75 cm². Celicam smo z aspiratorjem odstranili gojišče in površino plastenke, kjer so rasle, sprali s 5 mL fosfatnega pufera (PBS). Odstranili smo pufer, podlago gojišča prekrili z 2 mL tripsina in platenko pod mikroskopom tresli 2 minuti, nato 2 minuti inkubirali pri 37°C in 5 % vsebnostjo CO₂ in nazadnje 2 minuti stresali pod mikroskopom, dokler se celice niso v večini odlepile. Dodali smo 5–10 mL gojišča, z njim nekajkrat sprali platenko za gojenje, celično suspenzijo prenesli v centrifugirko in jo 10 minut centrifugirali pri 1200 obratih na minuto. Med

centrifugiranjem se je tvoril pelet celic, ki smo mu odstranili supernatant in ga resuspendirali v 2–4 mL svežega gojišča, odvisno od velikosti peleta in posledično števila celic.

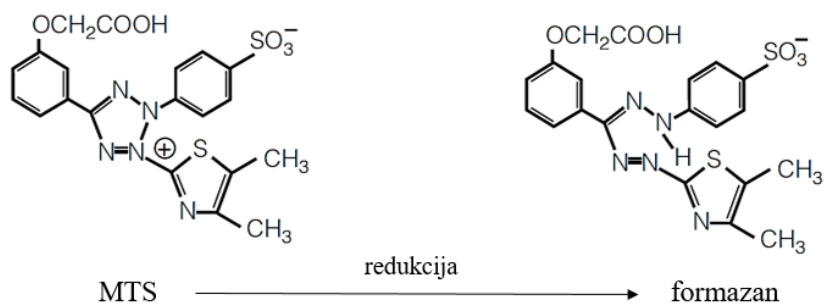
Prešteli smo celice in preračunali ustrezen volumen celične suspenzije, potreben za novo pasažo. V plastenko za gojenje celic smo dali 10 mL gojišča in dodali ustrezen volumen celične suspenzije. Plastenko smo premešali na podlagi, vsebino preverili pod mikroskopom in jo prestavili v inkubator, kjer so celice rasle v okolju s temperaturo 37°C in 5 % vsebnostjo CO₂.

Zamrzovanje celic

Zamrzovanje je potekalo po enakem postopku kot pri celični liniji Hep G2. 1 mL celic s koncentracijo med 2 in 3 x 10⁶ celic/mL smo dodali 50 µL DMSO in celice zamrznili.

Merjenje celične viabilnosti s testom MTS

Aktivnost zaviralcev topoizomeraz smo merili z ugotavljanjem odstotka viabilnosti celic. Izvedli smo kolorimetrično metodo, pri kateri smo uporabili CellTiter 96[®] AQueous One Solution in z meritvijo absorbance določili odstotek živih celic. Raztopina vsebuje tetrazolijevo komponento (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevo sol; dalje MTS) in fenazin etosulfat (PES), ki je reagent za prenos elektronov in stabilizator raztopine. MTS mitohondriji reducirajo v obarvan produkt formazan, ki je topen v celičnem gojišču (39). Reakcija, ki poteče, je prikazana na Sliki 6. Pri rokovanju z MTS moramo biti previdni, da ga ne izpostavimo svetlobi, sicer se razgradi. Iz zamrzovalnika smo ga prenašali ovitega v aluminijsko folijo, ko smo ga dodajali celicam, smo delali v LAF komori z ugasnjeno lučjo, ko smo prenašali mikrotitrsko ploščico do merilne naprave, smo jo zavili v aluminijsko folijo.



Slika 6: Prikaz pretvorbe MTS v obarvan produkt formazan (prirejeno po (39))

Postopek testiranja

Pri obeh celičnih linijah smo se držali enakih postopkov, ki so opisani v nadaljevanju. Prvi dan testiranja smo na mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami nasadili 100 μL celične suspenzije s koncentracijo 2×10^4 celic/mL, tako da je bilo v vsaki vdolbinici okvirno 2000 celic. Glede na načrt posameznega testiranja smo določili vdolbinice, v katere smo nasadili celice, in vdolbinice za slepo raztopino, kamor smo odpipetirali le gojišče. Nadalje smo po 24 urah inkubiranja pri 37°C in 5 % CO_2 dodali v izbrane vdolbinice po 50 μL zaviralcev topoizomeraz, pozitivne kontrole (etopozid), kontrole topila (DMSO) ali gojišča in po 72 urah inkubiranja dodali 10 μL raztopine CellTiter 96[®] AQueous One. Po dodatku smo celice inkubirali tri ure v inkubatorju pri 37°C in 5 % CO_2 , nato pa izvedli meritev. Absorbanco smo pomerili z napravo Biotek Synergy HT in s programom Gen5. Merili smo pri valovni dolžini 492 nm. Količina formazana je pri tej valovni dolžini sorazmerna številu živih celic. Načrt testiranja je predstavljen v spodnji preglednici.

Preglednica VIII: Shema nasaditve na testno ploščico za izvedbo presejalnega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μL celic + 50 μL gojišča											
B	100 μL celic + 50 μL spojine 1			100 μL celic + 50 μL spojine 7			100 μL celic + 50 μL spojine 13			slepa (150 μL gojišča)		
C	100 μL celic + 50 μL spojine 2			100 μL celic + 50 μL spojine 8			100 μL celic + 50 μL spojine 14					
D	100 μL celic + 50 μL spojine 3			100 μL celic + 50 μL spojine 9			100 μL celic + 50 μL etopozida ₁₀₀					
E	100 μL celic + 50 μL spojine 4			100 μL celic + 50 μL spojine 10			100 μL celic + 50 μL etopozida ₅₀					
F	100 μL celic + 50 μL spojine 5			100 μL celic + 50 μL spojine 11			100 μL celic + 50 μL DMSO					
G	100 μL celic + 50 μL spojine 6			100 μL celic + 50 μL spojine 12								
H	100 μL celic + 50 μL gojišča											

Iz primera načrta je razvidno, da smo po 100 μL celic vnesli v vse vdolbinice, razen v vdolbinice B11 – G11, kamor smo za kontrolo vnesli po 100 μL gojišča brez celic. Zadostovalo bi, da bi celice vnesli le v vdolbinice, ki smo jim nameravali dodati testne spojine, etopozid in DMSO (modro obarvano območje). Naslednji dan smo v modro obarvane vdolbinice vnesli po 50 μL testnih spojin, pozitivne kontrole ali kontrole topila, v ostale pa po 50 μL gojišča. Pred merjenjem absorbance smo v modro obarvane vdolbinice in vdolbinice z oznako »slepa« vnesli še po 10 μL reagenta MTS. Vsako spojino, oziroma koncentracijo določene spojine, smo na mikrotitrsko ploščico nanegli v triplicatih.

Izvedli smo tri vrste testov: test ustreznosti, s katerim smo ugotovili, po kolikšnem času je optimalno pomeriti vpliv spojin na viabilnost celic, presejalni test in test za ugotavljanje IC_{50} aktivnih spojin. Spojine, ki so pri presejalnem testu izkazale aktivnost, smo nadalje testirali v širšem koncentracijskem območju, in sicer v koncentracijah 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM in 75 μM . S pomočjo odstotka viabilnosti, ki smo ga izračunali v programu Microsoft Excel, smo v programu GraphPad Prism 5.0 grafično predstavili rezultate, program pa nam je izračunal tudi pripadajoče vrednosti IC_{50} .

Priprava celic

Za nanos na mikrotitrsko ploščico in izvedbo kolorimetričnega testa smo morali pripraviti celice v koncentraciji 2×10^4 celic na mililiter. V postopku presajanja smo po centrifugiranju prešteli celice in izračunali, kolikšen volumen celične suspenzije moramo dodati gojišču, da zadostimo temu pogoju. V veliko centrifugirko smo prenesli ustrezni količini gojišča in celične suspenzije, premešali, vsebino prelili v kadičko in celice z multikanalno pipeto nanegli v izbrane vdolbinice mikrotitrsko ploščice, v vsako vdolbinico po 100 μL .

Priprava raztopin spojin v ustreznih koncentracijah

Testne spojine in pozitivno kontrolo smo odtalili, premešali z vibracijskim stresalnikom in kratek čas centrifugirali v namizni centrifugi, nato pa prenesli ustrezno količino alikvotov za pripravo ostalih koncentracij v male epice. Raztopine za testiranje smo pripravljali v komori LAF. Pred vnosom v komoro smo ves material in embalažo kemikalij

očistili s 70 % etanolom. Na stojalo smo pripravili in označili epice in v njih pripravili raztopine za testiranje.

Za pripravo spojin v različnih koncentracijah smo iz 100 % DMSO in gojišča pripravili raztopini z 1,5 % in 2,25 % koncentracijo DMSO. Končna koncentracija vseh raztopin (DMSO in spojini) v vdolbinicah ploščice je bila trikrat manjša od pripravljene koncentracije, saj smo 50 μL raztopine spojine nanесли v vdolbinico, ki je že vsebovala 100 μL celične suspenzije. Če smo 50 μL spojine, pripravljene v koncentraciji 300 μM vnesli v vdolbinico s 100 μL vsebine, je bila končna koncentracija spojine v vdolbinici 100 μM . V nadaljevanju je pri opisu priprave spojin navedena koncentracija spojin pred nanosom na ploščico.

Za pozitivno kontrolo smo pripravili etopozid v koncentracijah 300 μM in 150 μM , ki smo ga pripravili z redčenjem iz 100 mM spojine. 100 mM etopozid smo redčili z 1,5 % DMSO, da smo dobili 20 mM spojino, ki smo jo redčili z ustreznim volumnom gojišča na 300 μM , iz te raztopine pa smo z dodatkom ustrezne količine 1,5 % DMSO pripravili etopozid v 150 μM koncentraciji.

Za presejalni test smo iz 10 mM raztopin z redčenjem v ustreznem volumnu gojišča pripravili raztopine s 150 μM koncentracijo. Pri testiranju odnosa med koncentracijo spojine in njenim učinkom smo z ustreznim redčenjem z gojiščem iz 10 mM spojin najprej pripravili 225 μM spojine, nato pa jih z nadaljnjim redčenjem pripravili še v 150, 90, 30, 3 in 0,3 μM koncentracijah. Pri tem smo vsako nadaljnje redčenje izvedli tako, da smo zmešali ustreznna volumna raztopine iz predhodne epice in 2,25 % DMSO. Primer načrta za pripravo testnih spojin je prikazan v Preglednici IX.

Preglednica IX: Primer priprave testne spojine v različnih koncentracijah

	1. epica 225 μM		2. epica 150 μM	3. epica 90 μM	4. epica 30 μM	5. epica 3 μM	6. epica 0,3 μM
10 mM spojina	12,6 μL	predhodna epica	320 μL	255 μL	100 μL	30 μL	30 μL
gojišče	560 μL	2,25 % DMSO	160 μL	170 μL	200 μL	270 μL	270 μL

V preglednici so navedene koncentracije pripravljenih spojin pred nanosom na ploščico, v posameznih vdolbinicah mikrotitske ploščice so bile koncentracije trikrat manjše.

Volumen raztopine spojine v posamezni epici mora biti dovolj velik, da spojino na ploščico nanesemo v triplikatih.

Analiza rezultatov

Da bi ugotovili vpliv testiranih spojin na metabolno aktivnost celic, smo od absorbance vzorcev z dodatkom zaviralcev topoizomeraz odšteli absorbance slepe raztopine in rezultat normalizirali na DMSO ustrezne koncentracije.

$$\% \text{ viabilnosti} = \frac{(A_{vz} - A_{sl})_{povpr.}}{(A_{DMSO} - A_{sl})_{povpr.}} \times 100 \%$$

V enačbi A_{vz} označuje absorbanco, izmerjeno v vdolbinici s spojinami in A_{sl} absorbanco v vdolbinicah, ki vsebujejo le gojišče brez celic (slepa raztopina). Z A_{DMSO} smo označili absorbanco v vdolbinicah z 0,5 % ali 0,75 % DMSO. Za izračun smo pri posamezni spojini uporabili vrednost absorbance za tisti DMSO, ki smo ga uporabili za njeno pripravo.

Rezultate smo grafično prikazali s pomočjo programa GraphPad Prism 5.0. Aktivnim spojinam smo želeli določiti tudi IC_{50} . V program smo v tabelo vnesli logaritme koncentracij testnih spojin in odstotke viabilnosti, ki smo jih izračunali v programu Excel. Izbrali smo model z variabilnim naklonom (variable slope). Program je izvedel linearno regresijo in izrisal krivuljo po enačbi:

$$y = bottom + (top - bottom) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - x) * HillSlope)})$$

pri čemer sta top in bottom y skrajni vrednosti zgornjega in spodnjega platoja krivulje (v našem primeru so na ordinatni osi odstotki celične viabilnosti), HillSlope pa predstavlja vrednost Hillovega koeficienta, ki označuje kooperativnost vezave.

Enačba za izračun IC_{50} se glasi:

$$IC_{50} = 10^{\left(\frac{1}{HillSlope} \times \log \left(\frac{top - bottom}{y - bottom} - 1\right) + x\right)}$$

Dobljene IC₅₀, ki pomenijo koncentracijo spojine, ki izzove odziv na polovici med največjim odzivom encima in med najbolj zavrtim odzivom encima, smo ovrednotili glede na posamezno spojino in razpršenost rezultatov. Ker smo izvajali le eno ali dve biološki ponovitvi testiranja, so rezultati v nalogi zgolj okvirna orientacijska napoved.

Rezultate presejalnih testov smo statistično ovrednotili z dvostranskim t-testom, s katerim smo opredelili, kdaj pride do signifikatno znižane viabilnosti celic. Statistično analizo smo izvedli v programu Microsoft Excel, in sicer smo uporabili dvostranski t-test s formulo:

t. test (niz podatkov₁; niz podatkov₂; repi; vrsta testa)

pri čemer smo kot prvi niz podatkov označili vrstice z izračunanimi normaliziranimi vrednostmi posamezne spojine (% viabilnosti), kot drugi niz podatkov smo označili vrstice z izračunanimi normaliziranimi vrednostmi uporabljenega topila, izbrali tip testa z dvema repoma (številka 2, dvostranski test) in nazadnje označili, da želimo izvesti test s kodo 3, ki pomeni test za dva vzorca z neenako varianco (heteroskedatično). Dobljena p-vrednost je kazala na statistično značilno spremembo viabilnosti celic, če je bila manjša od 0,05.

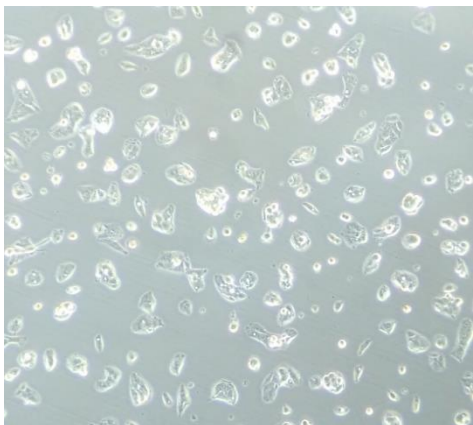
REZULTATI IN RAZPRAVA

Vzpostavljanje celičnih linij

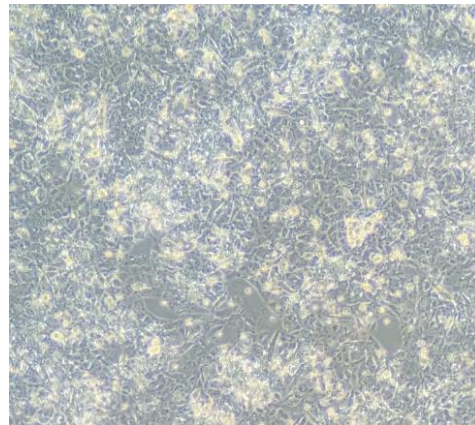
Vzpostavljanje celične linije Hep G2

Po začetni počasnejši rasti po odmrznitvi in prvi nasaditvi so celice Hep G2 rasle precej hitro in v velikem številu. Celice smo presajali, ko so dosegle okoli 80 % konfluente, običajno so jo dosegle v 48–72 urah. Preizkusili smo več razmerij presajanja celic, in sicer 1:6 s presajanjem enkrat tedensko in 1:3 s presajanjem dvakrat tedensko. Izkazalo se je, da je presajanje v razmerju 1:3 boljše od enkrat tedenskega presajanja v razmerju 1:6, saj so v drugem primeru nekatere celice razvile rjava jedra.

Celice Hep G2 se močno pritrdijo na podlago gojišča. Ker rastejo v skupkih, jih po dodatku tripsina ni priporočljivo stresati, saj bi se tvorili dodatni agregati. Ugotovili smo, da povečanje količine tripsina z 1 mL na 2 mL ne pripomore bistveno k boljši odlepitvi celic, temveč je bolje uporabiti le 1 mL tripsina in podaljšati čas inkubacije z začetnih 3 na 5 minut. Pazili smo, da celic nismo predolgo izpostavljali tripsinu, saj bi po približno 10 minutah lahko pomrle. Po kemičnem odlepljanju smo za inaktivacijo toksičnega tripsina v platenko dodali 10 mL gojišča, s katerim smo večkrat sprali podlago platenke za gojenje in tako z mehanskim odlepljanjem pridobili več celic. Ko smo vsebino platenke prenesli v centrifugirko, smo platenko opazovali pod mikroskopom. Če je v njej ostalo še več kot 20 % celic, smo ponovili mehansko odlepljanje z manjšo količino gojišča in suspenzijo prenesli v isto centrifugirko. Po centrifugiranju je vedno nastal lepo viden, bel, kompakten pelet celic.



Slika 7: Celice Hep G2 v prvih 24 h po nasaditvi na gojišče



Slika 8: Celice Hep G2, ko prerastejo > 80 % podlage. Rast poteka v skupkih in več plasteh

Da bi pri presajanju dosegli lepšo razporeditev celic, zmanjšali nastanek skupkov celic ter si olajšali štetje v hemocitometru, smo si pomagali s potegi skozi iglo v sterilno brizgo. Če smo izpustili korak z iglo, smo pri opazovanjem pod mikroskopom po obarvanju s tripan modrim v hemocitometru videli skupke namesto posamičnih celic in štetje ni bilo dovolj natančno. Celice Hep G2 rastejo tudi v plasteh (Slika 8) in z ugibanjem števila celic bi lahko dobili povsem napačne rezultate in posledično na testne ploščice nasadili celice v neprimerni koncentraciji.

Z iglo smo si pomagali tudi pri nasaditvi celic v novo platenko s svežim gojiščem. Vsebinsko epice smo ponovno premešali z nekaj potegi skozi iglo, nato pa s pipeto odmerili in prenesli ustrezn volumen celic v gojišče. Vsebinsko platenke za gojenje smo premešali še nekaj potegi skozi iglo in celice so se pri nasaditvi lepše in enakomernejše razporedile po podlagi (Slika 7).

Vzpostavljanje celične linije HUVEC

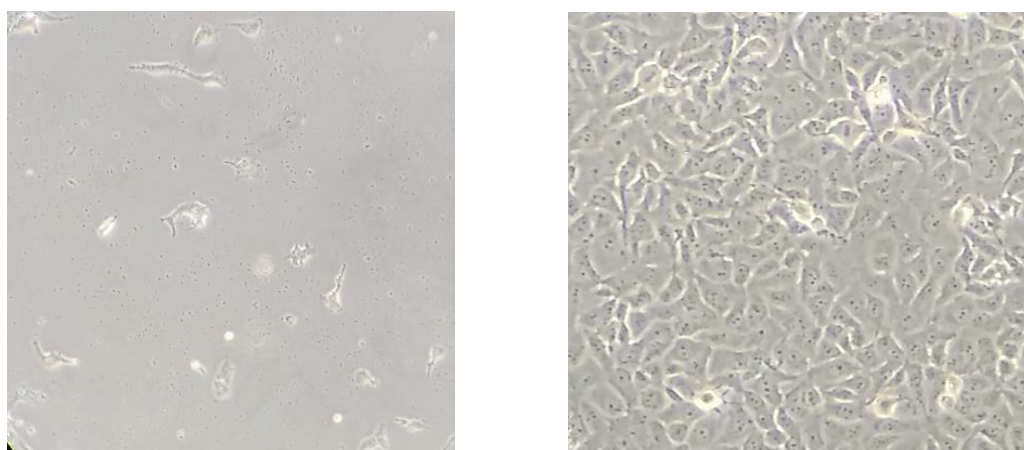
Za gojenje smo prejeli kriovialo s celicami, zamrznjenimi v 8. pasaži. Za nasajanje smo izbrali platenke z manjšim volumnom, 25 mL, in jim dodali po 5 mL gojišča. Ker so celice po odtalitvi bolj občutljive na centrifugiranje kot na DMSO in ker je količina DMSO po nasaditvi v platenke za gojenje celic z gojiščem zanemarljiva, celic po odtalitvi nismo centrifugirali. Krioprotektant DMSO je za odmrznjene celice toksičen, a v postopku zamrzovanja je bilo celicam dodanih le 5 % DMSO. 1 mL celic v gojišču z DMSO smo

razdelili v štiri 25 cm² plastenke za gojenje, ki so vsebovale po 5 mL gojišča, s čimer smo že tako majhno količino DMSO precej razredčili in s tem celicam povzročili manj stresa, kot bi ga s centrifugiranjem. Po 24 urah smo z menjavo celotnega gojišča odstranili vse ostanke DMSO. Ko smo vzgojili zadostno število celic, smo jih presajali v večje plastenke za gojenje s površino 75 cm².

Plavajočih celic, ki se običajno pojavijo, ko celice prerastejo več kot 60 % podlage, je bilo v primerjavi s pritrjenimi celicami zanemarljivo malo, zato jih pred presajanjem ni bilo potrebno s centrifugiranjem nasajati nazaj na gojišče.

V prvih dveh tednih gojenja po centrifugiranju celice niso tvorile vidnega peleta, zato nismo odesali vsega gojišča, temveč smo v centrifugirki pustili 0,5–1 mL vsebine in nadaljevali po enakem protokolu, kot če bi se tvoril pelet.

Za odlepljanje celic smo v malih plastenkah za gojenje uporabili 1 mL tripsina, v velikih pa smo dobili boljše rezultate, če smo njegovo količino povečali na 2 mL. Za odlepitev celic je bilo potrebno intenzivno stresanje plastenke s celično kulturo in dodanim tripsinom. Če smo platenko le enkrat stresali in nato njeno vsebino mehansko spirali z gojiščem, smo morali spiranje, oziroma tripsinizacijo, ponoviti vsaj dvakrat, da smo s podlage odlepili vsaj 80 % celic. Izkoristek odlepljanja smo povečali, ko smo celice po stresanju pod mikroskopom 2 minuti inkubirali pri 37°C in nato še 2 minuti stresali na sobni temperaturi. Po takem postopku je zadostovalo enkratno spiranje z gojiščem. Viabilnost celic, ki smo jo določili po barvanju s tripan modrim, je bila po obeh postopkih primerljiva. Morfologija celic je prikazana na Slikah 9 in 10.



Sliki 9 in 10: HUVEC celice nižje (levo) in visoke gostote rasti (desno). Vidne so vretenasto oblikovane celice z jedri

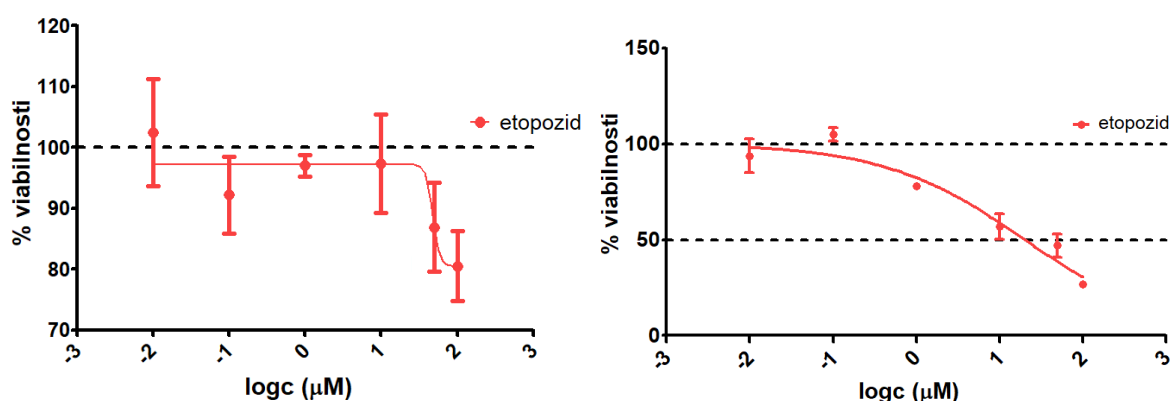
Priprava spojin

V postopku redčenja testnih spojin v gojišču ali DMSO ni prihajalo do vidnega obarjanja. Da bi zagotovili enakomerno raztapljanje, smo spojine pri pripravi premešali s potegi v pipeto in mešanjem na vibracijskem stresalniku. Če smo pripravili spojine za več testnih ploščic, smo vsebino epic tik pred nanosom na posamezno ploščico še enkrat premešali na vibracijskem stresalniku. Na videz so bile vse pripravljene spojine v vseh koncentracijah dobro topne.

Testiranje zaviralcev topoizomeraz na celični liniji Hep G2

Primerjava meritev po 24 in 72 urah

Najprej smo izvedli test, s katerim smo primerjali vrednosti absorbanc testnih spojin in kontrole 24 in 72 h po tretiranju celic. Pripravili smo dve testni ploščici, na kateri smo nanесли celice in po 24 h dodali testne spojine. Celicam prve ploščice smo dodali reagent MTS 24 h po dodatku testnih spojin in po treh urah pomerili absorbanco, drugi ploščici pa smo MTS dodali 72 h po dodatku spojin in po treh urah inkubiranja pomerili absorbanco. V programu Microsoft Excel smo iz absorbanc preračunali celično viabilnost. Na testno ploščico smo vselej nanесли pozitivno kontrolo etopozid v končnih koncentracijah 100, 50, 10, 1, 0,1 in 0,01 μM (Sliki 11 in 12).



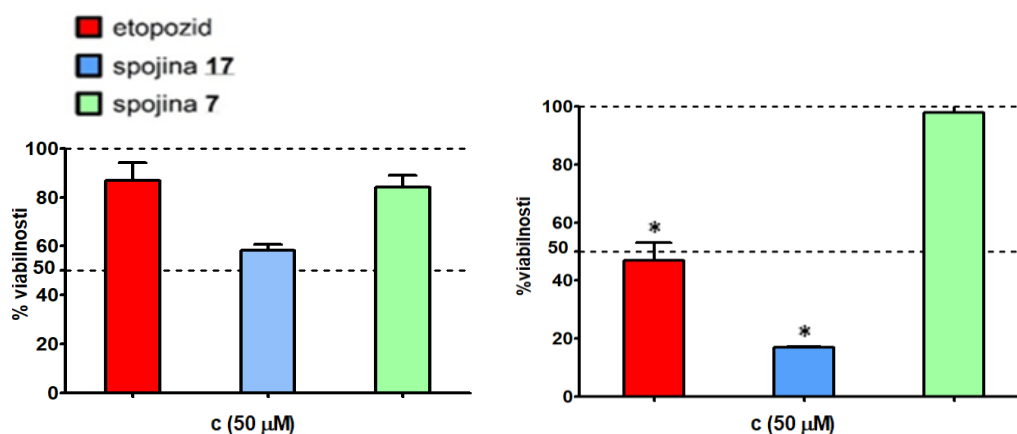
Sliki 11 in 12: Grafa spreminjanja % viabilnosti celic, tretiranih z etopozidom, z dodatkom MTS po 24 urah (levo) in po 72 urah (desno)

Testiranje smo izvedli s celicami v 7. pasaži. Odnos med logaritmom koncentracije spojine in odstotkom živih celic, oziroma citotoksičen učinek etopozida, po 24 urah ni bil jasno izražen, meritve so bile zelo variabilne. Desni graf prikazuje enakomernejši upad celičnega preživetja v skladu z višanjem koncentracije etopozida. Glede na rezultate prikazanih meritev pozitivne kontrole smo določili, da bomo reagent MTS celicam dodali 72 h po tretiranju z zaviralci topoizomeraz.

Presejalni testi

Da bi ugotovili, katera spojina pomembno vpliva na zmanjšanje celičnega preživetja, smo izvedli presejalne teste. Za aktivne spojine smo označili tiste, po dodatku katerih smo zaznali celično preživetje, nižje od 50 %. Koncentracija testiranih spojin je bila vselej 50 μ M. V vsakem presejalnem testiranju smo kot pozitivno kontrolo v najmanj 6 vdolbinic s celicami nanесли etopozid v koncentracijah 50 in 100 μ M. V nadaljevanju so grafično prikazani rezultati testiranja.

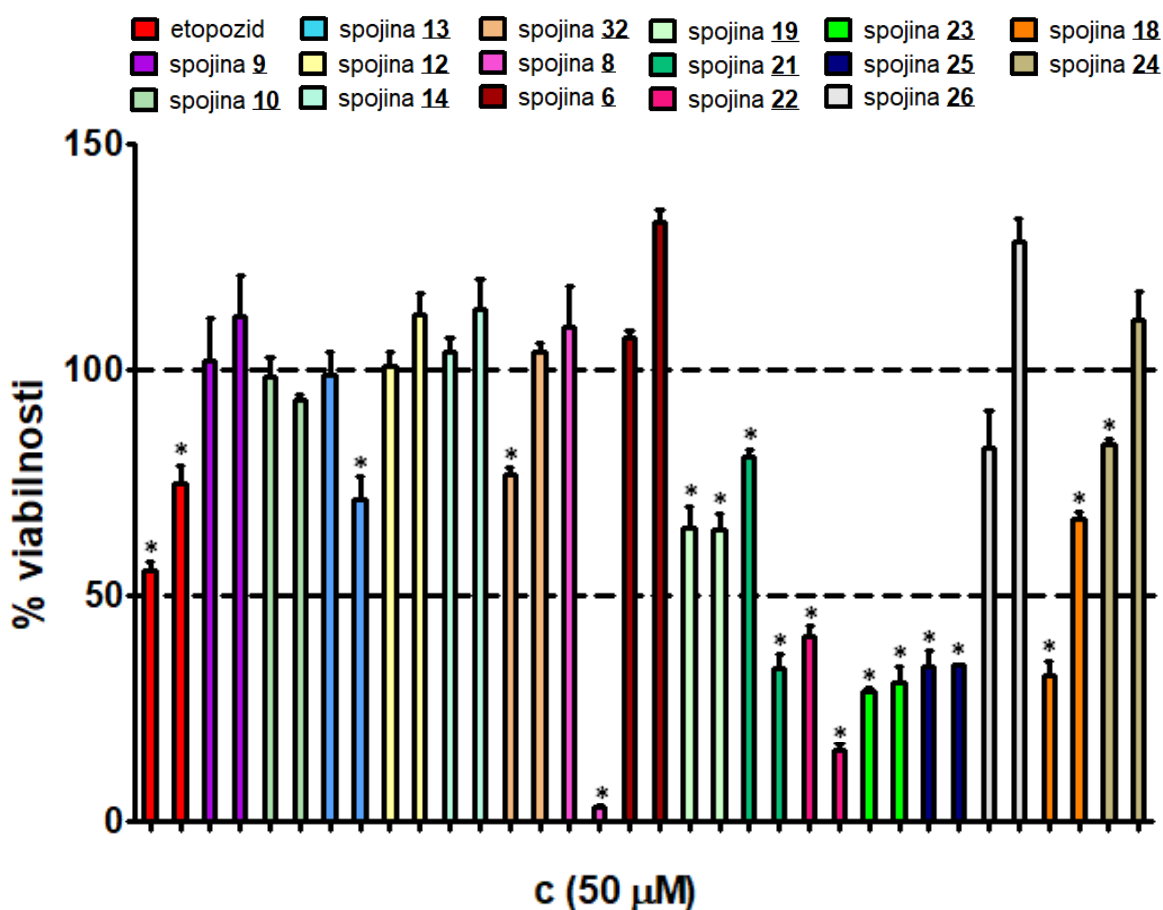
Za prvi presejalni test na Hep G2 smo izbrali spojini **7** in **17**. Izvedli smo ga kot poskusno testiranje, s katerim smo ugotavljali, kakšen je optimalni protokol izvedbe testa. Iz grafov je razvidno, da je pozitivna kontrola celično viabilnost zmanjšala pod 50 % šele po 72 urah. Levi graf prikazuje vpliv na celično preživetje po 24 urah, ko se učinek pozitivne kontrole in testnih spojin na celice še ni izrazil v pričakovani meri, zato bomo dalje obravnavali rezultate, prikazane na desnem grafu (Slika 14).



Sliki 13 in 14: Prvi presejalni test po 24 (levo) in 72 h (desno). * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo

Po dodatku spojine **17** so celice dosegle 16,9 % preživetje, zato smo določili, da spojina pomembno vpliva na celično rast in je primerna za nadaljnja testiranja v večjem razponu koncentracij. Celicam, tretiranim s spojino **7**, smo ugotovili skoraj 100 % viabilnost, zato smo spojino označili za neaktivno. Pozitivna kontrola etopozid je zmanjšala celično viabilnost na 46,9 %.

Na drugem presejalnem testu smo obravnavali več spojin. Ker smo pri testiranju sumili na napako pri pipetiranju, smo test ponovili. Na novo ploščico smo nanесли enake količine in koncentracije celic, zaviralcev, kontrole in reagenta MTS in pod enakimi pogoji izvedli meritev. Rezultati obeh testiranj so prikazani na skupnem grafu (Slika 15). Levi stolpci pripadajo prvi meritvi, desni pa prikazujejo rezultate ponovitve testiranja.

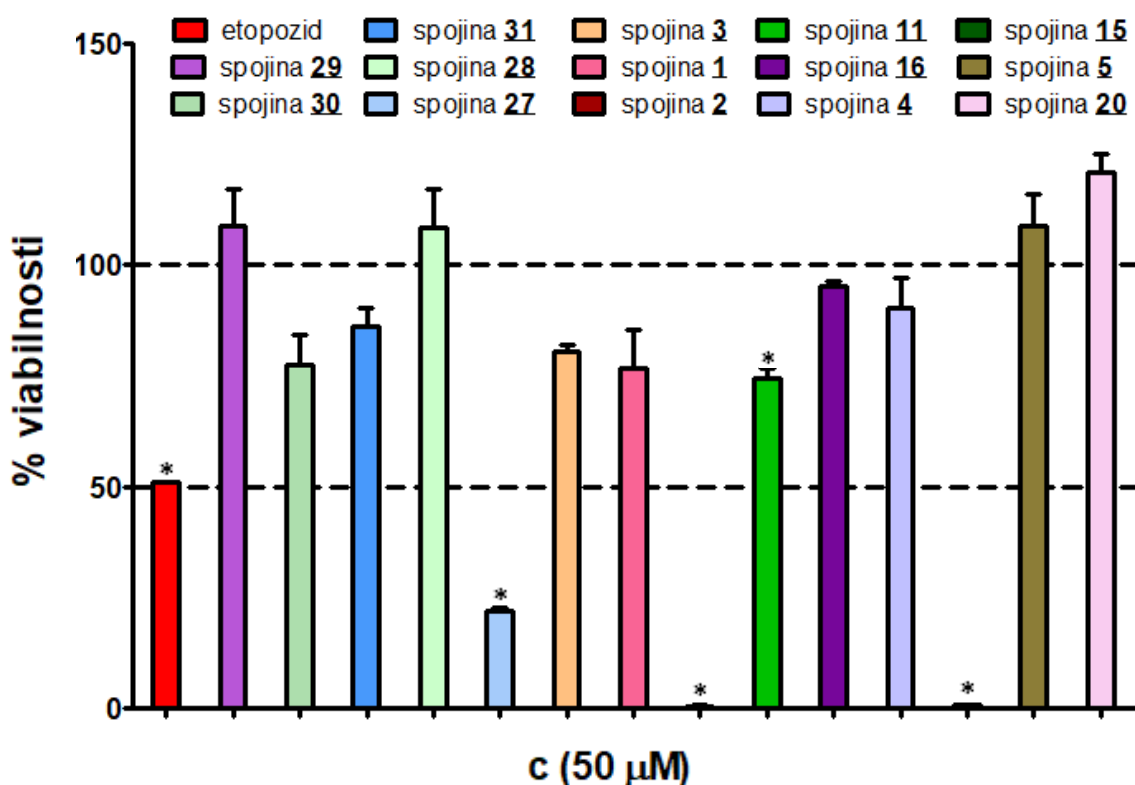


Slika 15: Drugi presejalni test na celični liniji Hep G2. Graf prikazuje dve biološki ponovitvi. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo

Prvič smo celično viabilnost, nižjo od 50 %, ugotovili pri spojinah **22**, **23**, **25** in **18**. Test smo izvedli s celicami v 8. pasaži. Spojina **22** je celično viabilnost zmanjšala na 41,1 %, spojina **23** na 28,7 %, spojina **25** na 34,3 % in spojina **18** na 32,3 %. Te spojine so izkazale celo boljšo aktivnost od etopozida, saj smo po njegovem dodatku ugotovili 55,4 % celično preživetje. Ostale spojine niso zmanjšale celičnega preživetja pod 50 %.

Neodvisna ponovitev testiranja s celicami v 10. pasaži je potrdila aktivnost spojin **22**, **23** in **25**, ne pa tudi spojine **18**. Spojina **22** je celično viabilnost zmanjšala na 15,7 %, spojina **23** na 30,7 % in spojina **25** na 34,7 %. Za razliko od prejšnjega testiranja sta se kot aktivni izkazali še spojini **8** in **21**. Pri prvi smo tretiranim celicam ugotovili 3,0 % viabilnost, pri drugi 34,0 % viabilnost. Za nadaljnja testiranja v širšem koncentracijskem obsegu smo izbrali spojine **8**, **18**, **21**, **22**, **23** in **25**.

Zadnji presejalni test na celični liniji Hep G2 smo izvedli z 12. pasažo celic (Slika 16). Za nadaljnja testiranja smo določili tri spojine.

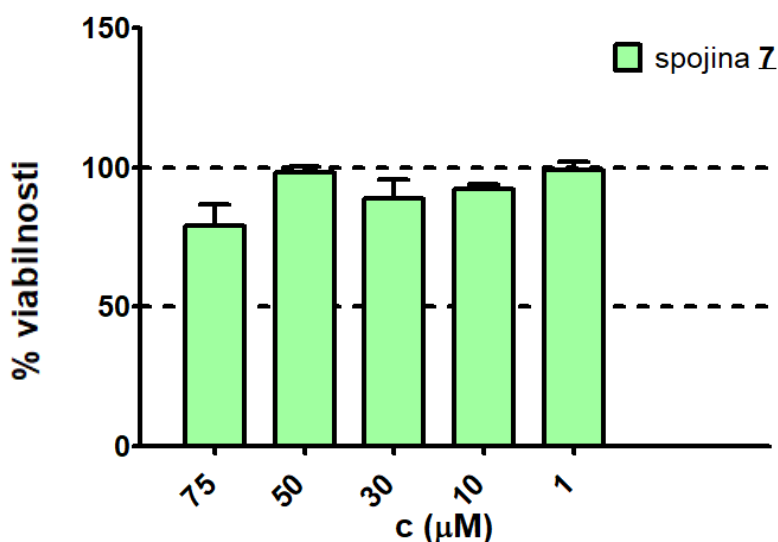


Slika 16: Tretji presejalni test na Hep G2. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo

Celicam Hep G2 smo po dodatku spojin 27, 2 in 15 ugotovili 22,1 %, 0,69 %, oziroma 0,7 % viabilnost, zato smo te spojine označili za aktivne. Pozitivna kontrola etopozid je celično viabilnost zmanjšala na 50,9 %. Ostale spojine celičnega preživetja niso zmanjšale pod 50 %, smo pa ugotovili signifikantno znižanje viabilnosti celic po dodatku spojine 11.

Test za določanje IC₅₀

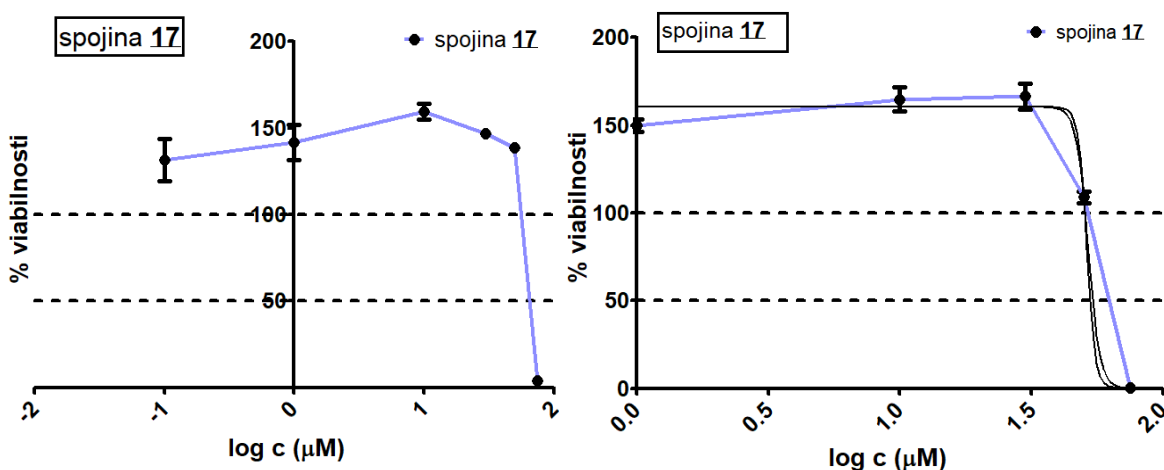
Ko smo s presejalnimi testi izbrali aktivne spojine (take, ki celično viabilnost zmanjšajo na 50 % ali manj), smo s testiranjem pri 5 ali 6 koncentracijah posameznih spojin ugotavljali koncentracije spojin, ki zavrejo 50 % aktivnosti encima (IC₅₀). Potrebno je upoštevati, da smo dobili le grobe ocene tega odmerka. Da bi določili IC₅₀, bi morali vsako testiranje izvesti v treh neodvisnih ponovitvah, zato so dobljeni rezultati nezanesljivi.



Slika 17: Poskusni test za določanje IC₅₀ pri spojini 7

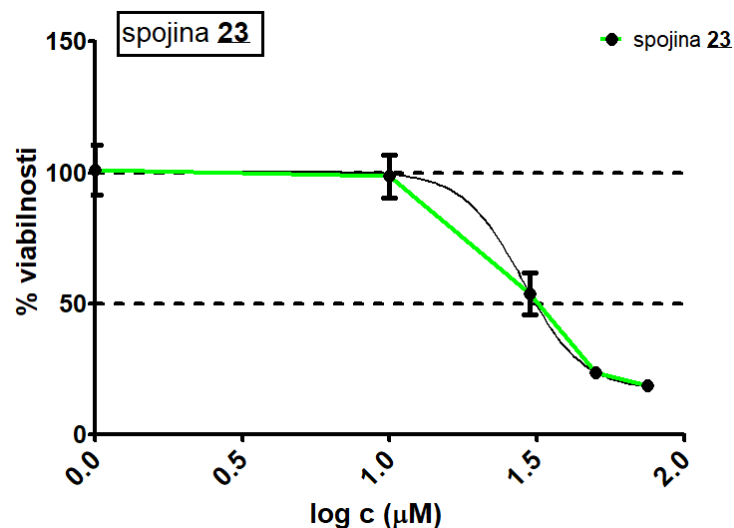
Pri spojini 7 izjemoma nismo najprej ugotavljali aktivnosti spojine in šele nato odnosa med odmerkom in učinkom, temveč smo jo že v prvem testiranju na testno ploščico nanesli v več koncentracijah, označenih na grafu (Slika 17). Uporabili smo celice v 7. pasaži. Spojina se je izkazala za neaktivno, saj ni pomembno vplivala na zmanjšanje celične viabilnosti. Z višanjem koncentracije je spojina bolj vplivala na zmanjšanje celičnega preživetja. Najučinkovitejša je bila pri najvišji, 75 µM, najmanj učinkovita pa pri najnižji koncentraciji, 1 µM. Pri 50 µM koncentraciji bi glede na rezultate pri ostalih koncentracijah

pričakovali večjo učinkovitost, vendar ne vemo, ali je rezultat višji zaradi napake pri redčenju spojine, pri pipetiranju, dodatku MTS reagenta ali zaradi lastnosti spojine. Da bi boljše raziskali delovanje spojine, bi morali izvesti več neodvisnih ponovitev testiranja, vendar spojina kot protibakterijska učinkovina zaradi neaktivnosti najverjetneje ne bi bila primerna.



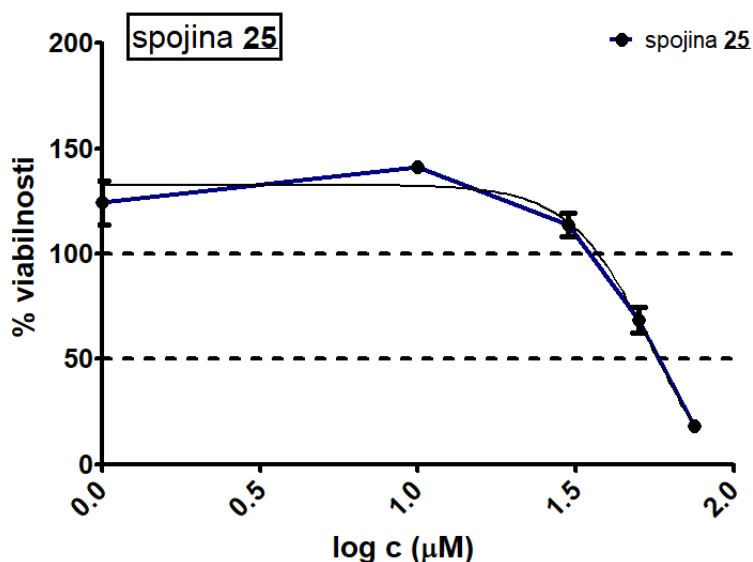
Sliki 18 in 19: Vpliv spojine **17** na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina **17** se je v predhodnem presejalnem testu pri koncentraciji 50 μM izkazala za aktivno, celicam smo določili 14,9 % viabilnost.. Test za ugotavljanje IC₅₀ smo izvedli dvakrat. Levi graf (Slika 18) prikazuje testiranje, ko smo celice v 10. pasaži izpostavili spojini v 75, 50, 30, 10, 1 in 0,1 μM koncentracijah, v drugem testiranju na celicah v 13. pasaži, katerega rezultate prikazuje desni graf (Slika 19), smo spojino nanegli v koncentracijah 75–1 μM. V obeh primerih pri 50 μM spojina ni zmanjšala celične viabilnosti, učinkovita je bila šele pri 75 μM, ko smo celicam ugotovili 3,8 %, oziroma 0,5 % viabilnost. Okvirna vrednost IC₅₀ za spojino glede na rezultate, prikazane na desnem grafu, je 52,0 μM, vendar bi bilo za pravo vrednost potrebno izvesti tri neodvisne biološke ponovitve.



Slika 20: Vpliv spojine 23 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

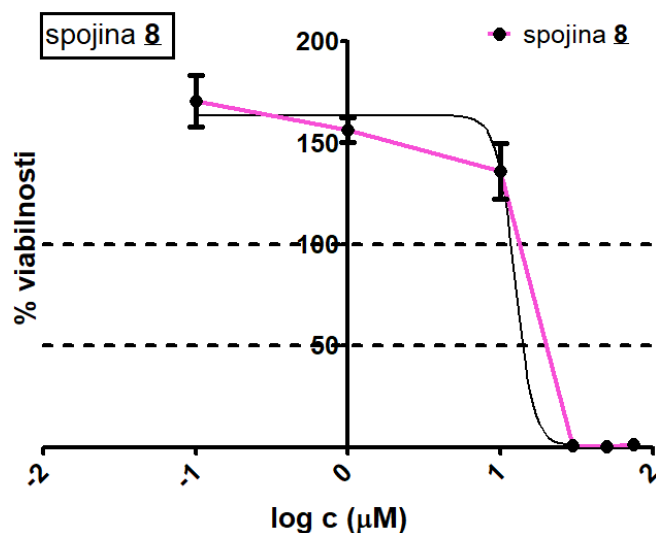
Spojina 23 je na zmanjšanje celične viabilnosti vplivala v koncentracijah 30, 75 in 50 µM, in sicer smo celicam ugotovili 53,8 %, 23,6 %, oziroma 18,6 % viabilnost (Slika 20). V koncentracijah 10 µM in 1 µM spojina ni bila aktivna. Program Prism je na podlagi rezultatov meritev določil okvirno vrednost IC₅₀, in sicer 28,4 µM. Uporabili smo celice v 10. pasaži.



Slika 21: Vpliv spojine 25 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

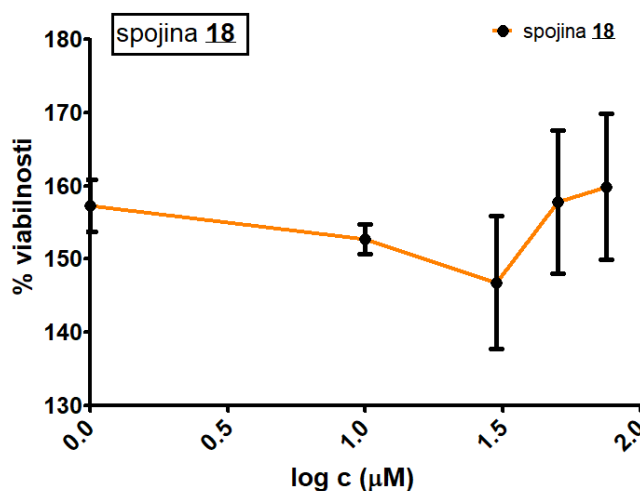
Pri določanju odnosa med odmerkom in učinkom je spojina 25 izkazala manjšo aktivnost kot pri presejalnem testu, kjer smo celicam izmerili povprečno 34,5 % viabilnost.

Pri dodatku spojine v koncentraciji 50 μM smo ugotovili 68,6 % viabilnost, večjo aktivnost pa je spojina izkazala pri 75 μM , ko smo ugotovili 18,2 % preživetje celic (Slika 21). Okvirna vrednost IC_{50} , ki jo je določil program Prism, znaša 55,6 μM . Testiranje smo izvedli na celicah v 10. pasaži.



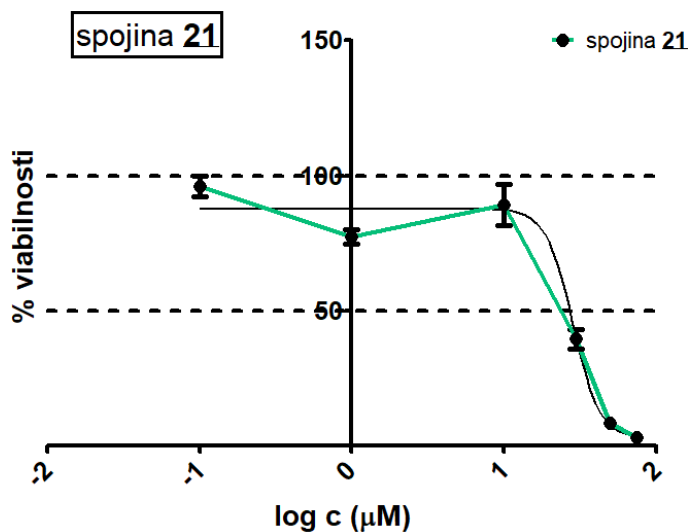
Slika 22: Vpliv spojine 8 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina 8 je bila aktivna v koncentracijah 30, 50 in 75 μM , in sicer smo celicam Hep G2 v 13. pasaži ugotovili 1,1 %, 0,5 %, oziroma 1,3 % viabilnost v primerjavi z netretiranimi celicami (Slika 22). Največjo aktivnost je spojina izkazala pri koncentraciji 50 μM . Okvirno vrednost IC_{50} je izračunal program Prism, in sicer naj bi znašala 12,5 μM .



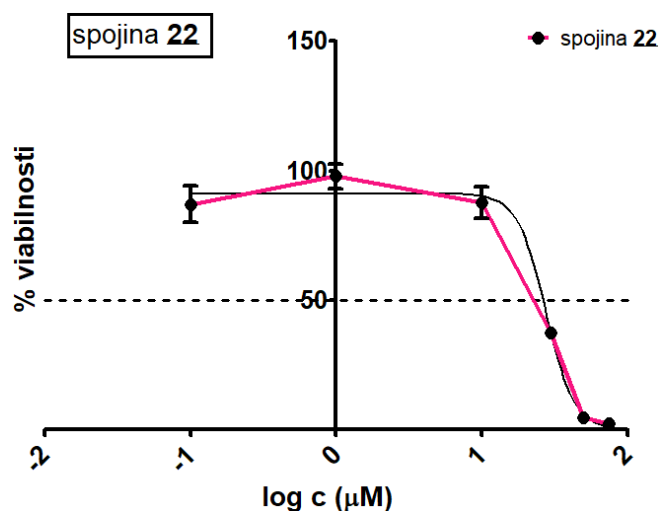
Slika 23: Vpliv spojine 18 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojino **18** smo v presejalnem testu v koncentraciji 50 μM določili kot aktivno (določili smo 32,6 % celično viabilnost). Pri določanju odnosa med odmerkom in učinkom v koncentracijah 75, 50, 30, 10 in 1 μM spojina ni vplivala na zmanjšanje celične viabilnosti (Slika 23). Iz grafa je razvidno, da so bili rezultati testiranja zelo razpršeni, prav tako ni mogoče sklepati na odnos med koncentracijo spojine in njeno aktivnostjo, kar bi lahko bila posledica slabe topnosti spojine ali napake pri redčenju oziroma nanosu spojine na testno ploščico. Vrednosti IC_{50} s programom nismo mogli napovedati. Uporabili smo celice v 13. pasaži.



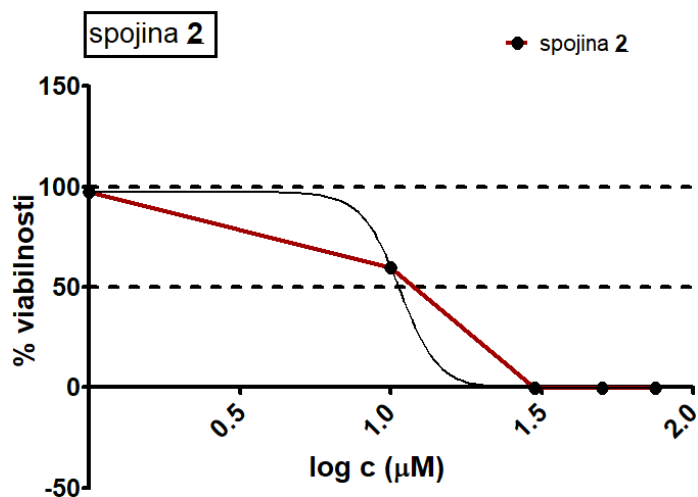
Slika 24: Vpliv spojine **21** na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina **21** se je tudi pri testiranju v 75, 50, 30, 10, 1 in 0,1 μM koncentracijah izkazala za aktivno, saj smo pri treh koncentracijah ugotovili zmanjšano celično viabilnost (Slika 24). Po dodatku spojine v 30 μM koncentraciji je celična viabilnost znašala 39,4 %, pri 50 μM na 8,2 % in pri 75 μM na 2,8 %. Za okvirno vrednost IC_{50} je program Prism določil 28,4 μM . Uporabili smo celice v 13. pasaži.



Slika 25: Vpliv spojine 22 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

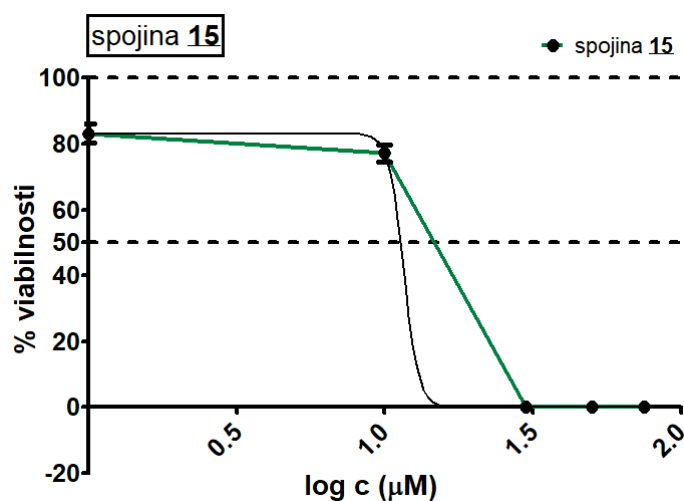
Po predhodno določeni aktivnosti v presejalnem testiranju pri koncentraciji 50 μM (41,1, oz. 15,7 % celična viabilnost) smo za spojino 22 v tem testiranju ugotovili še aktivnost pri 30 μM in 75 μM. Po dodatku 30 μM spojine smo celicam ugotovili 37,3 % viabilnost, pri 50 μM 4,5 % in pri 75 μM 2,2 % viabilnost (Slika 25). V koncentracijah 10, 1 in 0,1 μM spojina ni pomembno znižala celičnega preživetja. Za okvirno vrednost IC₅₀ je program Prism določil 27,5 μM. Uporabili smo celice v 13. pasaži.



Slika 26: Vpliv spojine 2 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

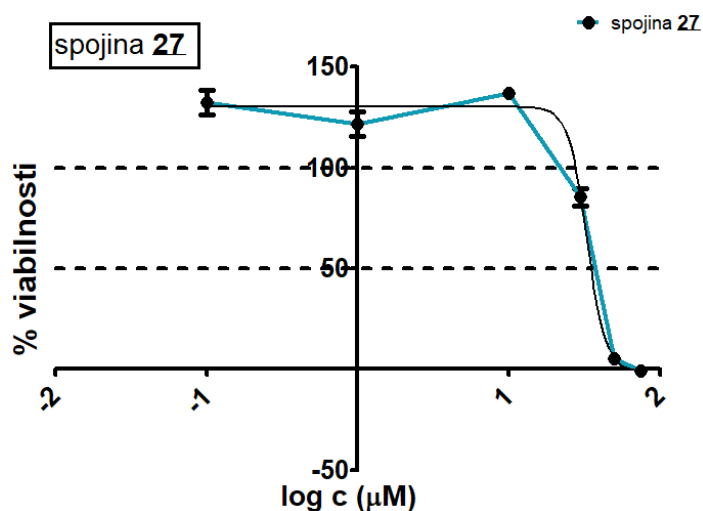
Spojino 2 smo testirali v petih različnih koncentracijah. Aktivnost je izkazala pri 30, 50 in 75 μM, ko nismo zaznali nobene metabolno aktivne celice (Slika 26). V koncentraciji 1 μM spojina ni zmanjšala celične viabilnosti, je pa nanjo vplivala v 10 μM koncentraciji, in sicer so celice v povprečju dosegle 59,8 % viabilnost. S programom Prism smo napovedali

okvirno vrednost IC_{50} , ki naj bi znašala $10,7 \mu\text{M}$. Testiranje smo izvedli s celicami v 14. pasaži.



Slika 27: Vpliv spojine 15 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina 15 je v $30, 50$ in $75 \mu\text{M}$ koncentraciji izkazala veliko aktivnost, saj s testom nismo zaznali nobene metabolno aktivne celice (Slika 27). V $1 \mu\text{M}$ in $10 \mu\text{M}$ koncentraciji spojina ni pomembno zmanjšala viabilnosti. Program Prism je kot okvirno vrednost IC_{50} določil $11,6 \mu\text{M}$. Testiranje smo izvedli s celicami v 14. pasaži.



Slika 28: Vpliv spojine 27 na viabilnost celic Hep G2 – odnos med koncentracijo in učinkom

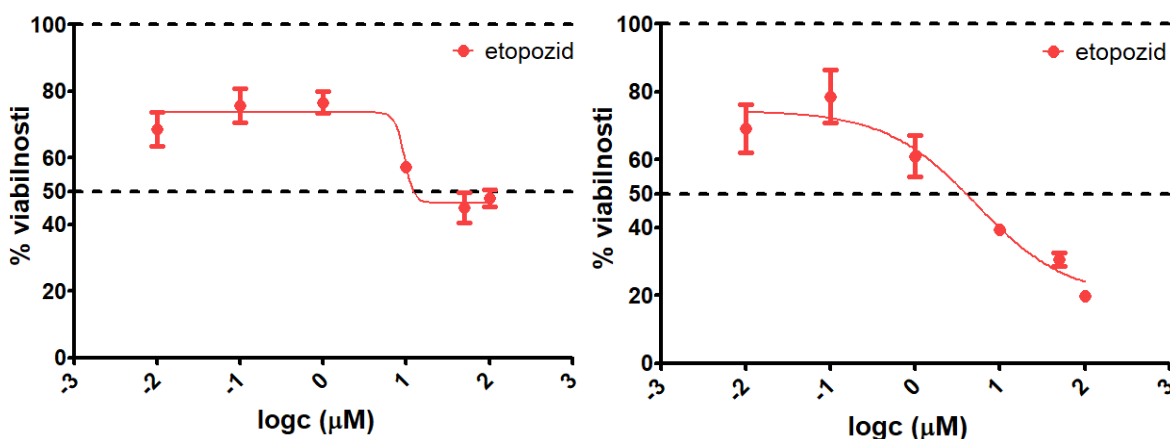
V testiranju odvisnosti učinka spojin na celično preživetje od njihove koncentracije smo pri spojini 27 ugotovili aktivnost v dveh koncentracijah. Po dodatku spojine v $50 \mu\text{M}$

koncentraciji smo ugotovili 5,5 % celično viabilnost, medtem ko po dodatku 75 μM spojine nismo zaznali metabolno aktivnih celic (Slika 28). V koncentracijah 30, 10, 1 in 0,1 μM spojina ni izkazala aktivnosti. Napovedana vrednost IC_{50} naj bi bila 32,9 μM . Testiranje smo izvedli s celicami v 14. pasaži.

Testiranje zaviralcev topoizomeraz na celični liniji HUVEC

Primerjava meritev po 24 in 72 urah

Da smo določili, po kakšnem časovnem protokolu bomo izvajali testiranje na celični liniji HUVEC, smo postopali enako kot pri celični liniji Hep G2. Na dve testni ploščici smo nasadili celice, po 24 urah dodali testne spojine in nato eni ploščici dodali reagent MTS po 24 urah in drugi po 72 urah inkubiranja. Meritve absorbanca smo izvedli po enakem protokolu, pri valovni dolžini 492 nm. Pozitivno kontrolo etopozid smo na ploščici nanesli v končnih koncentracijah 100, 50, 10, 1, 0,1 in 0,01 μM .



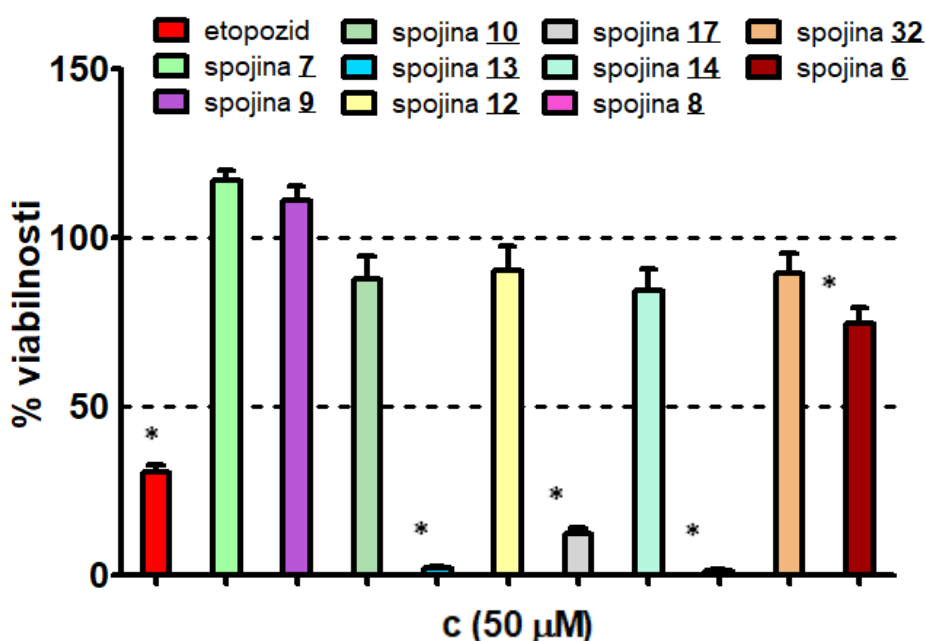
Slika 29: Primerjava učinka etopozida na zmanjšanje celične viabilnosti po 24 in 72 urah

Testiranje smo izvedli na 8. pasaži celične linije HUVEC. Levi graf prikazuje rezultate meritev absorbanca 24 ur po dodatku testnih spojin, rezultate desnega grafa smo dobili, ko smo reagent MTS dodali 72 ur po tretiranju s testnimi spojinami (Slika 29). Glede na večjo aktivnost etopozida in jasnejši odnos med koncentracijo in učinkom spojine smo se

odločili, da bomo tudi v primeru HUVEC celic kolorimetrični test izvajali 72 ur po dodatku testnih spojin. Program Prism je ocenil okvirno vrednost IC₅₀, in sicer 5,2 μM.

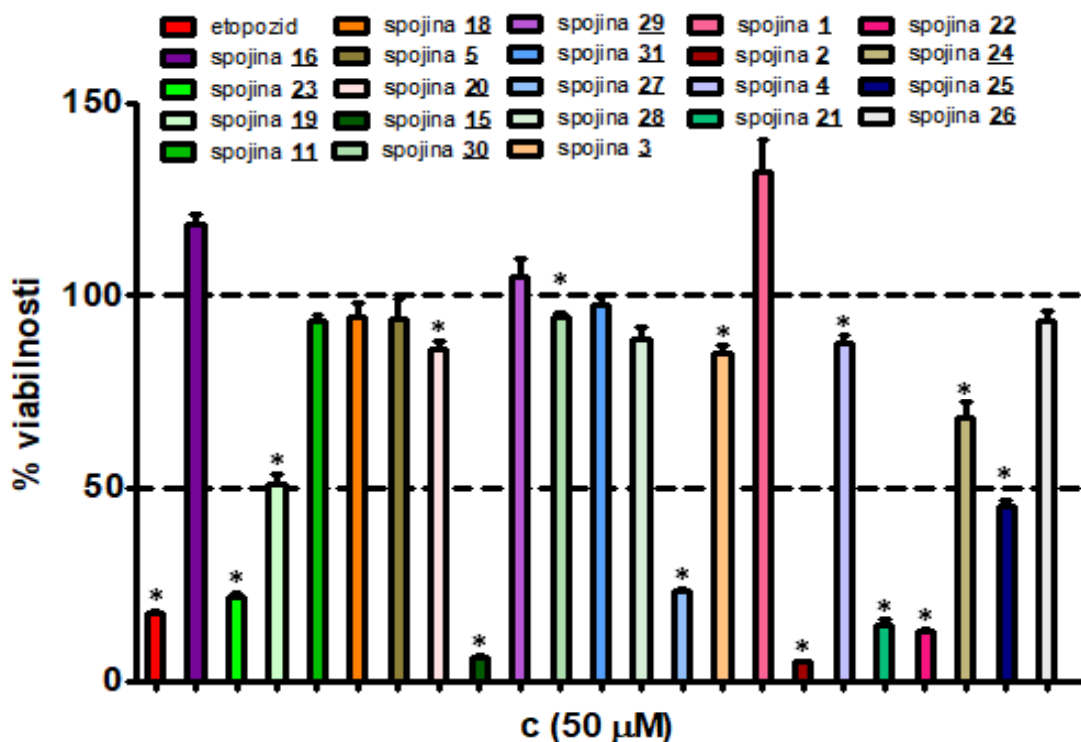
Presejalni testi

V presejalnih testih smo za spojine, pripravljene v koncentraciji 50 μM, ugotavljali, kakšno viabilnost dosežejo celice po njihovem dodatku. Za nadaljnja testiranja smo izbrali aktivne spojine, ki so celično viabilnost zmanjšale na 50 % ali manj.



Slika 30: Prvi presejalni test na celični liniji HUVEC. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo

Rezultate prvega presejalnega testiranja prikazuje Slika 30. Po dodatku pozitivne kontrole etopozida smo celicam HUVEC ugotovili 30,5 % viabilnost. Aktivnost so izkazale še spojine **13**, **17** in **8**, ki so celično viabilnost zmanjšale na 2,1 %, 12,1 %, oziroma 1,4 %. Ostale spojine smo označili za neaktivne in jih nismo uporabili za nadaljnja testiranja. Testiranje smo izvedli s celicami v 8. pasaži.



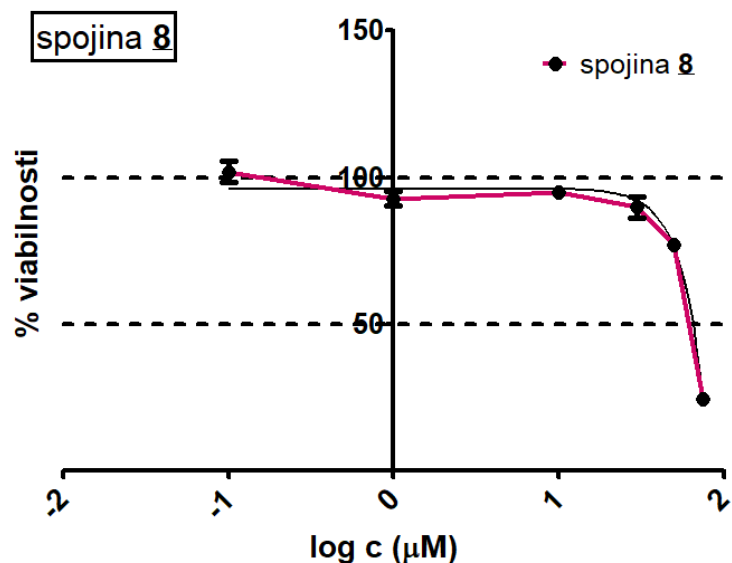
Slika 31: Drugi presejalni test na celični liniji HUVEC. * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolo

Drugi presejalni test na celični liniji HUVEC smo izvedli na treh testnih ploščicah. Slika 31 prikazuje zbrane rezultate. Rdeči stolpec, ki prikazuje vpliv pozitivne kontrole etopozida, sestavlja povprečje trojih triplicatov s treh testnih ploščic. V povprečju je celično preživetje po dodatku etopozida znašalo 17,7 %. Za nadaljnja testiranja smo določili 8 aktivnih spojin. Spojina **23** je celično viabilnost zmanjšala na 21,7 %, spojina **19** na 51,3 %, spojina **15** na 6,2 %, spojina **27** na 23,6 %, spojina **2** na 5,3 %, spojina **21** na 14,6 %, spojina **22** na 12,9 % ter spojina **25** na 45,2 %. Testiranje smo izvedli s celicami v 11. pasaži.

Test za določanje IC₅₀

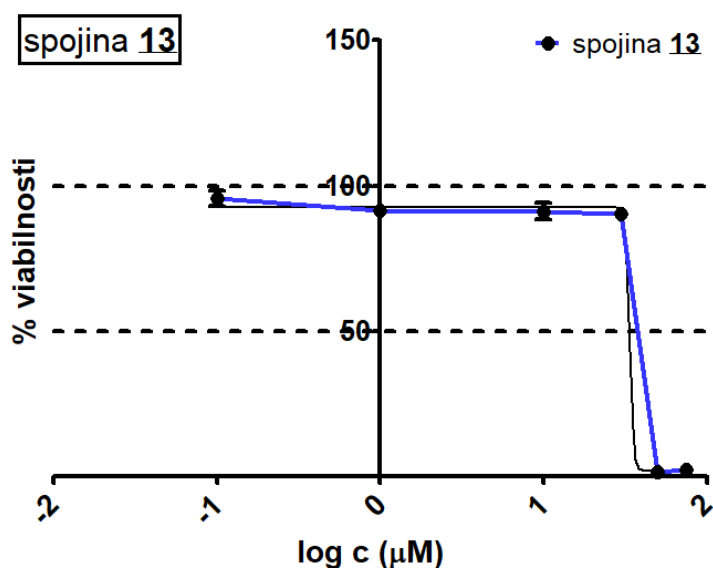
Spojine, ki smo jih v presejalnih testih označili za aktivne, smo za določanje odnosa med odmerkom in učinkom testirali še v širšem koncentracijskem območju. IC₅₀ zaradi premalo meritev nismo mogli določiti, pri grafih so navedene le okvirne vrednosti, dobljene

iz enega testiranja. Za natančnejše določanje bi mogli izvesti tri neodvisne biološke ponovitve.



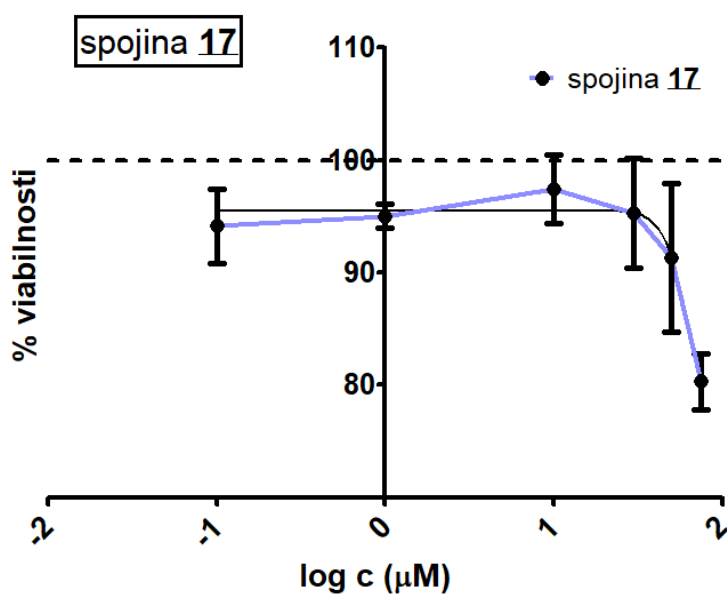
Slika 32: Vpliv spojine 8 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina 8 je v presejalnem testu izkazala veliko aktivnost, saj nismo zaznali metabolno aktivnih celic (Slika 32). V testiranju odnosa med koncentracijo in učinkom se je izkazala kot šibkejši zaviralec, saj je bila aktivna šele pri koncentraciji 75 μM, ko smo celicam določili 24,5 % viabilnost. V koncentracijah 0,1, 1, 10, 30 in 50 μM spojina ni pomembno vplivala na celično preživetje. Testiranje smo izvedli s celicami v 11. pasaži.



Slika 33: Vpliv spojine 13 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

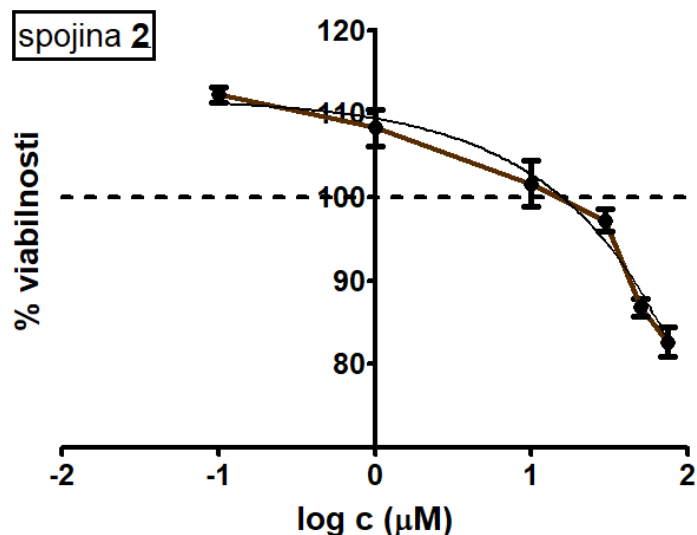
Spojina **13** je bila aktivna v dveh koncentracijah (Slika 33). Po dodatku spojine v 50 μM koncentraciji smo ugotovili 1,6 % celično viabilnost, pri 75 μM pa 2,2 % viabilnost. V nižjih koncentracijah spojina ni pomembno zmanjšala celičnega preživetja. Okvirna napovedana vrednost IC_{50} za to spojino je 33,5 μM . Testiranje smo izvedli s celicami v 11. pasaži.



Slika 34: Vpliv spojine **17** na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

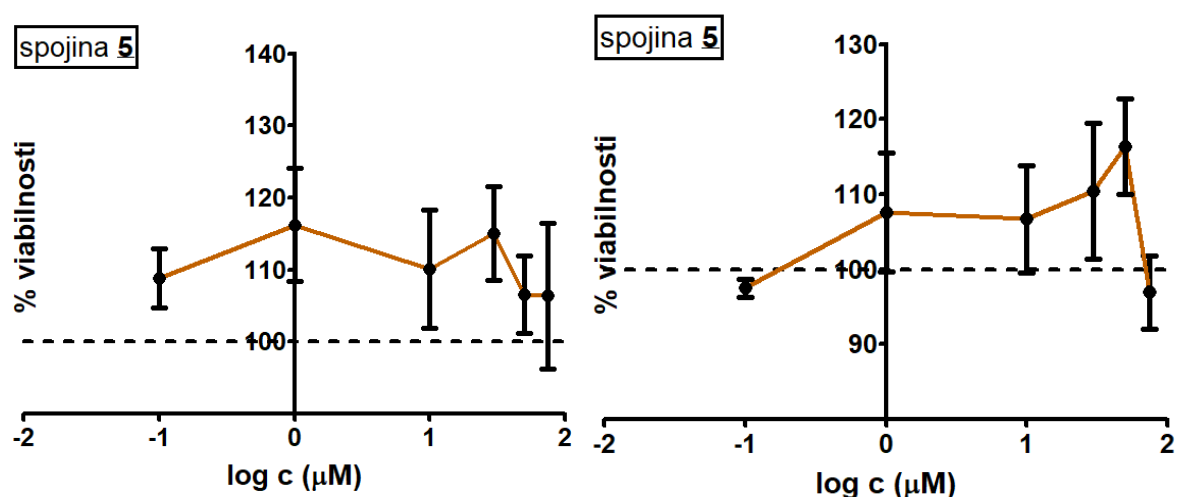
Čeprav se je spojina **17** v presejalnem testu pri koncentraciji 50 μM izkazala za aktivno (12,1 % viabilnost), tokrat celična viabilnost po dodatku spojine v koncentracijah 0,1, 1, 10, 30, 50 in 75 μM ni bila pomembno zmanjšana (Slika 34). Najnižjo celično viabilnost smo izmerili pri koncentraciji 75 μM , in sicer 80,3 %. Iz grafa je razvidno, da so bili rezultati precej razpršeni, kar je lahko posledica priprave spojin, priprave celic, izvedbe kolorimetričnega testa ali lastnosti spojin, oziroma celic. Testiranje smo izvedli s celicami v 11. pasaži.

Naslednja testiranja odnosa med koncentracijo in učinkom aktivnih spojin smo izvedli po dvakrat. Kjer sta pri posamezni spojini prikazana po dva grafa, velja, da levi graf prikazuje testiranje na celicah v 12. pasaži in desni graf testiranje na celicah v 15. pasaži.



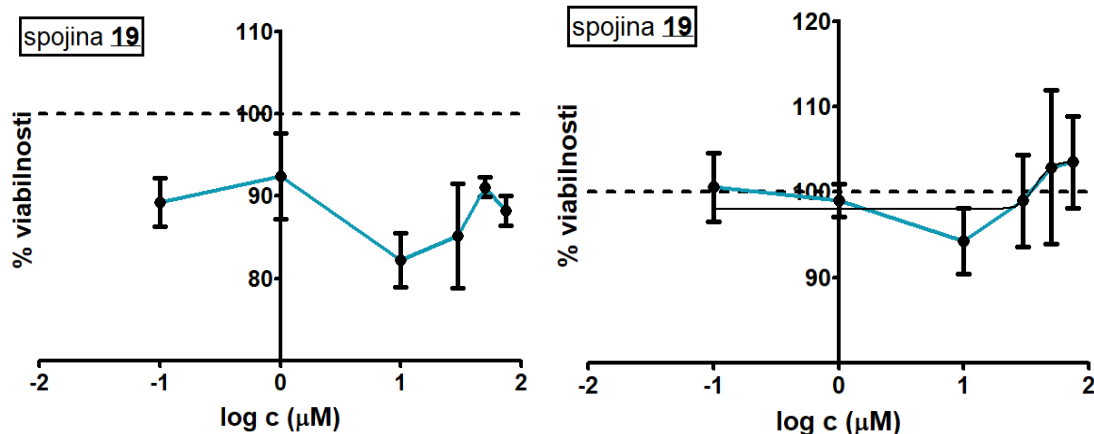
Slika 35: Vpliv spojine 2 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina 2 kljub predhodno ugotovljeni aktivnosti v presejalnem testu (5,3 % viabilnost) pri testiranju v koncentracijah 0,1, 1, 10, 30, 50 in 75 µM ni pomembno vplivala na celično preživetje. Izmerjene vrednosti celične viabilnosti so se gibale med 83 % in 112 %. Graf na Sliki 35 prikazuje testiranje, izvedeno s celicami v 12. pasaži.



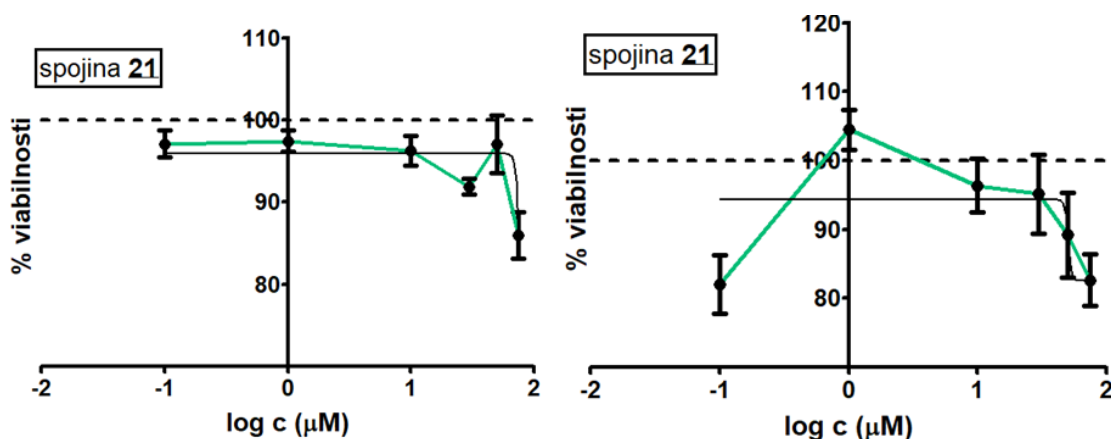
Sliki 36 in 37: Vpliv spojine 5 na rast celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina **5** na zmanjšanje celične viabilnosti ni vplivala v nobeni koncentraciji, je neaktivna. Iz grafov je razvidno, da so bili rezultati precej razpršeni in da ni jasne povezave med učinkom in odmerkom, oziroma učinka sploh ni (Sliki 36 in 37). Iz dobljenih rezultatov spojine ne moremo ovrednotiti. Razpršenost rezultatov in nejasna povezava med koncentracijami sta morda posledici slabe topnosti spojine v izbranem topilu.



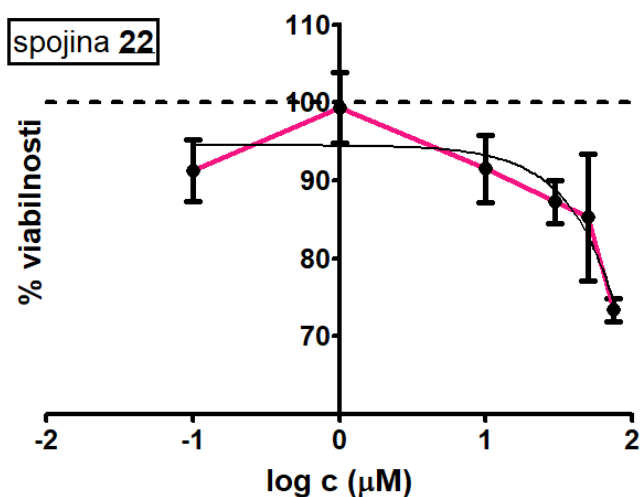
Sliki 38 in 39: Vpliv spojine **19** na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Tudi pri spojini **19** v testu za določanje odnosa med odmerkom in učinkom nismo ugotovili pomembnega vpliva na zmanjšanje celične viabilnosti. Rezultati so zelo variabilni in ni jasne povezave med koncentracijo spojine in njenim učinkom (Sliki 38 in 39). Potrebno bi bilo izvesti več bioloških ponovitev in raziskati topnost spojine v izbranem topilu, da bi ugotovili, ali so prikazani rezultati posledica tvorbe agregatov, oziroma drugega dejavnika.



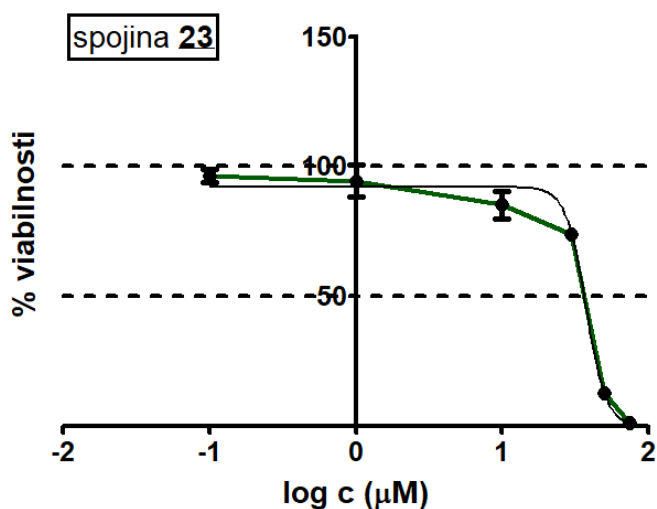
Sliki 40 in 41: Vpliv spojine **21** na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina 21 v testiranjih, prikazanih na zgornjih grafih, ni pomembno zmanjšala celične viabilnosti. Rezultati so bili v obeh testih zelo razpršeni, ni jasne povezave med koncentracijo in zmanjšanjem celične viabilnosti (Sliki 40 in 41). Da bi potrdili neaktivnost spojine, bi bilo potrebno izvesti še več ponovitev testa in raziskati topnost spojine.



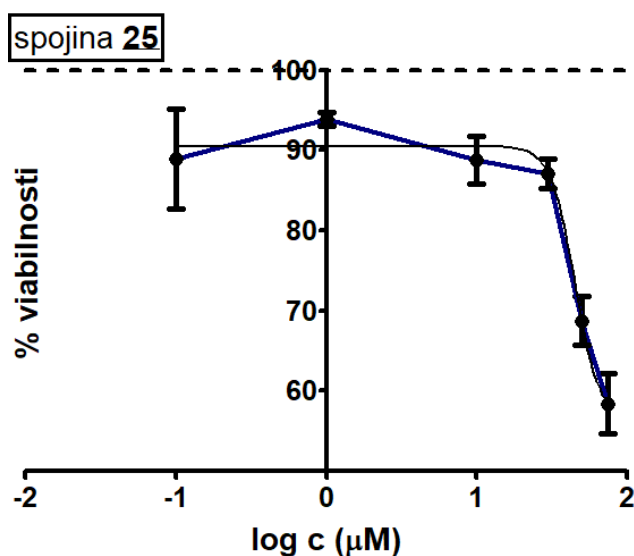
Slika 42: Vpliv spojine 22 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Slabo aktivnost v primerjavi s presejalnim testom smo ugotovili tudi pri spojini 22. Čeprav je dodatek spojine v presejalnem testu zmanjšal celično viabilnost na 12,9 %, smo spojino na podlagi rezultatov testa za določanje odnosa med odmerkom in učinkom določili za neaktivno. Celična viabilnost je po dodatku spojine v 75 µM koncentraciji znašala 73,4 %. Graf na Sliki 42 prikazuje rezultate testiranja na celicah v 12. pasaži.



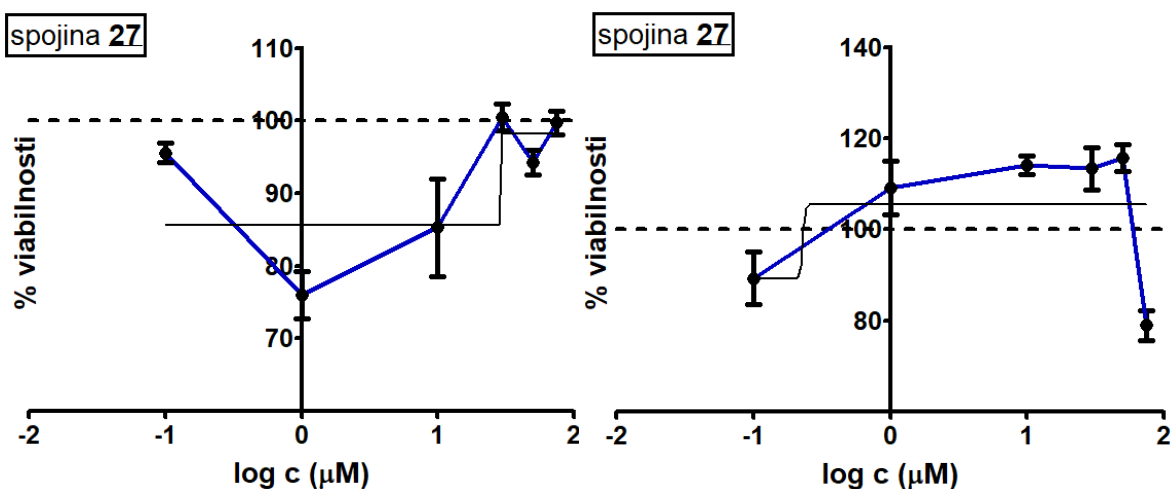
Slika 43: Vpliv spojine 23 na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina **23** je bila aktivna v koncentracijah 50 in 75 μM , kjer smo ugotovili 12,8 %, oziroma 1,3 % celično viabilnost. V koncentracijah 0,1, 1, 10 in 30 μM spojina ni pomembno vplivala na preživetje celic. Predvidena vrednost IC_{50} naj bi bila 37,4 μM . Slika 43 prikazuje rezultate testa, izvedenega na celicah v 12. pasaži.



Slika 44: Vpliv spojine **25** na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Spojina **25** v testiranjih odnosa med koncentracijo in učinkom ni dovolj zmanjšala celične viabilnosti, da bi potrdili njeno aktivnost. Po dodatku spojine v koncentraciji 75 μM smo celicam izmerili 58,4 % viabilnost. Slika 44 prikazuje rezultate testiranja, ki smo ga izvedli na 15. pasaži celic.



Sliki 45 in 46: Vpliv spojine **27** na viabilnost celic HUVEC – odnos med koncentracijo in učinkom

Čeprav je v presejalnem testu celično viabilnost zmanjšala na 23,6 %, v testiranjih odnosa med učinkom in koncentracijo spojina 27 ni bila aktivna (Sliki 45 in 46). Zaradi nejasne povezave med aktivnostjo spojine in njeno koncentracijo bi morali izvesti več bioloških ponovitev in raziskati topnost spojine.

Razprava

Vsako testno spojino smo v določeni koncentraciji na testno ploščico nanegli v triplikatih. Glede na absorbance, izmerjene v kolorimetričnem testiranju, smo s pomočjo programa Microsoft Excel izračunali relativno standardno deviacijo. Če je bila večja od 15, smo eno od izmerjenih absorbanc izločili.

Vpliv testnih spojin na zmanjšanje celične viabilnosti smo izvedli s kolorimetričnim testom, pri katerem smo uporabili reagent MTS, ki prikaže metabolno aktivnost celic. Z merjenjem absorbanc po pretvorbi MTS v formazan smo ugotavljali delež preživelih celic, ker pa test ne razlikuje med citotoksičnostjo in citostatičnostjo testnih spojin, ne vemo, ali spojine zaustavijo celično rast ali delujejo citotoksično. Izmerjena absorbanca je odvisna od števila živih celic, njihove metabolne aktivnosti ter tudi koncentracije reagenta MTS in časa inkubacije. Pri izvedbi testiranj smo celicam vselej dodali 10 μL reagenta MTS in testne ploščice inkubirali pri enakih pogojih ($t = 3\text{h}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $w_{\text{CO}_2} = 5\%$). Kljub enakemu odmerjenemu volumnu reagenta obstaja možnost napake pri pipetiranju, na primer zaradi tvorbe zračnega mehurčka v nastavku pipete ali ostanka dela reagenta na steni mikrotitrne ploščice. Včasih na izmerjene absorbance vplivajo nekatere sestavine gojišča za gojenje celic, ki lahko povzročijo lažne rezultate. Pri vrednotenju rezultatov je pomembno upoštevati, da ima tudi sama tetrazolijeva sol toksičen vpliv na celice (40).

Kljub na videz dobri topnosti testnih spojin pri raztapljanju v gojišču, oziroma DMSO, ne moremo biti popolnoma prepričani, da so se spojine v vdolbinicah testne ploščice enakomerno porazdelile, oziroma niso tvorile agregatov.

V nekaterih primerih je na grafih prikazana celična viabilnost, višja od 100 %. Tako visoko celično preživetje je le navidezno, verjetno je višja izmerjena vrednost posledica večjega celičnega metabolizma zaradi izpostavljenosti testnim spojinam. Tudi v primeru topila DMSO v 0,5 % in 0,75 % koncentraciji smo izmerili navidezno večje celično

preživetje, vendar vemo, da DMSO ne spodbuja celične rasti, temveč sčasoma celicam škoduje, in je visoka absorbanca najverjetneje posledica odziva celic na stres (41).

Rezultati testiranja na 12. in 15. pasaji celične linije HUVEC so vprašljivi. Marsikje ni jasne povezave med koncentracijo spojine in viabilnostjo celic, rezultati so zelo variabilni in aktivnost spojin je manjša v primerjavi s presejalnim testiranjem, oziroma je sploh ni. Po presaditvi celic v 16. pasajo smo opazili spremenjeno morfologijo celic. Postale so svetlejšje in bolj okroglih oblik.

Zaviralci človeške topoizomeraze II

Od testiranih zaviralcev človeške topoizomeraze II je bila na Hep G2 aktivna spojina **27**, ki smo ji določili okvirno vrednost IC_{50} . Spojina je pokazala aktivnost tudi v presejalnem testu na nerakavi celični liniji HUVEC, a je v naslednjem testiranju pri več koncentracijah nismo mogli dokazati. Potrebna bi bila nadaljnja testiranja z več ponovitvami na obeh celičnih linijah, da bi potrdili aktivnost na rakavih celicah in neaktivnost na nerakavih celicah ter določili pravi IC_{50} . Spojina **27** je med obravnavanimi zaviralci človeške topoizomeraze II edina toksična za rakave celice in netoksična za zdrave človeške celice. Gre za pirolamidni derivat, katerega struktura izhaja iz morskega alkaloida oroidina. Spojina je bila načrtovana kot ATP-kompetitivni zaviralec človeške DNA topoizomeraze II.

Preglednica X: Zbrani rezultati testiranja zaviralcev človeške topoizomeraze II na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC

Ime spojine	št. spojine	aktivnost na Hep G2	aktivnost na HUVEC
IZS-40	27	AKTIVNA $IC_{50} = 32,9 \mu M$	NEAKTIVNA
IZS-47	28	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
IZS-93	29	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
IZS-97	30	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
IZS-98	31	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA

Zaviralci DNA giraze

Vrednotenje citotoksičnosti, ki smo ga izvedli pri zaviralcih bakterijske DNA giraze B, je pomembno s stališča selektivnosti. Spojine, ki so izkazale aktivnost na obeh celičnih linijah, niso selektivne le za bakterijske encime. Neaktivne spojine so zanimive za nadaljnjo obravnavo, saj zaviralno delujejo le na bakterijsko DNA girazo B in so lahko uporabne v razvoju novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin.

Preglednica XI: Zbrani rezultati testiranja zaviralcev DNA giraze na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC

ime spojine	št. spojine	aktivnost na Hep G2	aktivnost na HUVEC
DBT-102	<u>1</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
DBT-126	<u>2</u>	AKTIVNA $IC_{50} = 10,7 \mu M$	NEAKTIVNA
DBT-190	<u>3</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
DBT-191	<u>4</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
KMB-21	<u>5</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
KOB-33	<u>6</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
LDN-9	<u>7</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
LDN-13	<u>8</u>	AKTIVNA $IC_{50} = 12,5 \mu M$	NEAKTIVNA
LMD-17	<u>9</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
LMD-20	<u>10</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
MDN-35	<u>11</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
MDN-48	<u>12</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
MDN-101	<u>13</u>	NEAKTIVNA	AKTIVNA $IC_{50} = 33,5 \mu M$
MDN-105	<u>14</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
NBH-12	<u>15</u>	AKTIVNA $IC_{50} = 11,6 \mu M$	AKTIVNA v presejalnem testu*
NNS-21	<u>16</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
TLK-6	<u>17</u>	AKTIVNA $IC_{50} = 52,0 \mu M$	NEAKTIVNA

ime spojine	št. spojine	aktivnost na Hep G2	aktivnost na HUVEC
TLK-11	<u>18</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
TLK-13	<u>19</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
TMM-9	<u>20</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
TZS-13	<u>21</u>	AKTIVNA IC ₅₀ = 28,4 µM	NEAKTIVNA
TZS-17	<u>22</u>	AKTIVNA IC ₅₀ = 27,5 µM	NEAKTIVNA
TZS-26	<u>23</u>	AKTIVNA IC ₅₀ = 28,4 µM	AKTIVNA IC ₅₀ = 37,4 µM
TZS-32	<u>24</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA
TZS-33	<u>25</u>	AKTIVNA IC ₅₀ = 55,6 µM	NEAKTIVNA
TZS-36	<u>26</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA

* Citotoksičnost spojine 15 smo na celični liniji HUVEC vrednotili le v presejalnem testiranju v koncentraciji 50 µM. Za določanje IC₅₀ je potrebno izvesti še testiranje v širšem koncentracijskem območju v treh bioloških ponovitvah.

Zaviralec izlivnih črpalk

Spojina ni bila aktivna na nobeni od obravnavanih celičnih linij. Njen mehanizem delovanja se razlikuje od delovanja zaviralcev topoizomeraz, zato za to nalogo ni pomembna. Uporabili smo jo, ker nas je zanimal učinek spojine z drugačnim mehanizmom delovanja na celice HUVEC in Hep G2. V presejalnih testih smo največji vpliv na zmanjšanje celičnega preživetja zaznali na celični liniji Hep G2, ko smo določili 76,6 % viabilnost. Spojina je bila sintetizirana kot zaviralec pregnan X receptorjev, zaviralno pa deluje tudi na P-glikoprotein izlivne črpalke, zato je potencialna učinkovina v terapiji raka.

Preglednica XII: Pregled rezultatov testiranja spojine 32 na celičnih linijah Hep G2 in HUVEC

ime spojine	št. spojine	aktivnost na Hep G2	aktivnost na HUVEC
KDS-26	<u>32</u>	NEAKTIVNA	NEAKTIVNA

Statistična analiza

Predpostavili smo, da so za nadaljnja testiranja primerne spojine, ki so v presejalnih testih celično preživetje znižale na 50 % ali manj. Da bi preverili, kakšno je v resnici signifikantno znižanje celične viabilnosti, smo izvedli dvostranski t-test. Pri interpretaciji rezultatov je bila potrebna previdnost, saj so pri nekaterih spojinah rezultati t-testa kazali na statistično značilno spremembo (p je bil manjši od 0,05), vendar so celično viabilnost navidezno celo povečale. Te rezultate smo izključili in upoštevali le tiste, pri katerih povprečna celična viabilnost ni presegla 100 %. Rezultati so zbrani v spodnjih preglednicah (Preglednica XIII, Preglednica XIV). Predpostavili smo, da se rezultati testiranj porazdeljujejo normalno (po Gaussovi krivulji). Da bi potrdili verodostojnost t-testa, bi morali izvesti grafično analizo porazdelitve podatkov ali statistično analizo, na primer Anderson-Darlingov, Kolmogorov-Smirnov ali Shapiro-Wilkov test (42).

Spojine, po dodatku katerih smo celicam izmerili statistično pomembno znižanje viabilnosti, smo v grafičnih prikazih rezultatov kolorimetričnega testiranja označili s simbolom*. Pozitivna kontrola etopozid je v koncentraciji 50 μ M pri vsakem testiranju statistično pomembno zmanjšala celično preživetje in je v sledečih preglednicah ne navajamo. Podvojene številke in oznake spojin pomenijo signifikantno znižanje celične viabilnosti v dveh bioloških ponovitvah testiranja.

Preglednica XIII: Prikaz spojin s statistično značilnim vplivom na preživetje celic Hep G2

ime spojine	št. spojine	% viabilnosti	% viabilnosti	% viabilnosti	povprečje viabilnosti (%)	t-test
DBT-126	<u>2</u>	0,722	0,635	0,722	0,693	0,00326
LDN-13	<u>8</u>	3,026	2,349	3,704	3,026	0,00087
MDN-35	<u>11</u>	76,652	70,072	77,085	74,603	0,03296
MDN-101	<u>13</u>	62,376	70,235	80,668	71,093	0,01538
NBH-12	<u>15</u>	0,548	0,722	0,895	0,722	0,00326
TLK-6	<u>17</u>	/	16,547	17,316	16,931	0,00274
TLK-11	<u>18</u>	35,284	29,233	/	32,259	0,00085
TLK-11	<u>18</u>	68,202	63,731	68,609	66,847	0,00259

ime spojine	št. spojine	% viabilnosti	% viabilnosti	% viabilnosti	povprečje viabilnosti (%)	t-test
TLK-13	<u>19</u>	71,761	66,989	55,909	64,886	0,00495
TLK-13	<u>19</u>	60,750	71,183	62,240	64,724	0,00144
TZS-13	<u>21</u>	82,330	82,585	77,557	80,824	0,02197
TZS-13	<u>21</u>	30,804	40,289	30,939	34,011	0,00012
TZS-17	<u>22</u>	43,892	36,989	42,443	41,108	0,00063
TZS-17	<u>22</u>	14,002	17,389	/	15,696	0,00022
TZS-26	<u>23</u>	28,977	30,000	27,102	28,693	0,00179
TZS-26	<u>23</u>	25,790	28,636	37,850	30,759	0,00015
TZS-32	<u>24</u>	85,653	81,477	83,693	83,608	0,03746
TZS-33	<u>25</u>	40,568	29,148	33,239	34,318	0,00021
IZS-40	<u>27</u>	23,232	21,068	22,107	22,136	0,00487
KDS-26	<u>32</u>	73,295	77,045	79,602	76,648	0,01197

Odnos med koncentracijo in učinkom smo na celični liniji Hep G2 testirali s spojinami 2, 8, 15, 17, 18, 21, 22, 23, 25 in 27. Poleg tega smo testirali še spojino 7, za katero t-test ni pokazal signifikantnega znižanja viabilnosti. Glede na p-vrednosti statistične analize presejalnega testa bi lahko odnos med koncentracijo spojine in njenim učinkom ugotavljali tudi za spojine 11, 13, 19, 24 in 32.

Preglednica XIV: Prikaz spojin s statistično značilnim vplivom na preživetje celic HUVEC

ime spojine	št. spojine	% viabilnosti	% viabilnosti	% viabilnosti	povprečje viabilnosti (%)	t-test
DBT-126	<u>2</u>	5,434	5,434	5,164	5,344	0,00019
DBT-190	<u>3</u>	85,050	82,077	88,652	85,260	0,00450
DBT-191	<u>4</u>	90,363	82,438	89,553	87,451	0,02096
KOB-33	<u>6</u>	/	69,664	79,522	74,593	0,04358
LDN-13	<u>8</u>	0,657	1,604	1,840	1,367	0,00262
MDN-101	<u>13</u>	2,313	2,392	1,682	2,129	0,00273

ime spojine	št. spojine	% viabilnosti	% viabilnosti	% viabilnosti	povprečje viabilnosti (%)	t-test
NBH-12	<u>15</u>	6,923	5,079	6,729	6,244	0,00113
TLK-6	<u>17</u>	13,039	8,307	15,089	12,145	0,00119
TLK-13	<u>19</u>	46,619	52,151	55,063	51,278	0,00067
TMM-9	<u>20</u>	84,083	84,180	90,586	86,283	0,04073
TZS-13	<u>21</u>	15,251	11,558	17,052	14,620	3,1E-06
TZS-17	<u>22</u>	14,080	11,288	13,449	12,939	4,5E-06
TZS-26	<u>23</u>	22,218	19,500	23,523	21,747	0,00175
TZS-32	<u>24</u>	76,674	63,795	64,245	68,238	0,01122
TZS-33	<u>25</u>	41,279	46,232	48,034	45,182	6,6E-05
IZS-40	<u>27</u>	22,276	23,807	24,617	23,566	1,9E-05
IZS-97	<u>30</u>	96,848	92,795	93,155	94,266	0,03751

Na celični liniji HUVEC smo odnos med koncentracijo in učinkom testirali za spojine 2, 8, 13, 17, 21, 22, 25 in 27 ter tudi 5, 19 in 23, ki jih v predstavljeni tabeli ni. Glede na rezultate statistične analize so celično preživetje signifikantno znižale tudi spojine 3, 4, 6, 15, 20, 24 in 30, ki bi jih lahko za določitev odnosa med učinkom in odmerkom testirali v večjem območju koncentracij.

SKLEPI

Test MTS je primeren za delo s celicami Hep G2 in HUVEC. Izvajamo ga lahko z enakimi reagenti in po enakem protokolu.

Na celični liniji Hep G2 smo ugotovili citotoksičnost enega zaviralca človeške topoizomeraze II (spojina 27). Ker je bila spojina razvita kot potencialna protitumorna učinkovina, je to željen učinek na celice. Ostale spojine iz skupine zaviralcev človeške topoizomeraze II nimajo protitumornega delovanja. Predvidevali smo, da zaviralci bakterijske DNA giraze B ne bodo toksični za celice Hep G2, vendar je bilo nekaj spojin vseeno aktivnih. Spojine, ki so problematične s stališča varnosti in niso primerne za protibakterijsko zdravljenje so spojine 2, 8, 15, 17, 21, 22, 23 in 25.

S testiranjem zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II na celični liniji HUVEC smo želeli potrditi varnost spojin. Pričakovali smo, da spojine ne bodo toksične za zdrave celice in s testiranjem smo našo hipotezo potrdili, saj nobena od 5 testnih spojin ni delovala zaviralno na rast celic HUVEC. Hipotetično naj bi bili zaviralci DNA giraze B citotoksični le za bakterijske celice, na človeške pa naj ne bi učinkovali zaviralno. Takih je bilo 23 spojin. Spojine, ki so bile citotoksične na celični liniji HUVEC, niso primerne kot protibakterijske učinkovine. To so spojine 13, 15 in 23.

Zaviralci človeške DNA giraze B, ki so bili neaktivni na obeh obravnavanih celičnih linijah, so primerni za nadaljnje raziskave v razvoju protibakterijskih učinkovin. Kot take so se izkazale spojine: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 24 in 26. Ostale spojine so neselektivne in so citotoksične za človeške celice.

Glede na rezultate statistične analize so viabilnost celic Hep G2 in HUVEC signifikantno zmanjšale tudi nekatere spojine, ki smo jih določili za neaktivne. Morda bi bilo ustrežnejše, da v testiranjih ne bi postavili fiksne meje odstotka viabilnosti za ovrednotenje aktivnosti spojin (v našem primeru smo za aktivne določili spojine, pri katerih smo celicam izmerili največ 50 % viabilnost), temveč bi aktivnost vrednotili glede na signifikantno zmanjšanje celičnega preživetja posamezne testne ploščice in nato v nadaljnja testiranja odnosa med odmerkom in učinkom uvrstili vse spojine, za katere je $p < 0,05$ in ki ne povzročijo povišanja celične viabilnosti nad 100 %.

Velika razpršenost rezultatov in nejasne povezave med učinkom in odmerkom nekaterih testiranih spojin bi lahko pomenile slabšo topnost spojine v uporabljenem topilu, oziroma celičnem gojišču. Da bi sum na slabo topnost izključili ali potrdili, bi bilo smiselno

raziskati topnost spojin in prisotnost morebitnih agregatov, ki bi lahko vplivali na rezultate testiranja.

Za še bolj kontrolirane pogoje gojenja celic bi lahko izvedli teste mikrobne kontaminacije laboratorija in celičnih linij.

Da bi dobili ustrezne rezultate presejalnih testiranj in določili točne vrednosti IC_{50} v testiranjih odnosa med odmerkom in učinkom, bi morali vsak test izvesti v vsaj treh neodvisnih bioloških ponovitvah. Za vrednotenje citotoksičnosti poleg testa viabilnosti, ki smo ga izvedli s tripan modrim, in metabolnega testa, ki smo ga izvedli s kolorimetričnim MTS testom, poznamo še teste preživetja, transformacije in inflamatorne teste. S testom MTS ne moremo določiti mehanizma delovanja spojin. Da bi ovrednotili, ali spojine delujejo citotoksično ali citostatično in po kakšnem mehanizmu, bi bilo potrebno izvesti druge teste, na primer pretočno citometrijo (43; 44).

LITERATURA

1. Državni program za obvladovanje raka 2017–2021, 20. 4. 2017, 18100-2/2017/4, str. 5–9, 15–21. [dostop 13. 12. 2017] <http://www.dpor.si/wp-content/uploads/2012/01/DPOR-2017-20211.pdf>
2. Fras AP: Onkologija, Ljubljana: Katedra za onkologijo in radioterapijo, 1994: 13–17.
3. Forner A, Llover JM, Bruix J: Hepatocellular Carcinoma. *Lancet* 2012; 379(9822): 1245–55.
4. Barbhuiya MA, Lemitri-Chlich G, Tran PT: Therapeutic potential of anti-angiogenic multimodal biomimetic peptide in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(60): 101520–34.
5. Gadžijev EM, Sojar V: Rak jeter. *Zdrav Vestn* 2003; 72: Supl. I: 49–52.
6. Bajrektarević DŽ. Ugotavljanje genotoksičnega vpliva izbranih citostatikov na bakterije, človeške in ribje jetrne celice. Magistrsko delo (Du2). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2013.
7. Pommier Y, Kohn KW: Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets. *Med Sci (Paris.)* 2003; 19: 173–86.
8. Pondugula SR, Pavek P, Mani S: Pregnane X Receptor and Cancer: Context-Specificity is Key. *Nuclear receptor research*. 2016; 3: 101198.
9. Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ: The Pregnane X Receptor: From Bench to Bedside. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008; 4(7): 895–908.
10. Amin ML. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*. 2013; 7: 27–34.
11. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008: 1028.
12. Nemeth J, Oesch G, Kuster SP: Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(2): 382–95.

13. Singh SB, Young K, Silver LL: What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol.*, 2017; 1; 133: 63–73.
14. Dale MM, Haylett DG: *Pharmacology Condensed*, 2nd Ed, Elsevier, Edinburgh, 2009: 106–12.
15. Alanis AJ: Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* 2005; 36: 697–705.
16. Miklavčič V: Preprečevanje nastanka in širjenja rezistentnih bakterijskih sevov in ostalih mikroorganizmov. *Obzor Zdr N* 1999; 33: 93–7.
17. Pommier Y: DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology* 2010; 17: 421–33.
18. Pogorelčnik B, Janežič M, Perdih, A: Zaviralci DNA topoizomeraze II alfa - pomembne tarče protirakavih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2015, 66(4): 326–33.
19. Champoux JJ: DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 369–413.
20. Štrukelj B, Kos J (ur.): *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 28, 29.
21. Gouveris P, Skopelitis E, Tsavaris N: Topoisomerase I and II Expression in Recurrent Colorectal Cancer Cells: A Dubious Matter. *InTechOpen*; 2011. [dostop 13. 12. 2017] <https://www.intechopen.com/books/dna-replication-current-advances/topoisomerase-i-and-ii-expression-in-recurrent-colorectal-cancer-cells-a-dubious-matter>
22. Baker MN, Rajan R, Mondragon A: Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(3): 693–701.
23. McClendon AK, Rodriguez AC, Osheroff N: Human topoisomerase IIa rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 39337–45.
24. Alt S, Mitchenall LA, Maxwell A, Heide L. Inhibition of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by aminocoumarin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(9): 2061–69.

25. Register zdravil. [dostop 13. 12. 2017] <https://mediately.co/si/drugs>.
26. Chene P. et al: Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. *BMC Chem. Biol.* 2009; 9: 1.
27. Tomašič T, Mašič LP: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem.* 2014; 14(1): 130–51.
28. Durcik M, Tammela P, Barančoková M, Tomašič T, Ilaš J, Kikelj D, Zidar N: Synthesis and Evaluation of N-Phenylpyrrolamides as DNA Gyrase B Inhibitors. *ChemMedChem* 2018; 13(2): 186–198.
29. Thermo Fisher. Guidelines for Maintaining Cultured Cells. [dostop 13. 12. 2017] <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/maintaining-cultured-cells.html>
30. ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines [dostop 13. 12. 2017] https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx
31. Trdan Lušin T, Trontelj J: In vitro modeli za preučevanje metabolizma učinkovin v jetrih. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 171–174.
32. Hewitt NJ, Hewitt P: Phase I and II enzyme characterisation of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 2004; 34(3): 243–56.
33. Morris KM, Aden DP, Knowles BB, Colten HR: Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest* 1982; 70(4): 906–913.
34. ATCC. Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™). [dostop 8. 12. 2017] <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>
35. Pečar Fonović U, et. al: Vaje iz farmacevtske biokemije, Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, 2011: 99–104.
36. ATCC. HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC® CRL-1730™). [dostop 20. 1. 2018] https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1730.aspx?geo_country=si#culturemethod

37. Cell applications, inc. Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC. [dostop 20. 1. 2018] <https://www.cellapplications.com/human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvec>
38. Sigma-Aldrich. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Culture Protocol. [dostop 20. 1. 2018] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/human-umbilical-vein-endothelial-cells.html>
39. Promega. CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin. [dostop 13. 12. 2017] <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-nonradioactive-cell-proliferation-assay-protocol>
40. Twentyman PR, Luscombe M: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; 56: 279–85.
41. Jamalzadeh J, Ghafoori H, Sariri R, Rabuti H, Nasirzade J et al.: Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW 264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna. J. Med. Biochem.* 2016; 4, e33453.
42. Ghasemi A, Zahediasl S: Normality tests for statistical analysis: A Guide for Non-Statisticians. *Int J Endocrinol Metab* 2012; 10(2): 486–489.
43. Adan A, Kiraz Y, Baran Y: Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17(14): 1213–21.
44. Pozarowski P, Huang X, Gong RW, Priebe W, Darzynkiewicz Z: Simple, semiautomatic assay of cytostatic and cytotoxic effects of antitumor drugs by laser scanning cytometry: effects of the bis-intercalator WP631 on growth and cell cycle of T-24 cells. *Cytometry A.* 2004; 57(2): 113–9.

PRILOGE

Priloga 1: Primer načrta presejalnega testiranja

Datum merjenja: 19.1. 09:00- MTS, ob 12:00 merjenje												
2. PLOŠČICA MERITEV PO 72 URAH												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		ETO	100 µM		LDN-9	50 µM		MDN105	LDN13	0,5% DMSO		
C			50 µM		LMD17	50 µM		50 µM	50 µM			
D			10 µM		LMD20	50 µM					slapa	
E			1 µM		MDN101	50 µM		KDSS26	KOB33			
F			0,1 µM		MDN48	50 µM		50 µM	50 µM			
G			0,01 µM		TLK-6	50 µM						
H												

Priloga 2: Primer načrta testiranja odnosa med koncentracijo in zaviralnim učinkom spojine na rast celic

Nasaditev: 30. 11. 2017 ob 10:00		Dodatek MTS: 4. 12. 2017 ob 10:00										
Tretiranje: 1. 12. 2017 ob 10:15		Merjenje: 4. 12. 2017 ob 13:00										
Hep G2 DOSE-RESPONSE ploščica b												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		75 μ M			75 μ M			ETO	100 μ M			
C		TZS-13	50 μ M		TZS-17	50 μ M		ETO	50 μ M			
D			30 μ M			30 μ M		DMSO	0,50%		sljepa	
E			10 μ M			10 μ M					(100+50 μ L)	
F			1 μ M			1 μ M		DMSO	0,75%			
G			0,1 μ M			0,1 μ M						
H												