

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDER REKIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE CITOTOKSIČNOSTI ANALOGOVI KSANTOHUMOLA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDER REKIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE CITOTOKSIČNOSTI ANALOGOVI KSANTOHUMOLA**

**CYTOTOXICITY OF XANTHOMOL ANALOGUES**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za biologijo (NIB), pod mentorstvomizr. prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom dr. Irene Zajc. Knjižnico spojin strukturnih analogov ksantohumola smo naredili z računalniškim programom FTrees na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko kemijo. Rešetali smo banko spojin National Cancer Institute (NCI), od koder smo izbrane spojine tudi naročili.

#### Zahvala

Zahvaliti se želim mentorju,izr. prof. dr Stanislavu Gobcu, mag. farm., za potrpežljivost in koristne nasvete. Zahvala gre tudi dr. Ireni Zajc za skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo ter koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se želim zahvaliti preostalim zaposlenim na NIB-u za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju. Zahvaljujem se tudi zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo za pomoč pri pridobivanju knjižnice spojin strukturnih analogov ksantohumola.

Predvsem pa se želim zahvaliti mojim staršem, ki so vedno podpirali, spodbujali in razumevajoče spremljali mojo študijsko pot.

#### Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorice dr. Irene Zajc.

Aleksander Rekič

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin  
Član komisije: doc. dr. Andrej Umek

# Vsebina

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>III</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VII</b>
<b>KAZALO GRAFOV</b> .....	<b>X</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. KSANTOHUMOL.....	2
1.1.1. Biološka uporabnost in presnova XN .....	3
1.1.2. Delovanje ksantohumola .....	5
1.2. RAČUNALNIŠKE METODE PRI ODKRIVANJU NOVIH UČINKOVIN.....	6
1.2.1. Metoda Feature trees (drevo molekulskih značilnosti).....	10
1.3. CELIČNE LINIJE .....	11
1.3.1. Celična linija jetrnega hepatoma: HepG2.....	11
1.3.2. Celična linija transformiranih endotelni celic popkovnične vene: HUVEC.....	12
1.3.3. Celična linija humanega multiformnega glioblastoma: SNB19 .....	12
1.3.4. Celična linija raka trebušne slinavke: MiaPaCa-2 .....	12
1.3.5. Celična linija humanega glioblastoma: U87.....	13
1.3.6. Celična linija pljučnega raka: NCI H1299.....	13
1.3.7. Celična linija nerakavih humanih astrocitov: NHA .....	13
1.4. PRESKUSI ZA UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	13
1.4.1. Preskus MTT za ugotavljanje citotoksičnosti .....	14
<b>2. NAČRT DELA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1. REAGENTI IN OPREMA .....	17
3.2. PRIPRAVA VZORCEV .....	18
3.2.1. Priprava knjižnice spojin STA .....	18
3.2.2. Priprava osnovnih raztopin .....	20
3.3. GOJENJE CELIC .....	21
3.3.1. Priprava medijev .....	22
3.3.2. Odmrzovanje celičnih linij.....	23
3.3.3. Presajanje celic .....	23
3.3.4. Štetje celic.....	24

3.3.5.	<i>Zamrzovanje celic</i> .....	25
3.4.	MTT TEST.....	25
3.4.1.	<i>Določanje citotoksičnosti</i> .....	25
3.5.	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV.....	27
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>29</b>
4.1.	CITOTOKSIČNO DELOVANJE XN NA VSEH CELIČNIH LINIJAH.....	29
4.2.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI U87 .....	31
4.3.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJE HEPG2.....	33
4.4.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI HUVEC.....	34
4.5.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI MIAPACA2.....	36
4.6.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI NCI H1299.....	38
4.7.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI SNB19.....	39
4.8.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI NHA.....	41
4.9.	ŠTRNJEN PREGLED REZULTATOV .....	42
<b>5.</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOGE</b> .....	<b>51</b>
7.1.	CITOTOKSIČNO DELOVANJE XN NA VSEH CELIČNIH LINIJAH.....	51
7.2.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI U87 .....	51
7.3.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJE HEPG2.....	52
7.4.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI HUVEC.....	53
7.5.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI MIAPACA2.....	54
7.6.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI NCI H1299.....	55
7.7.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI SNB 19.....	55
7.8.	PRESKUS MTT NA CELIČNI LINIJI NHA.....	56

## Seznam okrajšav

2-D - dvo dimenzionalen

3-D - tro dimenzionalen

DMSO - dimetil sulfo oksid

FBS - fetalni goveji serum (ang. *fetal bovine serume*)

FT - Feature trees (drevo molekulskih značilnosti)

HPLC - visokoločljiva tekočinska kromatografija

HTS - Rešetanje visokih zmogljivosti (ang. *High-throughput screening*)

HUVEC - ang. *human umbilical vein endothelial cells*

L-Glu - L-glutaminska kislina

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NEAA - neesencialne amino kisline

NHA - ang. *normal human astrocytes*

PBS - fosfatna puferna raztopina

Pen/strep - penicilin/streptomycin

XN - ksantohumol

IXN - izokksantohumol

VS- virtualno rešetanje (ang. *virtual screening*)

## Povzetek

Ksantohumul (3-(3,3-dimetil alil) 2,4,4-trihidroksi-6-metoksihalkon) je glavni prenilirani flavonoid hmelja (*Humulus Lupulus L.*). Ksantohumul je učinkovina, ki bi lahko predstavljala novo protitumorsko učinkovino, saj mnoge študije dokazujejo, da zavira presnovno aktivacijo prokarcinogenov, vpliva na razgrajevanje kancerogenih snovi, zavira genotoksične učinke kancerogenov na sesalske celice in posledično lahko vpliva na zaviranje rakavega obolenja. V diplomski nalogi smo na podlagi predpostavke, da imajo podobne spojine podobno biološko aktivnost, pridobili strukturne analoge ksantohumola z metodo dvo dimenzionalnega virtualnega rešetanja na osnovi liganda. Uporabili smo računalniški program FTrees in reševali smo banko spojin National Cancer Institute. Poleg ksantohumola smo izbrali še devet strukturnih analogov, ki smo jim določali citotoksičnost na petih tumorskih celičnih linijah (HepG2, NCI H1299, MiaPaCa 2, SNB19 in U87) in dveh nerakavih celičnih linijah (HUVEC in NHA). Celice smo za 24 ur izpostavili preiskovanim spojinam s koncentracijo  $40 \cdot 10^{-6}$  mol/l ali  $100 \cdot 10^{-6}$  mol/l in nato s kolorimetrično metodo MTT določili preživelost celic. Rezultate smo statistično obdelali s Studentovim t-testom. Strukturne razlike med ksantohumulom in strukturnimi analogi so pokazale, da slednji znižujejo odstotek preživelih celic le na določenih celičnih linijah, kar pa je lahko posledica morebitne različne občutljivosti posamezne celične linije na določen strukturni analog. Preživelost nerakave celične linije NHA je bila, v primerjavi z ostalimi strukturnimi analogi, po izpostavitvi ksantohumulom nižja, vendar so bile razlike premajhne, da bi lahko sklepali na selektivno citotoksičnost. Na podlagi naših rezultatov lahko ovrednotimo strukturni analog 5 kot najbolj učinkovitega, saj je statistično značilno znižal preživelost vseh celičnih linij, z izjemo nerakave celične linije HUVEC.

## Abstract

Xanthohumol is the principal prenylated flavonoid of the hop plant (*Humulus Lupulus L.*). Several studies have shown that xanthohumol could represent a new antitumour substance, due to its inhibiting effects on procarcinogen metabolic activation, effects on degradation of carcinogens and inhibition of the genotoxic effect on mammalian cells. Thus XN could inhibit cancer growth. Based on the assumption that similar compounds have similar biological effects, we used the two-dimensional structure-based virtual screening method to gather structural analogues of xanthohumol. We used FTrees software and screened the National Cancer Institute's compound data bank. We have selected nine structural analogues from our collection. These were tested, together with xanthohumol, for cytotoxic effects on five human cancer cell lines (HepG2, NCI H1299, MiaPaCa 2, SNB19 and U87) and also on two normal human cell lines (HUVEC and NHA). Cells were exposed for 24 hours to the chosen compounds in two different concentrations ( $40 \cdot 10^{-6}$  mol/l and  $100 \cdot 10^{-6}$  mol/l). We assessed cell viability by colorimetric MTT method. For statistical analysis, we used Student's t-test. The structural differences between xanthohumol and selected analogues were most likely the reason, that analogues decrease the viability of certain cell lines, but not the others. We assume that this could be due to the different sensitivity of cell lines to

structural analogues. Compared to structural analogues, cell viability of the normal cell line NHA was lower after exposure to xanthohumol, but the differences were not significant enough to state any selective cytotoxicity. Based on our results, we can conclude that the structural analogue 5 was the most effective as it statistically significantly decreased cell viability of all cell lines but HUVEC.

## Kazalo slik

SLIKA 1: STRUKTURA KSANTOHUMOLA IN IZOKSANTOHUMOLA. ....	2
SLIKA 2: OSNOVNE STRUKTURE FLAVONOIDOV. ....	3
SLIKA 3: ROBOT ZA IZVAJANJE HTS. ....	7
SLIKA 4: EN OD NAČINOV DEFINIRANJA FARMAKOFOROV. ....	9
SLIKA 5: RAZLIČNI PRISTOPI K VIRTUALNEM REŠETANJU SPOJIN. ....	10
SLIKA 6: PRIMER PREDSTAVITVE MOLEKULE KOT DREVESNE STRUKTURE. ....	11
SLIKA 7: SHEMATSKI PRIKAZ REDUKCIJE SUBSTRATA MTT. ....	15
SLIKA 8: IZBRANI STA KI SO NAJVEČKRAT ZNIŽALI PREŽIVELOST CELIC. ....	43

# Kazalo preglednic

PREGLEDNICA I: SEZNAM UPORABLJENE OPREME .....	17
PREGLEDNICA II: SEZNAM UPORABLJENIH REAGENTOV .....	18
PREGLEDNICA III: IZBRANI STRUKTURNI ANALOGI XN, KI SMO JIH VKLJUČILI V NAŠO RAZISKAVO .....	19
PREGLEDNICA IV: STRUKTURNI ANALOGI XN, USTREZNE MOLSKE MASE IN NATEHTE IZ KATERIH SMO PRIPRAVILI OSNOVNE RAZTOPINE .....	20
PREGLEDNICA V: SESTAVA HRANILNIH MEDIJEV ZA CELIČNE LINIJE .....	22
PREGLEDNICA VI: VOLUMEN RAZLIČNIH TEKOČIN ZA POSAMEZNE PLASTENKE, RAZLIČNIH POVRŠIN. ....	24
PREGLEDNICA VII: ŠTEVILO OBRATOV IN ČAS PRI CENTRIFUGIRANJU POSAMEZNIH CELIČNIH LINIJ. ....	24
PREGLEDNICA VIII: GOSTOTA NASAJANJA POSAMEZNE CELIČNE LINIJE ZA ENO VDOLBINICO NA MIRKROTITRSKI PLOŠČI .....	27
PREGLEDNICA IX: REZULTATI POSAMEZNEGA MTT PRESKUSA IN PRIKAZ ODSOTKOV (STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) POSAMEZNIH CELIČNIH LINIJ PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI XN S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L ALI 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI).51	
PREGLEDNICA X: PRIKAZ ODSOTKOV (STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE U87, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST, SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). ....	51
PREGLEDNICA XI: PRIKAZ ODSOTKOV (STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE U87, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). ....	52
PREGLEDNICA XII: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE HEPG2, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE ŠTIRIH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). ....	52
PREGLEDNICA XIII: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE HUVEC, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). ....	53

PREGLEDNICA XIV: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE HUVEC, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST, SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	53
PREGLEDNICA XV: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE MIA PACA-2, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE ŠTIRIH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	54
PREGLEDNICA XVI: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE MIA PACA-2, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE ŠTIRIH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	54
PREGLEDNICA XVII: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE NCI H1299, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	55
PREGLEDNICA XVIII: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE SNB19, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	55
PREGLEDNICA XIX: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE SNB19, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE ŠTIRIH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTAPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI (P<0,05). .....	56
PREGLEDNICA XX: PRIKAZ ODSOTKOV (GLEJ STOLPEC %) PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE NHA, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). PREGLEDNICA PRIKAŽUJE REZULTATE ŠTIRIH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. V STOLPCU T TEST SO	

PRIKAZANI REZULTATI STUDENTOVEGA T-TESTA, S KATERIM SMO DOLOČILI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSTOPANJE OD KONTROLNIH VREDNOSTI ( $P < 0,05$ ).....	56
---	----

## Kazalo grafov

GRAF 1: REZULTATI POSAMEZNEGA MTT PRESKUSA IN PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) POSAMEZNIH CELIČNIH LINIJ PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI XN S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L ALI 100 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE CELIČNE LINIJE, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	29
GRAF 2: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE U87, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	31
GRAF 3: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE U87, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	32
GRAF 4: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC CELIČNE LINIJE U87 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L ALI 100 $\mu$ MOL/L. ....	33
GRAF 5: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE HEPG2 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	33
GRAF 6: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE HUVEC, PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	34
GRAF 7: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE HUVEC PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODSSTOPAJO OD KONTROLE. ....	35
GRAF 8: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC CELIČNE LINIJE HUVEC PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI STRUKTURNIM ANALOGOM XN S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L ALI 100 $\mu$ MOL/L. ....	36
GRAF 9: PRIKAZ ODSOTKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI $\pm$ SD) CELIČNE LINIJE MIApACA-2 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 $\mu$ MOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V	

PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	36
GRAF 10: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE MIAPAČA-2 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI) GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	37
GRAF 11: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC CELIČNE LINIJE MIAPAČA-2 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L ALI 100 μMOL/L. ....	38
GRAF 12: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE NCI H1299 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	38
GRAF 13: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE SNB19 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	39
GRAF 14: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE SNB19 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	40
GRAF 15: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC CELIČNE LINIJE SNB19 PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI STRUKTURNIM ANALOGOM XN S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L ALI 100 μMOL/L. ....	41
GRAF 16: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC (ODSTOTKI ± SD) CELIČNE LINIJE NHA PO 24-URNI IZPOSTAVLJENOSTI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 100 μMOL/L IN PRIMERJAVA S KONTROLO (NETRETIRANIMI CELICAMI). GRAF PRIKAZUJE REZULTATE TREH NEODVISNIH PRESKUSOV, IZVEDENIH V PETIH VZPOREDNIH PONOVIIVAH. STOLPCI, KI SO OBARVANI Z RDEČO BARVO, PRIKAZUJEJO POSAMEZNE STA, KATERIH REZULTATI STATISTIČNO ZNAČILNO ODPSTOJAJO OD KONTROLE. ....	41
GRAF 17: PRIKAZ ODPSTOKOV PREŽIVELIH CELIC VSEH CELIČNIH LINIJ PO IZPOSTAVITVI PRESKUŠANIM SPOJINAM S KONCENTRACIJO 40 μMOL/L. ....	42

## 1. UVOD

Rak je bolezen, ki jo definira nenadzorovano razmnoževanje in širitev nenormalnih, telesu lastnih celic. Maligni tumor in maligna neoplazma (ang. *neoplasm*, pomeni novo rast), sta sinonima za besedo rak. Tumorje razdelimo na benigne in maligne. Oba imata sposobnost nenadzorovane rasti celic, vendar je med njima razlika v dediferenciaciji celic, invazivnosti in sposobnosti metastaziranja (širitev in vraščanje v druga tkiva). Rakave celice se razlikujejo od normalnih v:

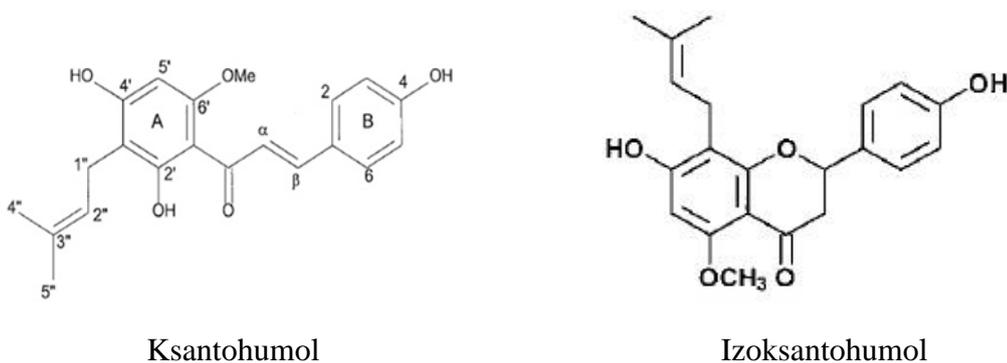
- nenadzorovani rasti in razmnoževanju,
- dediferenciaciji celic in izgubi njihovih osnovnih funkcij,
- invazivnosti,
- metastaziranju.

Sprememba normalne celice v rakavo je posledica ene ali več mutacij v DNA (npr. sprememba protoonkogen v onkogen), ki so lahko pridobljene (kemikalije, virusi, sevanje) ali podedovane. Kancerogeneza je kompleksen večstopenjski proces, ki po navadi vključuje več kot eno genetsko spremembo in skupaj z epigenetskimi faktorji (hormonski, kokancerogeni, tumorpromotorski učinki) vodi v nastanek raka. Rak lahko zdravimo kirurško, z obsevanjem ali kemoterapijo. Izbor terapije je odvisen od vrste in stopnje razvoja raka. Kemoterapija je način sistemskega zdravljenja raka, ki se lahko uporablja v kombinaciji z drugimi načini zdravljenja ali samostojno. Večina protitumorskih učinkovin zavira rast in razmnoževanje rakavih celic s poškodbo njihove DNA, kar vodi v apoptozo rakavih celic. Zaradi njihovega vpliva na celično delitev pa te učinkovine prizadenejo tudi normalne, hitro deleče celice, kot so celice kostnega mozga, spolne celice, celice lasnih mešičkov in celice prebavnega trakta. Posledično imajo protitumorske učinkovine veliko neželenih učinkov (1).

Protitumorske učinkovine razdelimo v splošnem na alkilirajoče citostatike, zaviralce celične presnove (antimetabolite), citotoksične antibiotike, protitumorske učinkovine rastlinskega izvora in hormone (1).

Napredek razvoja možnosti zdravljenja raka, v smislu pomembno značilnega zmanjšanja umrljivosti, še vedno ni zadovoljiv. Zato obstaja velika potreba po nadaljnjem razvoju novih zdravil in strategij za zdravljenja raka. Raziskave so potrdile mnogo učinkov ksantohumola (ang. *xanthohumol*, XN) *in vitro*, kot sta antioksidativni in protivnetni

učinek. Poleg tega XN zavira rast in razmnoževanje celic, angiogenezo ter spodbuja apoptozo. Zaradi naštetih lastnosti bi v prihodnosti lahko imel tudi terapevtsko uporabnost. Z novimi, računalniško podprtimi pristopi, kot je postopek virtualnega rešetanja (ang. *virtual screening*, VS), so možnosti odkrivanja novih zdravilnih učinkovin širše. Postopek omogoča, da na podlagi strukture XN v razpoložljivih knjižnicah spojin, poiščemo strukturne analoge z enakimi ali celo ugodnejšimi biološkimi učinki. Na ta način lahko enostavno in ekonomsko ugodno poiščemo morebitne nove učinkovine in jih uporabimo v poznejših laboratorijskih preskusih.



Slika 1: Struktura ksantohumola in izoksantohumola.

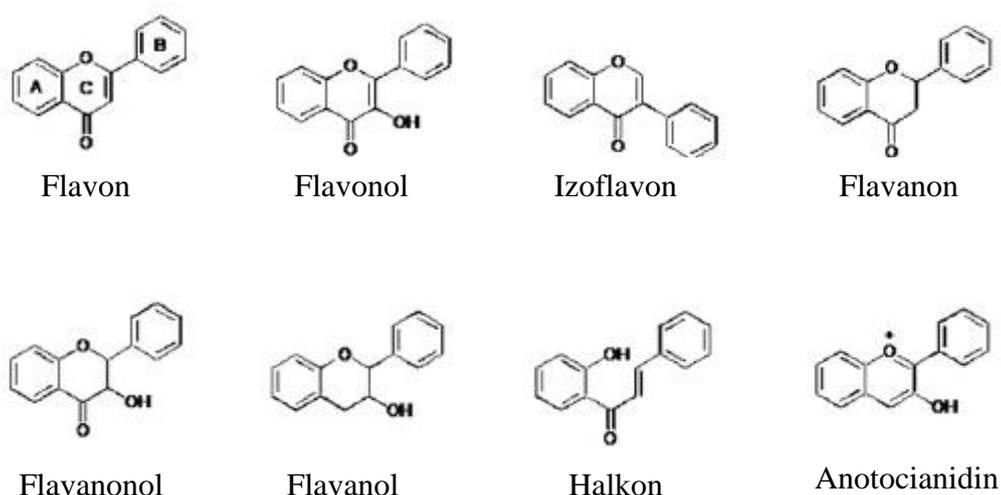
### 1.1. Ksantohumol

Ksantohumol (3-(3,3-dimetil alil) 2,4,4-trihidroksi-6-metoksihalkon) je glavni prenilirani flavonoid hmelja. Strukturno je enostavno preniliran halkon, ki se v naravi pojavlja v hmelju (*Humulus Lupulus L.*, Cannabaceae). Lupulinske žleze ženskih cvetov hmelja izločajo XN in preostale prenilirane flavonoide v obliki smole, skupaj z grenčinami in eteričnimi olji. Poleg XN se v smoli nahaja še trinajst sorodnih halkonov. Največ je XN (0.1 - 1 % suhe mase), v primerjavi z vsebnostjo ostalih sorodnih halkonov pa je 10 - 100-krat večja. Strukturna značilnost halkonov je prosta hidroksilna skupina na mestu 2', zaradi katere, preko izomerizacije, nastanejo ustrezni flavononi (2).

Raziskave potrjujejo protitumorsko delovanje flavonoidov *in vitro*. Flavonoidi so lahko sintetičnega izvora, najdemo pa jih tudi v sadju, zelenjavi, semenih, oreščkih, začimbah, čaju in rdečem vinu. Posledično so del vsakodnevne prehrane človeka. Do danes je znanih več kot 4.000 različnih flavonoidov (3). Osnovno kemijsko strukturo sestavljata fenilna obroča, ki sta med seboj povezana preko heterocikličnega pirana ali pa pirenskega obroča. Na podlagi strukturnih značilnosti jih delimo na več razredov: flavone, izoflavone,

flavonole, flavanole, flavanone, halkone in antocianidine (Slika 2) (3). Med seboj se razlikujejo v stopnji oksidacije heterocikličnega obroča, položaju in številu hidroksilnih ter metoksi skupin. Prenilirani flavonoidi imajo namesto flavonoidnega obroča prenilne ali geranilne skupine. Posledična večja lipofilnost molekule prispeva k visoki afiniteti do bioloških membran (4). XN sodi med halkone, ki imajo odprt ogljikov obroč, fenilna obroča pa sta povezana preko strukture treh ogljikov  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasičenega karbonilnega sistema (5).

Hmelj, ki je sestavina piva in mu poleg tega daje grenkobo in okus, je glavni in najpomembnejši vir XN za človeka. Medtem ko v hmelju prevladuje glavni prenilirani flavonoid XN, je v pivu to flavonon izoksantohumol (ang. *isoxanthohumol*, IXN). Zaradi zvišanja temperature v postopku varjenja piva poteče izomerizacija na prosti hidroksilni skupini XN in nastane flavonon IXN (2). Izomerizacija je tudi vzrok majhne vsebnosti XN in velike vsebnosti IXN v pivih. Največja koncentracija XN v svetlih pivih je 0,15 mg/l, medtem ko je koncentracija IXN med 0,04 - 3,44 mg/l. Biološka učinkovitost IXN je, v primerjavi s XN, manjša (6). Ravno zaradi dokazanih ugodnih učinkov XN, znanstveniki razvijajo raznovrstne postopke pridobivanja ekstraktov hmelja z veliko vsebnostjo XN in tudi postopke proizvodnje piva, obogatenga s XN (7).



Slika 2: Osnovne strukture flavonoidov.

### 1.1.1. Biološka uporabnost in presnova XN

V raziskavah protitumorskega delovanja XN so sočasno preučevali tudi presnovne lastnosti, biološko uporabnost in porazdelitev preniliranih flavonoidov ter halkonov iz

hmelja. V študijah so med drugim preučevali presnovo XN *in vitro* z uporabo podganjih in človeških jetrnih mikrosomov in odkrili štiri presnovke. Mednje sodi XN z dodatno hidroksilno skupino in dehidro-cikloksantohumol, ki predvidoma nastaneta v mešanih encimskih in kemičnih poteh biotransformacije (8). V reakciji glukuronidacije XN *in vitro* nastaneta dva pomembnejša monoglukuronida XN. Poglavitni presnovek glukuronidacije XN (približno 89 % vseh nastalih monoglukuronidov) nastane s konjugacijo glukuronske kisline na hidroksilno skupino na mestu C-4'. Glavnino preostalih 10 % presnovkov glukuronidacije pa predstavlja spojina, ki nastane s konjugacijo glukuronske kisline na kisik na mestu C-4 (9).

Nookandeh in sodelavci so preučevali presnovo XN pri podganah (ang. *Sprague - Dawley rats*). S spektroskopskimi metodami so iz blata podgan izolirali in ovrednotili 22 presnovkov XN v različnih časovnih presledkih. Pri tem je 89 % vseh presnovkov predstavljal XN, ki so ga izolirali v miligramskih količinah. Ostale presnovke so izolirali v mikrogramskih količinah. Nastali presnovki so bile ciklične prenilne spojine s hidroksilno skupino na mestu C-4' ali C-2', ne-ciklične prenilirane spojine z oksigeniranimi substituenti, XN-4'-O-glukuronid, XN-4-O-metil eter, XN-4-O-acetat in IXN (10).

Gerhäuser in sodelavci so s kinetičnim preskusom določali biološko uporabnost XN po peroralnem dajanju. Podganjim samicam so odvzeli vzorce plazme v različnih časovnih presledkih (v razponu od 1 ure do 48 ur) in nato z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (ang. *reverse phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) analizirali presnovke XN. Glavni presnovek je bil XN-4'-O-glukuronid z največjo plazemsko koncentracijo ( $C_{\max}$ ) 3,1  $\mu\text{mol/l}$ .  $C_{\max}$  nepresnovljenega XN je bil 0,34  $\mu\text{mol/l}$ , in sicer 4 ure po odmerjanju. IXN se je pojavil v plazmi v zanemarljivo nizkih koncentracijah (11).

Avula in sodelavci so določali farmakokinetiko XN na podganjih samcih (ang. *Wistar rats*). V prvem preskusu so podganam dali XN intravensko ali *per os* v odmerku 20 mg/kg telesne mase. V drugem preskusu pa so podgane prejele enkratni peroralni odmerek XN, in sicer 500 mg/kg telesne mase. Z uporabo HPLC so analizirali plazmo, blato in urin, ki so jih vzorčili v različnih časovnih presledkih. Dokazali so, da se XN in njegovi presnovki izločijo predvsem skozi gastrointestinalni trakt z blatom, v 24 urah po prejetem odmerku. Prav tako so dokazali, da se plazemska koncentracija XN po intravenskem dajanju po 60 minutah hitro zniža (12). Dosedanji preskusi so razkrili, da je biološka uporabnost XN po

peroralnem dajanju zelo majhna, najverjetneje zaradi zelo učinkovite presnove črevesnih mikroorganizmov (2).

### 1.1.2. Delovanje ksantohumola

V zadnjih letih se je zanimanje za fenolne spojine začelo povečevati, predvsem zaradi domnevno ugodnega delovanja, v smislu zaščite pred boleznimi, kot so rakava obolenja in srčno-žilne bolezni. Veliko raziskav (zlasti *in vitro*) je bilo narejenih predvsem na eni od sestavin hmelja, to je XN. Do danes so poročali o protivnetnem in antioksidativnem učinku XN ter o njegovem vplivu na rast in razmnoževanje celic, zato učinke XN povezujejo s protitumorskim delovanjem (7).

Raziskave potrjujejo učinkovitost XN zoper okužbe, ki jih povzročajo mikroorganizmi, kot so bakterije, virusi, glive in plazmodiji, saj zavirajo njihovo rast. XN zavira razvoj stafilokoknih in streptokoknih bakterij. Protivirusno delovanje so dokazali pri okužbi z govejim virusom diareje (ang. *bovine viral diarrhea virus*), citomegalovirusu, herpes simpleksu tipa 1 in 2 ter virusu humane imunske pomanjkljivosti 1 (HIV-1). Prav tako XN zelo učinkovito zavira razmnoževanje plazmodijev (*Plasmodium falciparum*), ki pri človeku povzročajo malarijo (16).

#### 1.1.2.1. **Antioksidativno delovanje**

Živi organizmi so nenehna tarča reaktivnih kisikovih spojin (ang. *reactive oxygen species*, ROS), med katere sodijo hidroksilni radikal, peroksid in superoksid, ki lahko preko lipidne peroksidacije sprožijo nastanek ateroskleroze, rakavega obolenja in nevrodegenerativnih bolezni. Predpostavljen mehanizem antioksidativnega delovanja flavonoidov je lovljenje ROS (2), ki ga potrjujejo tudi študije.

Gerhäuser in sodelavci so z metodo ORAC (ang. *oxygen radical absorbance capacity*) dokazali, da je XN kar 8.9- in 2.9-krat bolj učinkovit lovilec hidroksilnega in peroksilnega radikala, v primerjavi z referenčno spojino trolox (vodotopen vitamin E). Poleg tega je XN učinkovit lovilec superoksidnih radikalov, nastalih z ksantin-oksidozo, ne da bi encim neposredno zaviral. IXN v obeh preskusih ni pokazal antioksidativnih lastnosti (13). V predhodnih raziskavah so dokazali tudi zaviralni učinek XN na oksidacijo humanih nizkomolekularnih lipoproteinov (LDL) *in vitro*, sproženih z  $\text{Cu}^{2+}$  ter na lipidno peroksidacijo podganjih jetrnih mikrosomov, sproženih z  $\text{Fe}^{2+}$  - askorbatom ali terc-butilnim hidroperoksidom (14, 15).

### 1.1.2.2. Protitumorsko delovanje

XN je najboljše raziskana učinkovina rastlinskega izvora s protitumorskimi lastnostmi. S temi lastnostmi vpliva na različne poti kancerogeneze, s čimer zavira nastanek novotvorb. XN deluje protitumorsko na tri načine:

- zavira presnovo snovi, ki vzpodbujajo rast in razvoj rakavih celic (prokarcinogenov),
- inducira encime za razstrupljanje karcinogenov,
- zavira rast tumorja v zgodnjih fazah razvoja (2).

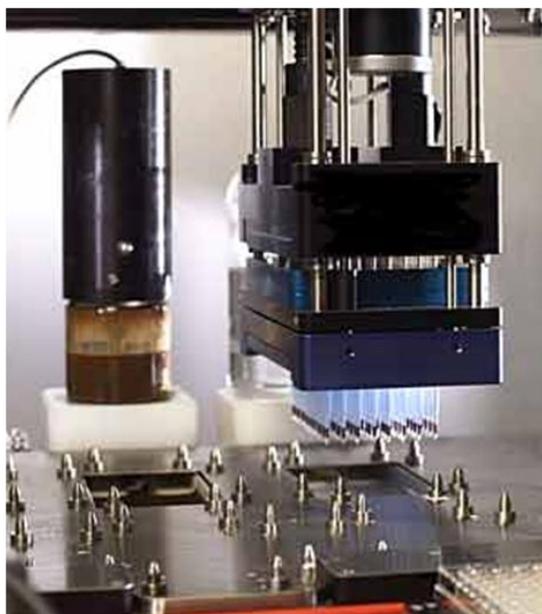
V začetni fazi kancerogeneze XN učinkovito vpliva na delovanje izoencimskega kompleksa CYP P450, ki je udeležen v presnovni aktivaciji prokarcinogenov (17). XN inducira NAD(P)H:kinon-reduktazo v gojenih mišjih celicah Hepa1c1c7. To je encim, ki pretvarja kinone v hidrokinone in s tem zmanjša njihovo toksičnost (13).

Učinek XN na rast in razmnoževanja celic ter citotoksične učinke XN so naprimer preskušali *in vitro* na celicah raka dojke (MCF-7), raka debelega črevesa (HT-29) in celicah raka jajčnikov (A-2780). Uspešno je zavrl rast in razmnoževanje celičnih linij MCF-7 in A-2780. Poleg tega nima dokazanih citotoksičnih učinkov na mišjih hepatocitih, kar je pomembno za razvoj nove zdravilne učinkovine na osnovi XN (5). Nenadzorovana rast in razvoj tumorskih celic povzročata vnetje. S tem se poveča nastanek prostaglandinov, ki so mediatorji vnetja. XN je učinkovito protivnetno sredstvo, saj zavira delovanje encimov ciklooksigenaze-1 in ciklooksigenaze-2 (COX-1 in COX-2) in tako zmanjša nastanek prostaglandinov (13). Za razvoj tumorja je ključnega pomena angiogeneza. Angiogeneza pomeni nastanek in razrast novih krvnih žil, ki zagotavljajo dostavo hranilnih snovi in kisika do delov rastočega tumorja. Znani sprožilci angiogeneze so prostaglandini in dušikov oksid (NO). Študije modelov *in vitro* dokazujejo, da XN zavira njihovo sintezo, zato je učinkovit zaviralec angiogeneze (1, 7, 13, 18, 19).

### 1.2. Računalniške metode pri odkrivanju novih učinkovin

Rešetanje visoke zmogljivosti (ang. *High-throughput screening*, HTS) in virtualno rešetanje (ang. *Virtual screening*, VS), sta pomembna pristopa pri sodobnem odkrivanju novih učinkovin. Metodi se razlikujeta predvsem v načinu pristopa, kjer je HTS eksperimentalno naravnan, medtem ko je VS bolj teoretičen. V preteklih letih je bilo predstavljeno veliko novih statističnih, računalniških in presejalnih metod, s katerimi lahko

združimo eksperimentalno ter *in silico* reševanje. S tem povečamo njun doprinos k odkrivanju novih učinkovin. Čeprav mnogo idej še ni doseglo praktične izvedbe, je v literaturnih podatkih že možno zaslediti nekaj uspešnih rezultatov tovrstnega zgodnjega odkrivanja novih učinkovin (20).



Slika 3: Robot za izvajanje HTS.

Pri odkrivanju novih spojin vodnic ima glavno vlogo tehnologija HTS. Gre za fizično reševanje obsežnih knjižnic spojin, kjer z biokemijskimi metodami merimo aktivnost spojin proti določeni tarči. Uporabna je v primerih, ko nimamo predhodnega znanja o strukturi tarče ali razmerju med strukturo in aktivnostjo (ang. *structure activity relationship*, SAR) referenčne spojine. Na uspešnost HTS je močno vplival napredek v avtomatizaciji in miniaturizaciji procesa, saj se pri samem procesu uporabljajo roboti, ki lahko v enem dnevu preverijo aktivnost več kot 10.000 spojin na določeni tarči. Kljub vsem napredkom je HTS še vedno ekonomsko neugoden in časovno zahteven postopek (20, 21, 22).

Alternativni pristop pri odkrivanju novih učinkovin so različni računalniški pristopi, med katerimi je najbolj priljubljeno VS. Metoda je namenjena reševanju obsežnih knjižnic spojin *in silico* in izbiranju manjšega števila kandidatnih molekul za nadaljnje preskuse, s katerimi lahko potrdimo zeleno biološko aktivnost. Tako se lahko s pomočjo VS iz nadaljnje raziskave izključi spojine, ki zagotovo niso aktivne ter pripravi ustrežnejše knjižnice spojin za HTS. VS v osnovi razdelimo na:

1. filtriranje s pomočjo osnovnih deskriptorjev (1-D reševanje),

2. dvodimenzionalno (2-D) rešetanje na osnovi liganda
3. tridimenzionalno (3-D) rešetanje na osnovi liganda in
4. strukturno podprto virtualno rešetanje (ang. *docking*) (20, 21).

- Filtriranje na osnovi preprostih deskriptorjev

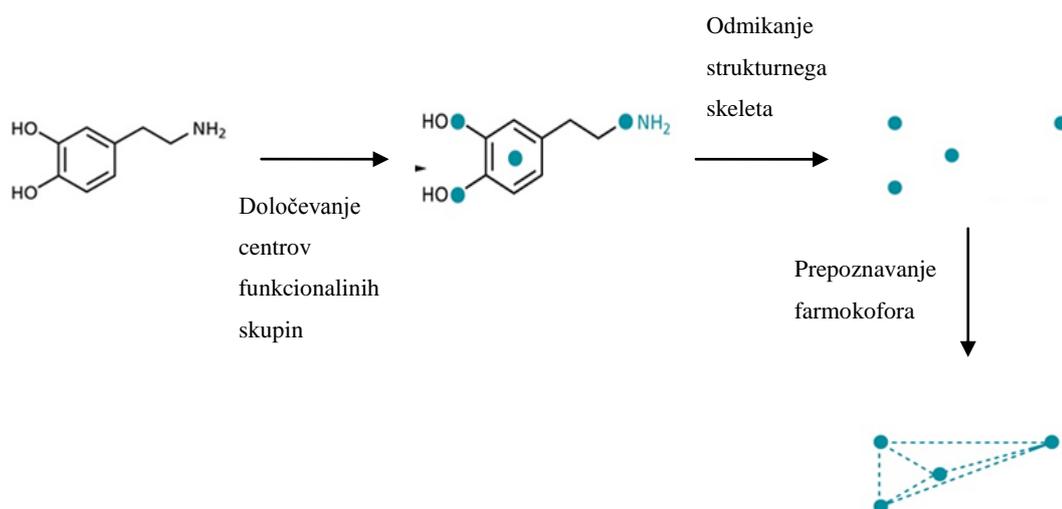
Najbolj preprosta metoda, ki temelji na uporabi enostavnih molekulskih deskriptorjev. Molekulski deskriptor je končni rezultat logičnega in matematičnega postopka, ki pretvori kemijsko informacijo, zapisano (kodirano) v simbolni kemijski formuli, v uporabno številčno vrednost. Uporabna je v najbolj zgodnjih fazah priprave knjižnice spojin z želenimi lastnostmi. Prav tako omogoča izključitev spojin z lastnostmi, ki niso primerne za nadaljnje raziskave.

- 2-D rešetanje na osnovi liganda

Metoda temelji na predpostavki, da imajo spojine s podobno strukturo tudi podobno aktivnost. Uporabna je, kadar struktura tarče ni znana in omogoča dodatno obogatitev knjižnice za HTS. Pri 2-D rešetanju iščemo spojine, ki so strukturno podobne vhodni spojini. Spojine so predstavljene kot binarni zapis (ang. *fingerprint*), v katerega so zajeti podatki o molekularni strukturi posamezne spojine. Primerjavo dveh binarnih zapisov ovrednotimo z Tanimotovim koeficientom, ki je merilo za podobnost (20).

- 3-D rešetanje na osnovi liganda

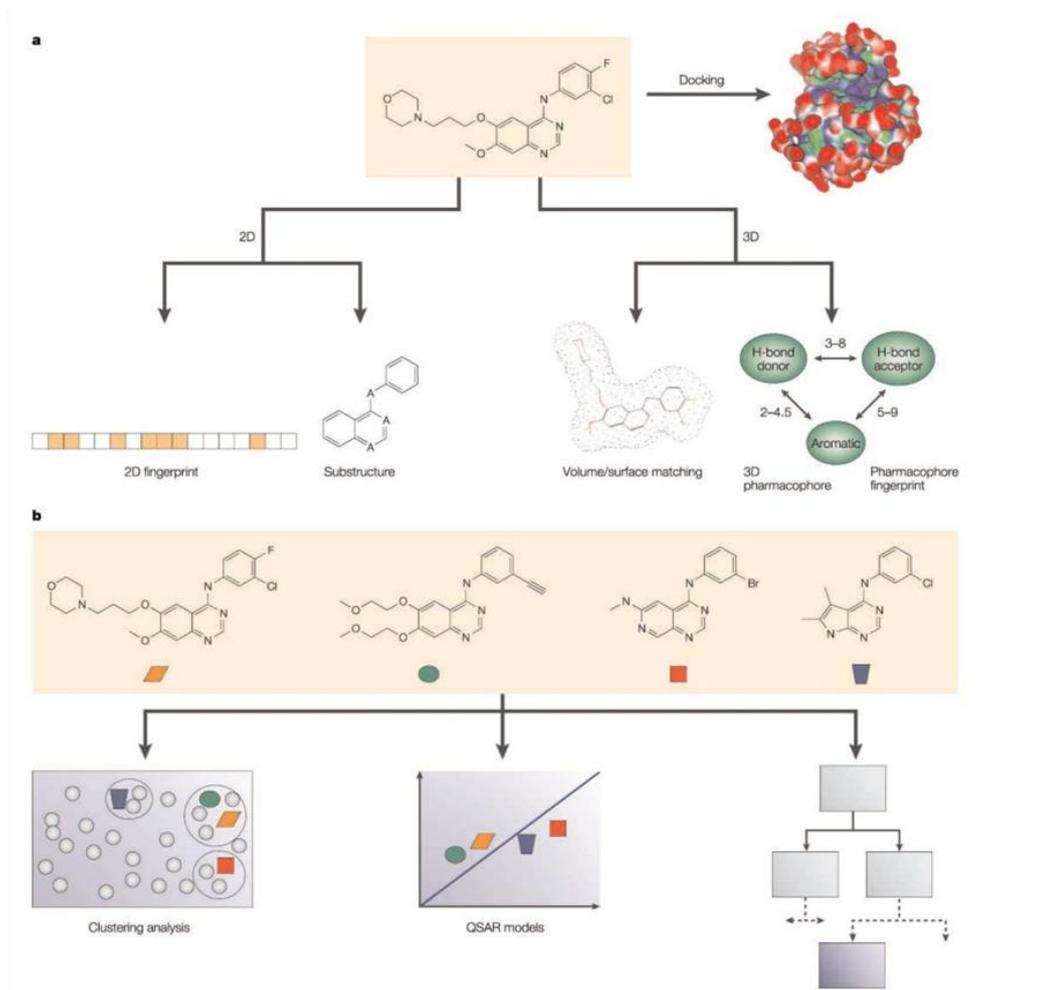
V naravi so molekule 3-D predmeti. Za rešetanje je potrebna knjižnica spojin, ki vsebuje podatke o molekulah v 3-D obliki. Običajno je potrebno napraviti pretvorbo iz 2-D v 3-D obliko s pomočjo molekulske dinamike. Tako najdemo konformacijo, ki je najbolj ugodna (energetski minimum). Najbolj običajen način rešetanja poteka z upoštevanjem farmakofornih točk. Farmakofor pomeni prostorsko razporeditev funkcionalnih skupin, ključnih za aktivnost molekule. Največkrat so farmakoforni modeli sestavljeni iz treh ali štirih točk. Po določitvi farmakofora različni računalniški programi poiščejo vse spojine, ki mu ustrezajo. Tako pridobljeni zadetki se lahko med seboj zelo razlikujejo, vendar je pomembna njihova skladnost s farmakoforom. Čeprav je 3-D rešetanje veliko bolj natančno v primerjavi z 2-D rešetanjem in omogoča obogatitev knjižnice spojin s strukturno različnimi spojinami, ima metoda nekaj slabosti. Je časovno bolj zahtevna in ne upošteva dejstva, da aktivna konformacija ni vedno enaka minimizirani (20, 22).



Slika 4: En od načinov definiranja farmakoforov.

- Strukturno podprto virtualno reševanje - sidranje (ang. *docking*)

Za strukturno podprto virtualno reševanje potrebujemo 3-D strukturo tarče. Slednje so posnete s pomočjo rentgenske kristalografije ali jedrske magnetne resonance. Za strukturno podprto virtualno reševanje se uporabljajo metode sidranja, kjer se s pomočjo računalniških metod vstavlja spojino v aktivno mesto tarče (ta je lahko ali receptor ali encim). Na podlagi podatkov o vezavni energiji je možna medsebojna primerjava spojin in razdelitev na tiste z najbolj in tiste z najmanj ugodnimi lastnostmi. Tako lahko zožimo izbor kandidatnih molekul za nadaljnja preskušanja aktivnosti (21).



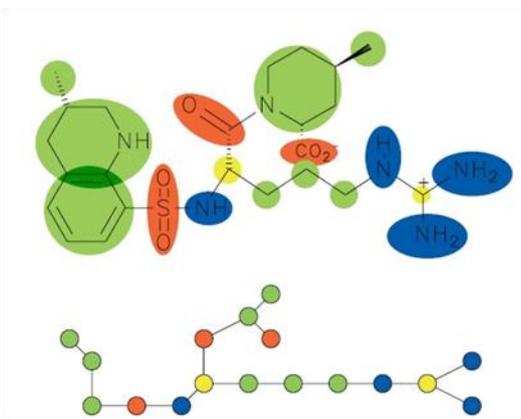
Slika 5: Različni pristopi k virtualnem rešetanju spojin.

### 1.2.1. Metoda *Feature trees* (drevo molekulskih značilnosti)

Kadar 3-D struktura tarče ni znana, je glavni način iskanja novih molekul na osnovi poznavanja strukture liganda (opisano zgoraj). Obstajajo tudi drugi načini, s katerimi ovrednotimo podobnosti med dvema molekulama, kot je naprimer metoda *Feature Trees* (FT) (23).

Namesto da predstavimo molekule v knjižnici spojin kot linearni binarni zapis, je za predstavitev molekule potreben izračun oziroma t.i. »feature tree«. Pri FT predstavimo molekulo kot drevesno strukturo hidrofobnih fragmentov in funkcionalnih skupin, na način kot so med seboj povezani. Kolenca (ang. *node*) drevesne strukture predstavljajo fragmente molekule, kjer vsako kolence označuje niz značilnosti (ang. *set of features*) pripadajočega fragmenta. Podatke o značilnostih lahko vnesemo s pomočjo posebnih računalniških algoritmov za vsako kolence, ki opisujejo strukturo kot tudi fizikalno-kemijske lastnosti

posameznega fragmenta. Vejice (ang. *edges*) povezujejo kolenca, tako kot so ti fragmenti povezani v 2-D strukturi molekule. Vsak atom v molekuli mora biti predstavljen z vsaj enim kolencem. Za dobro definirano drevesno strukturo je potreben pazljiv izbor niza atomov, ne da bi se pri tem slednji povezovali v cikle (23).



Slika 6: Primer predstavitve molekule kot drevesne strukture.

Primerjava dveh FT poteka z različnimi algoritmi, ki cepijo glavno drevesno strukturo na manjše poddrevesne strukture (ang. *subtree*). Z računalniškim programom izračunamo ujemanje med podstrukturami in izpeljemo številčno vrednost podobnosti (ang. *similarity values*). V osnovi gre za poravnavo ene drevesne strukture z drugo, s čimer lahko hitro prepoznamo SAR. Tak koncept primerjave, kjer poenostavimo predstavitev molekule, je uporaben predvsem pri iskanju strukturno podobnih spojin v že znanih podatkovnih bazah spojin. Poleg tega je FT zelo hitra metoda, s katero lahko prav tako obogatimo knjižnice spojin s strukturno različnimi spojinami (ang. *scaffold hopping*) (23).

### 1.3. Celične linije

#### 1.3.1. Celična linija jetrnega hepatoma: HepG2

Jetrni rak je maligni tumor v jetrih. Lahko je primaren (izvira iz jeter), ali sekundaren (se je razširil v jetra z drugega mesta nastanka). Primarni tumor jeter delimo na dve poglavitni vrsti: hepatom, ki se razvije iz jetrnih celic ter holangogiokarcinom iz celic, ki prekrivajo notranjost žolčnih izvodil. Najpogostejši jetrni rak pri otrocih je hepatoblastom (24).

Celično linijo HepG2 so izolirali leta 1979 z biopsijo jeter iz primarnega hepatoblastoma 11-letnega dečka. Morfološko so celice podobne epitelnim jetrnim celicam. Sintetizirajo in izločajo mnoge plazemske proteine, ki so značilni za zdrave človeške jetrne celice.

Primerne so za številne preskuse mutagenosti, citotoksičnosti, ekspresije genov, transkripcije in študije mehanizmov virusnih infekcij. HepG2 celice imajo ohranjeno aktivnost presnovnih encimov I. in II. faze biotransformacije, ki so ključnega pomena pri aktivaciji in detoksikaciji DNA reaktivnih karcinogenov. Ti encimi običajno izgubijo aktivnost v postopku kultivacije celic *in vitro* (26). Značilnost celic HepG2 je, da rastejo v skupkih, ki jih moramo pred nasajanjem na ploščo razbiti. Tako si zagotovimo homogeno suspenzijo, kar je ključnega pomena v preskusih ugotavljanja citotoksičnosti.

#### 1.3.2. Celična linija transformiranih endotelnih celic popkovnične vene: HUVEC

Celice HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) so endotelne celice, ki se pogosto uporabljajo v raziskavah angiogeneze, migracije in adhezije levkocitov *in vitro*. Celice imajo normalen kariotip in so nerakave. V bioloških testih se uporabljajo transformirane celične linije, kot so celice HUVEC. Njihova prednost je, v primerjavi z izvornimi celicami, nesmrtnost (spontana imortalizacija) (27). V nadzorovanih *in vitro* pogojih rastejo celice v eni plasti in zelo hitro, zato je potrebna previdnost, da ne dosežejo preraščenosti oziroma konfluence, ker tedaj odmrejo.

#### 1.3.3. Celična linija humanega multiformnega glioblastoma: SNB19

Multiformni glioblastom je zelo agresiven, hitro rastoč in invaziven možganski tumor. Zdravljenje obsega kirurški poseg, obsevanje in kemoterapijo, vendar je uspešnost zdravljenja majhna. Pričakovana doba preživetja bolnikov z multiformnim glioblastomom je približno eno leto (28). Celično linijo SNB19 so leta 1980 izolirali iz multiformnega glioblastoma 47-letnega moškega. Celična linija je vseskozi obdržala biološko aktivnost, primerljivo z multiformnim glioblastomom *in vivo*. Za SNB19 celice je značilna hitra rast, sinteza angiogenega dejavnika in visoka proteazna aktivnost. Uporablja se jih predvsem v raziskavah osnovnih patofizioloških lastnosti multiformnega glioblastoma (29).

#### 1.3.4. Celična linija raka trebušne slinavke: MiaPaCa-2

MiaPaca-2 je slabo diferencirana celična linija, izolirana iz raka trebušne slinavke. Rak trebušne slinavke je eden izmed agresivnejših oblik raka. Visoka smrtnost je večinoma posledica prepoznega odkritja bolezni. Večina do danes znanih zdravljenj ne ustavi njegovega razvoja (31). Celice so, morfološko gledano, velike in bogate s citoplazmo in imajo visoko stopnjo aneuploidije (nenormalno število kromosomov) (30).

### 1.3.5. Celična linija humanega glioblastoma: U87

Celična linija U87 je visoko maligna celična linija primarnega človeškega tumorja možgan, multiformnega glioblastoma. Celična linija ima spremenjeno število kromosomov oziroma je hipodiploidna (48 % celic iste linije ima kromosomsko število 44). Celice so pridobili iz malignega multiformnega glioblastoma 44-letne bolnice. Celice U87 so morfološko epiteljske celice, rastejo pritrjene na podlago in imajo značilno zvezdasto obliko (32).

### 1.3.6. Celična linija pljučnega raka: NCI H1299

Pljučni rak je najpogostejše rakavo obolenje pri moških in drugo najpogostejše pri ženskah. Poznamo več različnih vrst pljučnega raka. Drobnocelični rak pljuč najhitreje raste, se zelo zgodaj širi v okolico in zaseva v oddaljene dele telesa. V drugi skupini so vrste raka, ki ga sestavljajo ploščate, žlezne ali velike celice.. Celična linija NCI H1299 so celice karcinoma velikih celic, pridobljene iz pljučnega raka 43-letnega moškega (0).

### 1.3.7. Celična linija nerakavih humanih astrocitov: NHA

NHA (ang. *normal human astrocytes*) je celična linija nerakavih humanih astrocitov, ki izvira iz možganskih celic, 22 tednov starega darovalca. Celice NHA rastejo v enem sloju in imajo podolgovato, zvezdasto, vlaknasto obliko. Astrociti so pomembni gradniki krvno-možganske pregrade ter vplivajo na vazokonstrikcijo in vazodilatacijo kapilar. Med posameznimi celicami astrocitov se nahajajo presledkovni stiki, po katerih poteka neposredna komunikacija med celicami (35).

## 1.4. Preskusi za ugotavljanje citotoksičnosti

Za *in vitro* in *in vivo* ugotavljanje živosti in sposobnosti rasti in razmnoževanja celic (proliferacije) so bile razvite številne metode. V splošnem jih razdelimo v štiri skupine:

- reprodukcijski preskusi,
- preskusi prepustnosti,
- preskusi ugotavljanja presnovne aktivnosti,
- neposredni preskusi proliferacije.

**Reprodukcijske preskuse** uporabljamo za določanje števila celic v kulturi, ki so sposobne tvorbe kolonij *in vitro*. Pri takih preskusih v gojišče nasadimo suspenzije celic z nizko gostoto in po določenem času preštujemo število kolonij. Tak način je najbolj zanesljiv za

določanje števila živih in za razmnoževanje sposobnih celic, vendar je tudi najbolj zamuden (34).

**Preskusi prepustnosti** temeljijo na barvanju celic z barvili, kot je na primer tripan modro. Žive celice, katerih membrana ni poškodovana, se ne obarvajo, pri poškodovanih pa barvilo, ki je negativno nabit kromofor, prodre v notranjost celice. Iz razmerja števila obarvanih in ne obarvanih celic po dodatku barvila določimo preživelost. Štetje celic izvedemo s hemocitometrom. Ta metoda se pogosto uporablja za določanje gostote živih celic v celičnih suspenzijah, saj je hitra in ekonomsko ugodna, za izvedbo preskusa pa potrebujemo le majhen del celične populacije (34).

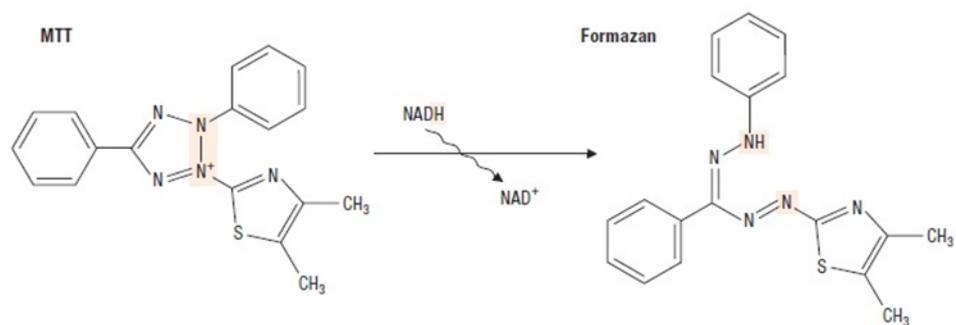
**Presnovno aktivnost** določamo na osnovi pretvorbe tetrazolijevih soli v obarvane formazane ob uporabi spektroskopskih metod (34), kot je na primer kolorimetrična metoda MTT.

V **neposrednih preskusih proliferacije** se kot indikator celične rasti uporablja sinteza deoksiribonukleinske kisline (DNA). Za ugotavljanje sposobnosti rasti in razmnoževanja celic se uporabljajo radioaktivni analogi ali analogi nukleotidov, ki nimajo radioaktivnih lastnosti. Določamo njihovo vključevanje v molekulo DNA (34).

Najbolj primerni so preskusi, ki jih lahko izvajamo na mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami. Z njimi lahko hitro ter sočasno analiziramo veliko vzorcev, porabimo manj medija, celic in mikrotitrskih plošč. Kolorimetrični preskusi nam omogočajo, da vzorce v mikrotitrskih ploščah ovrednotimo neposredno s spektrofotometrom (34).

#### 1.4.1. Preskus MTT za ugotavljanje citotoksičnosti

Preskusi za ugotavljanje citotoksičnosti na podlagi merjenja presnovne aktivnosti temeljijo na dejstvu, da se poškodba celice neizogibno izrazi z izgubo zmožnosti ohranjanja ter zagotavljanja energije za presnovno funkcijo in rast. Običajno merimo aktivnost mitohondrijev v prisotnosti kolorimetričnega substrata (na primer MTT). Za ugotavljanje citotoksičnosti spojin in vpliva na rast in razmnoževanje celic se pogosto uporablja tetrazolijeva sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid ali krajše MTT. Mitohondrijska sukcinat-dehidrogenaza presnovno aktivnih celic reducira MTT v nevodotopne vijoličaste kristale formazana. Tega določamo spektrofotometrično in je v linearnem razmerju s številom živih celic (34).



Slika 7: Shematski prikaz redukcije substrata MTT.

## 2. Načrt dela

Številni viri opisujejo širok spekter protitumorskega delovanja XN. Na podlagi predpostavke, da imajo strukturno sorodne spojine podobno biološko aktivnost, smo se odločili preučiti citotoksičnost XN in njegovih strukturnih analogov *in vitro*. Presejalni preskusi citotoksičnosti na humanih rakavih celičnih linijah so prvi korak pri vrednotenju spojin s protitumorskim delovanjem.

Z računalniškim programom FTrees bomo iz banke prosto dostopnih spojin NCI (National Cancer Institute), na podlagi strukture XN, pridobili knjižnico spojin strukturnih analogov (STA) XN. Glede na dostopnost spojin pri NCI, bomo izbrali 9 STA in preskusili njihovo citotoksično delovanje.

Citotoksičnost bomo določali na izbranih petih tumorskih celičnih linijah (HepG2, NCI H1299, MiaPaCa2, SNB19 in U87) in dveh nerakavih celičnih linijah (HUVEC in NHA). Vsako celično linijo bomo najprej namnožili. Nato bomo z uporabo ustreznega celičnega medija pripravili raztopine preskušanih spojin različnih koncentracij (40 ali 100  $\mu\text{mol/l}$ ).

Na podlagi umeritvenih krivulj za preskus MTT bomo za vsako celično linijo določili gostoto celic, ki pri kolorimetričnem preskusu omogoča meritev v ustreznem območju. Suspenzije celic z ustrezno gostoto bomo nanесли na mikrotitrne plošče in jih izpostavili mediju z raztopinami preskušanih spojin. Po 24 urah inkubacije bomo z MTT kolorimetričnim preskusom določili število preživelih celic. Preučili bomo odziv celic na različne koncentracije XN in njegovih STA ter rezultate slednjih primerjali z rezultati za XN. Na podlagi tako pridobljenih rezultatov bomo ovrednotili citotoksičnost XN in njegovih STA ter s tem preučili morebitno učinkovitost protitumorskega delovanja.

### 3. Materiali in metode

#### 3.1. Reagenti in oprema

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo (**Error! Reference source not found.**).

Preglednica I: Seznam uporabljene opreme.

Oprema	Proizvajalec
Pipete	Biohit
Nastavki za pipete	Costar
Mikrotitrne plošče z 96 vdolbinicami in pokrovom	Costar; Nunc
Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	PIA
Centrifuga	Tehtnica Železniki
Vorteks	IKA
Tehtnica	Metler Toledo
Plastenke za gojenje s perforiranim zamaškom (25 in 75 cm <sup>2</sup> )	Costar
Centrifugirge (15 in 50 ml)	Costar
Epice	Costar
Svetlobni mikroskop	Reiches - Jung
Hemocitometer	Mikropals
Inkubator	Sanyo (37° C, 5% CO <sub>2</sub> )
Stripete (5, 10, 25 in 50 ml)	Costar
Hladilnik	Gorenje
Zmrzovalna skrinja	Gorenje
Spektrofotometer s programom Magellan	Tecan (kombiniran merilec absorbance, florescence in iluminiscence)

Preglednica II: Seznam uporabljenih reagentov.

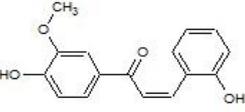
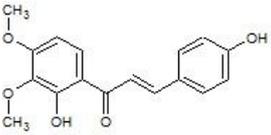
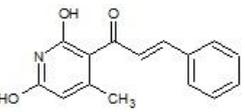
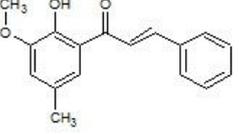
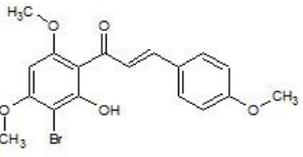
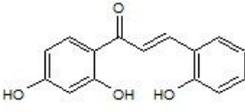
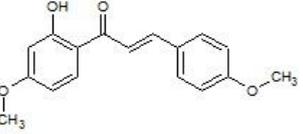
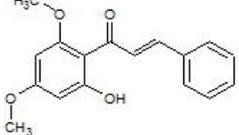
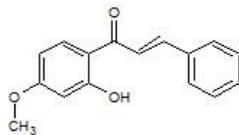
<b>Reagenti</b>	<b>Proizvajalec</b>
DMSO (dimetil sulfoksid)	Sigma
Tripan modro	Sigma
DMEM	Sigma
MEM	Sigma
RMPI 1640	PPA
Williams medium E	Sigma
FBS (fetalni goveji serum)	PPA
PBS (fosfatna puferna raztopina)	PPA
MTT	Gibco
NEAA (neesencialne aminokisljine)	Invitrogen
Hepes Buffer	Sigma
L-Glu (L glutaminska kislina)	PPA
Pen/Strep (penicilin/streptomycin)	PPA
Tripsin	Invitrogen

### 3.2. Priprava vzorcev

#### 3.2.1. Priprava knjižnice spojin STA

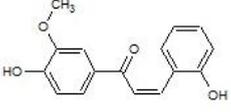
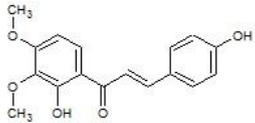
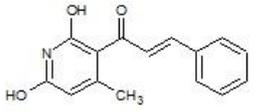
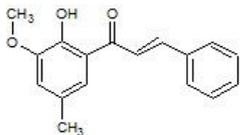
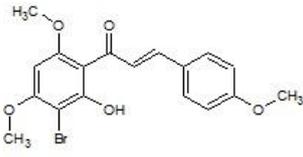
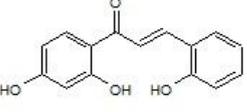
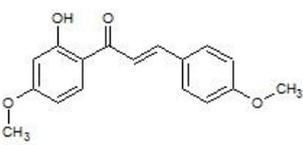
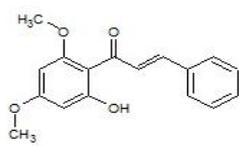
Strukturne analoge XN smo pridobili z 2-D virtualnim rešetanjem na osnovi liganda. Uporabili smo računalniško program FTrees, za katerega je značilno, da strukturo molekule predstavi kot drevesno strukturo (FT). S programom smo, na podlagi strukture XN, reševali knjižnico spojin NCI. Za to bazo smo se odločili, ker je prosto dostopna, poleg tega pa ima NCI tudi prosto dostopne že sintetizirane spojine. Med vsemi rezultati rešetanja na osnovi XN smo izbrali devet analogov.

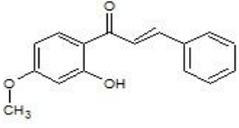
Preglednica III: Izbrani strukturni analogi XN, ki smo jih vključili v našo raziskavo.

Kemijska struktura	Oznaka NCI	Naša oznaka	Podobnost gleda na XN v odstotkih
	16720	1	0,93
	75528	2	0,93
	114645	3	0,93
	55798	4	0,93
	73260	5	0,92
	636790	6	0,92
	78638	7	0,91
	51351	8	0,91
	102053	9	0,91

3.2.2. Priprava osnovnih raztopin

Preglednica IV: Strukturni analogi XN, ustrezne molske mase in natehte iz katerih smo pripravili osnovne raztopine.

Kemijska struktura	Oznaka NCI	Naša oznaka	Molska masa (g/mol)	Masa natehte (mg)	Koncentracija (mol/l)
	16720	1	270	18	$40 \cdot 10^{-3}$
	75528	2	300	20,5	$40 \cdot 10^{-3}$
	114645	3	255	20,8	$40 \cdot 10^{-3}$
	55798	4	268	14,67	$40 \cdot 10^{-3}$
	73260	5	393	23,7	$40 \cdot 10^{-3}$
	636790	6	256	20,4	$40 \cdot 10^{-3}$
	78638	7	284	22,1	$40 \cdot 10^{-3}$
	51351	8	284	23,3	$40 \cdot 10^{-3}$

	102053	9	254	21,8	$40 \cdot 10^{-3}$
---	--------	---	-----	------	--------------------

Za testiranje citotoksičnosti smo opravljali preskuse s strukturnimi analogi XN pri koncentraciji  $40 \cdot 10^{-6}$  M, na izbranih celičnih linijah pa še koncentracijo  $100 \cdot 10^{-6}$  M. Koncentracijo  $40 \cdot 10^{-6}$  M smo izbrali, ker XN pri tej koncentraciji kaže dovolj visoko citotoksično aktivnost na različnih rakavih celičnih linijah, z drugo koncentracijo pa smo želeli preučiti delovanje analogov v odvisnosti od odmerka. Najprej je bilo potrebno pripraviti osnovne raztopine strukturnih analogov, s koncentracijo  $40 \cdot 10^{-3}$  M.

Na analitski tehtnici smo natehtali maso izbranih analogov in z upoštevanjem molske mase izračunali potreben volumen DMSO za željeno koncentracijo po enačbi 1.

Enačba 1:  $m$  je masa natehte,  $M$  je molska masa STA in  $c$  ( $40 \cdot 10^{-3}$  mol/l) je željena koncentracija osnovnih raztopin.

$$V(DMSO) = \frac{m}{M * c}$$

Natehtane STA smo prenesli v epice in nato z merilnimi pipetami dodali izračunan volumen DMSO. Tako pripravljene raztopine smo sterilizirali s filtriranjem skozi membranske filtre s premerom por  $0,22 \mu\text{m}$ . Nato je delo s STA potekalo le še v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka v aseptičnih pogojih. Med posameznimi preskusi smo hranili osnovne raztopine v zamrzovalniku. Odmrznili smo jih, tik preden smo ponovno izvedli posamezni preskus. XN je bil pripravljen v koncentraciji  $70 \cdot 10^{-3}$  M in smo ga prav tako hranili v zamrzovalniku.

### 3.3. Gojenje celic

Celice potrebujejo za svojo rast in preživetje v *in vitro* sistemih ustrezne hranilne medije. Te sestavljajo hranilne snovi, rastni faktorji in antibiotiki. Rastejo lahko le v mediju, ki ima ustrezno pH vrednost (7,4) in temperaturo, ki je enaka telesni temperaturi organizma, iz katerega so bile celice izolirane. Izbrane celične linije smo gojili v inkubatorju, ki je zagotavljal temperaturo  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ter atmosfero s 5 %  $\text{CO}_2$ . Celice smo gojili v sterilnih platenkah z ventilacijskim zamaškom in v ustreznem hranilnem mediju. Pri delu s

celicami smo vedno postopali aseptično. Delo smo opravljali z ustrežno zaščitno opremo (halja, rokavice) v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka.

### 3.3.1. Priprava medijev

Hranilne medije za celične linije, smo pripravljali sproti, in sicer v 50 ml centrifugirkah. Na ta način smo zagotovili uporabo vedno sveže pripravljenega medija. Medije smo pripravljali v aseptični tehniki. Pripravljene medije smo hranili v hladilniku in jih pred uporabo segreli v vodni kopeli s stalno temperaturo 37 °C.

Preglednica V: Sestava hranilnih medijev za celične linije.

Celična linija	Sestava medija	Količina
<b>U87</b>	- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
	- FBS	10 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
<b>HepG2</b>	- Williams medium E	
	- FBS	15 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
<b>NHA</b>	- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
	- FBS	10 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
	- HEPES pufer	20 mM
<b>HUVEC</b>	- MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	
	- FBS	10 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
	- NEAA	1 %
<b>MiaPaCa-2</b>	- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
	- FBS	10 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
	- HEPES pufer	20 mM
<b>SNB19</b>	- MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	
	- FBS	10 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
	- NEAA	1 %
<b>NCI H1299</b>	- RPMI 1640	
	- FBS	5 %
	- L-Glu	2 mM
	- Pen/Strep	1 %
	- HEPES	20 mM
	- NaHCO <sub>3</sub>	0,69 mg/ml

### 3.3.2. Odmrzovanje celičnih linij

Celične linije smo hranili zamrznjene in smo jih pred delom odmrznili. Celice smo odmrzovali pri sobni temperaturi. Vialo s celicami smo obrisali z etanolom in jo nato v laminariju hitro odtajali. Odtajevanje je moralo biti hitro in ni smelo trajati dlje od treh minut, da ne bi prišlo do poškodb celic. Takoj ko se je suspenzija s celicami odtajala, smo jo prenesli s pipetami volumna 1 ml v plastenko za gojenje, ki je imela površino 25 cm<sup>2</sup> (T25). Previdno smo dodali 5 ml segretega hranilnega medija in jih shranili v inkubator za 24 ur. Ker so zamrznjene celice shranjene v 10 % DMSO, ki je citotoksičen, smo po 24 urah celicam zamenjali hranilni medij in s tem odstranili DMSO.

### 3.3.3. Presajanje celic

Celice smo presajali pri 70-80 % konfluenci (oziroma preraščenosti). Na vsako plastenko smo napisali ime celične linije, pasažo (število presajanj; ob vsakem presajanju se vrednost poveča za eno) in datum presajanja.

#### **Splošen postopek presajanja celic:**

1. Odstranili smo medij z aseptično tehniko;
2. z 1x PBS (1 % raztopina) sprali celice (dolili, pazljivo pretresli in odpipetirali);
3. odlepili celice od dna plastenke z 0,25 % tripsinom/0,2 % EDTA<sup>1</sup> (dodali tripsin in pazljivo stresali plastenko) ter pod mikroskopom preverili, če so celice res odlepljene. Tripsin lahko deluje le 5 minut, potem začnejo celice odmirati;
4. suspenziji v plastenki dodali vsaj 3,5 ml hranilnega medija in prenesli celotno vsebino plastenke v 15 ml cetrifugirko;
5. cetrifugirali 5 min pri številu obratov, določenem za posamezno celično linijo;
6. supernatant odpipetirali, usedlino pa ponovno suspendirali s pipeto v 1 mL svežega hranilnega medija,
7. celice prešteli in ustrezen volumen suspenzije celic prenesli v novo, pravilno označeno plastenko in dopolnili s hranilnim medijem do predpisanega volumna;
8. plastenko hranili v inkubatorju.

Pri delu smo uporabljali plastenke dveh različnih velikosti. Glede na površino plastenke smo uporabili ustrezne volumne tekočin.

---

<sup>1</sup> Za HepG2 smo uporabljali 0,1 % tripsin

Preglednica VI: Volumen različnih tekočin za posamezne platenke, različnih površin.

<b>Površina platenke</b>	<b>25 cm<sup>2</sup></b>	<b>75 cm<sup>2</sup></b>
<b>PBS</b>	5 ml	5 ml
<b>Tripsin</b>	1,5 ml	3 ml
<b>Volumen medija</b>	5 ml	10 ml

Celične linije so potrebovale nekaj dni, da so si opomogle po odmrznitvi in pričele normalno rasti. Vse celične linije, z izjemo NHA, so rasle hitro, tako da smo jih presejevali vsake 2 do 3 dni, dokler jih ni bilo dovolj za izvedbo poskusa. Celično linijo NHA smo presajali vsakih 21 dni.

Preglednica VII: Število obratov in čas pri centrifugiranju posameznih celičnih linij.

<b>Celična linija</b>	<b>Število obratov na minuto</b>	<b>Čas centrifugiranja (min)</b>
<b>U87</b>	1000	5
<b>HepG2</b>	800	5
<b>HUVEC</b>	1000	5
<b>MiaPaCa2</b>	1000	5
<b>SNB19</b>	1000	5
<b>NCI H1299</b>	1000	5
<b>NHA</b>	800	5

#### 3.3.4. Štetje celic

Za štetje celic smo uporabili metodo barvanja celic s tripan modrim. Tripan modro je barvilo, ki obarva samo mrtve celice. Vitalne celice se svetijo, saj je njihova membrana nepoškodovana in neprepustna za barvilo. Za štetje celic smo ponovili splošni postopek presajanja celic do šeste točke (podpoglavje Presajanje celic). Odpipetirali smo 10  $\mu$ l celične suspenzije in ji primešali 40  $\mu$ l tripan modrega v sterilni epici. 10  $\mu$ l mešanice s tripan modrim smo nanесли na hemocitometer in pod svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice. Število celic/ml smo izračunali po enačbi 2.

Enačba 2:  $n$  je število celic v štirih kvadratih hemocitometra,  $N$  je število celic v 1 ml celične suspenzije. Število 5 predstavlja petkratno redčitev celic v tripan modrem, z  $10^4$  pa množimo, ker je volumen suspenzije na področju kvadrata 1/10000 ml

$$N = \frac{n}{4} * 5 * 10^4$$

### 3.3.5. Zamrzovanje celic

Z zamrzovanjem dosežemo dolgotrajno shranjevanje celičnih linij. Celice lahko hranimo pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  več mesecev ali pa pri temperaturi do  $-175^{\circ}\text{C}$  (ob uporabi tekočega dušika) več let. Tako shranjene kulture imajo vlogo banke, s pomočjo katere lahko obnovimo celično, kadar je to potrebno.

Izbrane celične linije smo zamrzovali v hranilnem mediju in 10 % DMSO, ki deluje kot krioprotektant. Pri zamrzovanju je postopek enak kot pri splošnem postopku presajanja celic (poglavje Presajanje celic) do točke 6. V posamezno kriogeno vialo smo odpipetirali 900  $\mu\text{l}$  svežega hranilnega medija, v katerem je bilo suspendirano ustrezno število celic. Nato smo v vialo dodali še 100  $\mu\text{l}$  DMSO, kar je ustrezalo končni koncentraciji DMSO (10 %). Vialo smo pravilno opremili z imenom linije, pasažo, datumom zamrznitve in jo prenesli v zamrzovalno skrinjo s temperaturo  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3.4. MTT test

MTT (1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska dehidrogenaza presnovno aktivnih celic reducira v vijoličaste netopne kristale formazana. Nastali formazan je topen v DMSO. Njegovo količino smo merili spektrofotometrično pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtrom valovne dolžine 690 nm. MTT preskus je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje števila celic. Razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic je linearno in specifično za vsako celično linijo. Uporabljamo ga lahko za določevanje citotoksičnosti snovi in njihovega vpliva na rast in razmnoževanje celic.

### 3.4.1. Določanje citotoksičnosti

Na vsaki celični liniji smo opravili po tri preskuse, vsakokrat pri drugi pasaži. Posamezen preskus je trajal tri dni in je vseboval naslednje stopnje: nasajanje celic na mikrotitrne plošče z 96 vdolbinicami, priprava analogov in XN za tretiranje celičnih linij, dodajanje MTT in meritev. Preskuse smo za vsako koncentracijo delali posamično.

### Nasajanje celic na mikrotitrne plošče

- Celice smo odlepili z dna platenke s tripsinom in jih prešteli, po predhodno opisanih postopkih.
- Število celic je moralo zadostovati, da smo lahko na vsaki plošči naenkrat opravili preskus v petih paralelah - vse STA, XN v dveh različnih koncentracijah (40 in 100  $\mu\text{mol/l}$ ) in dve kontroli. Kontrol nismo tretirali z analogi in so pripomogle k preračunavanju preživelosti celic. Za vsak preskus smo napolnili 80 vdolbinic.
- V 50 ml centrifugirko smo odmerili 16 ml hranilnega medija, kar je zadostovalo za naš preskus. V ta hranilni medij smo dodali ustrezní volumen celične suspenzije, katerega število celic je zadostovalo za razporeditev na naši mikrotitrski plošči.
- Vsebino v centrifugirki smo med nanašanjem mešali s pomočjo vorteksa. S tem smo dosegli enakomernost gostote celic v vsaki vdolbinici.
- V vsako vdolbinico smo s pipeto vbrizgali 200  $\mu\text{l}$  celične suspenzije ustrezne gostote. Gostote nasajanja celičnih linij na mikrotitrne plošče so prikazane v Preglednici V.
- Po končanem nasajanju smo mikrotitrsko ploščo pokrili, označili z datumom in prenesli v inkubator za približno 20 ur oziroma toliko časa, dokler se celice niso prilepile na dno vsake vdolbinice.

### Priprava analogov in XN za obravnavo celičnih linij

- Najprej smo na sobni temperaturi odmrznili STA in XN.
- Delovanje STA smo testirali na vseh celičnih linijah pri koncentraciji  $40 \cdot 10^{-6}$  M. Na celičnih linijah MiaPaCa2, U87, HUVEC in SNB19 smo preskusili še koncentracijo  $100 \cdot 10^{-6}$  M. XN smo preskusili v koncentracijah  $40 \cdot 10^{-6}$  M in  $100 \cdot 10^{-6}$  M na vseh celičnih linijah.
- Osnovne raztopine STA smo razredčili s hranilnim medijem do želene koncentracije. Predhodno smo v brezprašni komori pripravili sterilne 2 ml epice in jih označili z številkami analogov. Nato smo v vsako epico dodali 1,2  $\mu\text{L}$  pripadajočega analoga in 1200  $\mu\text{L}$  hranilnega medija s pipeto. Osnovno raztopino ( $c=40 \cdot 10^{-3}$  M) smo redčili tisočkrat, kar je ustrezalo preskušani koncentraciji  $40 \cdot 10^{-6}$  M. Morali smo preračunati, kakšen volumen XN moramo dodati v 1200  $\mu\text{l}$  hranilnega medija. Za izdelavo preskusnih raztopin STA s koncentracijo  $100 \cdot 10^{-6}$  M, smo v vsako epico dodali 3  $\mu\text{l}$  osnovne raztopine STA in redčili z 1200  $\mu\text{l}$  hranilnega medija. Po redčenju smo epice zaprli, homogenizirali in premešali vsebino na vorteksu.

- Nasajene celice smo pregledali pod svetlobnim mikroskopom in nato zamenjali uporabljen medij s novo pripravljenim medijem, ki je vseboval tudi izbrane spojine. Pri kontrolnih celicah smo le zamenjali medij s svežim.
- Po končanem delu smo mikrotitrsko ploščo prenesli v inkubator, kjer smo jo pustili 21 ur.

#### Dodajanje MTT in meritev

- Po 21 urah smo v vsako vdolbinico s celicami dodali 20  $\mu$ l (oziroma 10 %) MTT in ponovno prenesli v inkubator za naslednje 3 ure.
- Po treh urah smo iz vdolbinic odstranili medij in MTT. Delo nato ni več potekalo v brezprašni komori ampak v digestoriju. Kristalom formazana, ki so ostali na dnu, smo dodali 200  $\mu$ l DMSO s pipeto in jih z mešanjem raztopili.
- Nazadnje smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm (z referenčnim filtrom 690 nm).

Preglednica VIII: Gostota nasajanja posamezne celične linije za eno vdolbinico na mikrotitrski plošči.

Celična linija	Gostota nasajanja celičnih linij	Volumen hranilnega medija
<b>U87</b>	7000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>HepG2</b>	8000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>HUVEC</b>	7000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>MiaPaCa2</b>	7000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>SNB19</b>	7000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>NCI H1299</b>	9000/vdolbinico	200 $\mu$ l
<b>NHA</b>	30000/vdolbinico	200 $\mu$ l

### 3.5. Statistična analiza podatkov

Pridobljene rezultate meritev smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev paralelek iz več neodvisnih preskusov. S Studentovim t-testom (dvodelno porazdelitvijo in dvovzorčno neenako varianco) smo primerjali rezultate vzorčnih skupin in kontrole, ki so jo

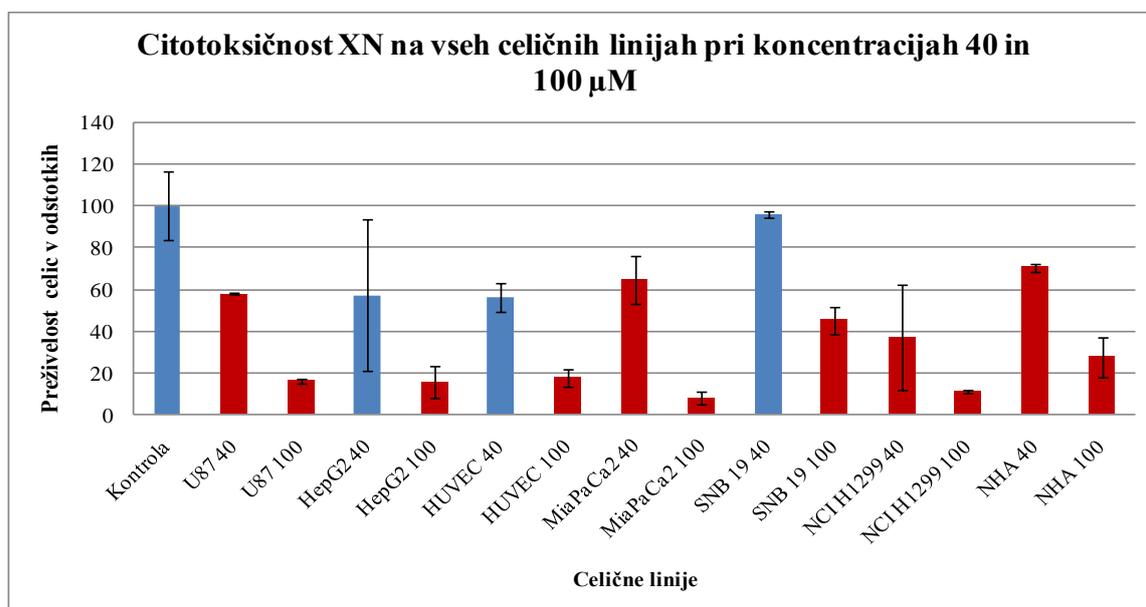
predstavljale celice, izpostavljene zgolj mediju. Odstopanja od kontrole smo imeli za statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta dva vzorca enaka, manjša od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Vse pridobljene rezultate meritev smo najprej normalizirali. Povprečni vrednosti kontrole smo določili vrednost 1. Povprečne vrednosti absorbanc celic, tretiranih z XN in STA smo nato delili s povprečno vrednostjo kontrole in dobili odstotek preživelih celic pri posamezni celični liniji. Za vsako celično linijo smo izvedli več neodvisnih preskusov (od tri do pet preskusov na posamezni celični liniji). Za grafični prikaz delovanja XN in STA na posamezni celični liniji smo primerjali normalizirane vrednosti posameznih preskusov. Normaliziranim vrednostim neodvisnih preskusov smo določili povprečno vrednost, standardno napako in s Studentovim t-testom primerjali normalizirane vzorčne vrednosti s kontrolo. Odstopanja od kontrole smo obravnavali kot statistično značilna, kadar je bila verjetnost, da sta dva vzorca enaka, manjša od 0,05 ( $p < 0,05$ ). Za grafični prikaz smo normalizirane vrednosti množili s 100 in tako pridobili odstotke (%). Kontrola je tako imela vrednost 100 %.

## 4. Rezultati in razprava

Namen naše raziskave je bil preučiti delovanje XN in njegovih strukturnih analogov na preživelost celic *in vitro*. Strukturne analoge XN smo pridobili z računalniškim programom Ftress iz brezplačne banke spojin NCI. Za ugotavljanje citotoksičnosti preiskovanih spojin smo izbrali pet humanih rakavih celičnih linij (U87, HepG2, MiaPaCa-2, SNB19, NCI H1299) ter dve humani nerakavi celični liniji (NHA, HUVEC). Spojine smo preskušali na vseh celičnih linijah pri koncentraciji 40  $\mu\text{mol/l}$ . Pri celičnih linijah U87, MiaPaCa-2, SNB19 in HUVEC smo spojine preskušali še pri koncentraciji 100  $\mu\text{mol/l}$  in s tem raziskali ali je jakost delovanja sorazmerna s koncentracijo. Celične linije smo za 24 ur izpostavili XN in STA. Za ugotavljanje citotoksičnosti smo uporabili preskus MTT, pri čemer so presnovno aktivne (žive) celice po encimski poti spreminjale tetrazolijevo sol MTT v netopne kristale formazana. Tega smo raztopili v DMSO in ga določali spektrofotometrično. Vrednosti nastalega formazana so linearno korelirale s številom živih celic. Pridobljene rezultate meritev smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel. Izračunali smo povprečno vrednost, standardni odklon in s Studentovim t-testom določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

### 4.1. Citotoksično delovanje XN na vseh celičnih linijah



Graf 1: Rezultati posameznega MTT preskusa in prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) posameznih celičnih linij po 24-urni izpostavljenosti XN s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  ali 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne celične linije, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Poleg strukturnih analogov ksantohumola (STA XN) smo preučili tudi vpliv XN na vseh celičnih linijah v koncentracijah 40  $\mu\text{mol/l}$  in 100  $\mu\text{mol/l}$ . Pri koncentraciji 100  $\mu\text{mol/l}$  je XN deloval toksično na vse celične linije in je statistično značilno znižal preživelost vseh celičnih linij: U87 16,0% ( $p=0,007$ ), HepG2 15,6% ( $p=0,003$ ), HUVEC 17,7% ( $p=0,022$ ), MiaPaCa-2 7,7% ( $p=3*10^{-4}$ ), SNB19 45,2% ( $p=0,004$ ), NCI H1299 11,3% ( $p=4*10^{-5}$ ) in NHA 27,6% ( $p=6*10^{-4}$ ).

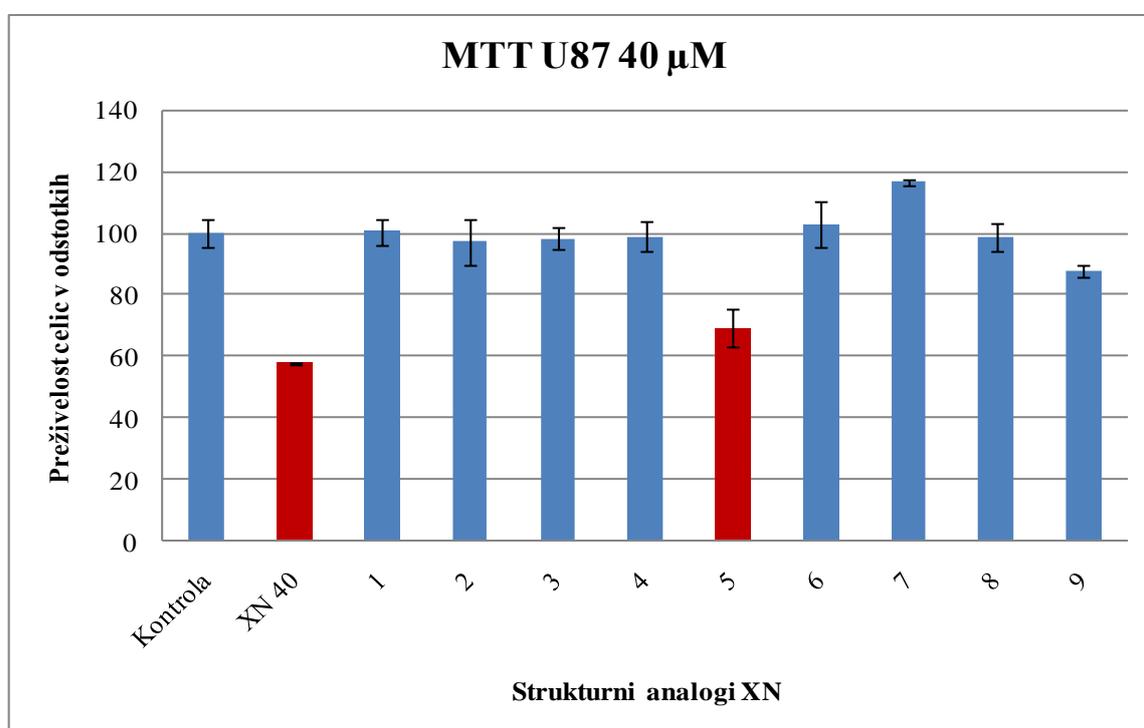
XN je pri koncentraciji 40  $\mu\text{mol/l}$  statistično značilno znižal preživelost celičnih linij U87 (57,9 %;  $p=0,003$ ), MiaPaCa-2 (64,6%;  $p=0,034$ ), NCI H1299 (37,2%;  $p=0,049$ ) in NHA (70,6%;  $p=0,028$ ). Pri tej koncentraciji je imela najmanjšo preživelost celična linija NCI H1299 (37%;  $p=0,049$ ), v primerjavi s kontrolo (100 % preživelost celic). Na nerakavih celičnih linijah NHA in HUVEC je bila preživelost celic 70,6 % ( $p=0,028$ ) in 56 % ( $p=0,074$ ). Preživelost celic NHA je sicer nekoliko večja v primerjavi z rakavimi celičnimi linijami, vendar iz rezultatov ne moremo sklepati na selektivno citotoksično delovanje XN na rakave celice. Preživelost celične linije SNB19 po izpostavitvi XN s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in je bila najvišja (96 %;  $p=0,151$ ) in ni bila statistično značilno različna od kontrole. Pri 100  $\mu\text{mol/l}$  koncentraciji XN, je bila preživelost SNB19 prav tako višja v primerjavi z drugimi celičnimi linijami (45 %;  $p=0,004$ ) (Graf 1).

Naše rezultate lahko primerjamo tudi z rezultati podobnih raziskav citotoksičnosti XN. Maherjeva je v svojem diplomskem delu določila koncentracijsko območje selektivne citotoksičnosti, in sicer od 10  $\mu\text{mol/l}$  do 40  $\mu\text{mol/l}$  (36). Pri tej koncentraciji se je preživelost rakavih in nerakavih celic že začela zmanjševati. V primerjavi s preživelostjo nerakave celične linije NHA iz naše raziskave, se je preživelost enake celične linije v raziskavi Maherjeve znižala pri nekoliko višjih koncentracijah XN (60  $\mu\text{mol/l}$ ). To razliko lahko pripišemo uporabi vzorca XN z drugačno aktivnostjo oziroma čistoto spojine.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo na različno občutljivost celičnih linij na XN. Podobne ugotovitve so v svoji študiji objavili tudi Miranda in sodelavci. Raziskovali so antiproliferacijske in citotoksične vplive preniliranih flavonoidov na človeške rakave celične linije MCF-7 (rak dojke), HT-29 (rak debelega črevesa) in A-2780 (rak jajčnikov). Celice raka jajčnikov so bile bolj občutljive na XN v primerjavi s celicami raka debelega črevesa in raka dojk (5). Po drugi strani je bil XN izrazito citotoksičen za celično linijo raka debelega črevesa z  $IC_{50}$  (polovična maksimalna zaviralna koncentracija, ang. *half-maximal inhibitory concentration*) z 4,1  $\mu\text{mol/l}$  (37), za celice bolnikov s kronično

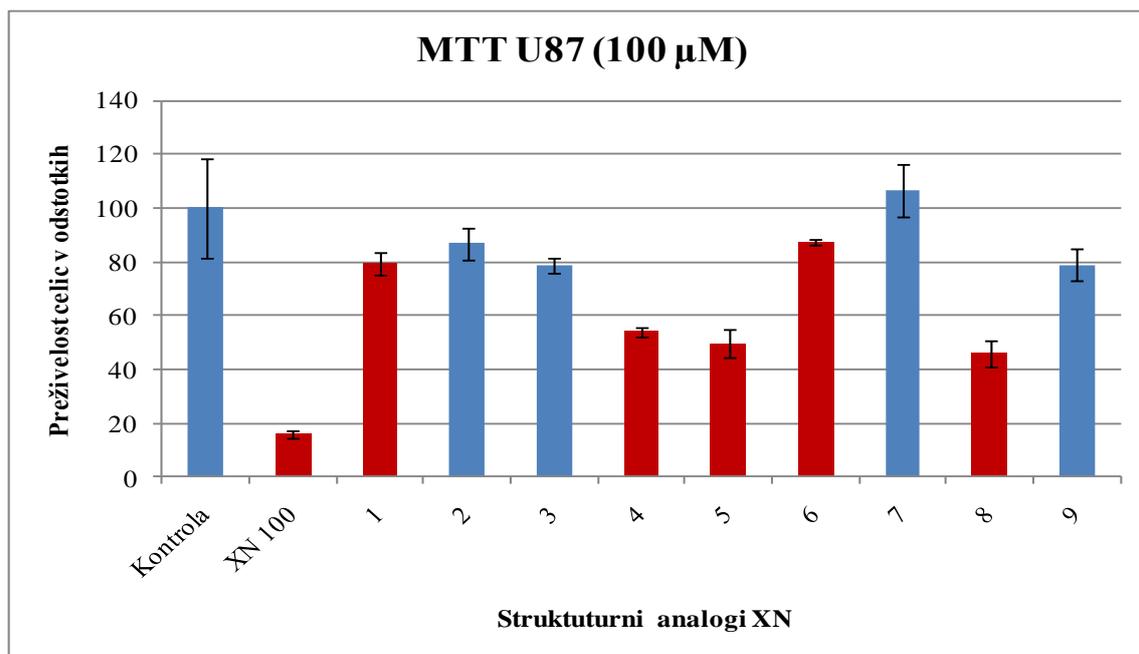
levkemijo pa XN zavira rast s povprečnim  $IC_{50}$  24  $\mu\text{mol/l}$  (38). Celične linije, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, so si različne. Izolirane so bile iz različnih tkiv in imajo posledično tudi različne lastnosti, kot so lahko npr. presnovne značilnost, hitrost rasti in razmnoževanja, vrsta celic (rakave oziroma nerakave), itd. Iz prej omenjenih raziskav je razvidno, da se vsaka celična linija različno odzove na izpostavitve XN, saj na nekatere deluje bolj citotoksično kot na druge. To je razvidno tudi iz naše raziskave. Možno je, da so nekatere celične linije zaradi naštetih lastnosti bolj občutljive na XN. Podobne zaključke je možno posplošiti na preučevane STA XN, kar je pokazala tudi naša raziskava.

#### 4.2. Preskus MTT na celični liniji U87



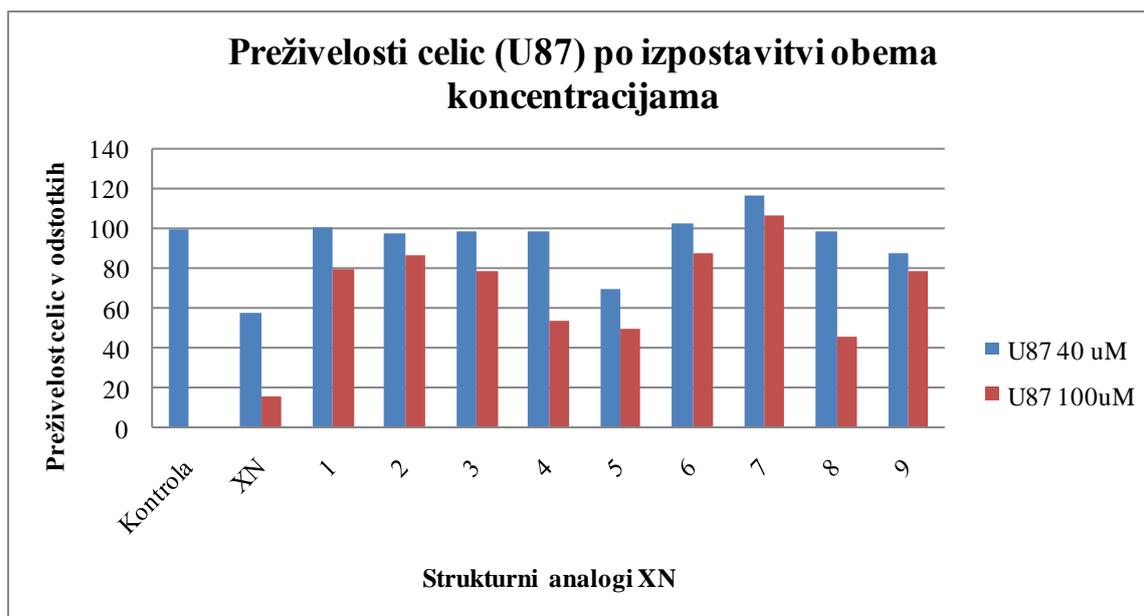
Graf 2: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije U87, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Pri preskušani koncentraciji 40  $\mu\text{mol/l}$  je zgolj STA 5 statistično značilno zavrl rast celične linije U87 ( $p=0,012$ ). Odstotek preživelih celic pri obravnavi s tem analogom je bila 69% v primerjavi s kontrolo (100 % preživelost). Drugi preiskovani STA niso statistično značilno vplivali na preživelost celic pri isti koncentraciji, zato jih ne moremo obravnavati kot biološko pomembne. STA 6 (103%;  $p=0,56$ ) in 7 (116%;  $p=0,022$ ) sta v primerjavi s kontrolo, povečala število celic. Pri STA 7 je bilo to zvišanje statistično značilno.



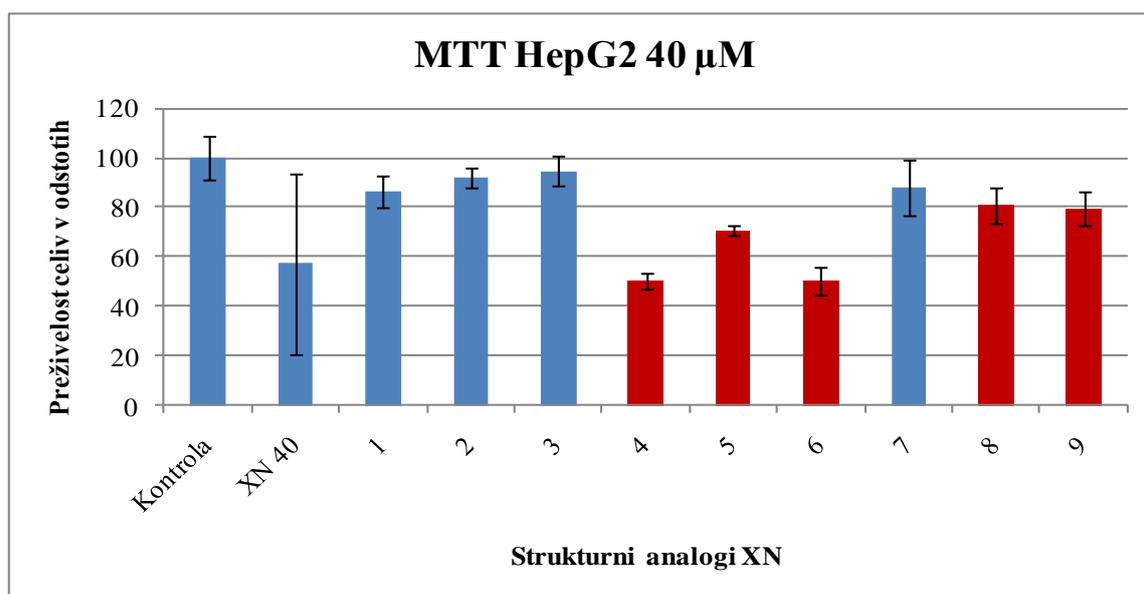
Graf 3: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije U87, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Pri koncentraciji 100  $\mu\text{mol/l}$  so statistično značilno znižali preživelost celic STA 1 (79,4 %;  $p=0,014$ ), 4 (53,9 %;  $p=0,016$ ), 5 (49,6 %;  $p=0,003$ ), 6 (87,3 %;  $p=0,044$ ) in 8 (45,9;  $p=0,043$ ) (Graf 3). Iz primerjave rezultatov preživelosti z uporabo preskušanih koncentracij je razvidno, da je biološki učinek STA pri tej celični liniji odvisen od koncentracije, saj je preživelost celic pri višji koncentraciji STA, manjša. Nobeden izmed analogov s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  nima enakovrednega delovanja kot XN. Odstotek preživelih celic je po izpostavitvi XN 16 % ( $p=0,007$ ), medtem ko je bila najnižja preživelost celic po izpostavitvi STA 8, in sicer 45,9 % ( $p=0,043$ ) (Graf 4).



Graf 4: Prikaz odstotkov preživelih celic celične linije U87 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40 µmol/l ali 100 µmol/l.

#### 4.3. Preskus MTT na celični liniji HepG2

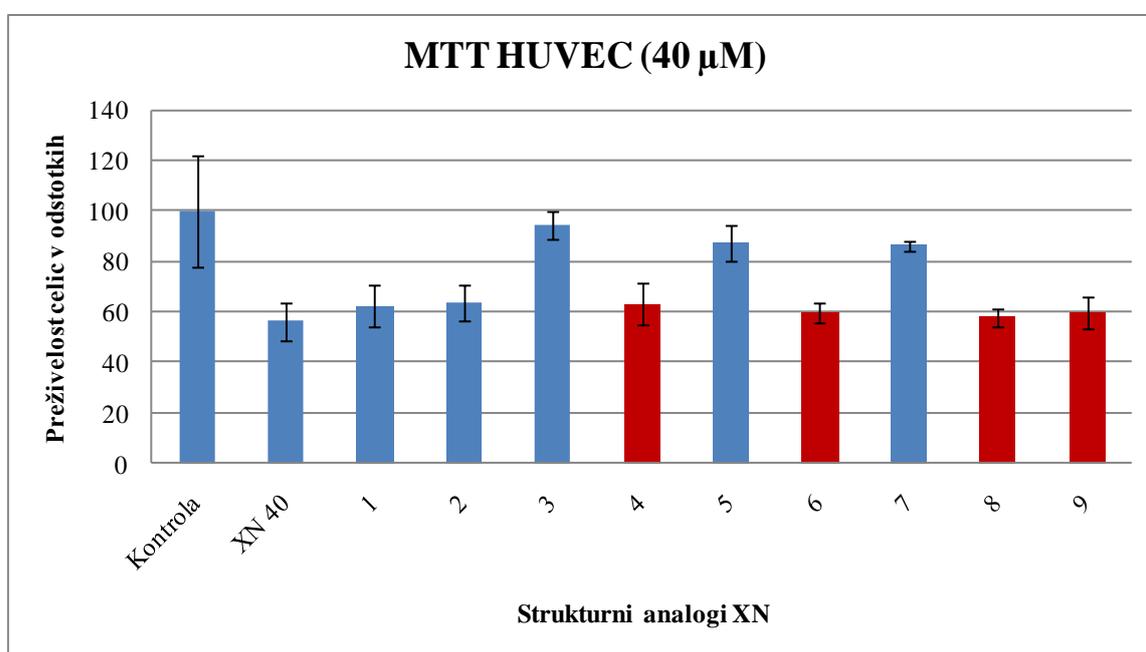


Graf 5: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije HepG2 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40 µmol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Na tej celični liniji smo opravili preskus MTT le z uporabo preskušanih spojin s koncentracijo 40 µmol/l. Celice so rasle v skupkih, ki smo jih pred nasaditvijo razbili z brizgo. Zaradi tega procesa je bilo delo z njimi zamudno. Poleg tega pa so bili rezultati

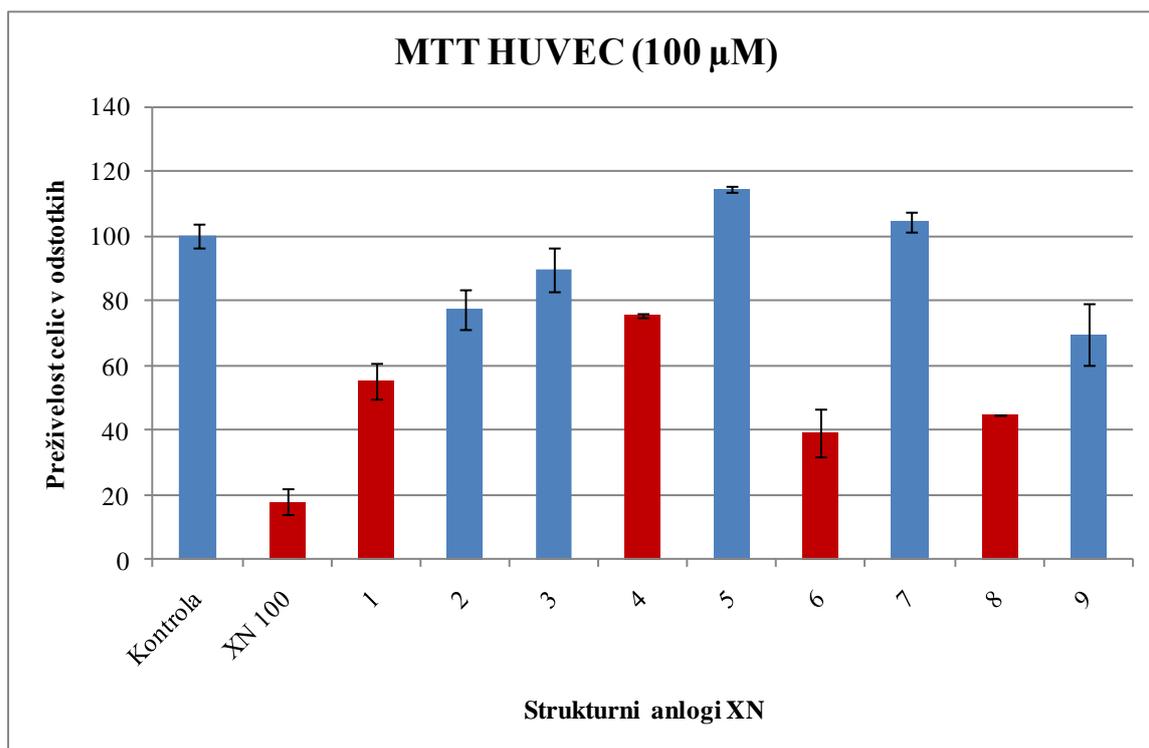
med posameznimi preskusi težko primerljivi, kar je razvidno iz večjih standardnih odklonov. Preživelost celične linije HepG2 so statistično značilno znižali naslednji analogi: 4 (50,5 %;  $p=0,029$ ), 5 (70,7 %;  $p=0,001$ ), 6 (50,0 %;  $p=0,004$ ), 8 (80,7 %;  $p=0,012$ ), 9 (79,4 %;  $p=0,033$ ). Preživelost celic po izpostavitvi STA 4 (50,5 %,  $p=0,029$ ) in 6 (50,0 %,  $p=0,004$ ) je bila nižja od preživelosti celic po izpostavitvi XN (57,3 %;  $p=0,179$ ). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da imata omenjena strukturna analoga izrazitejši citotoksični učinek kot pa XN. Preživelost celic po izpostavitvi preostalim analogom ni bila statistično značilno spremenjena.

#### 4.4. Preskus MTT na celični liniji HUVEC



Graf 6: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki ± SD) celične linije HUVEC, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40 µmol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

STA s koncentracijo 40 µmol/l, ki so po obravnavi celične linije HUVEC statistično značilno znižali njeno preživelost, so: 4 (62,9 %;  $p=0,016$ ), 6 (59,5 %;  $p=0,003$ ), 8 (57,9 %;  $p=0,003$ ) in 9 (59,8 %;  $p=0,008$ ). Preživelost celic po izpostavitvi XN pri isti koncentraciji (56,2 %) je bila nižja v primerjavi z rezultati preživelosti celic po izpostavitvi STA (Graf 6).

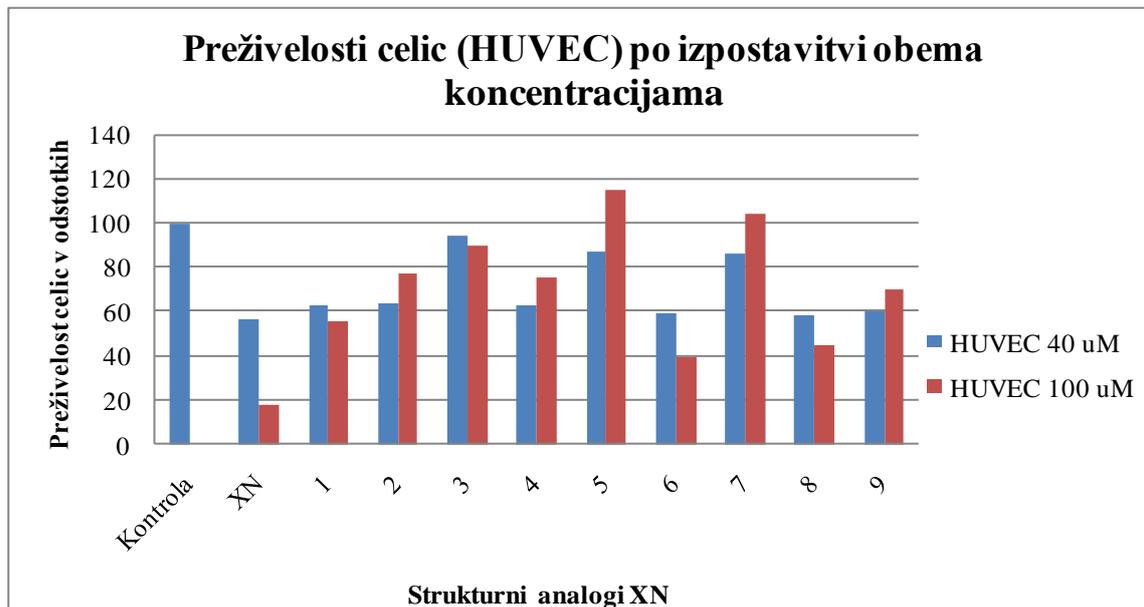


Graf 7: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije HUVEC po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu$ mol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

STA s koncentracijo 100  $\mu$ mol/l, ki so statistično značilno znižali preživelost celic, so: 1 (55,2 %;  $p=0,005$ ), 4 (75,4 %;  $p=0,015$ ), 6 (39,2 %;  $p=0,004$ ) in 8 (44,9 %;  $p=0,0002$ ). Preživelost celic po izpostavitvi XN z enako koncentracijo (17,7 %,  $p=0,022$ ) je bila nižja v primerjavi s STA (Graf 7). Iz primerjave rezultatov preživelosti celic po izpostavitvi obema koncentracijama, je razvidno, da je odziv po izpostavitvi STA 2, 4, 5, 7 in 9, obratno sorazmeren. Po izpostavitvi celic omenjenim STA s koncentracijo 100  $\mu$ mol/l, se je število celic, v primerjavi s kontrolo, povečalo (Graf 8).

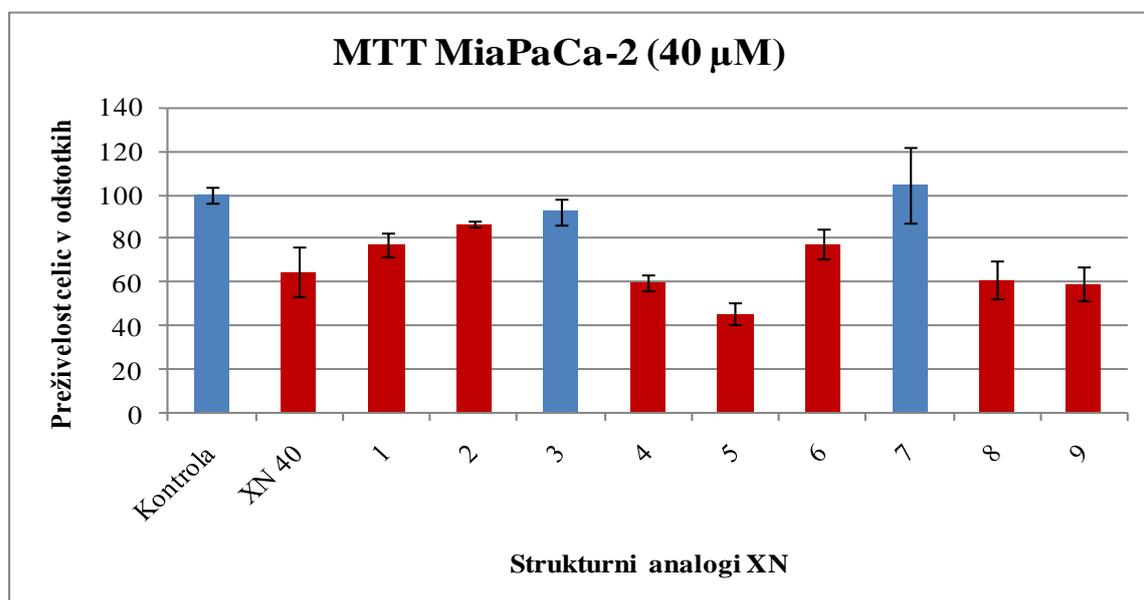
Celična linija HUVEC je nerakava celična linija in izpostavitvev XN z obema koncentracijama je, v primerjavi s kontrolo (100 % preživelost), močno znižala preživelost celične linije. Iz primerjave je razvidno, da imajo vsi STA, v primerjavi s XN, manjši biološki učinek. Ker gre za nerakavo celično linijo, bi to lastnost STA lahko upoštevali pri nadaljnjem rešetanju spojin, saj bi s tem pridobili skupino spojin z višjo stopnjo selektivne citotoksičnosti za rakave celice. Izpostavitvev celične linije koncentraciji 100  $\mu$ mol/l, je pri nekaterih STA celo povečalo število celic. To povečanje bi lahko povezali z morebitnim

estrogenim delovanjem nekaterih STA na celice, kar bi posledično lahko tudi ugodno vplivalo na rast in razmnoževanje nerakavih celic.



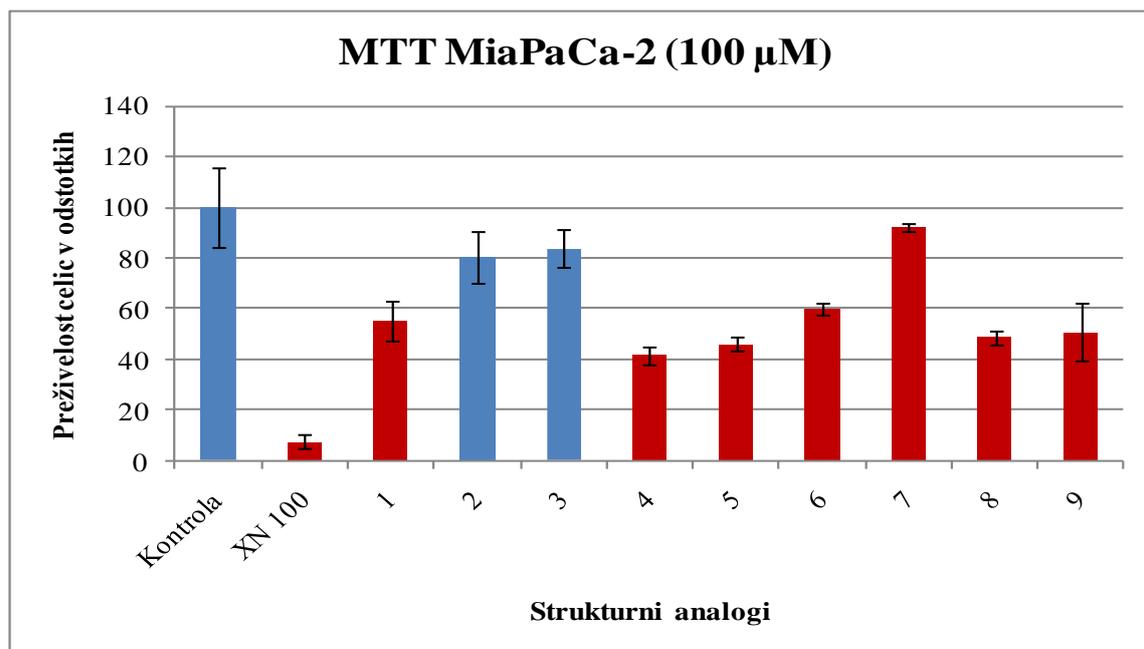
Graf 8: Prikaz odstotkov preživelih celic celične linije HUVEC po 24-urni izpostavljenosti strukturalnim analogom XN s koncentracijo 40 µmol/l ali 100 µmol/l.

#### 4.5. Preskus MTT na celični liniji MiaPaCa2



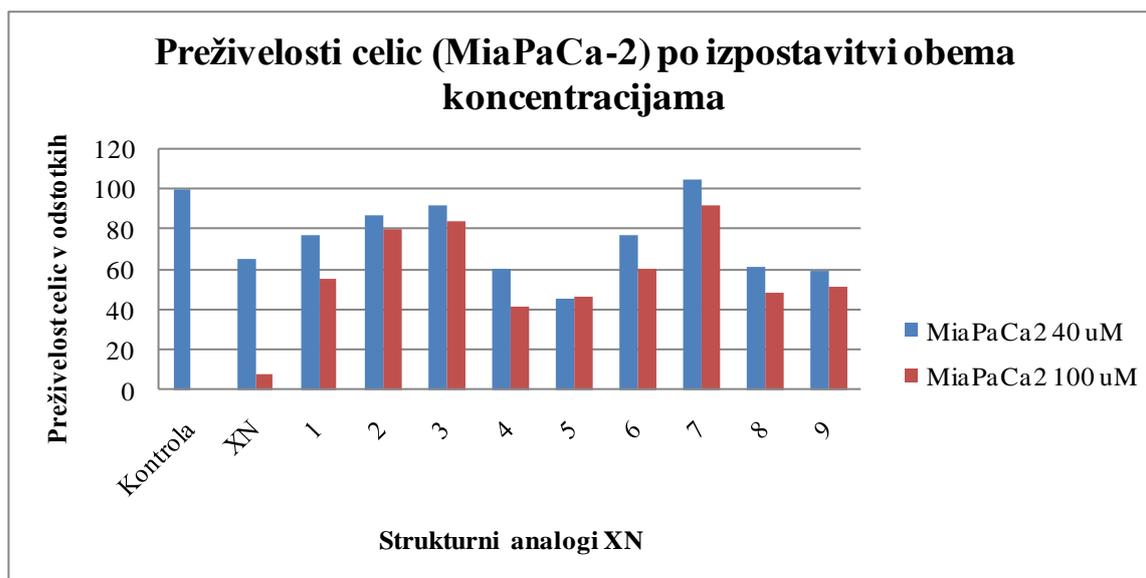
Graf 9: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki ± SD) celične linije MiaPaCa-2 po 24-urni izpostavljenosti preiskanim spojinam s koncentracijo 40 µmol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

STA s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$ , ki so po tretiranju celične linije MiaPaCa-2 statistično značilno znižali njeno preživelost, so: 1 (77,2 %;  $p=0,016$ ), 2 (86,8 %;  $p=0,005$ ), 4 (59,8 %;  $p=0,039$ ), 5 (45,3 %;  $p=0,003$ ), 6 (77,5 %;  $p=0,031$ ), 8 (60,9 %;  $p=0,016$ ) in 9 (59,3 %;  $p=0,012$ ). Preživelost celic je bila po izpostavitvi STA 4, 5, 8 in 9 nižja v primerjavi z rezultati preživelosti celic po izpostavitvi XN z enako koncentracijo (64,6 %,  $p=0,034$ ) (Graf 9).



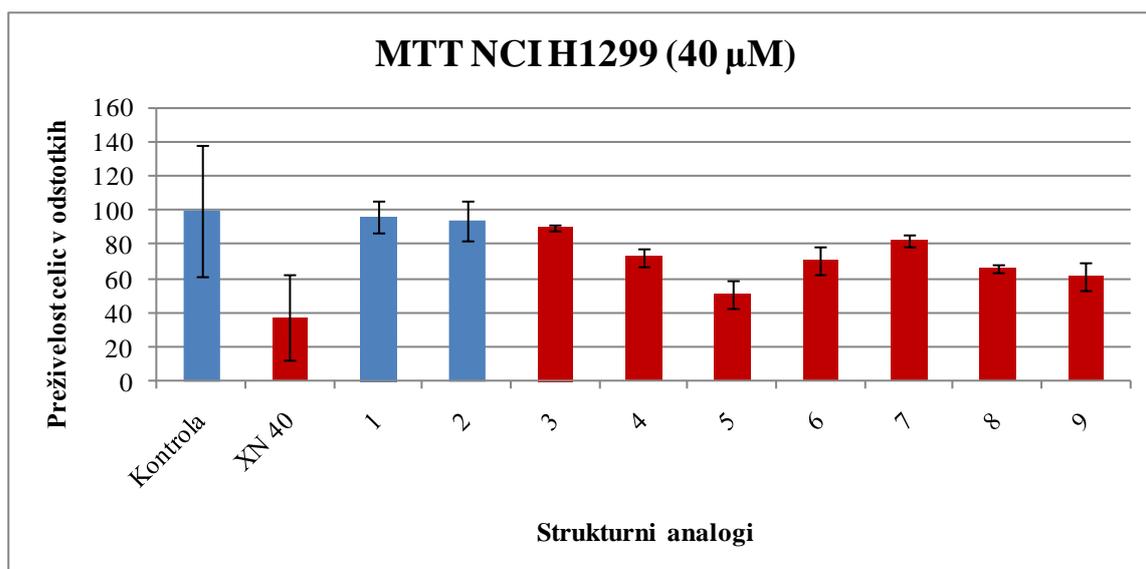
Graf 10: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije MiaPaCa-2 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Pri koncentraciji 100  $\mu\text{mol/l}$  so preživelost celic statistično značilno znižali STA: 1 (55,4 %;  $p=0,01$ ), 4 (41,6 %;  $p=0,001$ ), 5 (46,2 %;  $p=0,021$ ), 6 (60,0 %;  $p=0,001$ ), 8 (48,6 %;  $p=0,0008$ ) in 9 (50,9 %;  $p=0,012$ ). Preživelost celic po izpostavitvi XN pri isti koncentraciji (7,8 %,  $p=0,0003$ ) je bila nižja v primerjavi z rezultati preživelosti celic po izpostavitvi STA, ki so jo prav tako statistično značilno znižali (Graf 10). Razlog je lahko drugačen mehanizem delovanja STA v primerjavi s XN, saj je citotoksično delovanje STA manjša. Iz primerjave rezultatov preživelosti celic je razvidna manjša preživelost celic po izpostavitvi preskušanim spojinam z višjo koncentracijo, kar nakazuje, da je biološka aktivnost STA premosorazmerna s koncentracijo (Graf 11).



Graf 11: Prikaz odstotkov preživelih celic celične linije MiaPaCa-2 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  ali 100  $\mu\text{mol/l}$ .

#### 4.6. Preskus MTT na celični liniji NCI H1299

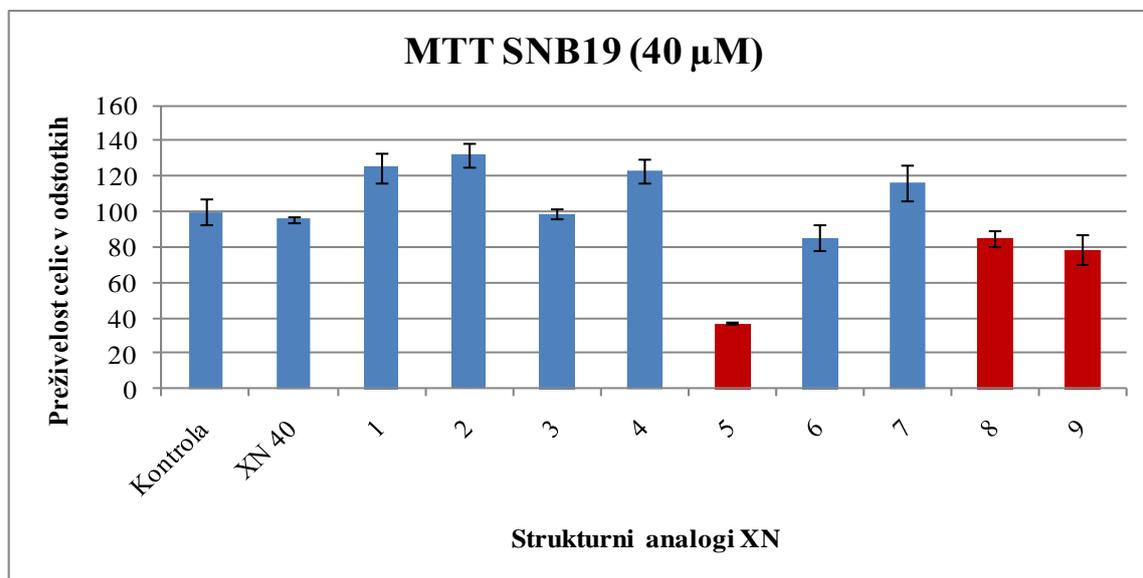


Graf 12: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije NCI H1299 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Na tej celični liniji smo opravili preskus MTT le z uporabo preskušanih spojin s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$ . Preživelost celic so statistično značilno znižali naslednji analogi: 3 (89,8 %;  $p=0,006$ ), 4 (72,4 %;  $p=0,011$ ), 5 (50,4 %;  $p=0,009$ ), 6 (70,8 %;  $p=0,027$ ), 7 (82,7 %;  $p=0,014$ ), 8 (65,9 %;  $p=0,002$ ) in 9 (61,1 %;  $p=0,013$ ). Preživelost celic po

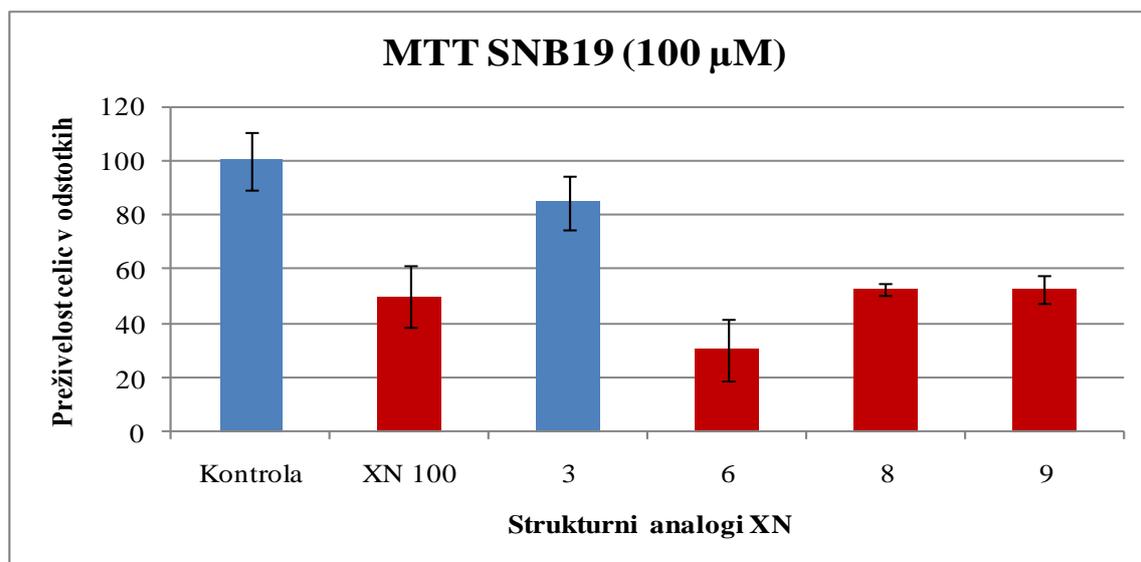
izpostavitvi XN (37,2%,  $p=0,049$ ), je bila nižja v primerjavi z rezultati preživelosti celic po izpostavitvi STA. Rezultati nakazujejo, da XN deluje bolj citotoksično na to celično linijo, kot pa STA (Graf 12).

#### 4.7. Preskus MTT na celični liniji SNB19



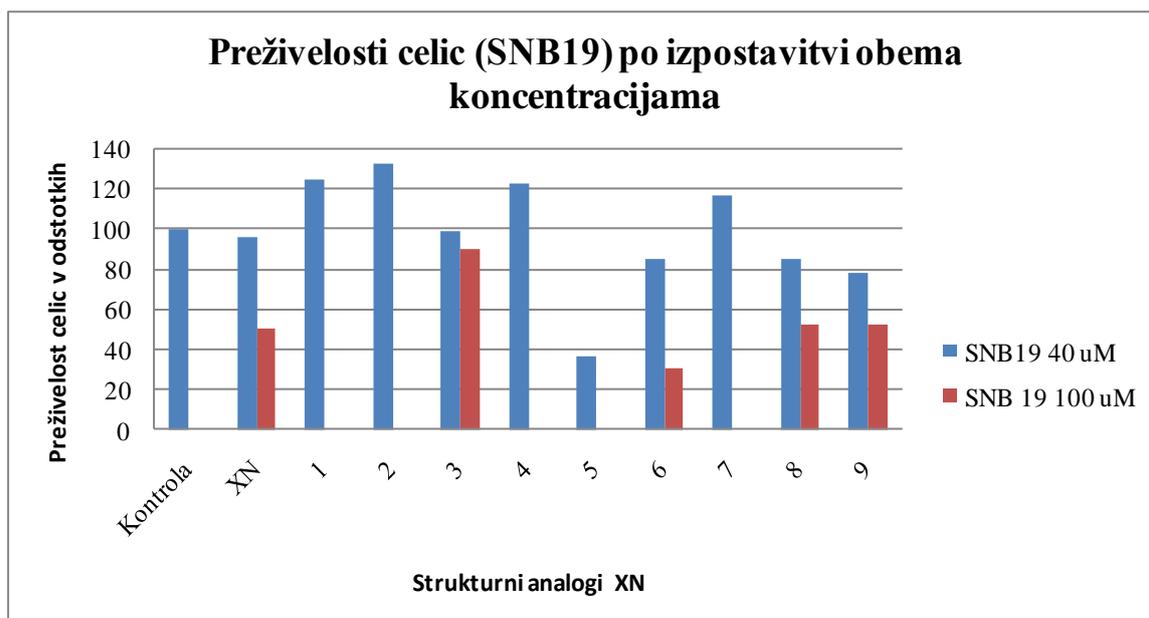
Graf 13: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije SNB19 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracija 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

STA s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$ , ki so po izpostavitvi celični liniji SNB19 statistično značilno znižali njeno preživelost, so: 5 (36,8 %;  $p=3 \cdot 10^{-5}$ ), 8 (78,6 %;  $p=0,029$ ) in 9 (78,6 %;  $p=0,046$ ). Vsi STA, ki so statistično značilno znižali preživelost celic, so v primerjavi z rezultati preživelosti celic po izpostavitvi XN z enako koncentracijo, delovali bolj citotoksično. Najnižja preživelost celic je bila po izpostavitvi STA 5 (36,8 %), medtem ko je bila preživelost pri XN 95,8 % ( $p=0,151$ ). STA 1, 2, 4 so pri tej koncentraciji ugodno vplivali na rast celic in v primerjavi s kontrolo, se je njihovo število povečalo. Vzrok tega povečanja so lahko že manjše strukturne razlike STA v primerjavi s strukturo XN. XN ima antiestrogeno delovanje (11). Na podlagi rezultatov preživelosti celic po izpostavitvi STA, je možno sklepati na šibke estrogene lastnosti STA, kar ima lahko pozitiven vpliv na rast in razmnoževanje celic (Graf 13).



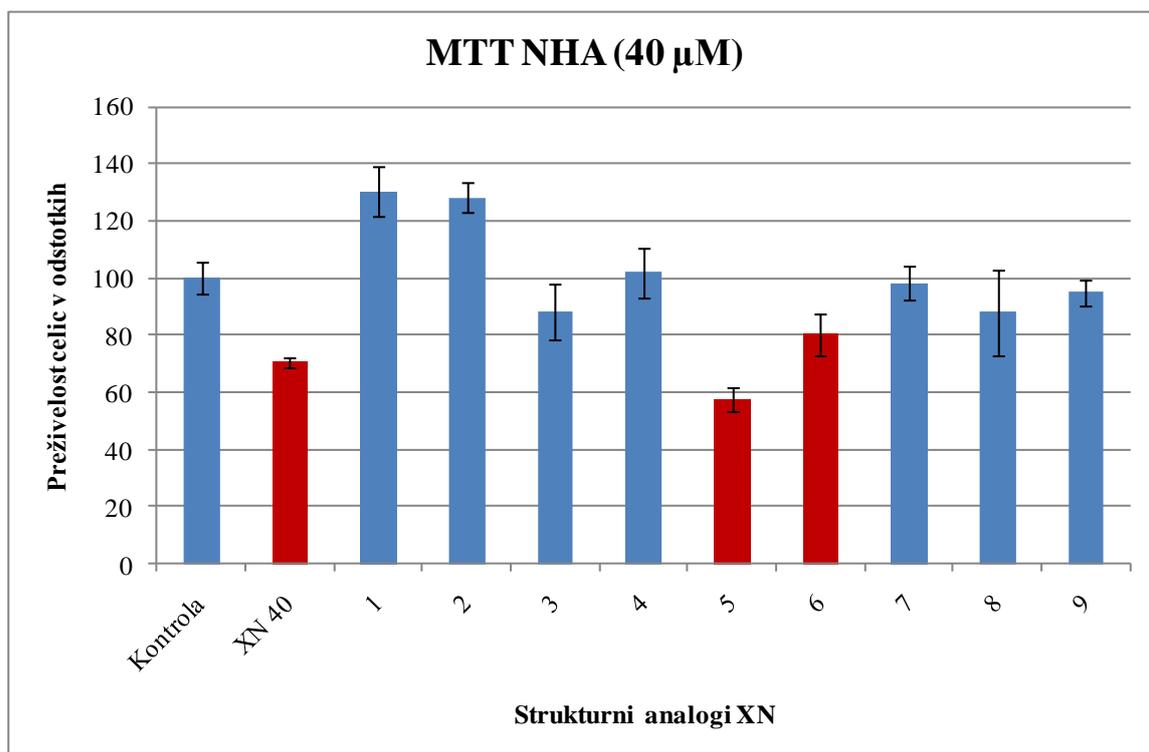
Graf 14: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije SNB19 po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Preučevali smo citotoksičnost naslednjih STA s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$ : 3, 6, 8 in 9. Izbrali smo analoge, ki so pri preskusu z uporabo koncentracije 40  $\mu\text{mol/l}$  zavrlji rast celic. Preživelost celic so statistično značilno znižali STA 6 (30,4 %;  $p=0,001$ ), 8 (52,5 %;  $p=0,0006$ ) in 9 (52,6 %;  $p=0,004$ ). Preživelost celic po izpostavitvi STA 6 (30,4 %,  $p=0,001$ ) je bila nižja v primerjavi z rezultati preživelosti po izpostavitvi XN z enako koncentracijo (50,0 %,  $p=0,0003$ ) (Graf 14). Iz primerjave rezultatov preživelosti celic po izpostavitvi obema koncentracijama je razvidno, da je preživelost celic po izpostavitvi preskušanim spojinam z višjo koncentracijo, manjša. (Graf 15).



Graf 15: Prikaz odstotkov preživelih celic celične linije SNB19 po 24-urni izpostavljenosti strukturnim analogom XN s koncentracijo 40 µmol/l ali 100 µmol/l.

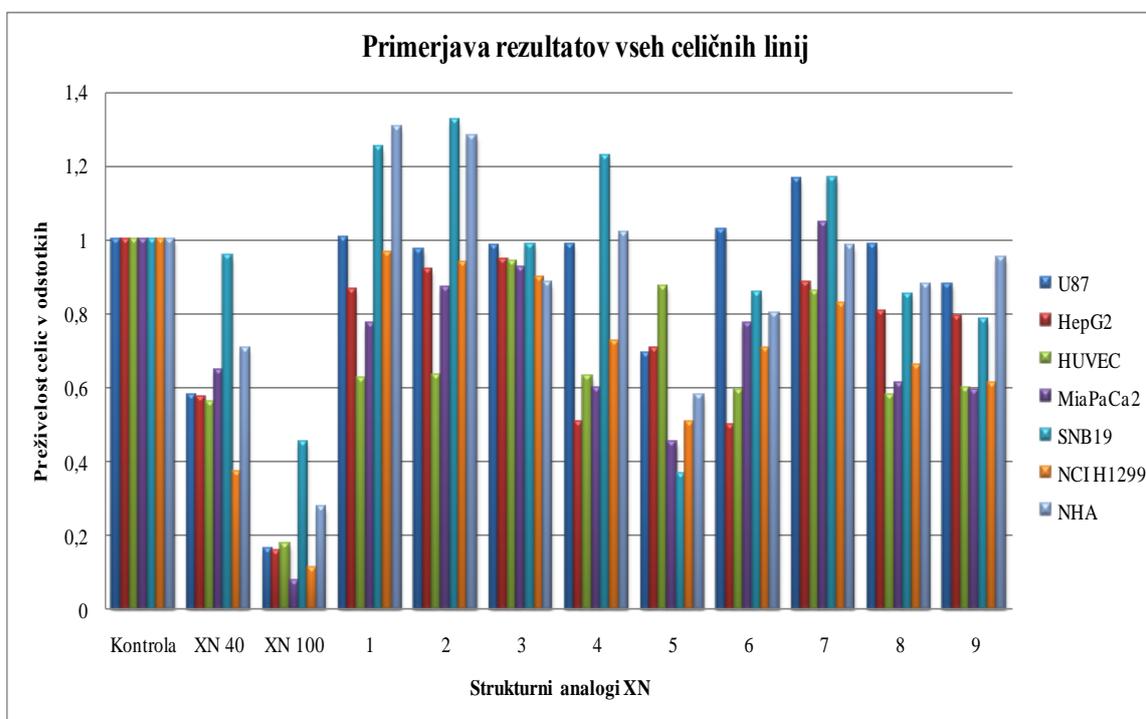
#### 4.8. Preskus MTT na celični liniji NHA



Graf 16: Prikaz odstotkov preživelih celic (odstotki ± SD) celične linije NHA po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100 µmol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Graf prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. Stolpci, ki so obarvani z rdečo barvo, prikazujejo posamezne STA, katerih rezultati statistično značilno odstopajo od kontrole.

Na nerakavi celični liniji NHA smo opravili preskus MTT le z uporabo preskušanih spojin s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$ . Preživelost sta statistično značilno znižali spojini 5 (57,8 %;  $p=0,003$ ) in 6 (80,3 %;  $p=0,045$ ). STA 1 (130 %;  $p=0,127$ ) in 2 (128 %;  $p=0,081$ ) sta pri tej koncentraciji povečala število celic, vendar to povišanje ni bilo statistično značilno. Preživelost po izpostavitvi XN je bila pri tej koncentraciji 70,6 % ( $p=0,028$ ) in v primerjavi z ostalimi STA, nižja (Graf 16). Vzrok večje preživelosti bi lahko bilo šibko estrogeno delovanje omenjenih STA. Lahko sklepamo, da imajo STA ugoden vpliv na rast in razmnoževanje celic na nerakavi celični liniji in morebiten regenerativen učinek na zdrave celice (Graf 17).

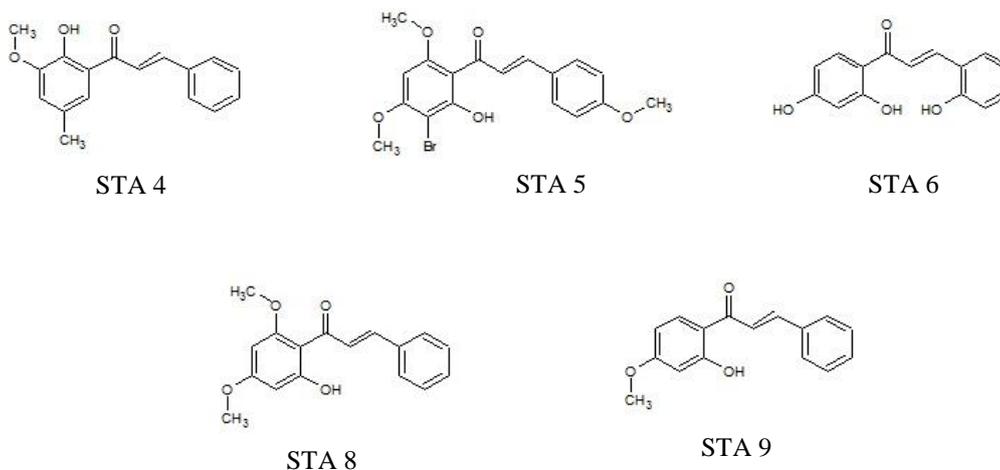
#### 4.9. Strnjen pregled rezultatov



Graf 17: Prikaz odstotkov preživelih celic vseh celičnih linij po izpostavitvi preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$ .

Primerjava rezultatov citotoksičnega delovanja vseh STA na izbranih celičnih linijah prikazuje raznolikost delovanja STA (Graf 17). V primerjavi z rezultati delovanja XN na izbrane celične linije pri enaki koncentraciji, lahko izpostavimo STA, ki so najpogosteje znižali preživelost celic. To so STA 4, 5, 6, 8 in 9. Vsak od naštetih STA je uspešno znižal preživelost različnih celičnih linij, kar nakazuje na morebitno drugačno občutljivost celične linije za določen STA. Tako STA 4 statistično značilno zniža preživelost celic pri celičnih linijah HepG2, HUVEC, MiaPaCa-2 in NCI H1299. STA 5 lahko označimo kot najbolj

učinkovitega, saj je na vsaki celični liniji, razen nerakavi celični liniji HUVEC, statistično značilno znižal preživelost celic. Tako je pri celičnih linijah SNB19 in MiaPaCa-2 bila, v primerjavi s preživelostjo celic po izpostavitvi XN, preživelost celic celo nižja. STA 6 je statistično značilno znižal preživelost celic na celičnih linijah HepG2, HUVEC, MiaPaCa-2, NCI H1299 in NHA. Na celični liniji MiaPaCa-2 pa je bila preživelost celic, v primerjavi s XN, nižja. STA 8 je statistično značilno znižal preživelost celičnih linij HepG2, HUVEC, MiaPaCa-2 in NCI H1299. Prav tako pa je na enakih celičnih linijah statistično značilno znižal preživelost celic STA 9.



Slika 8: Izbrani STA ki so največkrat znižali preživelost celic.

Razlika v delovanju med XN in STA je lahko posledica strukturne narave in razporeditve funkcionalnih skupin v molekuli halkona. XN ima dva fenilna obroča povezana z verigo treh ogljikovih atomov, in sicer  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasičenega karbonilnega sistema. Fenilni obroč B ima hidroksilno skupino na mestu 4, fenilni obroč A pa ima hidroksilni skupini na mestih 2' in 4', na mestu 3' prenilno skupino in na mestu 6' metoksi skupino. Plochmann in sodelavci so v svoji raziskavi preiskovali od strukture odvisno delovanje flavonoidov, med drugim tudi XN. Njihova študija razkriva, da flavonoidi lažje prehajajo celične membrane zaradi večje lipofilnosti s tem dosegajo višje znotrajcelične koncentracije. XN ima na obroču A, na mestu 3', prenilno skupino za katero je znano, da ima večjo afiniteto za celične membrane (39). Vsi omenjeni STA so si med seboj zelo podobni: imajo fenilna obroča, povezana z verigo treh ogljikovih atomov  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasičenega karbonilnega sistema, prav tako kot XN.

STA 4 je v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celičnih linij HepG2 in MiaPaCa-2. Na mestu 3' na fenilnem obroču A ima metoksi skupino namesto prenilne

skupine, na mestu 2' ima hidroksilno skupino in na mestu 5' metilno skupino. Fenilni obroč B nima hidroksilne skupine, kakor jo ima XN.

STA 5 je v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celičnih linij MiaPaCa-2 in SNB19. Na fenilnem obroču A ima na mestu 3' brom, na mestu 4' in 6' metoksi skupino, na mestu 2' pa hidroksilno skupino. Na fenilnem obroču B ima na mestu 4 metoksi skupino.

STA 6 je v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celične linije MiaPaCa-2. Na fenilnem obroču A ima na mestih 2' in 4' hidroksilno skupino. Na fenilnem obroču B pa ima hidroksilno skupino na mestu 2.

STA 8 je v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celične linije MiaPaCa-2. Statistično značilno je zmanjšal tudi preživelost celičnih linij HUVEC in NCI H1299. Na fenilnem obroču A ima na mestu 4' in 6' metoksi skupino, na mestu 3' nima funkcionalne skupine, na mestu 2' pa je hidroksilna skupina. Fenilni obroč B ni substituiran.

STA 9 je v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celične linije MiaPaCa-2. Statistično značilno je zmanjšal tudi preživelost celičnih linij HUVEC in NCI H1299, vendar je bila pri slednjih, v primerjavi s podatki po izpostavitvi XN, preživelost večja. Na fenilnem obroču A ima na mestu 4' metoksi skupino, na mestu 2' pa hidroksilno skupino. Fenilni obroč B ni substituiran.

Na podlagi primerjav struktur XN in STA (4, 5, 8, 9), lahko sklepamo da je za citotoksično delovanje nujno potrebna osnovna struktura:

- dva fenilna obroča,
- povezana z verigo treh ogljikovih atomov  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasičenega karbonilnega sistema.

Prenilna skupina na mestu 3' fenilnega obroča A je verjetno pripomogla k boljšemu citotoksičnemu delovanju XN na vse celične linije, in sicer zaradi vpliva na lipofilnost. STA 5 ima namesto prenilne skupine brom (Br), vendar je ta zamenjava, v primerjavi s XN, bolj izrazito zmanjšala preživelost celičnih linij MiaPaCa-2 in SNB19. Zamenjava prenilne skupine z metoksi skupino v STA 4 je verjetno povzročila zmanjšanje preživelosti celičnih linij HepG2 in MiaPaCa2. STA 6 ima mesto 3' nesubstituirano in je, v primerjavi s XN, povzročil manjšo preživelost celične linije HepG2. Tudi STA 8 in 9 nimata prenilne skupine na mestu 3', a imata zaradi tega verjetno večjo jakost delovanja na celično linijo MiaPaCa-2. STA 7, ki prav tako ni substituiran na mestu 3', je celo povečal število celic rakavih celičnih linij (U87, SNB19 in MiaPaCa2). Na preostalih celičnih linijah pa je

zmanjšal preživelost celic, a to zmanjšanje ni bilo statistično značilno. Na podlagi naštetih dejstev je možno sklepati, da je za citotoksično delovanje morda potrebna velika lipofilna funkcionalna skupina na mestu 3' fenilnega obroča A.

Tako kot XN imajo vsi izbrani STA hidroksilno skupino na mestu 2' v fenilnem obroču A. Edini STA, ki ni imel hidroksilne skupine na mestu 2', in sicer 1 pa je, primerjavi s XN, imel manjšo jakost delovanja na vseh celičnih linijah. Lahko sklepamo, da je za citotoksično delovanje morebiti potrebna hidroksilna skupina na mestu 2' fenilnega obroča A.

Mesto 5' v strukturi XN ni substituirano. STA 4 pa ima na mestu 5' metilno skupino in, v primerjavi s XN, morebiti posledično večjo jakost delovanja na celični liniji HepG2 in MiaPaCa-2. Preostali analogi prav tako nimajo substituiranega mesta 5', kar najbrž pripomore k boljšemu citotoksičnemu delovanju.

XN ima v strukturi hidroksilno skupino na mestu 4' fenilnega obroča A. STA 5, 8 in 9 imajo na tem mestu metoksi spojino in, v primerjavi s XN, morebiti posledično večjo jakost delovanja na celičnih linijah SNB19 in MiaPaCa-2.

Na mestu 6' fenilnega obroča A je v strukturi XN metoksi skupina. STA 4, 6, 9 na tem mestu niso substituirani. Odsotnost te funkcionalne skupine je lahko povezana z večjo jakostjo delovanja na celične linije MiaPaCa-2 in HepG2. STA 5 ima na mestu 6' metoksi skupino. Jakost delovanja tega analoga je med naštetimi tudi najmočnejša. Lahko sklepamo, da je za večjo jakost citotoksičnega delovanja morebiti potrebna metoksi skupina na mestu 6'.

Na mestu 4' fenilnega obroča B ima XN hidroksilno skupino. STA 4, 8 in 9 na tem mestu niso substituirani. Razlika morebiti ponovno vpliva zgolj na določene celične linije. STA 5 ima na tem mestu metoksi spojino in je zaradi tega možno učinkoviteje delovanje na celični liniji MiaPaCa-2 in SNB19. Ker STA 5 zmanjšuje preživelost nekaterih celičnih linij v večji meri kot XN, je morebiti za večjo jakost citotoksičnega delovanja ugodnejša zamenjava hidroksilne skupine z metoksi skupino.

Če povzamemo lahko sklepamo, da k boljšemu citotoksičnemu delovanju STA pripomore substitucija na mestu 3' fenilnega obroča A z veliko lipofilno funkcionalno skupino. Mesto 2' fenilnega obroča A je najbolje, da ostane substituirano z hidroksilno skupino, mesto 5'

ostane nesubstituirano, mesto 6' zaseda metoksi skupina, hidroksilno skupino na mestu 4 fenilnega obroča B pa bi lahko nadomestila metoksi skupina.

## 5. Sklep

Preučevali smo delovanje XN in njegovih strukturnih analogov na preživelost celic *in vitro*. Strukturne analoge XN smo pridobili z računalniškim programom Fress iz banke prosto dostopnih spojin NCI. Za ugotavljanje citotoksičnosti preiskovanih spojin smo izbrali pet humanih rakavih celičnih linij (U87, HepG2, MiaPaCa-2, SNB19, NCI H1299) ter dve humani nerakavi celični liniji (NHA, HUVEC). Spojine smo preskušali na vseh celičnih linijah pri koncentraciji 40  $\mu\text{mol/l}$ . Pri celičnih linijah U87, MiaPaCa-2, SNB19 in HUVEC smo spojine preskušali še pri koncentraciji 100  $\mu\text{mol/l}$  in s tem raziskali ali je jakost delovanja sorazmerna s koncentracijo. Celične linije smo za 24 ur izpostavili XN in STA. Za ugotavljanje citotoksičnosti smo uporabili preskus MTT. Pridobljene rezultate meritev smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel. Preučili smo odziv celic na različne koncentracije XN in njegovih STA ter rezultate slednjih primerjali z rezultati za XN. Na podlagi tako pridobljenih rezultatov smo ovrednotili citotoksičnost XN in njegovih STA ter s tem preučili morebitno učinkovitost protitumorskega delovanja. V primerjavi z rezultati delovanja XN na izbrane celične linije pri enaki koncentraciji, lahko izpostavimo STA, ki so najpogosteje znižali preživelost celic. To so STA 4, 5, 6, 8 in 9. Vsak od naštetih STA je uspešno znižal preživelost različnih celičnih linij, kar nakazuje na morebitno drugačno občutljivost celične linije za določen STA.

Rezultati naše raziskave nakazujejo, da je za citotoksično delovanje potreben osnovni skelet: dva fenilna obroča, povezana z verigo treh ogljikovih atomov  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasičenega karbonilnega sistema, mesto 3' fenilnega obroča A naj ima veliko lipofilno funkcionalno skupino in mesto 5' naj ostane nesubstituirano. Fenilni obroč B bi z morebitno metoksi skupino na mestu 4, izkazoval učinkovitejše citotoksično delovanje.

Na osnovi dobljenih rezultatov predlagamo nadaljnji razvoj spojin v smeri iskanja spojin z učinkovitejšo citotoksičnostjo na vseh rakavih celičnih linijah in večjo selektivnostjo za rakave celice. V procesu razvoja spojin bi bilo smiselno še naprej iskati spojine, ki so strukturni analogi XN in ob tem upoštevati predlagane strukturne značilnosti, za katere smo v naši študiji ugotovili povezanost s citotoksičnim delovanjem.

## 6. Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6, Churchill Livingstone, 2007:718-730
2. Stevens JF, Page JE: Xanthohumol and related prenylfavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 2004; 65: 1317-30.
3. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 673-751.
4. Botta B, Vitali A, Menendez P, Misiti D, Delle Monache G: Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr Med Chem.* 2005; 12(6): 717-39.
5. Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR: Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37: 271-85
6. Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML: Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1999; 832(1-2): 97-107.
7. Magalhães PJ, Carvalho DO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA: Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(5): 591-610
8. Yilmazer M, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR: In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(3): 223-31
9. Yilmazer M, Stevens JF, Buhler DR: In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett.* 2001; 491(3): 252-6
10. Nookandeh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhäuser C, Becker H: Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry* 2004; 65(5): 561-70
11. Gerhäuser C: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer.* 2005; 41(13): 1941-54
12. Avula B, Ganzera M, Warnick JE, Feltenstein MW, Sufka KJ, Khan IA. High-performance liquid chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples. *J Chromatogr Sci.* 2004; 42(7): 378-82
13. Gerhäuser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H: Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther.* 2002; 1(11): 959-69
14. Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR: Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(9): 3876-84

15. Rodriguez RJ, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR: Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(5): 437-45
16. Gerhäuser C: Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res.* 2005; 49(9): 827-31
17. Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica.* 2000; 30(3): 235-51
18. Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S: Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull.* 2003; 26(1): 61-5
19. Dell'Eva R, Ambrosini C, Vannini N, Piaggio G, Albin A, Ferrari N: AKT/NF-kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies. *Cancer.* 2007; 110(9): 2007-11
20. Bajorath J: Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 ; 1(11): 882-94
21. Shoichet BK: Virtual screening of chemical libraries. *Nature.* 2004; 432 (7019): 862-5
22. Schneider G, Baringhaus KH: *Molecular Design*, Wiley-VCH, 2008, Weinheim: 149-72
23. Rarey M, Dixon JS: Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching. *J Comput Aided Mol Des.* 1998; 12(5): 471-90
24. Abou-Alfa GK, DeMatteo R: *100 Questions&Answers about Liver Cancer*, Jason and Bartlett Publishers, USA, 2006: 2-4
25. Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T, Darroudi F, Natarajan AT: Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res.* 1998; 402(1-2): 185-202
26. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 1979; 282(5739): 615-6
27. Cockerill GW, Meyer G, Noack L, Vadas MA, Gamble JR: Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. *Lab Invest.* 1994; 71(4): 497-509
28. Ko AH, Dollinger M, Rosenbaum EH: *Everyone's Guide to Cancer Therapy*, 5, Andrew McMeel Publishing, Kansas City, 2008: 467
29. Welch WC, Morrison RS, Gross JL, Gollin SM, Kitson RB, Goldfarb RH, Giuliano KA, Bradley MK, Kornblith PL: Morphologic, immunologic, biochemical, and cytogenetic characteristics of the human glioblastoma-derived cell line, SNB-19. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995; 31(8): 610-6
30. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ: Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer.* 1977; 19(1): 128-35

31. Su GH, Pancreatic Cancer Methods and protocols, Humana Press Inc, New Jersey, 2005: 1
32. Ponten J, Macintyre EH: Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand. 1968; 74: 465- 486
33. Dostopno na naslovu:  
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-5803&Template=cellBiology>
34. Eisel D, Fertig G, Fischer B, et al.: Apoptosis and cell proliferation. Booklet by Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica, 1998: 67-70
35. Amara FM, Junaid A, Clough RR, Liang B: TGF- $\beta$ 1, regulation of Alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. Molecular brain research. 1999; 71: 42-49
36. Maher K: Toksičnost ksantohumola za različne vrste normalnih in rakavih celic. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2008
37. Pan L, Becker H, Gerhäuser C: Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. Mol Nutr Food Res. 2005 Sep;49(9):837-43
38. Lust S, Vanhoecke B, Janssens A, Philippe J, Bracke M, Offner F: Xanthohumol kills B-chronic lymphocytic leukemia cells by an apoptotic mechanism. Mol Nutr Food Res. 2005; 49(9): 844-50
39. Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C: Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. Arch Biochem Biophys. 2007; 460(1): 1-9.

## 7. Priloge

### 7.1. Citotoksično delovanje XN na vseh celičnih linijah

Preglednica IX: Rezultati posameznega MTT preskusa in prikaz odstotkov (stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) posameznih celičnih linij po 24-urni izpostavljenosti XN s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  ali 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami).

Preskus	1	2	3	4	$x_{\text{pov}}$	SD	T test	Norm.	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	0,1656		1	100	16,5608
<b>U87 40</b>	0,582	0,577			0,5792	0,00324	0,00346	0,57922	57,92	0,32371
<b>U87 100</b>	0,108		0,089		0,0984	0,01318	0,00658	0,16037	16,04	1,31811
<b>HepG2 40</b>	0,954	0,229	0,538		0,5736	0,36372	0,17939	0,57358	57,36	36,3717
<b>HepG2 100</b>	0,223	0,068	0,178		0,1564	0,07949	0,00295	0,15643	15,64	7,94896
<b>HUVEC 40</b>	0,511	0,613			0,5622	0,07247	0,07419	0,56222	56,22	7,24732
<b>HUVEC 100</b>	0,148	0,206			0,177	0,04038	0,02208	0,17704	17,7	4,03821
<b>MiaPaCa2 40</b>	0,526		0,757	0,657	0,6464	0,11574	0,03391	0,64642	64,64	11,5743
<b>MiaPaCa2 100</b>	0,1		0,043	0,088	0,0773	0,02986	0,00035	0,07729	7,729	2,98587
<b>SNB 19 40</b>		0,968	0,948		0,9582	0,01432	0,15142	0,95824	95,82	1,43172
<b>SNB 19 100</b>	0,525	0,421	0,41		0,452	0,06363	0,00446	0,45198	45,2	6,36296
<b>NCI H1299 40</b>	0,63	0,13	0,35		0,372	0,2512	0,0494	0,3718	37,18	25,1176
<b>NCI H1299 100</b>	0,12	0,11	0,1		0,113	0,0095	4E-05	0,1126	11,26	0,94712
<b>NHA 40</b>		0,69		0,719	0,706	0,018	0,0276	0,7064	70,64	1,80038
<b>NHA 100</b>	0,2	0,25	0,42	0,242	0,277	0,096	0,0006	0,2766	27,66	9,60201

### 7.2. Preskus MTT na celični liniji U87

Preglednica X: Prikaz odstotkov (stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije U87, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test, so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{\text{pov}}$	SD	T test	Norm.	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,042		1	100	4,2356
<b>XN 40</b>	0,582	0,577		0,5792	0,003	0,0035	0,579	57,92	0,3237
<b>XN 100</b>	0,108		0,089	0,0984	0,013	0,0066	0,16	16,04	1,3181
<b>1</b>	0,956	1,019	1,039	1,0046	0,043	0,8702	1,005	100,5	4,3389
<b>2</b>	0,889	1,007	1,02	0,9719	0,072	0,5706	0,972	97,19	7,2426
<b>3</b>	0,959	0,962	1,024	0,9818	0,036	0,4789	0,982	98,18	3,6477
<b>4</b>	0,962	1,044	0,963	0,9898	0,047	0,7421	0,99	98,98	4,7002
<b>5</b>	0,666	0,76	0,65	0,6919	0,059	0,0122	0,692	69,19	5,939
<b>6</b>	0,946	1,084	1,057	1,029	0,073	0,5645	1,029	102,9	7,3371
<b>7</b>		1,161	1,172	1,1662	0,008	0,0216	1,166	116,6	0,7988
<b>8</b>		1,022	0,957	0,9894	0,046	0,7985	0,989	98,94	4,579
<b>9</b>		0,863	0,893	0,8779	0,021	0,0787	0,878	87,79	2,1459

Preglednica XI: Prikaz odstotkov (stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije U87, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,187		1	100	18,7
<b>XN 40</b>	0,582	0,577		0,5792	0,003	0,003	0,579	57,92	0,324
<b>XN 100</b>	0,108		0,089	0,0984	0,013	0,007	0,16	16,04	1,318
<b>1</b>	0,815	0,744	0,823	0,794	0,043	0,014	0,794	79,4	4,325
<b>2</b>	0,801	0,904	0,905	0,8701	0,06	0,063	0,87	87,01	5,951
<b>3</b>	0,767		0,805	0,7862	0,027	0,056	0,786	78,62	2,688
<b>4</b>	0,528	0,551		0,5393	0,016	0,016	0,539	53,93	1,634
<b>5</b>	0,55	0,449	0,49	0,4963	0,051	0,003	0,496	49,63	5,083
<b>6</b>		0,864	0,882	0,8728	0,013	0,044	0,873	87,28	1,256
<b>7</b>	0,955	1,096	1,14	1,0636	0,097	0,373	1,064	106,4	9,679
<b>8</b>	0,423		0,495	0,4591	0,051	0,043	0,459	45,91	5,129
<b>9</b>	0,746	0,831		0,7886	0,06	0,125	0,789	78,86	5,959

### 7.3. Preskus MTT na celični linije HepG2

Preglednica XII: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije HepG2, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate štirih neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	4	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	0,085		1	100	8,4738
<b>XN 40</b>		0,954	0,229	0,538	0,574	0,364	0,179	0,5736	57,36	36,372
<b>XN 100</b>		0,223	0,068	0,178	0,156	0,079	0,003	0,1564	15,64	7,949
<b>1</b>		0,855	0,806	0,929	0,863	0,062	0,062	0,863	86,3	6,1774
<b>2</b>	0,927	0,959	0,874		0,92	0,043	0,083	0,92	92	4,2672
<b>3</b>	0,963	0,982	0,862	0,984	0,948	0,058	0,17	0,9479	94,79	5,7872
<b>4</b>			0,528	0,482	0,505	0,032	0,029	0,505	50,5	3,2151
<b>5</b>	0,685	0,719		0,719	0,707	0,02	0,001	0,7074	70,74	1,9629
<b>6</b>	0,462		0,473	0,565	0,5	0,056	0,004	0,4999	49,99	5,6366
<b>7</b>	0,728	1,003	0,884	0,91	0,881	0,114	0,13	0,8814	88,14	11,433
<b>8</b>	0,885	0,778	0,723	0,844	0,807	0,071	0,012	0,8075	80,75	7,1353
<b>9</b>	0,809	0,851		0,721	0,794	0,067	0,033	0,7936	79,36	6,654

## 7.4. Preskus MTT na celični liniji HUVEC

Preglednica XIII: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije HUVEC, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD%
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,222		1	100	22,17
<b>XN 40</b>	0,511	0,613		0,562	0,072	0,074	0,562	56,22	7,247
<b>XN 100</b>	0,148	0,206		0,177	0,04	0,022	0,177	17,7	4,038
<b>1</b>		0,683	0,564	0,624	0,084	0,1	0,624	62,35	8,401
<b>2</b>		0,686	0,583	0,634	0,073	0,089	0,634	63,45	7,292
<b>3</b>	0,967	0,881	0,985	0,944	0,055	0,223	0,944	94,43	5,531
<b>4</b>	0,608	0,559	0,72	0,629	0,083	0,016	0,629	62,92	8,253
<b>5</b>	0,845	0,823	0,952	0,873	0,069	0,086	0,873	87,32	6,901
<b>6</b>	0,638	0,584	0,563	0,595	0,039	0,003	0,595	59,48	3,879
<b>7</b>		0,875	0,85	0,862	0,018	0,058	0,862	86,22	1,774
<b>8</b>	0,552	0,564	0,621	0,579	0,037	0,003	0,579	57,89	3,681
<b>9</b>	0,57	0,549	0,668	0,596	0,063	0,008	0,596	59,57	6,333

Preglednica XIV: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije HUVEC, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test, so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,039		1	100	3,8643
<b>XH 40</b>	0,511	0,613		0,562	0,072	0,074	0,562	56,22	7,2473
<b>XN 100</b>	0,148	0,206		0,177	0,04	0,022	0,177	17,7	4,0382
<b>1</b>	0,57	0,49	0,598	0,552	0,056	0,005	0,552	55,25	5,5964
<b>2</b>	0,816		0,73	0,773	0,06	0,119	0,773	77,32	6,0432
<b>3</b>	0,824	0,95	0,915	0,896	0,065	0,109	0,896	89,63	6,475
<b>4</b>	0,748		0,76	0,754	0,008	0,015	0,754	75,44	0,8315
<b>5</b>		1,151	1,139	1,145	0,008	0,025	1,145	114,5	0,8055
<b>6</b>	0,347	0,352	0,476	0,392	0,073	0,005	0,392	39,16	7,299
<b>7</b>	1,022		1,067	1,045	0,031	0,295	1,045	104,5	3,1393
<b>8</b>	0,449	0,45		0,449	3E-04	2E-04	0,449	44,94	0,0268
<b>9</b>	0,629		0,762	0,695	0,094	0,137	0,695	69,52	9,402

## 7.5. Preskus MTT na celični liniji MiaPaCa2

Preglednica XV: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije MiaPaCa-2, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate štirih neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	4	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	0,037		1	100	3,7198
<b>XN 40</b>	0,526		0,757	0,657	0,646	0,116	0,0339	0,646	64,64	11,574
<b>XN 100</b>	0,1		0,043	0,088	0,077	0,03	0,0003	0,077	7,729	2,9859
<b>1</b>	0,806	0,798	0,714		0,773	0,051	0,0165	0,773	77,25	5,1204
<b>2</b>	0,882	0,871	0,85		0,868	0,017	0,0052	0,868	86,76	1,6599
<b>3</b>	0,863	0,921	0,987		0,923	0,062	0,1657	0,923	92,33	6,207
<b>4</b>	0,573		0,622		0,598	0,035	0,0389	0,598	59,79	3,4798
<b>5</b>	0,494	0,469	0,397		0,453	0,05	0,0028	0,453	45,32	4,9986
<b>6</b>	0,856	0,733	0,735		0,775	0,07	0,031	0,775	77,46	7,0404
<b>7</b>	0,882	1,225	1,027		1,045	0,172	0,6972	1,045	104,5	17,194
<b>8</b>	0,518	0,616	0,694		0,609	0,088	0,0165	0,609	60,94	8,7995
<b>9</b>	0,633	0,644	0,503		0,593	0,078	0,0121	0,593	59,34	7,8285

Preglednica XVI: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije MiaPaCa-2, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate štirih neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	4	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	0,154		1	100	15,436
<b>XN 40</b>	0,526		0,757	0,657	0,646	0,116	0,0339	0,646	64,64	11,574
<b>XN 100</b>	0,1		0,043	0,088	0,077	0,03	0,0003	0,077	7,729	2,9859
<b>1</b>	0,642		0,51	0,509	0,554	0,077	0,0097	0,554	55,37	7,6858
<b>2</b>	0,918		0,739	0,745	0,801	0,102	0,077	0,801	80,08	10,172
<b>3</b>	0,922		0,81	0,78	0,837	0,075	0,0636	0,837	83,74	7,4624
<b>4</b>	0,391		0,458	0,398	0,416	0,037	0,0013	0,416	41,55	3,6515
<b>5</b>	0,444			0,48	0,462	0,025	0,021	0,462	46,2	2,5084
<b>6</b>	0,598	0,628		0,575	0,6	0,026	0,0014	0,6	60,03	2,6221
<b>7</b>		0,934	0,925	0,908	0,922	0,013	0,0098	0,922	92,23	1,3423
<b>8</b>	0,515		0,476	0,467	0,486	0,026	0,0008	0,486	48,6	2,5965
<b>9</b>	0,635		0,413	0,479	0,509	0,114	0,0175	0,509	50,9	11,385

## 7.6. Preskus MTT na celični liniji NCI H1299

Preglednica XVII: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije NCI H1299, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu$ mol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,385		1	100	38,51
<b>XH 40</b>	0,633	0,133	0,349	0,372	0,251	0,0494	0,372	37,18	25,12
<b>XN 100</b>	0,122	0,112	0,103	0,113	0,009	4E-05	0,113	11,26	0,947
<b>1</b>	1,008	0,858	1,023	0,963	0,091	0,5544	0,963	96,28	9,147
<b>2</b>	0,988	0,807	1,019	0,938	0,115	0,4475	0,938	93,8	11,45
<b>3</b>	0,91	0,9	0,883	0,898	0,014	0,0059	0,898	89,78	1,369
<b>4</b>	0,781	0,692	0,698	0,724	0,05	0,0106	0,724	72,36	4,96
<b>5</b>	0,567	0,538	0,411	0,505	0,083	0,0092	0,505	50,54	8,268
<b>6</b>	0,707	0,793	0,624	0,708	0,084	0,0267	0,708	70,81	8,433
<b>7</b>	0,84	0,787	0,854	0,827	0,035	0,0137	0,827	82,73	3,532
<b>8</b>	0,686	0,647	0,645	0,659	0,023	0,0016	0,659	65,94	2,339
<b>9</b>	0,647	0,522	0,665	0,611	0,078	0,0131	0,611	61,13	7,78

## 7.7. Preskus MTT na celični liniji SNB 19

Preglednica XVIII: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije SNB19, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu$ mol/l in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate treh neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	$x_{pov}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	0,069		1	100	6,936
<b>XN 40</b>		0,968	0,948	0,958	0,014	0,151	0,958	95,82	1,432
<b>XN 100</b>	0,525	0,421	0,41	0,452	0,064	0,004	0,452	45,2	6,363
<b>1</b>	1,254	1,327	1,165	1,249	0,081	0,034	1,249	124,9	8,092
<b>2</b>	1,297	1,272	1,4	1,323	0,068	0,014	1,323	132,3	6,758
<b>3</b>	0,994	0,964	1,01	0,989	0,023	0,505	0,989	98,91	2,339
<b>4</b>	1,281	1,253	1,155	1,23	0,066	0,027	1,23	123	6,616
<b>5</b>	0,369	0,361	0,373	0,368	0,006	3E-05	0,368	36,8	0,608
<b>6</b>	0,908	0,882	0,774	0,855	0,071	0,07	0,855	85,45	7,069
<b>7</b>	1,213	1,053	1,239	1,168	0,101	0,102	1,168	116,8	10,1
<b>8</b>	0,865	0,804	0,89	0,853	0,044	0,029	0,853	85,3	4,431
<b>9</b>	0,805	0,857	0,695	0,786	0,083	0,046	0,786	78,57	8,256

Preglednica XIX: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije SNB19, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 100  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate štirih neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	4	5	$x_{\text{pov}}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	1	0,104		1	100	10,35
<b>XN 40</b>				0,968	0,9481	0,958	0,014	0,151	0,958	95,82	1,432
<b>XN 100</b>	0,457	0,689	0,525	0,421	0,41	0,5	0,115	6E-04	0,5	50,03	11,46
<b>3</b>		0,914	0,896		0,7312	0,847	0,101	0,119	0,847	84,71	10,07
<b>6</b>		0,47	0,216	0,245	0,2848	0,304	0,114	0,001	0,304	30,41	11,39
<b>8</b>			0,511	0,549	0,5166	0,525	0,021	6E-04	0,525	52,54	2,052
<b>9</b>			0,557	0,557	0,4631	0,526	0,054	0,004	0,526	52,6	5,448

### 7.8. Preskus MTT na celični liniji NHA

Preglednica XX: Prikaz odstotkov (glej stolpec %) preživelih celic (odstotki  $\pm$  SD) celične linije NHA, po 24-urni izpostavljenosti preskušanim spojinam s koncentracijo 40  $\mu\text{mol/l}$  in primerjava s kontrolo (netretiranimi celicami). Preglednica prikazuje rezultate štirih neodvisnih preskusov, izvedenih v petih vzporednih ponovitvah. V stolpcu T test so prikazani rezultati Studentovega t-testa, s katerim smo določili statistično značilno odstopanje od kontrolnih vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Preskus	1	2	3	4	$x_{\text{pov}}$	SD	T test	Norm	%	SD %
<b>Kontrola</b>	1	1	1	1	1	0,0567		1	100	5,673
<b>XN 40</b>		0,694		0,719	0,706	0,018	0,028	0,706	70,64	1,8
<b>XN 100</b>	0,196	0,252	0,416	0,242	0,277	0,096	6E-04	0,277	27,66	9,602
<b>1</b>		1,242	1,365		1,303	0,0869	0,127	1,303	130,3	8,69
<b>2</b>		1,32	1,247		1,283	0,0515	0,081	1,283	128,3	5,148
<b>3</b>		0,951	0,814		0,882	0,0967	0,336	0,882	88,25	9,672
<b>4</b>		0,98	1,122	0,961	1,021	0,0881	0,721	1,021	102,1	8,805
<b>5</b>	0,561	0,547	0,626		0,578	0,0421	0,003	0,578	57,82	4,209
<b>6</b>	0,717	0,854		0,84	0,803	0,0751	0,045	0,803	80,34	7,507
<b>7</b>	0,956	0,942	1,052		0,983	0,0601	0,681	0,983	98,35	6,007
<b>8</b>	0,724	0,895	1,022		0,88	0,1494	0,3	0,88	88,05	14,94
<b>9</b>	0,91	1	0,946		0,952	0,0454	0,208	0,952	95,19	4,535