

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO



TEJA GLAVNIK

**SINTEZA DERIVATOV CIMETNE KISLINE IN NJIHOVO  
VREDNOTENJE NA MODELIH LEVKEMIJ**

**SYNTHESIS OF CINNAMIC ACID DERIVATIVES AND THEIR  
EVALUATION ON LEUKEMIC MODELS**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mateja Sove, mag. farm.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se prof. dr. Ireni Mlinarič Raščan, mag. farm., za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge, asist. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za strokovno pomoč in usmerjanje pri izvajanju laboratorijskega dela in asist. dr. Matevžu Prijatelju, mag. farm., za nasvete in pomoč pri izvajanju laboratorijskega dela. Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za vzpodbudo, podporo in lepe trenutke v času študija.*

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Ljubljana, junij 2012

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>5</b>
<b>KAZALO ENAČB.....</b>	<b>6</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV .....</b>	<b>9</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Apoptoza .....</b>	<b>12</b>
1.1.1    Mehanizem .....	12
1.1.2    Vpliv na apoptozo kot terapevtski pristop.....	15
1.1.2.1    Inhibitorji proteinov Bcl-2 .....	15
1.1.2.1.1    TRAIL.....	15
1.1.2.1.2    IAP .....	15
1.1.2.1.3    Antagonisti MDM2 .....	16
1.1.2.1.4    Aktivatorji kaspaz .....	16
<b>1.2 Maligne bolezni limfocitov.....</b>	<b>16</b>
1.2.1    Terapija malignih limfocitnih bolezni.....	17
1.2.2    Modulacija apoptoze kot terapevtski pristop .....	17
<b>1.3 Cimetna kislina in derivati .....</b>	<b>18</b>
1.3.1    Naravni viri .....	18
1.3.2    Učinki .....	19
1.3.2.1    Antioksidativni učinki .....	19
1.3.2.2    Protibakterijski učinki .....	20
1.3.2.3    Protivirusni učinki .....	20
1.3.2.4    Protiglivični učinki .....	21
1.3.2.5    Protitumorni učinki .....	21
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>25</b>
3.1.1    Materiali pri sintezi spojin.....	25
3.1.2    Materiali pri testiranju spojin na celičnih linijah .....	26
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>29</b>

3.2.1	Metode pri sintezi, čiščenju in karakterizaciji spojin.....	29
3.2.1.1	Kromatografske metode .....	29
3.2.1.2	Spektroskopske metode.....	29
3.2.1.3	Določevanje tališč .....	29
3.2.1.4	Elementna analiza .....	30
3.2.1.5	Nomenklatura spojin .....	30
3.2.1.6	Sinteza spojin .....	30
3.2.1.6.1	Sinteza 3-cianofenilcinamata (spojina 1).....	30
3.2.1.6.2	Sinteza 4-cianofenilcinamata (spojina 2).....	32
3.2.1.6.3	Sinteza 4-(trifluorometil)fenilcinamata (spojina 3) .....	33
3.2.1.6.4	Sinteza 2-cianofenilcinamata (spojina 4).....	35
3.2.1.6.5	Sinteza 3-(trifluorometil)fenilcinamata (spojina 5) .....	36
3.2.1.6.6	Sinteza etil 3-cinamamidobenzoata (spojina 6) .....	38
3.2.1.6.7	Sinteza 3-cinamamidobenzojske kisline (spojina 7).....	41
3.2.2	Metode pri biološkem testiranju spojin na celičnih kulturah .....	43
3.2.2.1	Metode dela s celičnimi kulturami .....	43
3.2.2.2	Gojenje celičnih kultur .....	43
3.2.2.3	Subkultiviranje celičnih kultur .....	43
3.2.2.4	Odmrzovanje celic.....	44
3.2.2.5	Štetje celic .....	44
3.2.2.6	Ugotavljanje metabolne aktivnosti celic z uporabo testa MTS .....	45
3.2.2.7	Pretočna citometrija.....	46
3.2.2.7.1	Ugotavljanje vpliva derivatov cimetne kisline na celični cikel .....	48
3.2.2.7.2	Ugotavljanje apoptoze z uporabo Annexina V .....	49
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Derivati cimetne kisline in citotoksičen učinek na celice B in T levkemij .....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Vpliv prve serije derivatov cimetne kisline (spojine 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12) na proliferacijo celic Ramos in Jurkat.....	51
4.1.2	Vpliv druge serije derivatov cimetne kisline (spojine 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15) na proliferacijo celic Ramos in Jurkat.....	55
4.1.3	Derivati cimetne kisline in njihov vpliv na celični cikel celic Ramos in Jurkat .....	58
<b>4.2</b>	<b>Vpliv derivatov cimetne kisline na programirano celično smrt v celicah Ramos ...</b>	<b>67</b>
4.2.1	Ugotavljanje apoptoze z Annexinom V .....	67
4.2.2	Ugotavljanje metabolne aktivnosti ob prisotnosti inhibitorja kaspaz .....	69

<b>5 SKLEP .....</b>	<b>71</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>73</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze (6).....	13
Slika 2: Regulatorni proteini iz družine Bcl-2 in njihov vpliv na apoptozo (5).....	14
Slika 3: V naravi prisotni analogi cimetne kisline .....	18
Slika 6: Sinteza spojine 1 .....	30
Slika 7: Sinteza spojine 2 .....	32
Slika 8: Sinteza spojine 3 .....	33
Slika 9: Sinteza spojine 4 .....	35
Slika 10: Sinteza spojine 5 .....	36
Slika 11: 1. stopnja sinteze spojine 6 .....	38
Slika 12: 2. stopnja sinteze spojine 6 .....	39
Slika 13: 3. stopnja sinteze spojine 6 .....	40
Slika 14: Sinteza spojine 7 .....	41
Slika 4: Celični metabolizem reagenta MTS.....	45
Slika 5: Shema pretočnega citometra (22) .....	47
Slika 15: Strukturne formule spojin iz knjižnice Fakultete za farmacijo, ki smo jih testirali	50
Slika 16: Strukturne formule prve serije spojin.....	51
Slika 17: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos ob prisotnosti spojin 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12 .....	52
Slika 18: Relativna metabolna aktivnost celic Jurkat ob prisotnosti spojin 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12 .....	53
Slika 19: Strukturne formule druge serije spojin.....	55
Slika 20: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos ob prisotnosti spojin 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15 .....	56
Slika 21: Relativna metabolna aktivnost celic Jurkat ob prisotnosti spojin 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15 .....	56
Slika 22: Vpliv spojine 5 na potek celične delitve celic Ramos .....	59
Slika 23: Odstotek mrtvih celic Ramos po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 24 h.....	60
Slika 24: Odstotek stimuliranih celic Ramos v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 24 h .....	60
Slika 25: Odstotek mrtvih celic Ramos po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 48 h.....	61

Slika 26: Odstotek stimuliranih celic Ramos v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 48 h .....	62
Slika 27: Vpliv spojine 5 na potek celične delitve celic Jurkat .....	63
Slika 28: Odstotek mrtvih celic Jurkat po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 24 h .....	64
Slika 29: Odstotek stimuliranih celic Jurkat v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 24 h .....	64
Slika 30: Odstotek mrtvih celic Jurkat po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 48 h .....	65
Slika 31: Odstotek stimuliranih celic Jurkat v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 48 h .....	66
Slika 32: Ugotavljanje apoptoze z Annexinom V na celicah Ramos, stimuliranih 24 h z 10 µM in 100 µM spojinami 15, 4 in 5 .....	69
Slika 33: Vpliv inhibitorja kaspaz na relativno metabolno aktivnost s spojinama 4 in 5 stimuliranih celic Ramos .....	70

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje gostote celic .....	45
---	----

## POVZETEK

Rakave bolezni limfocitov se slabo odzivajo na zdravljenje s klasičnimi citotoksičnimi kemoterapeutiki. Novejše raziskave kažejo, da je vzrok pogosto v napakah v proteinih, ki sodelujejo pri mehanizmu celične smrti. V okviru našega diplomskega dela smo ugotavljali, če estri in amidi cimetne kisline vplivajo na smrt levkemičnih celic in ali le-te umrejo po mehanizmu apoptoze. Derivati cimetne kisline so zanimivi zaradi širokega spektra učinkov in nizke toksičnosti. Glede na rezultate testa metabolne aktivnosti stimuliranih kultur Burkittovega limfoma in T-celične levkemije smo sintetizirali dve seriji estrov in amidov cimetne kisline iz različnih fenolov in anilinov. Opazovali smo vpliv substituentov in njihovih položajev na fenolovem obroču na aktivnost spojin. Ugotovili smo, da je najbolj ugodna substitucija z elektronprivlačnimi skupinami, kot sta ciano in trifluorometilna skupina. Amidi cimetne kisline iz anilinov z različnimi substituenti so na levkemične celične linije vplivali manj kot cinamati. Najbolj sta metabolno aktivnost zmanjšali 3-trifluorometilfenilcinamat (spojina **5**) in 2-cianofenilcinamat (spojina **4**), zato smo raziskali njun vpliv na celični cikel. V celicah Burkittovega limfoma smo pod vplivom spojine **5** opazili povečanje odstotka celic v fazi S celičnega cikla, kar lahko kaže na inhibicijo sinteze DNA pod vplivom te spojine. V nadaljevanju smo s testom metabolne aktivnosti ob prisotnosti inhibitirja kaspaz 3 in 7 ter barvanjem z Annexinom V, označenim s fluoroforjem, dokazali, da pri stimulaciji s spojino **5** ne pride do apoptoze, ampak celice umrejo po drugem mehanizmu. Kljub temu, da naša hipoteza, da derivati cimetne kisline v levkemičnih celicah sprožijo apoptozo, ni bila potrjena, so spojine vseeno zanimive, saj so citotoksične za levkemične celice. Potrebne bi bile še dodatne raziskave, ki bi razjasnile mehanizem delovanja teh spojin. Z optimizacijo strukture spojin bi lahko dobili še bolj učinkovite spojine, zato derivati cimetne kisline predstavljajo pomembno izhodišče pri razvoju novih učinkovin za zdravljenje rakavih bolezni limfocitov.

## ABSTRACT

Malignant lymphocyte diseases are often poorly sensitive to traditional cytotoxic chemotherapy agents. Recent research shows that the main reason for this phenomena are defective proteins involved in cell death mechanism. In our study, we examined the effects of cinnamic acid esters and amides on death of cancerous leukemic cells and tried to confirm the mode of cell death. Cinnamic acid derivatives are interesting compounds because of their broad spectrum of biological effects and low toxicity in general. According to the results of metabolic activity of stimulated Burkitt lymphoma cells and T-cell leukemia cells we synthesized two series of esters and amides of cinnamic acid from different phenols and anilines. We observed how several substituents on different positions on the aromatic ring of phenols and anilines affect the activity of compuonds. The most potent were compounds with electron withdrawing groups like cyano and trifluoromethyl group. In general, cinnamates were more active than cinnamamides. 3-(trifluoromethyl) phenyl cinnamate (compound **5**) and 2-cyanophenil cinnamate (compound **4**) were the most potent inhibitors of cell metabolic activity. Therefore, we decided to evaluate their effect on the cell cycle. In Burkitt's lymphoma cells treated with compound **5** we observed an increased percentage of cells in S phase of cell cycle which can indicate inhibition of DNA sythesis. In addition we performed the test of metabolic activity in the presence of caspase 3 and 7 inhibitor and Annexin V staining which showed that compound **5** does not induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell line. Our hypothesis that cinnamic acid derivatives induce apoptosis in leukeamic cell lines was not confirmed, however we still showed that incubation with our compounds leads to cell death. Structural optimization of our compounds could lead to more potent cytotoxic agents which could be developed into new agents for treatment of malignant lymphocyte diseases.

## **Seznam kratic in okrajšav**

»BH3 only«: družina proapoptotičnih proteinov Bcl-2

<sup>1</sup>H-NMR: jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)

7-AAD: 7-aminoaktinomicin

angl.: angleško

Apaf-1: angl. apoptotic protease activating factor 1

Bad: proapoptotični protein»BH3 only«

Bak: proapoptotični protein

Bax: proapoptotični protein

Bcl-2: produkt gena *bcl-2*, ki preprečuje apoptozo

Bcl-w: produkt gena *bcl-w*, ki preprečuje apoptozo

Bcl-xL: produkt gena *bcl-xl*, ki preprečuje apoptozo

BCR: B-celični receptor

Bf1-1/A1: antiapoptotični protein Bcl-2

Bid: proapoptotični protein»BH3 only«

Bim: proapoptotični protein»BH3 only«

Bmf: proapoptotični protein»BH3 only«

BOP: benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat

cAMP: ciklični adenozin monofosfat

CAPE: fenetilni ester kavne kisline

cFLIP: angl. FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein

cIAP1: proteinski inhibitor apoptoze 1

cIAP2: proteinski inhibitor apoptoze 2

COX-2: ciklooksigenaza tipa 2

DCC: *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DISC: angl. death-inducing signalling complex

DMAP: 4-dimetilaminopiridin

DMF: *N,N*-dimetilformamid

DMSO: dimetil sulfoksid

DNaza: encim, ki katalizira hidrolizo DNA

DNA: deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)

ESI-MS: masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem

FADD: angl. Fas-associating protein with death domain

FALS: angl. forward angle light scatter

Fas: površinska molekula celic T<sub>c</sub>, tarča TNF

FBS: zarodni goveji serum (angl. fetal bovine serum)

FCS: angl. forward scatter channel

Fem-x: celična kultura malignega melanoma

FLICE: kaspaza 8

Fyn: protein signalne poti integrinov (angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase)

HeLa: celična linija humanega adenokarcinoma materničnega vratu

HEPA: zračni filter za komoro LAF (angl. high-efficiency particulate arresting)

HTLV-1: virus, ki povzroči T-celično levkemijo

IAPs: proteinski inhibitorji apoptoze (angl. inhibitor of apoptosis protein)

IR: infrardeča spektroskopija

K562: celična kultura kronične mieloidne levkemije

LAF: angl. laminar air flow

Mcl-1: antiapoptotični protein Bcl-2

MDM2: blokator transkripcije gena za p53

MF: mobilna faza

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol

NFκB: jedrni dejavnik kapa B (transkripcijski faktor)

Noxa: proapoptotični protein»BH3 only«

p21: angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1

p53: tumor zaviralni protein

PARP: protein, ki sodeluje pri popravljanju napak v DNA (angl. poly (ADP-ribose) polymerase)

PBMC: celice iz periferne krvi z okroglim jedrom (angl. peripheral blood mononuclear cell)

PBS: fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffered saline)

PE: fikoeritin

Puma: angl. p53 upregulated modulator of apoptosis

RALS: angl. right angle light scatter

RF: retencijski faktor

RNaza: encim, ki katalizira hidrolizo RNA

RPMI: medij za gojenje levkemičnih celičnih linija, kratica izvira iz Roswell Park Memorial Institute

SMAC: ang. second mitochondrial activator of caspases

SSC: angl. side scatter channel

TLC: tankoplastna kromatografija

TMS: trimetil siloksan

TNF: dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)

TRAIL: apoptoza inducirajoči ligand, soroden TNF (angl. TNF related apoptosis inducing ligand)

UVB: utravijolični žarki B

XIAP: angl. X-linked inhibitor of apoptotic protein

# 1 UVOD

## 1.1 Apoptoza

Apoptoza ali programirana celična smrt je normalna fiziološka oblika celične smrti, ki igra pomembno vlogo v razvoju in ohranjanju tkivne homeostaze (1). Pomembna je tako v embrionalnem razvoju pri oblikovanju organov in tkiv kot tudi pri odraslih, kjer je odgovorna za uravnovešenje celične proliferacije. Predstavlja tudi obrambni mehanizem, s katerim se iz organizma odstranjujejo poškodovane in potencialno nevarne celice, kot so z virusi okužene celice ali celice s poškodovano DNA (2).

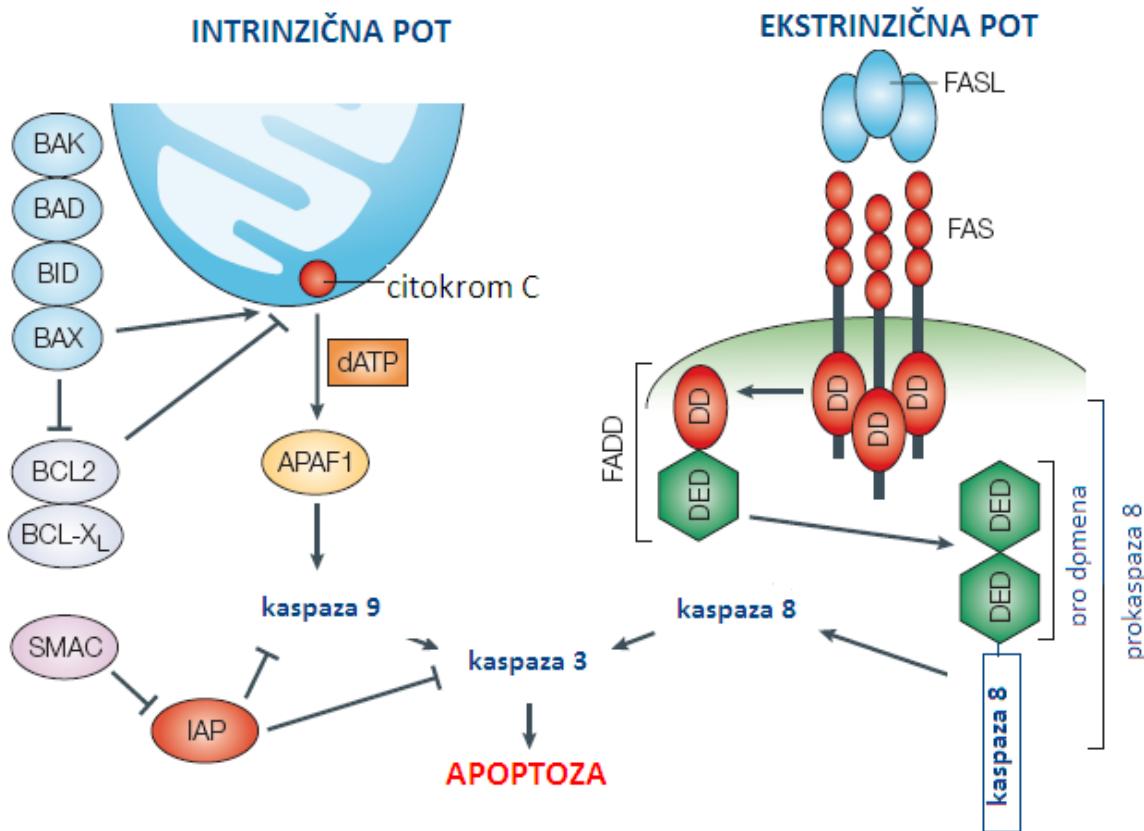
Značilno za apoptozo je pojavljanje mehurčkastih izrastkov na membrani, skrčenje celice, kondenzacija kromatina in fragmentacija DNA. V končni stopnji nastala apoptotska telesca s fagocitozo odstranijo makrofagi ali sosednje celice, kar v primerjavi z nekrozo ne vodi v vnetje okoliškega tkiva (2).

### 1.1.1 Mehanizem

Apoptoza je natančno reguliran in visoko zmogljiv sistem celične smrti, ki je odvisen od interakcije med mnogimi dejavniki. Program celične smrti lahko sproži vrsta dražljajev tako iz okolja celice kot znotraj celice same. Biokemična aktivacija apoptoze poteka večinoma po ekstrinzičnem ali intrinzičnem mehanizmu (slika 1) (2).

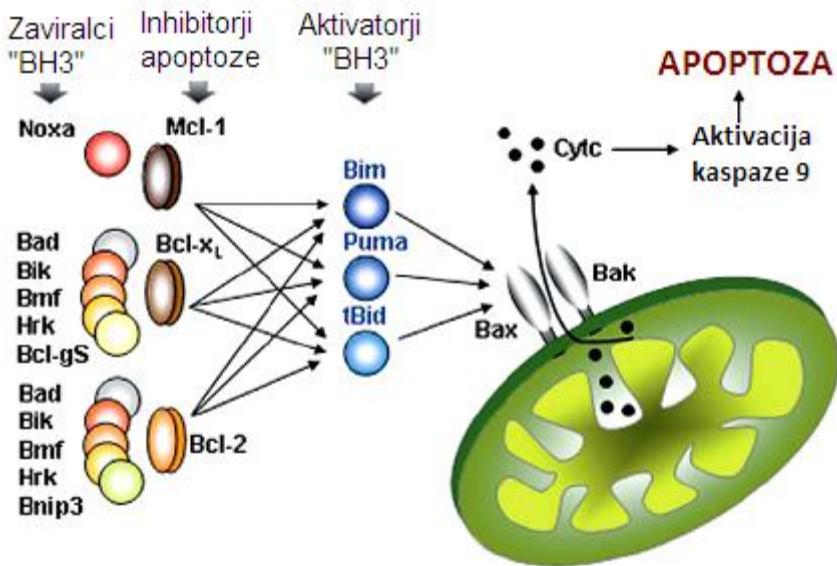
Ekstrinzična pot se aktivira z vezavo na smrtne receptorje, ki se nahajajo na površini celice. To so Fas, receptor za TNF (tumor necrosis factor) in TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) receptor (5). Vezava liganda na te receptorje povzroči nastanek signalnega kompleksa DISC (death-inducing signaling complex), ki ga sestavljajo Fas-asociirana smrtna domena (FADD), kaspaza 8 in kaspaza 10. Ta reakcija sproži aktivacijo efektorskih kaspaz 3, 6, in 7, kar ima za posledico sproženje proteolitične kaskade. Ekstrinzično pot apoptoze nadzoruje celični FLICE inhibitorni protein cFLIP (FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein), ki je homolog prokaspaze 8/10 in prepreči vezavo prokaspaze 8 v kompleks DISC (4).

Intrinzična pot apoptoze se sproži znotraj celice zaradi poškodbe DNA, ki ima za posledico povečanje propustnosti membrane mitohondrija, iz katerega se sprosti citokrom c. V citoplazmi se citokrom c poveže z Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1) in prokaspazo 9.



Slika 1: Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze (6)

Sproščanje apoptogenih proteinov nadzorujejo proteini iz družine Bcl-2 (slika 2). Poznamo antiapoptotične proteine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bf1-1/A1) in proapoptotične proteine, ki jih delimo na proteine »BH3-only« (Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf) in proteina Bax in Bak. Vezava in oligomerizacija Bax in Bak na mitohondrijsko membrano je glavni razlog za aktivacijo intrinzične poti. Antiapoptotični proteini Bcl-2 blokirajo oligomerizacijo Bax in Bak in interakcijo proteinov »BH3-only« z njima. Izražanje proteinov »BH3-only« je pod nadzorom proteina p53, ki se izraža ob celičnem stresu (2).



Slika 2: Regulatorni proteini iz družine Bcl-2 in njihov vpliv na apoptozo (5)

Pomembna regulatorja apoptoze sta tudi MDM2 in p53. Ob poškodbi DNA protein p53 ustavi celični cikel in preko proteinov »BH3-only« sproži apoptizo (6). MDM2 blokira transkripcijo gena za p53 in povzroči hitrejši razpad proteina p53 (2).

Na nivoju intrinzične poti na potek apoptoze vplivajo tudi proteinski inhibitorji apoptoze (IAPs)- XIAP, cIAP1, cIAP2, ki se sprostijo iz mitohondrija in z vezavo na njihovo aktivno mesto inhibirajo kaspaze. Ob povečanju propustnosti mitohondrijske membrane pa se sprosti v citoplazmo tudi protein SMAC, ki inhibira proteine IAP in omogoča nadaljnji potek apoptoze (3).

Kaspaze so proteolitični encimi, ki služijo kot mediatorji pri različnih poteh apoptoze. Ena izmed glavnih tarč je inhibitor DNaze, ki je v aktivni obliki odgovoren za fragmentacijo jedrne DNA (3). Glavne skupine substratov za kaspaze so apoptotični, strukturni proteini, proteini, ki sodelujejo pri popravljanju napak pri prepisovanju DNA in proteini, ki nadzorujejo celični cikel. Kaspaze so v citoplazmi prisotne v neaktivni obliki in se aktivirajo z odcepom dela verige, kar katalizirajo druge kaspaze. Kaskada se začne s tvorbo kompleksa DISC ali Apaf-1, citokroma c in dvema molekulama kaspaze 9, ki omogočata avtoaktivacijo znotraj kompleksa.

Zadnja stopnja apoptoze je pakiranje vsebine celic v apoptotska telesca in fagocitoza. Odstranjevanje apoptotičnih celic je ključno za tkivno homeostazo, saj se tako prepreči izlitje potencialno citotoksičnih ali imunogenih snovi v okolico.

### **1.1.2 Vpliv na apoptozo kot terapevtski pristop**

Napaka v nadzoru apoptoze lahko zmoti krhko ravnotežje med celično smrtjo in proliferacijo, kar ima lahko za posledico razvoj bolezni, kot so rakava obolenja, avtoimunske in nevrodegenerativne bolezni. Izogibanje apoptozi se je izkazalo za eno izmed šestih nujno potrebnih sprememb v celični fiziologiji, kar lahko posledično povzroči maligno rast in je značilna za večino vrst raka (6). V začetku razvoja učinkovin, ki vplivajo na apoptozo, je bil glavni princip vnos rekombinantnih proteinov, a gre zaradi slabega prehajanja skozi celične membrane in nezmožnosti peroralne aplikacije razvoj v smeri sinteze majhnih molekul (7).

#### **1.1.2.1 Inhibitorji proteinov Bcl-2**

Prvi način zavirjanja izražanja antiapoptotičnih proteinov Bcl-2 je uporaba protismiselnih oligonukleotidov, kot je oblimersen, ki je v kliničnih študijah že pokazal učinek. Zanimiv je tudi razvoj majhnih molekul, ki bi oponašale proteine BH3, razvili so že nekaj takšnih molekul (antimycin A, keleritin, gosipol) (6).

##### **1.1.2.1.1 TRAIL**

Smrtni receptorji predstavljajo potencialno tarčo za induciranje apoptoze, predvsem zato, ker je mehanizem po tej poti neodvisen od p53. Kljub prizadevanjem se topni TNF in protitelesa z agonistično aktivnostjo do Fas niso izkazali za učinkovita, ker so ob njihovi uporabi opazili hude toksične stranske učinke. Več obeta ciljanje na receptorje za TRAIL (6)

##### **1.1.2.1.2 IAP**

Inhibicija IAP, predvsem XIAP, je zanimiva tarča za zdravljenje raka, ker je povečano izražanje XIAP značilno za mnogo oblik raka in je značilno za odporne oblike raka. V fazi razvoja so tudi že nepeptidni inhibitorji XIAP (6). Apoptozo lahko sproži tudi vezava mimetikov SMAC na proteine IAP (5).

#### ***1.1.2.1.3 Antagonisti MDM2***

Sintetizirali so peptide, ki se sicer močno vežejo na aktivno mesto MDM2, a so slabo prehajali skozi celično membrano. Nepeptidni analogi cis-imidazola, nutlini, so pokazali aktivnost v nanomolarnih koncentracijah, in sicer so povzročili zastoj v fazah G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub> celičnega cikla (6).

#### ***1.1.2.1.4 Aktivatorji kaspaz***

Na aktivacijo kaspaz kot strategijo za zdravljenje raka lahko vplivamo z vnosom zapisa za inducibilne kaspaze v celico, s tripeptidi, ki se direktno vežejo na kaspaze ali z majhnimi molekulami. Aktivnost so pokazali diklorobenzil carbamati in indoloni, ki inducirajo oligomerizacijo Apaf-1, in derivati gambogajske kisline, katerih mehanizem delovanja še ni pojasnjen (7).

Poznamo še dosti drugih načinov, kako sprožiti apoptozo v rakavih celicah, a so manj pomembni. Razlogi so večinoma v slabosti selektivnosti za rakaste celice ali nepojasnjenu mehanizmu delovanja.

### ***1.2 Maligne bolezni limfocitov***

Levkemije so maligne novotvorbe krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopiranje enega klena nenormalnih in nefunkcionalnih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi. Glede na vrsto celic jih delimo na limfatične (B ali T) in mieloične levkemije, glede na razvojno stopnjo levkemičnih celic in hitrost poteka bolezni pa na akutne (hitro potekajoče) in kronične (dolgotrajne) levkemije. Limfomi so maligni tumorji, ki izvirajo iz limfocitov B, T ali naravnih celic ubijalk. Nastanejo zaradi nenadzorovanega razraščanja celic v limfatičnem tkivu (9) .

### **1.2.1 Terapija malignih limfocitnih bolezni**

Akutna maligna bolezen limfocitov je hitro napredujoča bolezen, zato jo je treba začeti zdraviti takoj, ko je diagnoza postavljena. Cilj zdravljenja je zmanjšati število rakavih celic v kostnem mozgu oziroma limfnem tkivu in preprečiti njihovo metastaziranje v druga tkiva. Po smernicah levkemije in limfome zdravimo s kemoterapevtiki:

- Antimetaboliti: citarabin, fludarabin
- Antraciklinski antibiotiki: doksorubicin, daunorubicin
- Inhibitorji topoizomeraze: mitoksantron, etopozid, topotekan
- Alikilirajoči citostatiki: ciklofosfamid, ifosfamid, klorambucil, dakarbazin, karmustin, mekloretamin
- Vinka alkaloidi: vinkristin, vinblastin

Kot podpora terapija je za lajšanje stranskih učinkov ponavadi potrebna uporaba glukokortikoidov (deksametazon, prednizolon) in rastnih dejavnikov. V kombinaciji s temi zdravili pogosto uporabljamo tudi radioterapijo in presaditev kostnega mozga (**Napaka! Vira sklicevanja ni bilo mogoče najti.**).

Kronično limfocitno levkemijo zdravimo simptomatsko, ker velja za neozdravljivo. Pojavlja se predvsem pri starejših bolnikih in napreduje mnogo počasneje kot akutna levkemija, v poznih stopnjah bolezni pa se zdravi na enak način kot le-ta. Novejši pristopi k zdravljenju temeljijo predvsem na ciljanem zdravljenju z monoklonskimi protitelesi proti membranskim markerjem (11).

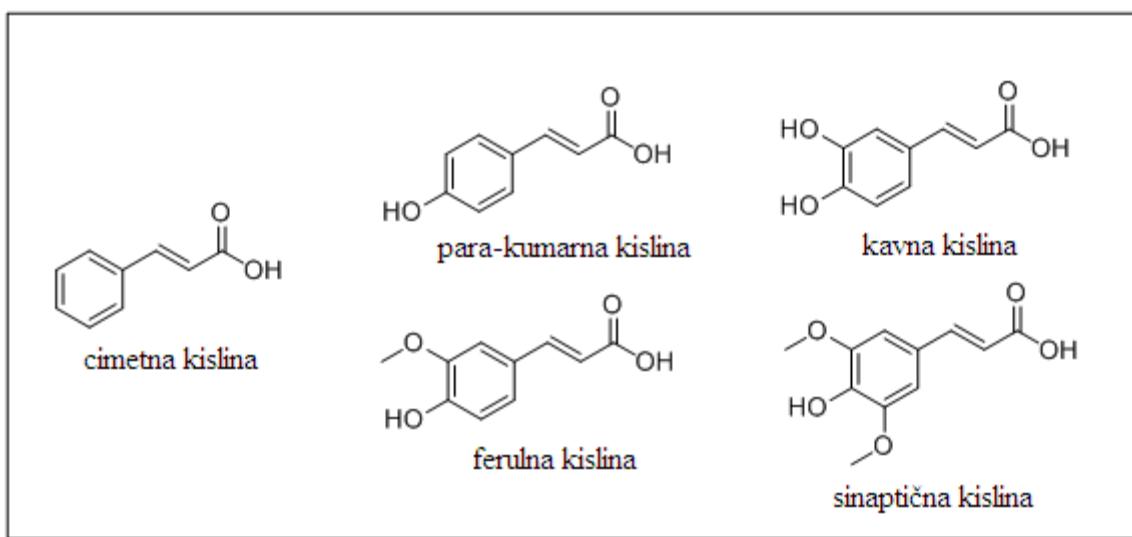
### **1.2.2 Modulacija apoptoze kot terapevtski pristop**

Apoptoza je vpletena v mnogo vidikov imunskega odziva, razvoj zrelih limfocitov, regulacijo imunskega odziva in celično citotoksičnost (7). Napake v mehanizmu apoptoze so pri levkemičnih celicah vedno prisotne in so ključnega pomena za njihovo prevlado nad normalnimi celicami. Pogosto so celice z okvarjenim mehanizmom apoptoze povezane s slabo odzivnostjo levkemije na standardno kemoterapijo in slabim preživetjem bolnikov.

Ciljana terapija, ki temelji na indukciji apoptoze, je najbolj obetajoča strategija razvoja zdravil za levkemije. Ta pristop je zanimiv predvsem zaradi večje specifičnosti take terapije za rakaste celice in posledično manjšega neželenega vpliva na normalne krvotvorne izvorne celice (10).

### 1.3 Cimetna kislina in derivati

Cimetna kislina ima dolgo zgodovino uporabe kot dišava in sredstvo za izboljšanje okusa. Priпадa skupini avksinov, to so rastlinski hormoni, ki uravnava rast in diferenciacijo celic. Hidroksicinamati se biosintetizirajo preko deaminacije aminokisline fenilalanin in so prekurzorji flavonoidov ter pomemben člen v biokemijski poti do nastanka lignina (13). Prisotnost benzenovega obroča in kratke nenasičene verige je vzrok za slabo polarnost in slabo topnost teh spojin v vodi. V naravi so prisotni predvsem bolj vodotopni derivati, kot so *para*-kumarna, kavna, ferulna in sinaptična kislina (slika 3), ki pa so redko v prosti obliki. Večinoma gre za estre s kininsko ali vinsko kislino ali pa se nahajajo v obliki glikozidov (14).



Slika 3: V naravi prisotni analogi cimetne kisline

#### 1.3.1 Naravni viri

V naravi so cimetna kislina in njeni derivati zelo razširjeni, a jih večinoma najdemo v zelo nizkih koncentracijah. Izjema so nekatere začimbe oziroma naravna olja, smole in balzami. Cimetno kislino najdemo v visokih koncentracijah v eteričnem olju cimeta, v nižjih

koncentracijah pa tudi v eteričnem olju bazilike in nekaterih drugih zelišč (17). Konjugati z različnimi kislinami pa so v rastlinskem svetu zelo razširjeni, najpogosteje v naravi najdemo kavno kislino in sicer kot ester s kininsko ali vinsko kislino. V zeleni zelenjavi je dosti cikorne kisline (ester dikavne kisline in vinske kisline) ter estra *para*-kumarne kisline z vinsko kislino in jabolčno kislino. Glikozidi sinaptične kisline so v največjih količinah prisotni v brokoliju in cvetači, paradižnik pa vsebuje največ *para*-kumarne kisline. Med naravnimi derivati cimetne kisline je potrebno omeniti še rožmarinsko kislino, katere glavni vir predstavljajo zelišča. Estri ferulne kisline so v najvišjih koncentracijah prisotni v otrobih različnih žit, predvsem pšenici in koruzi (17).

## 1.3.2 Učinki

Zaradi pogoste prisotnosti v rastlinah in nizke toksičnosti so farmakološki učinki derivatov cimetne kisline zanimivi za raziskovanje. Dokazali so že veliko različnih učinkov na biološke sisteme in jih pogosto uporabljajo kot spojine vodnice pri razvoju novih, terapevtsko uporabnih učinkovin (15).

### 1.3.2.1 Antioksidativni učinki

Fenolne spojine so znane po svojih dobrih antioksidativnih lastnostih, predvsem zaradi visokega redoks potenciala. Hidroksicimetne kisline, kot so kavna, ferulna in sinaptična kislina, so močni reducenti, celo močnejši od butil hidroksitoluena, ki ga pogosto uporabljamo kot konzervans. Najmočnejši antioksidanti so tisti derivati, ki imajo na *para* položaju na aromatskem obroču hidroksilno skupino. Ob prisotnosti oksidanta pride namreč do nastanka fenoksil radikala, ki je preko konjugirane dvojne vezi na propenski stranski verigi resonančno stabiliziran. Antioksidativno delovanje lahko povečamo tudi z uvedbo prenilne skupine na *meta* položaj na fenilnem obroču, ker tako še dodatno stabiliziramo fenoksil radikal preko pozitivnega induktivnega efekta prenilne skupine. Antioksidativno delovanje derivatov cimetne kisline je odvisno od cinamoilnega fragmenta, vrsta in položaj substituentov na aromatskem obroču vpliva le na povečanje ali zmanjšanje aktivnosti. Hidroksicinamati z dolgo alkilno verigo so se zaradi svojih antioksidativnih lastnosti, lipofilnosti in zmožnosti absorpcije UVB žarkov izkazali kot koristni dodatki h kozmetičnim izdelkom, pri zaščiti pred soncem in zdravljenju eritema in podobnih kožnih bolezni. Heksilni estri in amidi kavne in

ferulne kislina so zaradi svojih antioksidativnih lastnosti in lipofilnosti zanimivi za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (15)

### **1.3.2.2 Protibakterijski učinki**

Cimetna kislina deluje protibakterijsko tako proti patogenim bakterijam kot bakterijam, ki so odgovorne za kvarjenje hrane. Glavni razlog za omejeno uporabo cimetne kislina v te namene je slaba topnost v vodi. Inhibitorno delovanje proti Gram pozitivnim in Gram negativnim bakterijam so pokazale tudi hidroksicimetne kislina: kumarna, ferulna in sinaptična kislina. Razvoj novih antibiotikov proti *Staphylococcus aureus*, odpornih proti meticilinu in vankomicinu, gre tudi v smeri amidov dihidrokavne kislina, saj so se izkazali za bolj učinkovite kot oksacilin. Kot potencialne spojine proti mikobakterijam so se pokazali hidrazidi izoniazida in cimetne kislina, ki so učinkoviti že v mikromolarnih koncentracijah. Protibakterijsko in hkrati protiglivično delovanje izkazujejo v različnih študijah nekateri estri, sečnine, pirazoli, acil hidrazoni in benzildenski hidrazidi (15).

### **1.3.2.3 Protivirusni učinki**

Cimetna kislina zavira razmnoževanje virusa konjskega herpes virusa tipa 1. Nekatere sestavine dietiletrske frakcije brazilskega propolisa, za katere so potrdili, da so estri substituirane cimetne kislina, so učinkovite proti virusu gripe. Rožmarinsko kislino v ekstraktu melise (*Melissa officinalis*) lahko uporabljam pri terapiji okužbe z virusom herpes simpleks. Derivate cimetne kislina najdemo tudi med inhibitirji HIV-1 integraze. Glavna strukturna zahteva za zaviranje encima sta dve vicinalni hidroksilni skupini na aromatskem obroču. Nekateri estri cimetne in *ortho*-kumarne kislina z derivati holesterola delujejo proti poliovirusu tipa 1. Tudi naravni derivati cimetne kislina, kot je *para*-sulfoksicimetna kislina, izolirana iz morske trave *Zostera marina*, imajo protivirusno delovanje, natančneje deluje proti virusu denga. Na zaviranje razmnoževanja virusa vezikularnega stomatitisa in virusa herpes simpleks tipa 1 vpliva 1-cinamoil 3,11-dihidroksimeliakarpin, izoliran iz ekstrakta drevesa indijska lipovka (*Melia azedarach*). Še bolj zanimivi so derivati cimetne kislina in tieno[2,3-d]oksazinonov, saj v nanomolarnih koncentracijah zavirajo virus herpes simpleks tipa 2, virus varicella zoster in proteaze citalomegalovirusa (15).

#### **1.3.2.4 Protiglivični učinki**

Cimetna kislina in njeni derivati imajo velik potencial pri razvoju protiglivičnih učinkovin. Že samo cimetno kislino bi lahko uporabljali v losjonih in šamponih za odpravljanje prhljaja, ki je posledica okužbe z *Malassezia ovalis*. V kompleksu s sečnino je bila cimetna kislina učinkovita proti glivam *Candida albicans* in *Aspergillus niger*, metil substituirane cimetne kisline na mestu 2 in 3 aromatskega obroča pa proti nekaterim rastlinskim patogenim glivam. Derivati cimetne kisline so zanimivi predvsem zato, ker so za razliko od sinteznih protiglivičnih učinkovin nizko toksični za ribe in dvoživke in zato varnejši za okolje. Izopropil 4-hidroksicinamid in butil 4-hidroksicinamid sta podobno učinkovita proti glivi *Phytum sp.* kot komercialni fungicid iprobenfos. Po učinkovitosti proti človeškim patogenom izstopa  $3\beta$ -cinamoiloleanska kislina, ki se je proti glivi *Candida guilliermondii* in drugim vrstam iz družine *Candida* izkazala za bolj učinkovito kot flukonazol. Širok spekter protiglivičnega delovanja imajo triazoli s cimetno skupino, substituirano s trifluorometilno skupino na aromatskem obroču (15).

#### **1.3.2.5 Protitumorni učinki**

Cimetna kislina in njeni naravni derivati so že dolgo poznani po svojem protitumornem delovanju in se jih predvsem v kitajski medicini že stoletja uporablja v te namene. Ker imajo  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasičen karboksilni strukturni fragment, lahko nastopajo kot Michaelovi akceptorji, predvsem proti glutationu in cistinskim ostankom. Kljub protitumornem delovanju pa ima cimetna kislina in tudi večina njenih derivatov nizko toksičnost za človeka.

Cimetna kislina zavira proliferacijo adenokarcinoma debelega črevesja, in sicer vpliva na signalno pot preko cAMP in posledično zavira encimsko izoprenilizacijo proteinov, ki je nujna za prenos signalov za celično delitev. Podobne učinke ima cimetna kislina tudi na druge vrste raka, pri malignem melanomu so opazili tudi močno zmanjšano invazivnost tumorja. Kavna kislina direktno inhibira encim Fyn, ki je ključen za poškodbe celičnega materiala zaradi UVB sevanja preko vpliva na COX-2. Cimetne kisline, substituirane na obroču in nenasicieni verigi so bile aktivne proti novi tarči v terapiji hormonsko odvisnih rakov, to je 17-hidroksisteroid dehidrogenazi tipa 5. V razvoju neoplazem imajo pomembno vlogo encimi prenil transferaze, ki predvsem vplivajo na odpornost proti apoptozi, angiogenezo, invazivne

lastnosti in metastaziranje. Etanolni ekstrakt brazilskega propolisa, ki vsebuje tri prenilirane derivate cimetne kislina, artepinil, baharin in drupanin, je v različnih študijah pokazal izjemne protitumorne lastnosti. Te spojine preko zaviranja prenil transferaz vplivajo na indukcijo apoptoze človeških rakavih celičnih linij. Tudi sintezne farnezil in geraniloksicimetne kislina, ki selektivno inhibirajo GGTazo I (geranilgeranil transferaza I), so zanimive za nadaljnji razvoj. Čeprav je v naravi bolj razširjena *trans* cimetna kislina poznamo tudi *cis* obliko, katere derivati zavirajo od ciklina odvisne kinaze in povzročijo zastoj celičnega cikla v fazi G<sub>1</sub> pri rakavih celičnih linijah. S kombiniranjem cimetne kislina in adamantana so prišli do nove spojine vodnice, ki je bolj učinkovita kot kombinacija adamantana in tertazola, tiazolona in hidroksamske kislina. Nova spojina vpliva na zaviranje rasti rakavih celic, povzroči apoptozo in zmanjšuje angiogenezo v rakavem tkivu.

Cinamati so številni in dobro raziskani derivati cimetne kislina, ki so pokazali izjemno protitumorno delovanje. Med naravnimi estri cimetne kislina je zaradi svojih antioksidativnih lastnosti in citotoksičnega učinka na celično kulturo akutne mieloidne levkemije zanimiva rožmarinska kislina, ki je glavna sestavina eteričnega olja sivke (*Lavandula officinalis*). Fenetilni ester kavne kislina (CAPE), izoliran iz propolisa, je zelo učinkovit pri metastatskem karcinomu debelega črevesa, deluje pa preko različnih mehanizmov. V prvi vrsti je CAPE izjemen antioksidant, preko zaviranja transkripcijskega dejavnika NF-κB in matriksnih metaloproteaz pa vpliva na sposobnost tumorja za metastaziranje. Dobro je raziskan vpliv CAPE na apoptozo celic mieloidne levkemije. Povzroči sproščanje citokroma c iz mitohondrija, zmanjšanje izražanja Bcl-2, povečanje izražanja Bax, aktivacijo kaspaze 3 in aktivacijo PARP. V primeru citotoksične spojine metil 3,4-hidroksicinamat se je izkazalo, da je *E*-konfiguracija in α, β-nenasičen karbonilni fragment ključen za delovanje. Z uvedbo cimetnega fragmenta je mogoče doseči tudi izboljšanje protitumornega delovanja mnogih naravnih spojin, kot so kamfotericin, howinol A, akronicin, rezerpin, fumagilin, šisandrol, in povečanje učinkovitosti terapije proti rakom, odpornim proti več učinkovinam, s taksujunaninom C. Zaradi svoje strukture so zanimivi klustri estrov cimetne in kavne kislina z metil azidi, ki so vplivali tudi na zmanjšanje hitrosti delitve celične linije od estrogena odvisnega raka dojk preko zaviranja 5-lipooksigenaze.

Tudi amidi cimetne kislina se pogosto pojavljajo v naravi in predstavljajo svojo skupino spojin, ki izkazujejo protitumorno delovanje. Gliva *Streptomyces griseoluteus* proizvaja 2-

metilcinamid, ki vpliva predvsem na zmanjšanje invazivnosti in metastaziranja pri malignem melanomu. S pripajanjem cimetne kisline, substituirane z iperitno skupino, na distamicin so dosegli opazno izboljšanje aktivnosti v primerjavi z učinkovitostjo talimustina. Če enako substitucijo uvedemo na molekulo talimustina pa dobimo kar dvajsetkrat bolj učinkovito spojino. Zaradi slabe topnosti so sintetizirali tudi cinamidne derivate duarokarmicina A, s čimer so obdržali učinkovitost in izboljšali njegove lastnosti. Cinamoilbenzotriazolilamid in 3-(nitrocinamoil)piridin sta reverzibilna inhibitorja transaminaze 2, ki sodeluje pri endocitozi, apoptozi in regulaciji celične rasti. Zaradi učinkovitosti pri raku ledvic, debelega črevesa, dojke, melanomu in levkemijah ti spojini kažeta na možnost razvoja učinkovin, ki ciljajo na to tarčno molekulo. Cinamoilkinaloni z antranilno kislino so se izkazali kot spojine, ki povzročajo zastoj v celični fazi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> na celičnih linijah raka pljuč. Zaradi razvoja odpornosti nekaterih vrst raka proti inhibitorjem tirozin kinaz so uvedli cimetni fragment na pirimidinski obroč. Novo sintetizirani cinamoilpirimidini se vežejo na isto vezavno mesto in so do trikrat bolj učinkoviti od izhodiščnih molekul. Kot osnova za sintezo piperazinskih analogov cimetne kisline, ki imajo citotoksične lastnosti in se vežejo na DNA, je služil pirolobenzodiazepinski protitumorni antibiotik antramicin. Izboljšanje antiproliferativnega učinka bestatina na celične linije levkemije so dosegli s sintezo serije N-cinamoil-L-aspartatnih kislin in njihovih derivatov s hidroksamsko kislino. Podobne spojine delujejo tudi kot zaviralci histonske deacetilaze, encima, ki vpliva na posttranslacijske modifikacije histonov in je pomemben v procesu tumorskih sprememb celic. Ob prisotnosti omenjenih spojin je prišlo v celičnih linijah kronične in akutne levkemije do sprožitve apoptoze zaradi hiperacetilacije H3, H4 in heath shock proteina 90, zvišanja izražanja p21 in ustavitev celičnega cikla v fazi G<sub>1</sub>. Največji izliv pri razvoju novih učinkovin prestavlja rakava obolenja, ki so neobčutljiva na apoptozne signale. V tem primeru se osredotočamo predvsem na podaljševanje trajanja mitoze in posledično na počasnejše razščanje rakavih celic, na tak način delujejo cinamoilhidrazidi. Še bolj učinkoviti pa so njihovi njihovi derivati, ki imajo namesto dvojne vezi na cimetni kislini ciklopropilni fragment (13).

## **2 NAMEN DELA**

Derivati cimetne kisline vplivajo na proliferacijo rakavih celic in predhodne raziskave kažejo, da so estri cimetne kisline in fenolov selektivno toksični za levkemične celice (25). Namen diplomskega dela je sintetizirati različne derivate cimetne kisline in ovrednotiti njihov vpliv na proliferacijo levkemičnih celičnih kultur.

Aktivnost spojin bomo testirali na humanih modelnih celičnih linijah Ramos (Burkittov limfom) in Jurkat (T-celična levkemija). V prvem delu biološkega testiranja bomo na teh modelnih celičnih linijah ovrednotili spojine, ki so učinkovite pri zavirjanju celične proliferacije na modelu celične kulture K562 (2526) ter struktorno podobne spojine, ki smo jih sintetizirali na novo. Glede na rezultate testa celične proliferacije (test MTS) bomo sintetizirali drugo serijo spojin, ki bodo izhajale iz strukture najbolj aktivne spojine iz prve serije. Tudi te spojine bomo ovrednotili s testom MTS.

V drugem delu diplomskega dela bomo z uporabo pretočne citometrije ugotavljeni, kako spojine, ki so najbolj zavirale celično proliferacijo, vplivajo na celični cikel. V nadaljevanju bomo ugotavljeni, ali spojine inducirajo celično smrt po mehanizmu apoptoze. Uporabili bomo metodo barvanja z Annexinom V, označenim s fluoroforom, ter testom celične proliferacije MTS ob prisotnosti inhibitorja kaspaz 3 in 7.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Materiali pri sintezi spojin**

###### **Reagenti in topila**

Pri delu smo uporabljali kemikalije in topila različnih proizvajalcev: Chemika (Avstralija), Aldrich (ZDA), Fluka (Švica), Merck (Nemčija), Lek (Slovenija) in Janssen (ZDA).

Reagenti, ki smo jih uporabili so: *trans* cimetna kislina, 4-cianofenol, BOP, diizopropilamid, 3-cianofenol, DCC, DMAP, 4-(trifluorometil)fenol, 2-cianofenol, 3-(trifluorometil)fenol, 3-aminobenzojska kislina, etanol, tionilklorid, DMF, oksalilklorid in dioksan.

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in izolaciji: diklorometan, etilacetat, heksan in brezvodni etanol (vsa »pro analysi«).

Za spiranje pri izolaciji pa smo pripravili nasičeno raztopino NaCl, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub>, 1M raztopino NaOH in 10 % raztopino citronske kisline, za odstranjevanje vode iz organskega topila pa brezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

###### **Laboratorijska oprema**

- tehnica: Mettler Toledo PB403-S, ZDA
- rotavapor: Büchi Rotavapor R-114, Švica
- kromatotron: Harrison Research Chromatotron HR 5146, ZDA
- UV svetilka: Lamag UV-CABINET II, Nemčija

### **3.1.2 Materiali pri testiranju spojin na celičnih linijah**

#### **Kemikalije**

- DMSO (Merck Chemicals, Nemčija)
- raztopina tripanskega modrila (Sigma – Aldrich, ZDA)
- Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent (reagent za test MTS) (Promega, ZDA)
- absolutni etanol (KEFO, Slovenija)
- propidijev jodid (Invitrogen, ZDA)
- 4 % paraformaldehid (Sigma Life Science, ZDA )
- specifični inhibitor kaspaz 3 in 7

#### **Kompleti**

Komplet za barvanje z Annexinom V- PE Annexin V Apoptosis detection kit I (BD Pharmingen, ZDA)

- 10x Annexin V Binding Buffer (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>)
- 7-AAD
- PE Annexin V

#### **Pufri**

PBS (fosfatni pufer s soljo):

- NaCl
- KCl
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ultračista voda

### **Encimi**

- RNaza

### **Celične kulture**

- Ramos
- Jurkat

### **Gojišče**

Medij RPMI:

- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma – Aldrich, ZDA)
- 10 % FBS
- 1 % glutamin
- 1 % antibiotik (streptomicin, penicilin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma – Aldrich, ZDA)
- 0,1 % 2-merkaptoetanol (Sigma – Aldrich, ZDA)

### **Laboratorijska oprema**

- analitska tehntica: Exacta 300 EB Tehntica, Slovenija
- centrifuga: Centric 332A Tehntica, Slovenija
- inkubator: Sanyo Incusafe MCO 18 AIC, Japonska
- LAF komora: Iskra PIO M12, Slovenija

- mikrotitrskie ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami): TPP, Švica
- mikrotitrski čitalec: Tecan GENious, Švica
- nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL): Sarstedt, Nemčija
- pipete: Biohit, Eppendorf Research plus, Nemčija
- pretočni citometer: BD FACS Calibour Flow cytometer, ZDA
- programska oprema za Tecan: Magellan V3.X IVD
- stekleničke za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm<sup>2</sup> rastne površine): TPP, Švica
- svetlobni mikroskop: Olympus CKX41, Nemčija
- vodna kopel: Memmert, Nemčija
- vibracijski mešalnik: Biosan Combi-spin, ZDA

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Metode pri sintezi, čiščenju in karakterizaciji spojin**

#### **3.2.1.1 Kromatografske metode**

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo izvajali na ploščah Silica gel 60 F254 (Merck) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu.

Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko ( $\lambda = 254$  in  $366$  nm).

Za kolonsko kromatografijo smo uporabljali silikagel z velikostjo delcev  $0,063\text{-}0,200$  mm (Merck).

Za pripravo plošč za kromatotron smo uporabljali silikagel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck).

#### **3.2.1.2 Spektroskopske metode**

$^1\text{H}$  NMR spektri so bili posneti na inštrumentu Bruker Avance DPX 300 v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili CDCl<sub>3</sub> in TMS kot interni standard. Spektri so bili posneti pri temperaturi 302 K.

Masni spektri so bili posneti na inštrumentu Varian-MAT 311 A z FAB in EI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

IR spektri so bili posneti na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FTIR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

#### **3.2.1.3 Določevanje tališč**

Tališča so bila določena na mikroskopu z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A in so nekorigirana.

### 3.2.1.4 Elementna analiza

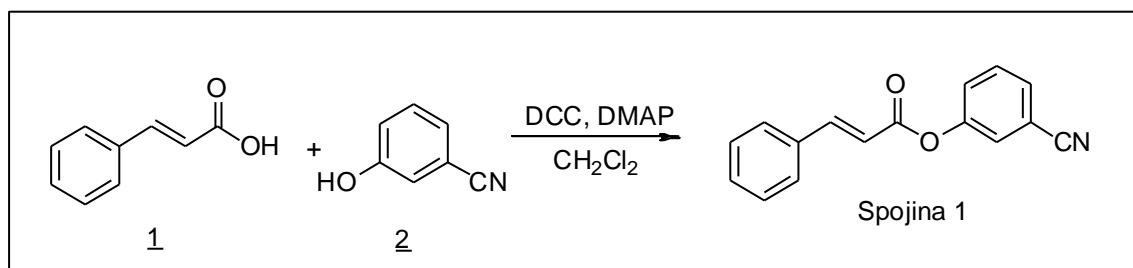
Elementne analize za ogljik, vodik in dušik so bile izvedene na inštrumentu Perkin Elmer 2400 na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

### 3.2.1.5 Nomenklatura spojin

Pri poimenovanju spojin in risanju strukturnih formul smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw, verzija 12.0, Cambridge Soft 1986-2009.

### 3.2.1.6 Sinteza spojin

#### 3.2.1.6.1 Sinteza 3-cianofenilcinamata (spojina 1)



Slika 4: Sinteza spojine 1

Cimetno kislino (0,963 g, 6,0 mmol) (1), 3-cianofenol (0,774 g, 6,5 mmol) (2), DCC (1,341 g, 6,5 mmol) in DMAP (0,061 g, 0,5 mmol) natehtamo v bučko in raztopimo v diklorometanu (30 mL) ter mešamo 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes filtriramo in jo speremo z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2x20 mL), 10 % citronske kislino (2x25 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (1x25 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo etilacetat/heksan = 2/1.

Opis: beli kristali

Izkoristek: 65 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,46

Tališče: 72 – 80 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) =

6,63 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,45 – 7,48 (m, 4H, H-Ar)

7,54 – 7,57 (m, 3H, H-Ar)

7,58 – 7,65 (m, 2H, H-Ar)

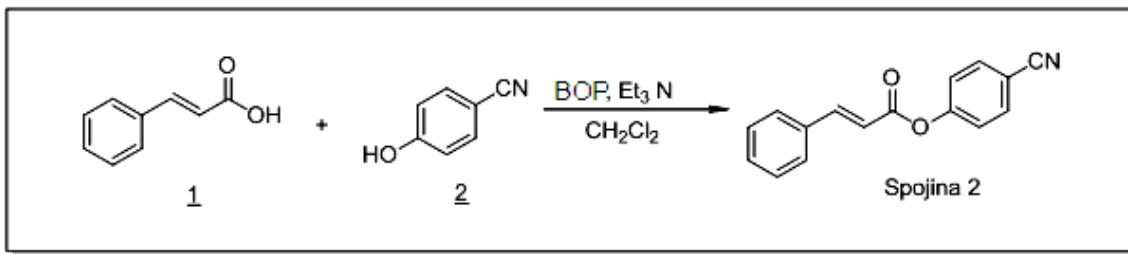
7,92 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3431,8; 3083,4; 2228,3; 1728,0; 1646,4; 1311,3; 1238,7; 1140,4; 968,9; 767,0; 679,4

**ESI-MS:** m/z= 250,1 (M+H<sup>+</sup>)

<b>Elementna analiza:</b>	%C	%H	%N
Izračunano za C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> :	77,10	4,45	5,62
Ugotovljeno:	75,55	4,21	5,50

### 3.2.1.6.2 Sinteza 4-cianofenilcinamata (spojina 2)



Slika 5: Sinteza spojine 2

Cimetno kislino (0,963 g, 6,5 mmol) (1), 4-cianofenol (0,774 g, 6,5 mmol) (2) in BOP (1,066 g, 6,5 mmol) natehtamo v bučko in raztopimo v diklorometanu (30 mL). Dodamo diizopropiletilamin (3,42 mL, 20 mmol mmol) ter mešamo 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes prefiltriramo in jo speremo z 10 % citronsko kislino (2x50 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (3x50 mL), 0,1 M  $\text{NaOH}$  (1x50 mL), prečiščeno vodo (1x50 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (2x 50 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo etilacetat/heksan = 1/2.

Opis: beli kristali

Izkoristek: 59 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,81

Tališče: 102–104°C

**<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) =

6,64 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,33 – 7,36 (m, 2H, H-Ar)

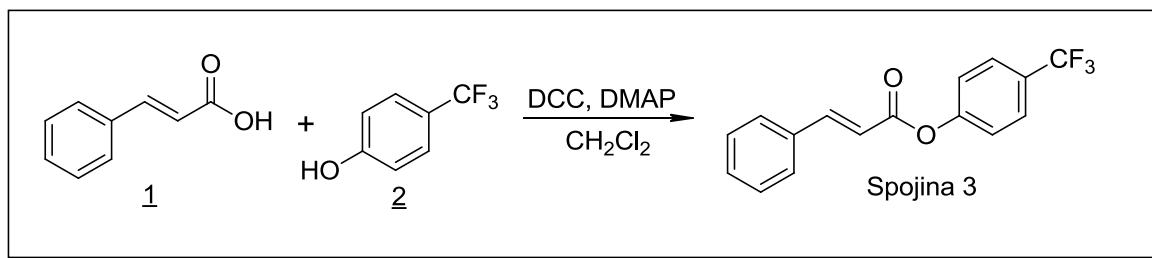
7,46 – 7,48 (m, 3H, H-Ar)

7,60 – 7,63 (m, 2H, H-Ar)

7,72 – 7,75 (m, 2H, H-Ar)

7,89 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

### 3.2.1.6.3 Sinteza 4-(trifluorometil)fenilcinamata (spojina 3)



**Slika 6:** Sinteza spojine 3

Cimetno kislino (0,831 g, 5,6 mmol), DCC (1,273 g, 6,2 mmol) in DMAP (0,068 g, 0,6 mmol) natehtamo v bučko in raztopimo v diklorometanu (30 mL) ter mešamo 15 min na ledeni kopeli. Nato dodamo še 4-(trifluorometil)fenol (1,0 g, 6,2 mmol) (2) in pustimo mešati še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes filtriramo in jo speremo z 10 % citronsko kislino (2x25 mL), prečiščeno vodo (1x25 mL), 1M NaOH (2x25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x25 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo z uporabo Chromatotron® (mobilna faza: heksan/etilacetat= 10/1).

Opis: beli kristali

Izkoristek: 76 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,51

Tališče: 85 – 93 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm)=

6,66 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,33 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, H-Ar)

7,45 – 7,47 (m, 3H, H-Ar)

7,61 – 7,62 (m, 2H, H-Ar)

7,71 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, H-Ar)

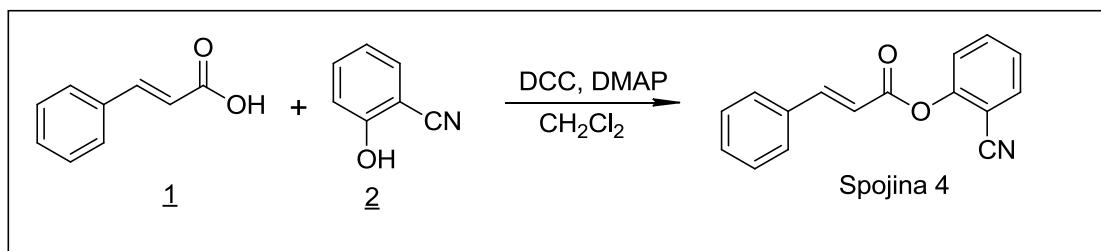
7,92 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3431,2; 2929,7; 2367,5; 1733,3; 1633,2; 1326,1; 1213,0; 1149,8; 1065,2; 1007,9; 865,3; 765,6; 708,7; 684,5; 590,7

**ESI-MS:** m/z= 293,1 (M + H<sup>+</sup>)

<b>Elementna analiza:</b>	%C	%H	%N
Izračunano za C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> O <sub>2</sub> :	65,76	3,79	0,00
Ugotovljeno:	65,86	3,59	0,00

### 3.2.1.6.4 Sinteza 2-cianofenilcinamata (spojina 4)



Slika 7: Sinteza spojine 4

Cimetno kislino (0,741 g, 5,0 mmol), DCC (1,135 g, 5,5 mmol) in DMAP (0,061 g, 0,5 mmol) natehtamo v bučko in raztopimo v diklorometanu (30 mL) ter mešamo 15 min na ledeni kopeli. Nato dodamo še 2-cianofenol (0,655 g, 5,5 mmol) (2) in pustimo mešati še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes prefiltriramo in jo speremo z 10 % citronsko kislino (2x25 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2x25 mL), 1M NaOH (2x25 mL), prečiščeno vodo (1x25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x 25 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo z uporabo Chromatotron® (mobilna faza: heksan/etilacetat= 10/1).

Opis: beli kristali

Izkoristek: 60 %

RF ((MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,47

Tališče: 80–93°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm)=

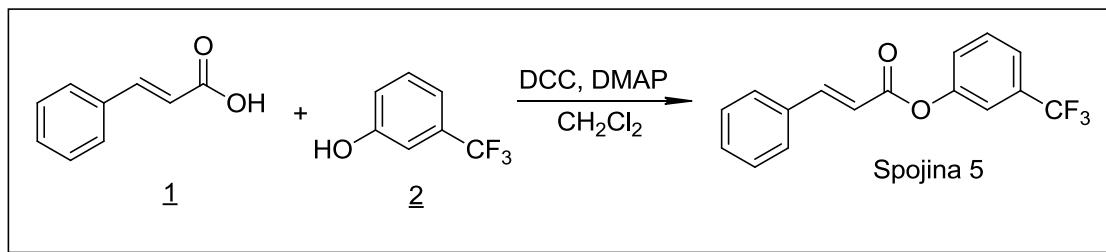
6,70 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,38–7,47 (m, 5H, H-Ar)

7,62–7,75 (m, 4H, H-Ar)

8,00 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

### 3.2.1.6.5 Sinteza 3-(trifluorometil)fenilcinamata (spojina 5)



Slika 8: Sinteza spojine 5

Cimetno kislino (0,741 g, 5,0 mmol), DCC (1,135 g, 5,5 mmol) in DMAP (0,061 g, 0,5 mmol) natehtamo v bučko in raztopimo v diklorometanu (30 mL) ter mešamo 15 min na ledeni kopeli. Nato dodamo še 3-(trifluorometil)fenol (0,874 g, 5,5 mmol) (2) in pustimo mešati še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes filtriramo in jo speremo z 10 % citronsko kislino (2x25 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2x25 mL), 1M NaOH (2x25 mL), prečiščeno vodo (1x25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x25 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo z uporabo Chromatotron® (mobilna faza: heksan/etilacetat= 10/1).

Opis: beli kristali

Izkoristek: 55 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,60

Tališče: 70–85 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm)=

6,66 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,39–7,49 (m, 5H, H-Ar)

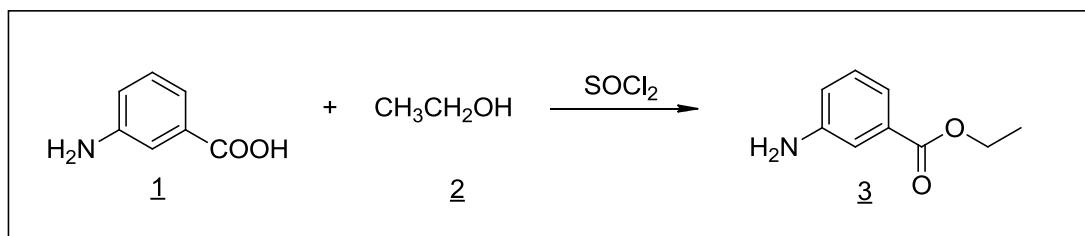
7,53–7,56 (m, 2H, H-Ar)

7,59–7,62 (m, 2H, H-Ar)

7,92 (d, *J*= 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

### 3.2.1.6.6 Sinteza etil 3-cinamamidobenzoata (spojina 6)

#### 1. Stopnja: sinteza etil 3-aminobenzoata (3)



Slika 9: 1. stopnja sinteze spojine 6

3-aminobenzojsko kislino (2,343 g, 20 mmol) (1) zatehtamo v bučko, raztopimo v brezvodnem etanolu (40 mL) (2) in mešamo na ledeni kopeli. Nato po kapljicah dodamo tionilklorid (2,92 mL, 40 mmol) in mešamo na ledeni kopeli še 15 min. Ko se reakcijska zmes segreje na sobno temperaturo, jo dve uri segrevamo pri  $80^\circ\text{C}$ . Nato reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in dodamo toliko dietiletra, da izpadejo kristali, ki jih odnučamo in posušimo. Kristale nato raztopimo v diklorometanu (100 mL), spiramo z 1M NaOH (2x50 mL), prečiščeno vodo (1x50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x 50 mL) ter sušimo nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Topilo odparimo in dobimo čisto spojino 3.

Opis: beli kristali

Izkoristek: 86 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,34

Tališče: 250–266 °C

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta(\text{ppm})=$

1,41 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ )

4,41 (m, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ )

7,28 (s, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>)

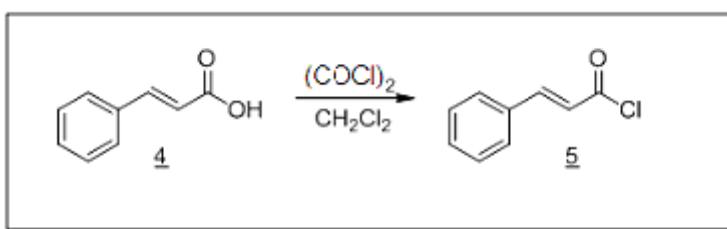
7,54 (m, 1H, H-Ar)

7,78 (d, 1H, H-Ar)

8,08 (d, 1H, H-Ar)

8,16 (d, 1H, H-Ar)

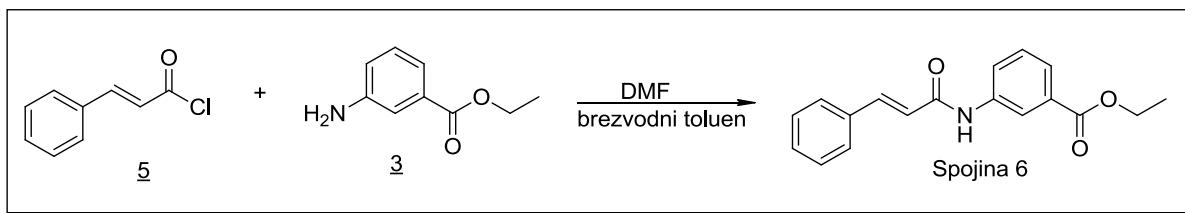
2. Stopnja. Sinteza kislinskega klorida cimetne kisline (5)



Slika 10: 2. stopnja sinteze spojine 6

Cimetno kislino (1,755 g, 11,8 mmol) zatehtamo v bučko in jo raztopimo v brezvodnem diklorometanu (40 mL). Raztopino ohladimo na 0 °C in ji dodamo 2 kapljici dimetilformamida ter oksalilklorid (1,21 mL, 18,7 mmol). Odstranimo ledeno kopel in segrevamo eno uro pri 45 °C. Produktu odparimo topilo, prebitni oksalilklorid pa azeotropno odstranimo s prelivanjem in sledečim odparevanjem diklorometana (2x50 mL). Nastali produkt takoj uporabimo v naslednji stopnji sinteze.

3. Stopnja: Sinteza etil 3-cinamamidobenzoata (spojina 6)



Slika 11: 3. stopnja sinteze spojine 6

Etil 3-aminobenzoat (3,6 g, 12,9 mmol) (4) zatehtamo v bučko in jo raztopimo v brezvodnem toluenu (40 mL). Nato počasi dokapavamo raztopino kislinskega klorida cimetne kisline (1,966 g, 11,8 mmol) v brezvodnem toluenu (5 mL) in dodamo še trietilamin (3,6 mmol, 23,6 mL). Reakcijsko zmes segrevamo 1,5 h pri 130 °C, ohladimo na sobno temperaturo in pustimo mešati še 6 dni. Nato reakcijsko zmes spiramo z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (1x50 mL), prečiščeno vodo (1x50 mL), 10 % raztopino citronske kisline (1x50 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (1x50 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtriramo in odparimo topilo ter spojino očistimo z uporabo Chromatotron® (mobilna faza: heksan/etilacetat=10/1).

Opis: amorfna bela snov

Izkoristek: 59 %

RF (MF: etilacetat/heksan = 2/1): 0,28

Tališče: 118–124 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm)=

1,31–1,36 (m, 3H, CH<sub>3</sub>)

4,31–3,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)

6,83 (d, *J*= 15,8 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,40–7,51 (m, 4H, Ar-CH=CH + 3H-Ar)

7,73–7,84 (m, 4H, Ar-H)

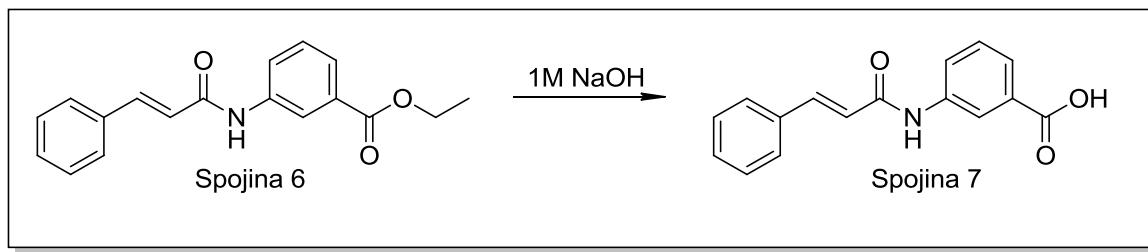
7,97–8,00 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H, H-Ar)

8,34 (s, 1H, H-Ar)

10,43 (s, 1H, NH)

**ESI-MS:** m/z= 296,1 (M + H<sup>+</sup>)

### 3.2.1.6.7 Sinteza 3-cinamamidobenzojske kisline (spojina 7)



**Slika 12:** Sinteza spojine 7

Etil 3-cinamamidobenzoat (0,590 g, 2,0 mmol) (6) zatehtamo v bučko in suspendiramo v 1M NaOH (10 mL). Dodamo dioksan (10 mL) in mešamo 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes nakisamo s koncentrirano HCl do pH = 6 in oborino odnučamo. Oborino

raztopimo v 0,1M NaOH (10 mL) in spiramo z dietiletrom (2x10 mL). Vodno fazo nato nakisamo do pH = 4, odnučamo oborino (spojina 7) in produkt posušimo.

Opis: beli kristali

Izkoristek: 69 %

RF (MF: etilacetat): 0,30

Tališče: 230–245 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm)=

6,83 (d, *J*= 15,7 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,39–7,65 (m, 8H, Ar-CH=CH + H-Ar, )

7,95 (d, *J*= 7,9 Hz, 1H, H-Ar)

8,33 (s, 1H, H-Ar)

10,39 (s, 1H, NH)

12,98 (s, 1H, COOH)

**ESI-MS:** m/z= 268,1 (M + H<sup>+</sup>)

## **3.2.2 Metode pri biološkem testiranju spojin na celičnih kulturah**

### **3.2.2.1 Metode dela s celičnimi kulturami**

Delo s celičnimi kulturami zahteva veliko pazljivosti, saj moramo vedno zagotavljati sterilne pogoje. Vsa opravila delamo v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), ki se nahaja v prostoru s posebnim režimom čistoče. Za vstop v ta prostor moramo obleči druga zaščitna oblačila in obutev kot jih nosimo v drugih prostorih. LAF komora zagotavlja sterilne pogoje z mehanskim preprečevanjem kontaminacije ter stalnim pretokom preko HEPA filterov filtriranega zraka na delovno površino. Pred začetkom dela moramo delovne površine LAF komore vedno razkužiti s 70 % etanolom in za pol ure vklopiti obsevanje z ultravijolično svetlobo. Vse pripomočke in ves material moramo pred vnosom v komoro razkužiti s 70 % etanolom. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice, ki jih pred vsakom posegom v LAF komoro in tudi med delom razkužimo.

Pri našem delu smo uporabili dve levkemični celični liniji (20):

- Ramos je celična linija B-celične levkemije Burkittovega limfoma, pridobljena iz 3-letnega dečka in
- Jurkat je celična linija akutne T-celične levkemije, pridobljena iz 14-letnega dečka

### **3.2.2.2 Gojenje celičnih kultur**

Celični liniji Ramos in Jurkat smo gojili v mediju RPMI z 10 % FBS, glutaminom, antibiotikom, antimikotikom in 2-merkaptoetanolom. Celice smo gojili in redčili v stekleničkah za gojenje celičnih kultur ali ploščicah za celične kulture v inkubatorju pri 37 °C v prisotnosti 5 % atmosfere CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2.3 Subkultiviranje celičnih kultur**

Za doseganje ustreznega števila in optimalne rasti celic smo jih morali presejati vsake 2 do 3 dni, tako da smo jih redčili z medijem RPMI, segretim na 37 °C.

### **3.2.2.4 Odmrzovanje celic**

Celične kulture shranjujemo v krionampulah pri -80 °C v zmrzovalniku ali pri -180 °C v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom. Celice so shranjene v 10 % DMSO, ki je citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti hitro.

#### Reagenti:

- medij RPMI

#### Postopek:

Krioampulo s celicami smo takoj prenesli iz zamrzovalnika v vodno kopel, segreto na 37 °C in jo rahlo stresali, da smo pospešili odmrzovanje. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL medija RPMI, segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratov na minuto. Nastali supernatant smo odpipetirali in celice suspendirali v ustreznem volumnu medija RPMI, segretega na 37 °C. Celično suspenzijo smo prenesli v sterilno mikrotitrsko ploščico za gojenje celičnih kultur in jo inkubirali v CO<sub>2</sub> inkubatorju.

### **3.2.2.5 Štetje celic**

#### Reagenti:

- tripansko modrilo
- medij RPMI

#### Postopek:

Trikrat tedensko smo celične kulture razredčili do gostote  $1,0 \cdot 10^{-5}$  celic na mL. Najprej smo kulturo dobro premešali in je 10 µL zmešali z 10 µL tripanskega modrila. 10 µL pripravljene mešanice smo odpipetirali v komorico za štetje krvnih celic. Število celic v vseh 4 kvadratih smo delili z 2 in dobili gostoto celic krat  $10^4$  na mL kulture.

$$\text{Št.celic/ml} = \frac{A + B + C + D}{4} \times DF \times 10^4$$

#### **Enačba 1: Računanje gostote celic**

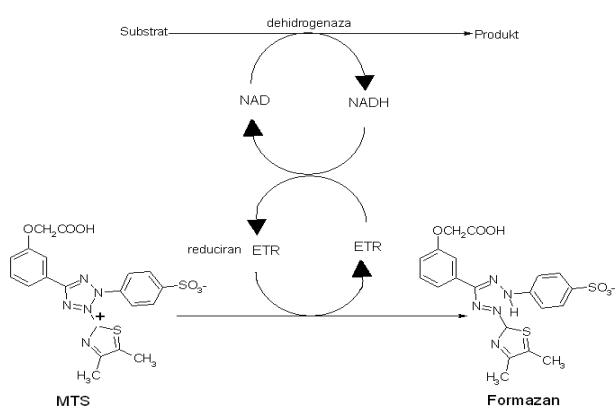
A, B, C, D: število živih/mrtvih celic v posameznem polju komorice

DF: faktor redčenja

Nato smo preračunali koliko kulture potrebujemo za želeno koncentracijo, izračunan volumen odpipetirali v gojišče in dodali na 37 °C segret RPMI medij. Celične kulture smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **3.2.2.6 Ugotavljanje metabolne aktivnosti celic z uporabo testa MTS**

MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol)) je reagent za kolorimetrično merjenje aktivnosti encimov, ki reducirajo MTS do vijolično obarvanih formazanov (18). V reagenčni raztopini imamo MTS v obliki soli in fenazin etosulfat (angl. phenazine ethosulfate; PES), ki je reagent za prenos elektronov. Ta tetrazolijeva sol prehaja v celice, kjer se pod vplivom reducirajočih reagentov v mitochondrijih reducira do formazana. Količina nastalega formazana je sorazmerna številu živih metabolno aktivnih celic in jo lahko merimo spektrofotometrično pri 490 nm (19).



**Slika 13: Celični metabolizem reagenta MTS**

### Reagenti:

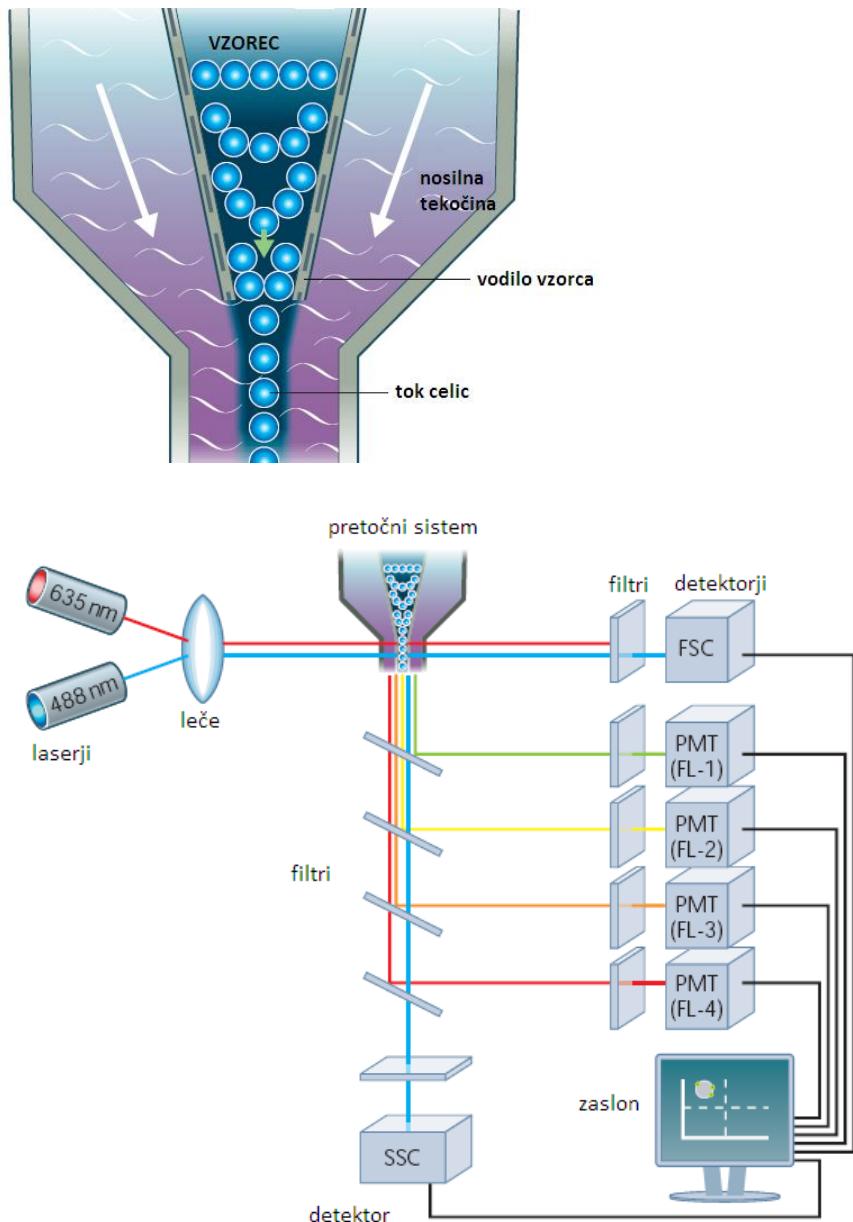
- DMSO
- raztopine spojin v DMSO
- reagent MTS

### Postopek:

V mikrotitrsko ploščico s 24 vdolbinicami smo odpipetirali 500  $\mu\text{L}$  celične kulture s koncentracijo  $1,0 \cdot 10^5$  celic na mL. Celicam smo dodali po 5  $\mu\text{L}$  raztopin spojin v DMSO s koncentracijo 0,1 mM, 1,0 mM in 10,0 mM, da smo dobili končne koncentracije spojin v celičnih kulturah 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ . Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI oziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO. DMSO je citotoksičen in bi lahko dobili lažno pozitivne rezultate, ker je v našem primeru topilo za spojine. Stimulirani kulturi smo inkubirali 24 in 48 h pri 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$ . Po določenem času (24, 48 h) smo kulturi odpipetirali v dve mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami. Iz vsakega alikvota različno tretirane celične kulture smo vzeli dvakrat po 100  $\mu\text{L}$  (dvojna tehnična ponovitev). Dodali smo 10  $\mu\text{L}$  MTS na 100  $\mu\text{L}$  vzorca in inkubirali še dve uri. Nato smo izmerili absorbanco barvila na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan pri valovni dolžini 492 nm. Absorbanco kontrolnih vzorcev smo odšteli od absorbanc vzorcev in dobili vrednost, ki je sorazmerna metabolni aktivnosti celic.

### **3.2.2.7 Pretočna citometrija**

Pretočna citometrija je tehnika, s katero analiziramo lastnosti celic v suspenziji. S pomočjo hidrodinamskega fokusiranja tok celic usmerimo tako, da skozi mesto interakcije z laserjem potujejo posamično. Ko celica potuje mimo izvora svetlobe, odda svetlobne signale, ki so odvisni od njenih lastnosti. Velikost celice in njena granuliranost vplivata na sisanje svetlobe, če pa celico ali njene komponente označimo s fluorokromi, pa lahko merimo emisijo svetlobe. S fotodetektorji svetlobne signale pretvorimo v električne in dobimo podatek o velikosti in granuliranosti celic ter moči emitirane svetlobe.



**Slika 14:** Shema pretočnega citometra (22)

Razpršenost svetlobe merimo z dvema detektorjema (slika 5). FALS (forward angle light scatter), ki meri sisanje svetlobe v kotu do  $20^\circ$  na ravnino poti laserskega žarka in nam da podatek o velikosti celice - FCS (forward scatter channel). RALS (right angle light scatter), ki meri sisanje pravokotno na žarek, pa nam da podatek o notranji zgradbi celice - SSC (side scatter channel).

Pretočni citometer ima dva do štiri fluorescenčne detektorje, s katerimi merimo jakost emitirane svetlobe določene valovne dolžine, ki je večjih valovnih dolžin kot vzbujevalna svetloba. Z imunofluorescenčnimi tehnikami lahko z uporabo specifičnih protiteles, konjugiranih s protitelesi, natančno določimo lastnosti in število preiskovanih celic (21).

### ***3.2.2.7.1 Ugotavljanje vpliva derivatov cimetne kisline na celični cikel***

Propidijev jodid je fluorescenčno barvilo, ki se interkalira v DNA in RNA, zato moramo RNA odstraniti. S pretočnim citometrom lahko določimo količino DNA v celicah in tako dobimo podatek o razmerju med celicami v posameznih fazah celičnega cikla. Celice v fazah G<sub>2</sub> in M imajo dvakratno količino DNA kot tiste v fazah G<sub>0</sub> in G<sub>1</sub>, to vidimo kot dvakrat večjo flourescenco. V fazi S imajo celice količino DNA nekje med temo vrednostma (23).

#### Reagenti:

- etanol
- PBS
- RNaza
- propidijev jodid (vodna raztopina, 1 mg/mL)

#### Postopek:

Po inkubaciji smo 500 µL vzorcev prenesli v epruvete z zamaški, primerne za pretočno citometrijo, in jih centrifugirali pri 1200 rmp 5 min. Medij smo odlili in sediment resuspendirali v 2 mL mrzlega 80 % etanola. Vzorce smo za dve uri postavili v zamrzovalnik na -20 °C. Ohlajene vzorce smo 5 min centrifugirali pri 1200 rpm, odlili etanol in dodali barvilo. Za en vzorec smo zmešali 500 µL PBS, 5 µL RNaze in 20 µL propidijevega jodida. Vzorce smo dobro premešali in inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C 30 min. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na pretočnem citometru.

### **3.2.2.7.2 Ugotavljanje apoptoze z uporabo Annexina V**

V zgodnji fazi apoptoze pride do translokacije fosfolipida fosfatidilserina z notranje na zunanj stran plazemske membrane celice. Annexin V je protein, ki se z visoko afiniteto veže na fosfatidilserin. Annexin V, označen s fluorokromom (npr. fikoeritinom - PE), nam služi kot sonda za analizo apoptoze s pretočnim citometrom. Ker se Annexin V veže tudi na celice v pozni fazi nekroze, ga moramo uporabljati v kombinaciji z barvilo, ki prehaja samo v nekrotične celice (propidijev jodid, 7-amino aktinomicin: 7-AAD). Celice, ki so pozitivne glede na obe barvili, so mrtve, žive celice so negativne na obe barvili, celice v zgodnji fazi apoptoze pa so pozitivne na Annexin V in negativne na 7-AAD (24).

#### Reagenti:

- Annexin V vezavni pufer
- PE Annexin V
- 7-AAD

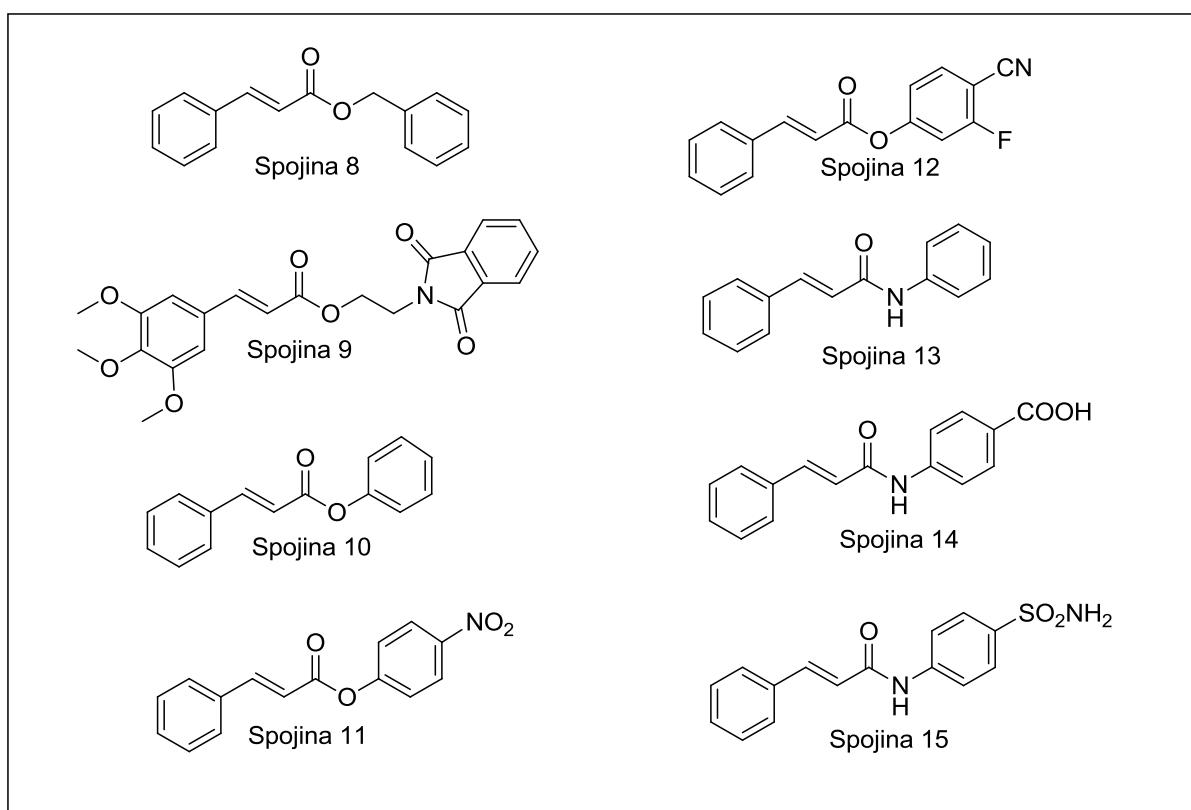
#### Postopek:

Po inkubaciji smo 100 µL celične kulture odpipetirali v epruvete z zamaški, primerne za pretočno citometrijo, in jih centrifugirali 5 min na 1200 rpm. Medij smo odlili, dodali barvilo in dobro resuspendirali. Za en vzorec smo zmešali 100 µL 1x vezavnega pufra, 5 µL Annexina V in 5 µL 7-AAD. Vzorce smo inkubirali v temi na sobni temperaturi 15 min, nato pa jim dodali še 400 µL 1x vezavnega pufra in jih analizirali na pretočnem citometru.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Derivati cimetne kisline in citotoksičen učinek na celice B in T levkemij

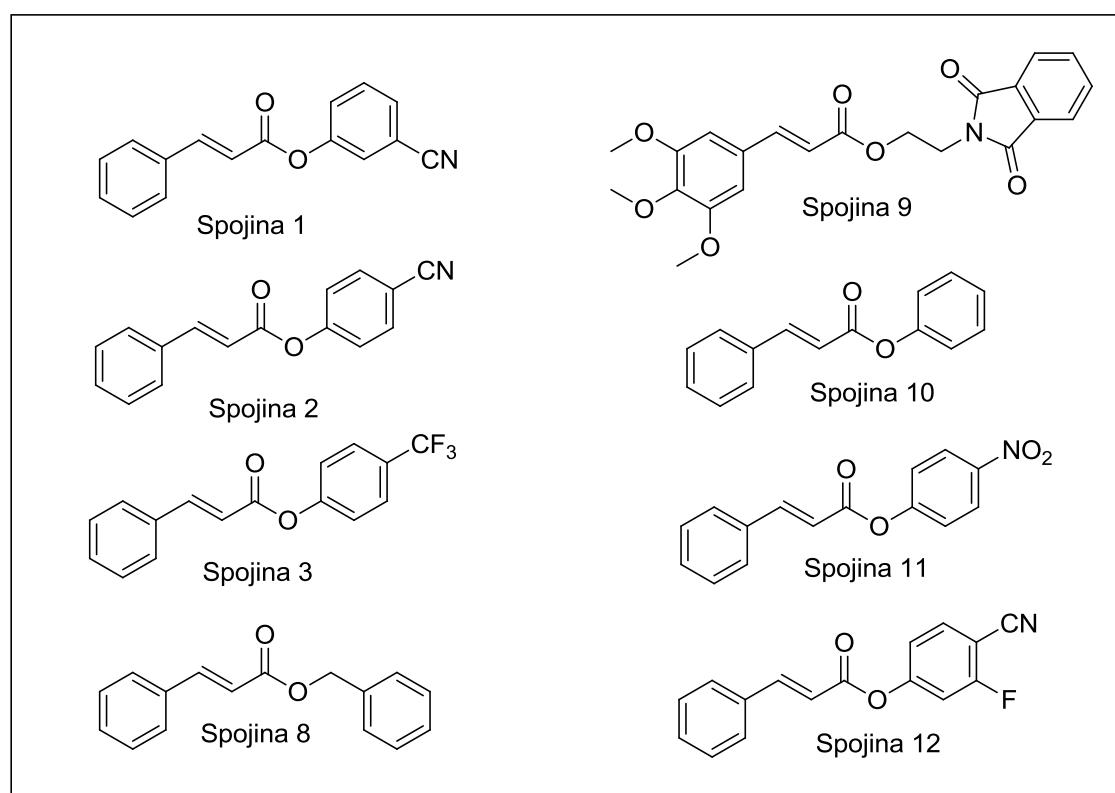
Derivati cimetne kisline imajo širok spekter farmakoloških učinkov in so zanimivi za razvoj novih učinkovin. Estri in amidi cimetne kisline izkazujejo selektivno toksičnost za maligne celične linije humanega adenokarcinoma materničnega vratu (HeLa), humane mielogene levkemije (K562), malignega melanoma (Fem-x) in na estrogen odzivnega humanega raka dojk (MCF-7) v primerjavi z zdravimi celicami iz periferne krvi z okroglimi jedri (PBMC) (25). V prvem delu biološkega testiranja spojin smo zato ovrednotili vpliv na humane celične linije B-limfoma (celična kultura Ramos) in T-celične levkemije (celična kultura Jurkat). Testirali smo spojine, ki smo jih sintetizirali sami in ki smo jih dobili iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo (slika 15) (25, 26).



Slika 15: Strukturne formule spojin iz knjižnice Fakultete za farmacijo, ki smo jih testirali

#### **4.1.1 Vpliv prve serije derivatov cimetne kisline (spojine 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12) na proliferacijo celic Ramos in Jurkat**

Na podlagi opažanj, da estri in amidi cimetne kisline vplivajo na proliferacijo celic K562 (25), smo nekatere najbolj aktivne spojine (spojine **2, 8, 9** in **10**) ovrednotili še na celičnih linijah Ramos in Jurkat. Sintetizirali smo tudi nekaj strukturno podobnih spojin (spojine **1, 3, 11** in **12**), ker nas je zanimalo, kako različni substituenti na aromatskem obroču vplivajo na aktivnost spojin. Farmakološki vpliv spojin na celice Ramos in Jurkat smo ovrednotili s testom MTS.

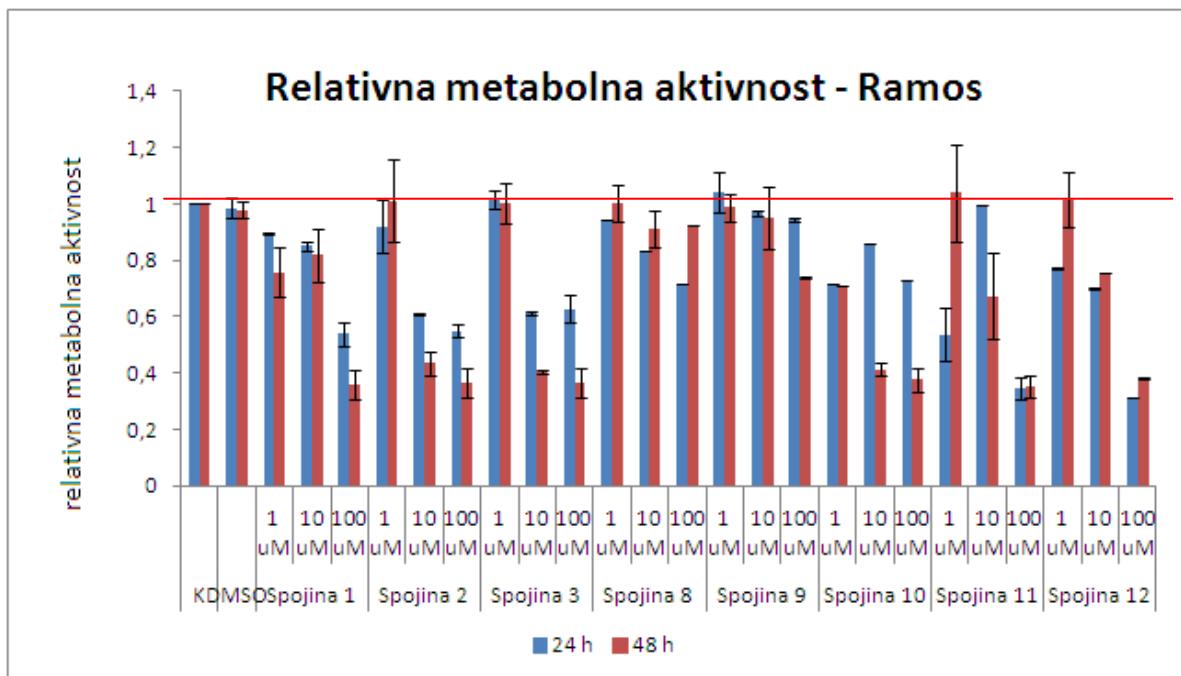


**Slika 16: Strukturne formule prve serije spojin**

#### **Vrednotenje celične metabolne aktivnosti celic Ramos in Jurkat s testom MTS**

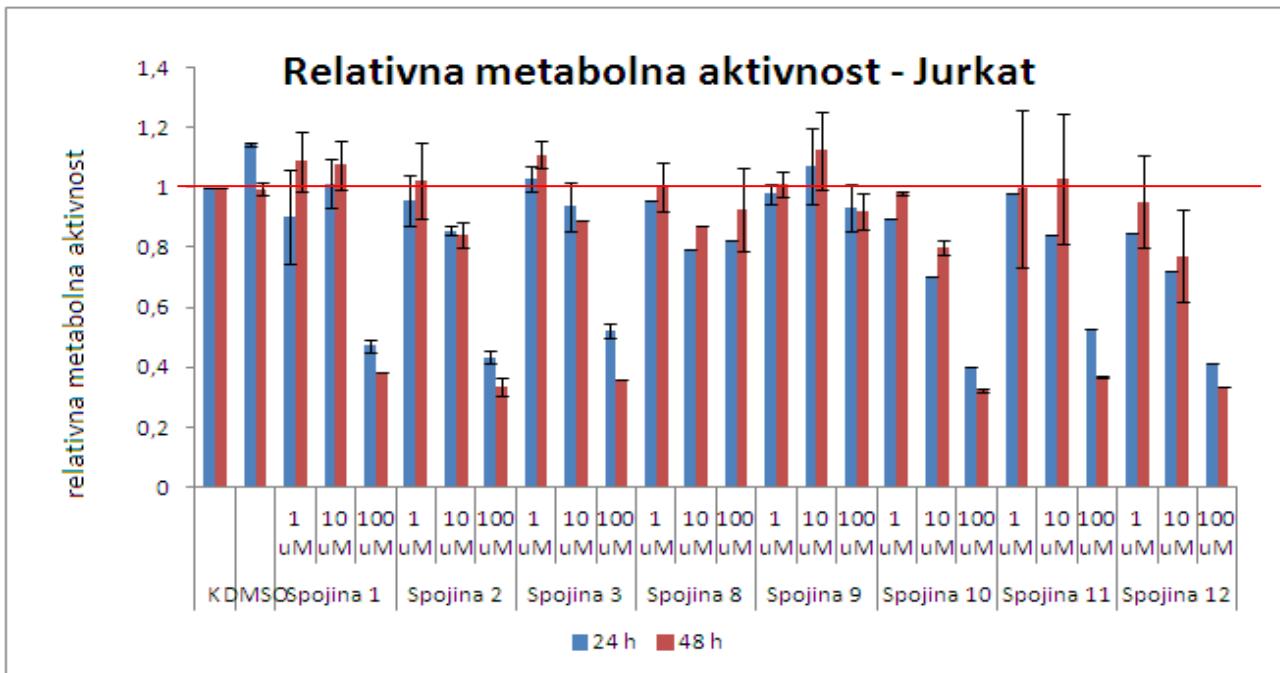
Celice Ramos in Jurkat smo inkubirali v prisotnosti spojin iz prve serije v treh različnih koncentracijah in merili njihovo metabolno aktivnost s testom MTS. Pripravili smo 1 µM, 10 µM in 100 µM raztopine spojin v kulturi. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI ozziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO.

DMSO je citotoksičen in bi zato lahko dobili lažno pozitivne rezultate, ker je v našem primeru topilo za spojine. Celice smo dali v inkubator in po 24 in 48 urah izvedli MTS, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.2.2.6. Poskus smo ponovili še enkrat in podatke statistično obdelali (sliki 17 in 18).



Slika 17: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos ob prisotnosti spojin 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12

$1 \times 10^5$  celic Ramos na mL smo inkubirali s spojinami 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12 v 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 24 h (modri stolpci) in 48 h (rdeči stolpci). S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost. Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.



**Slika 18: Relativna metabolna aktivnost celic Jurkat ob prisotnosti spojin 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12**

$1 \times 10^5$  celic Jurkat na mL smo inkubirali s spojinami 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11 in 12 v  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  in  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji 24 h (modri stolpci) in 48 h (rdeči stolpci). S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost. Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.

Na podlagi testa MTS je razvidno, da po 24 h in 48 h inkubacije spojini 8 in 9 ne izkazujeta nobenega vpliva na metabolno aktivnost celic Ramos. Spojine 1, 2, 3, 10, 11 in 12 so pokazale medsebojno primerljiv ter koncentracijsko odvisen vpliv na metabolno aktivnost celic Ramos, pri čemer spojine 1, 2, 3, 11 in 12 v  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji zmanjšajo metabolno aktivnost na tretjino v primerjavi s kontrolnimi celicami. Pri  $1 \mu\text{M}$  koncentraciji je bila aktivna samo spojina 10, ki je v tej koncentraciji znižala metabolno aktivnost celic na 0,72 po 24 h in 0,71 po 48 h v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Spojini 2 in 3 sta pri  $10 \mu\text{M}$  koncentraciji povzročili zmanjšanje metabolne aktivnosti celic na vrednost, ki je primerljiva z vrednostjo pri stimulaciji s  $100 \mu\text{M}$  koncentracijo.

Na metabolno aktivnost celic Jurkat so vplivale iste spojine, a v manjši meri kot na celice Ramos. Spojini 8 in 9 nista vplivali na metabolno aktivnost, spojine 1, 2, 3, 10, 11 in 12 pa so pri  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji izkazovale podoben vpliv na zmanjšanje metabolne aktivnosti v

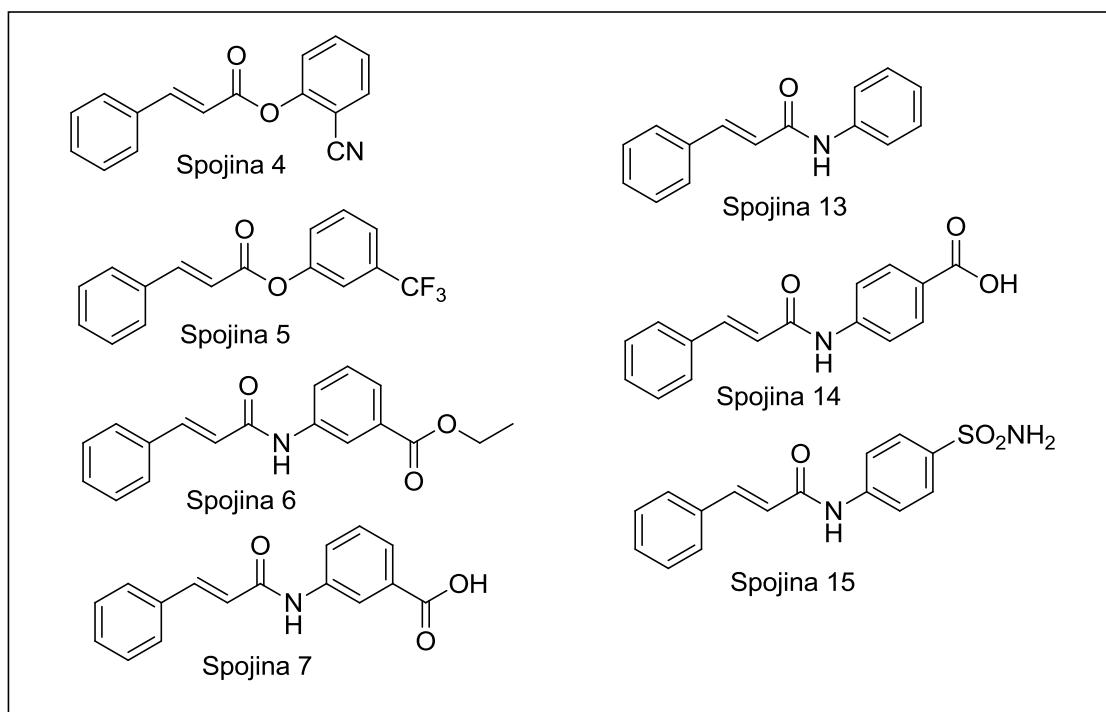
primerjavi s kontrolnimi celicami. Metabolna aktivnost celic, inkubiranih s temi spojinami, se je zmanjšala na tretjino vrednosti v nestimuliranih celicah.

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da substitucija na aromatskem obroču cimetne kisline slabo vpliva na aktivnost spojin in zato smo se odločili, da spojin takega tipa ne bomo sintetizirali. Uvedba dodatne elektronprivlačne skupine na spojino 2 (spojina 12) ni izboljšala vpliva na celične kulture, zato smo v nadaljevanju sintetizirali le monosubstituirane derivate. Ciano- in trifluorometil substituirane spojine (spojine 1, 2 in 3) so bile aktivne, zato smo v nadaljevanju sinterizirali še njihove analoge z drugačnim položajem teh skupin na aromatskem obroču.

Na podlagi farmakološke aktivnosti spojin in njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (slaba topnost nekaterih spojin iz prve serije v mediju) smo v nadaljevanju sintetizirali drugo serijo spojin.

#### **4.1.2 Vpliv druge serije derivatov cimetne kisline (spojine 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15) na proliferacijo celic Ramos in Jurkat**

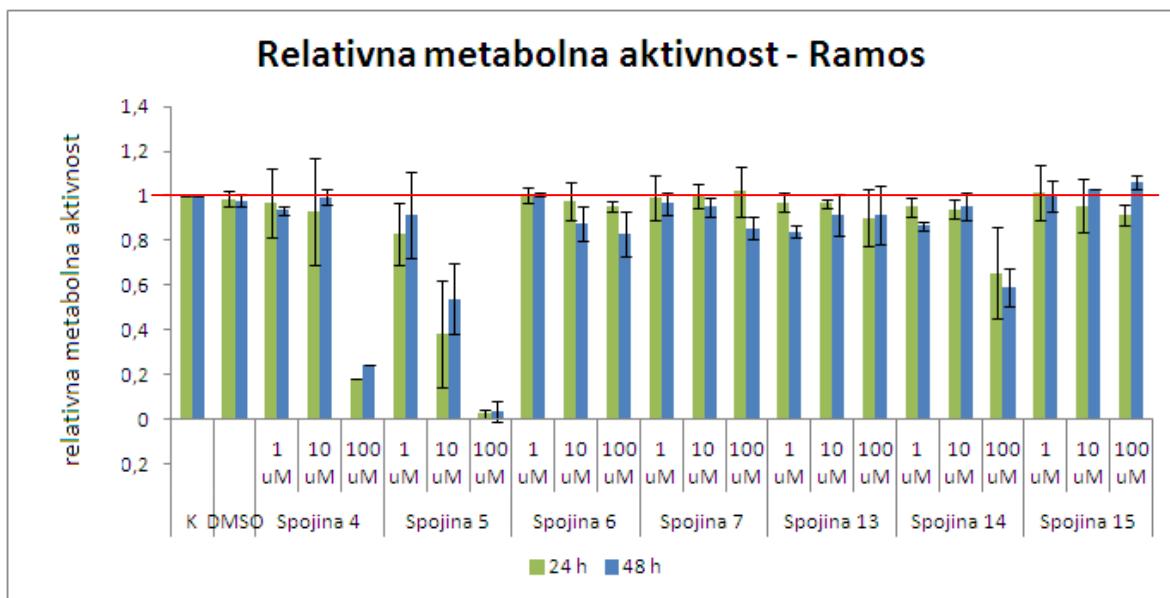
Glede na ugotovitve iz testiranja vpliva na metabolno aktivnost prve serije spojin smo sintetizirali drugo serijo spojin (slika 19).



**Slika 19: Strukturne formule druge serije spojin**

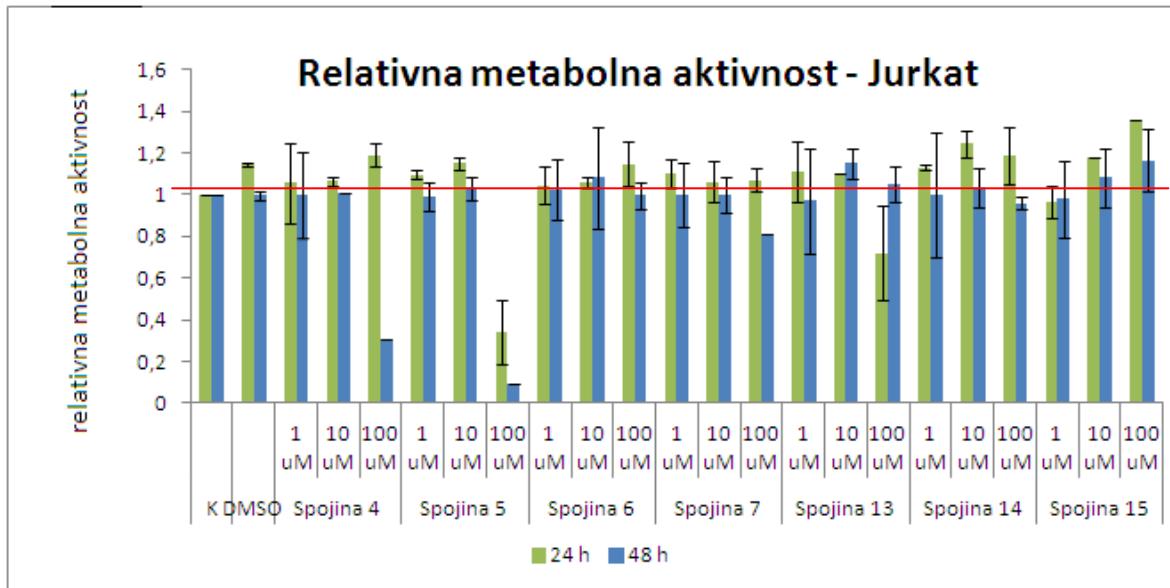
#### **Vrednotenje celične metabolne aktivnosti celic Ramos in Jurkat s testom MTS**

Celice Ramos in Jurkat smo inkubirali v prisotnosti druge serije spojin v treh različnih koncentracijah in merili njihovo metabolno aktivnost s testom MTS. Pripravili smo 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  raztopine spojin v kulturi. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI oziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO. Celice smo dali v inkubator in po 24 in 48 urah izvedli MTS, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.2.2.6. Poskus smo ponovili še enkrat in podatke statistično obdelali (slike 20 in 21).



Slika 20: Relativna metabolna aktivnost celic Ramos ob prisotnosti spojin 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15

$1 \times 10^5$  celic Ramos na mL smo inkubirali s spojinami 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15 v 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 24 h (zeleni stolpci) in 48 h (modri stolpci). S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost. Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.



Slika 21: Relativna metabolna aktivnost celic Jurkat ob prisotnosti spojin 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15

$1 \times 10^5$  celic Jurkat na mL smo inkubirali s spojinami 4, 5, 6, 7, 13, 14 in 15 v 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 24 h (zeleni stolpci) in 48 h (modri stolpci). S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost.

aktivnost. Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.

Na podlagi testa MTS spojin iz druge serije je razvidno, da po 24 h in 48 h inkubacije spojine 6, 7, 13 in 15 ne izkazujejo vpliva na metabolno aktivnost celic Ramos. Med spojinami iz druge serije je izstopala spojina 5, ki je na celicah Ramos skoraj popolnoma zavrla metabolno aktivnost (po 24 h inkubacije je v primerjavi s kontrolnimi celicami metabolna aktivnost padla na na  $0,025 \pm 0,021$  in po 48 h inkubacije na  $0,035 \pm 0,049$ ). Pri  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji je bila učinkovita tudi spojina 4, vendar v manjši meri kot spojina 5. Majhno zmanjšanje metabolne aktivnosti smo opazili tudi pri spojnini 14 v  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji.

Na metabolno aktivnost celic Jurkat so spojine druge serije podobno kot spojine prve serije vplivale v manjši meri. Spojine 6, 7, 13, 14 in 15 ne vplivajo na metabolno aktivnost celic. Spojina 4 v  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji po 24 h inkubacije ne povzroči padca metabolne aktivnosti, po 48 h pa le-ta pade na tretjino v primerjavi s kontrolnimi celicami. Največji vpliv na metabolno aktivnost celic Jurkat je imela spojina 5 v  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji, saj je metabolno aktivnost zmanjšala na 0,34 po 24 h in 0,09 po 48 h, v primerjavi s kontrolnimi celicami.

V primerjavi s spojinam iz prve serije smo ugotovili, da so amidi manj učinkoviti kot estri, saj spojine 6, 7, 13, 14 in 15 niso imele nobenega vpliva na zmanjšanje metabolne aktivnosti. Z zamenjavo ciano skupine (spojina 1 iz prve serije) s trifluorometilno skupino na *meta* položaju fenola (spojina 5 iz druge serije) smo dosegli povečanje učinkovitosti na obeh celičnih linijah, aktivnost spojine 4 pa kaže na ugoden vpliv substitucije na *ortho* položaju fenola na učinkovitost spojine.

Namen testa MTS je bil ovrednotiti vpliv spojin na celice z vidika metabolne aktivnosti oziroma viabilnosti. Spojina 5 najbolj zmanjša metabolno aktivnost celic Ramos in v manjši meri tudi celic Jurkat in posledično povzroči celično smrt. Za kakšen tip celične smrti gre s tem testom ne moremo ugotoviti. To vprašanje smo naslovili z ustreznimi metodami molekularne biologije (analiza celičnega cikla, označevanje fosfatidilserina na membrani in uporaba specifičnih inhibitorjev kaspaz).

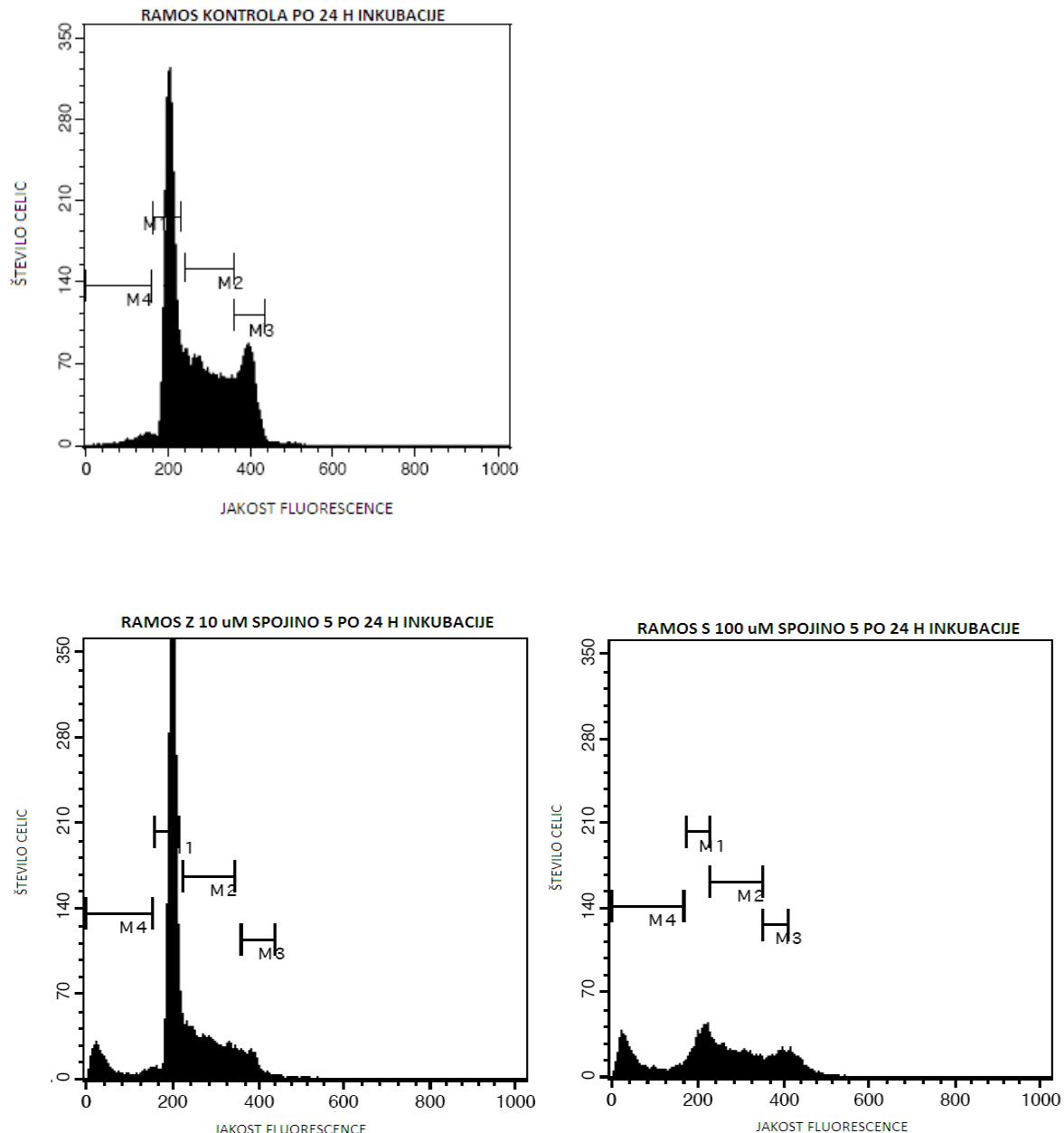
#### **4.1.3 Derivati cimetne kisline in njihov vpliv na celični cikel celic Ramos in Jurkat**

V predhodnem eksperimentu smo ugotovili, da ima spojina 5 največji vpliv na zmanjšanje metabolne aktivnosti celic Ramos in Jurkat, zanimive rezultate pa je pokazala tudi spojina 4. Spojina 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni povzročila nobene spremembe v metabolni aktivnosti, zato smo jo uporabili kot kontrolno spojino. V nadaljevanju smo želeli natančneje ovrednotiti in pojasniti vzroke za manjšo metabolno aktivnosti. V prvem delu smo tako proučili, kako spojini 4 in 5 vplivata na celični cikel izbranih celičnih kultur.

Celični cikel je zaporedje dogodkov, ki vodijo v delitev celice. Delimo ga na interfazo, kjer celica raste in podvojuje DNA, in mitozo ali celično delitev (faza M). Interfazo sestavlja faze G<sub>1</sub>, S in G<sub>2</sub>. Celice v fazi G<sub>0</sub> mirujejo in ni del celičnega cikla. Ko vstopi celica v fazo G<sub>1</sub> se začne pripravljati na delitev: celica začne rasti, bolj intenzivno se začne prepisovati mRNA in sintetizirati se začnejo proteini, potrebni za delitev. Sledi ji »kontrolna točka G<sub>1</sub>«, kjer se preveri, ali je celičnih sestavin za podvajanje DNA dovolj, in v fazi S se DNA podvoji. Nato nastopi faza G<sub>2</sub>, kjer celica še naprej pridobiva na velikosti in sintetizira proteine, ki sestavljajo mikrotubule. Na prehodu v fazo mitoze nastopi druga kontrolna točka in delijo se le celice, ki so na jederno delitev pripravljene (22).

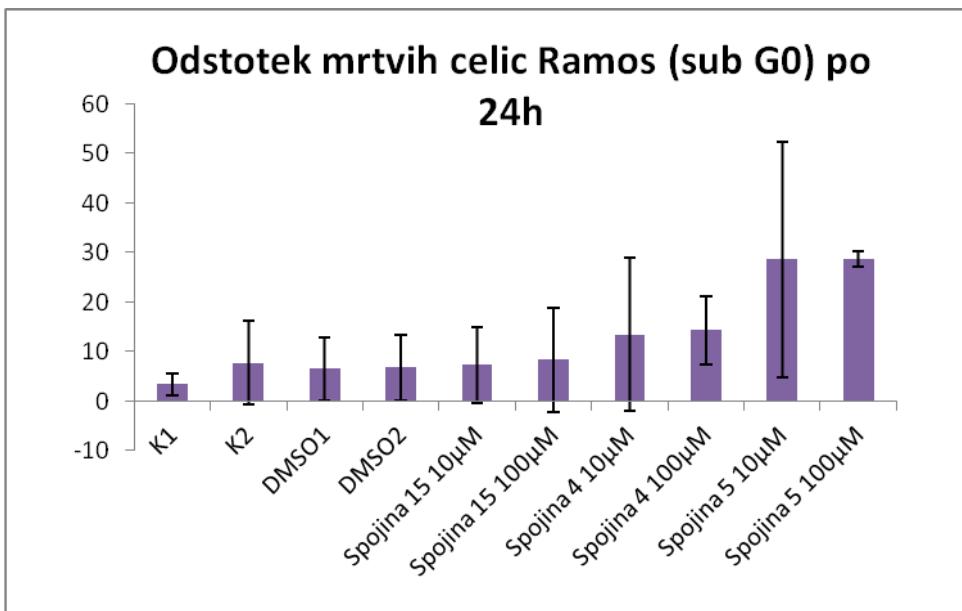
#### **Ugotavljanje vpliva spojin na celični cikel celic Ramos in Jurkat s pretočno citometrijo**

Celice Ramos in Jurkat smo inkubirali ob prisotnosti spojin 4, 5 in 15 v 10 µM in 100 µM koncentraciji. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI oziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO. Vzorce smo dali v inkubator in po 24 in 48 h ovrednotili vpliv na celični cikel s pomočjo pretočnega citometra, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.2.2.7.1. (slike 22 in 27). Poskus smo ponovili še enkrat in podatke statistično ovrednotili (slike 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30 in 31).



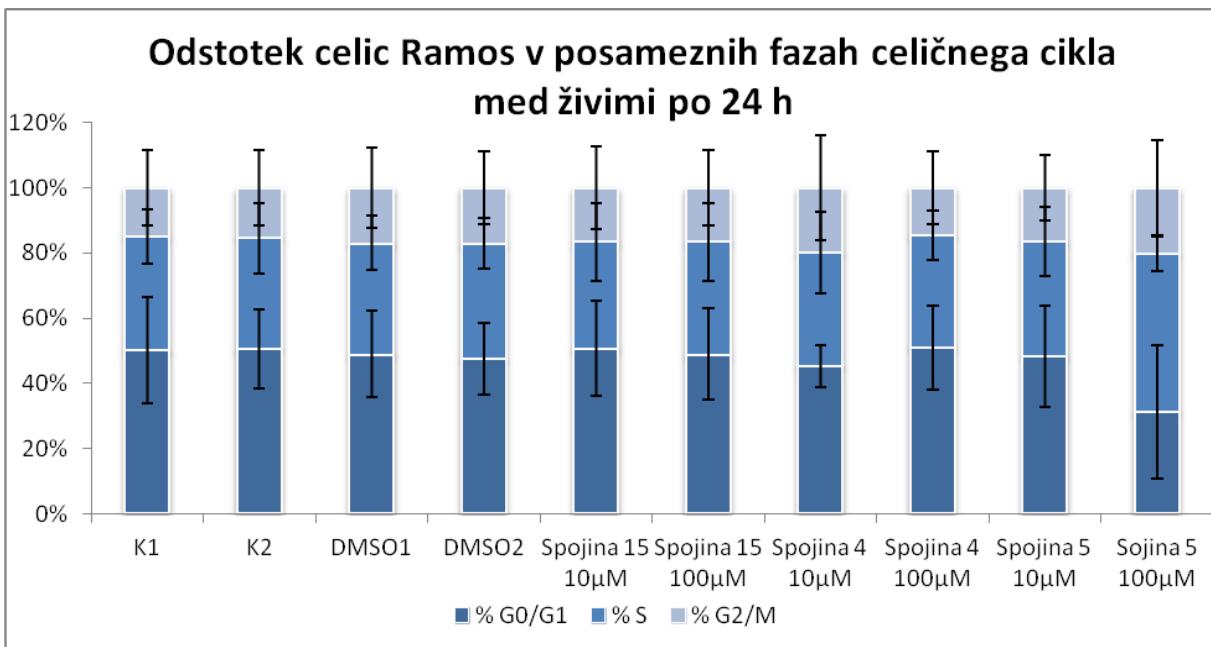
**Slika 22: Vpliv spojine 5 na potek celične delitve celic Ramos**

Na sliki so histogrami, pridobljeni z analizo na pretočnem citometru. Prikazujejo primer histograma kontrolnega vzorca, z  $10 \mu\text{M}$  spojino 5 stimuliranih celic in z  $100 \mu\text{M}$  spojino 5 stimuliranih celic. Posamezen histogram prikazuje število celic v odvisnosti od jakosti fluorescence propidijevega jodida. Analizirano celično kulturo lahko razdelimo v štiri skupine, ki predstavljajo faze celičnega cikla, v katerih se celice nahajajo: M1 - faza G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, M2 – faza S, M3 – faza G<sub>2</sub>/M in M4 – faza sub G<sub>0</sub>/mrtve celice.



**Slika 23: Odstotek mrtvih celic Ramos po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 24 h**

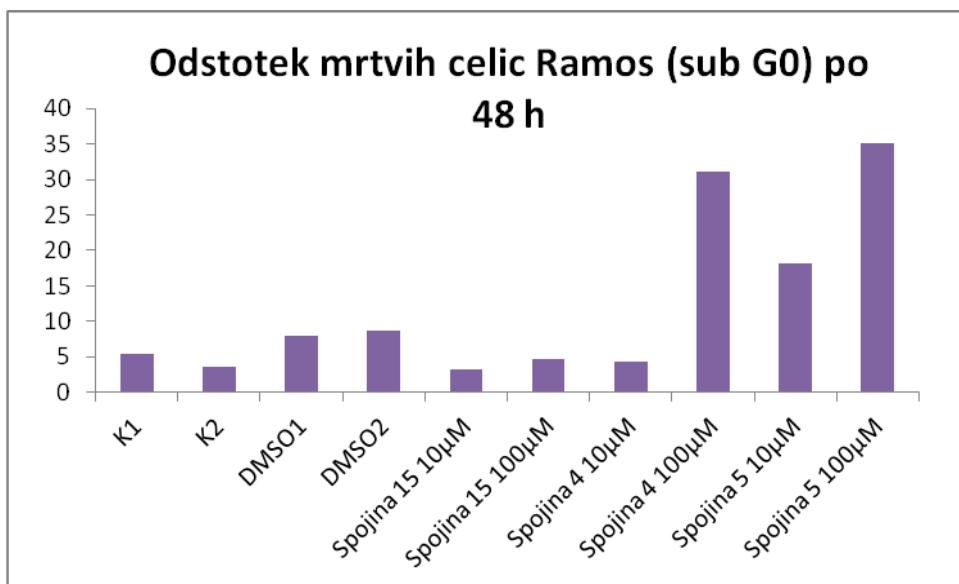
$5,0 \times 10^5$  celic Ramos na mL smo inkubirali ob prisotnosti spojin 15, 4 in 5 v 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 24 h in opazovali njihov vpliv na celični cikel. Graf prikazuje odstotek mrtvih celic v celičnih ciklih tretiranih celic.



**Slika 24: Odstotek stimuliranih celic Ramos v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 24 h**

Graf prikazuje razporeditev populacije živih celic v fazah celičnega cikla G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (temno modri stolpci), S (srednje modri stolpci) in G<sub>2</sub>/M (svetlo modri stolpci) po 24 h stimulacije.

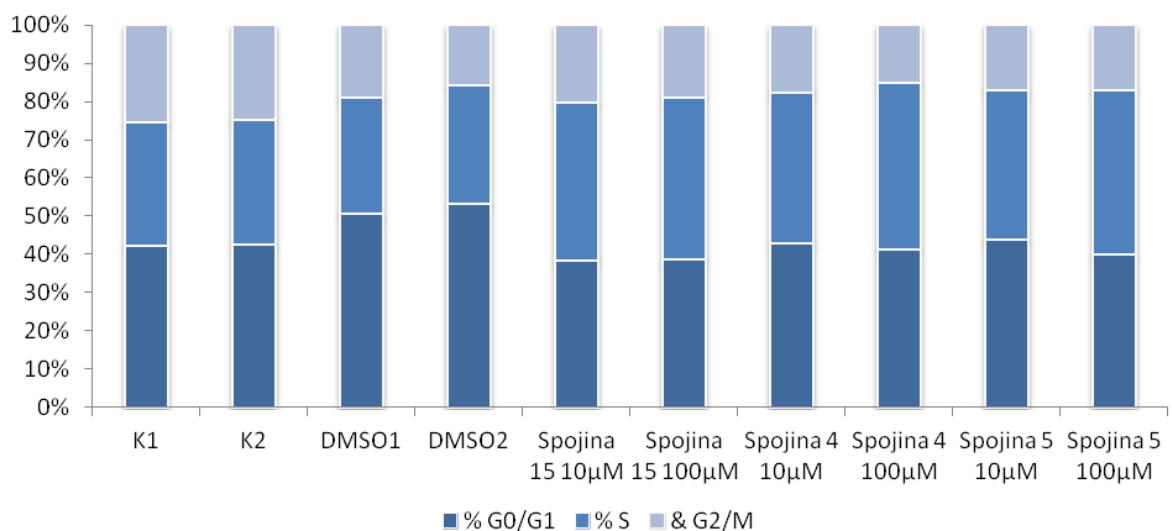
Iz prvih dveh grafov (sliki 23 in 24) lahko vidimo, da v prvih 24 h stimulacije celic Ramos pride do sprememb v celičnem ciklu pod vplivom spojin 4 in 5, kot smo pričakovali glede na rezultate testa MTS. Odstotek mrtvih celic je pri stimulaciji s spojino 4 primerljiv pri obeh koncentracijah, pri stimulaciji s spojino 5 pa je odstotek mrtvih celic večji pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji (slika 23). Graf na sliki 24 nam prikazuje samo populacijo živih celic. Rezultati kažejo, da pride pri stimulaciji celic s 100  $\mu\text{M}$  spojino 5 do podaljšanja faze S ( $48,4 \pm 0,052$  %, v primerjavi s kontrolnimi celicami, kjer je v fazi S  $34,1 \pm 0,083$  % celic) kar lahko kaže na vpliv te spojine na zaviranje sinteze DNA. Hkrati lahko opazimo zmanjšanje odstotka mirujočih celic v faz G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, kar je posledica povečanja odstotka celic v fazi S in odstotka mrtvih celic.



**Slika 25: Odstotek mrtvih celic Ramos po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 48 h**

$5,0 \times 10^5$  celic Ramos na mL smo inkubirali ob prisotnosti spojin 15, 4 in 5 v 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 48 h in opazovali njihov vpliv na celični cikel. Graf prikazuje odstotek mrtvih celic v celičnih ciklih tretiranih celic.

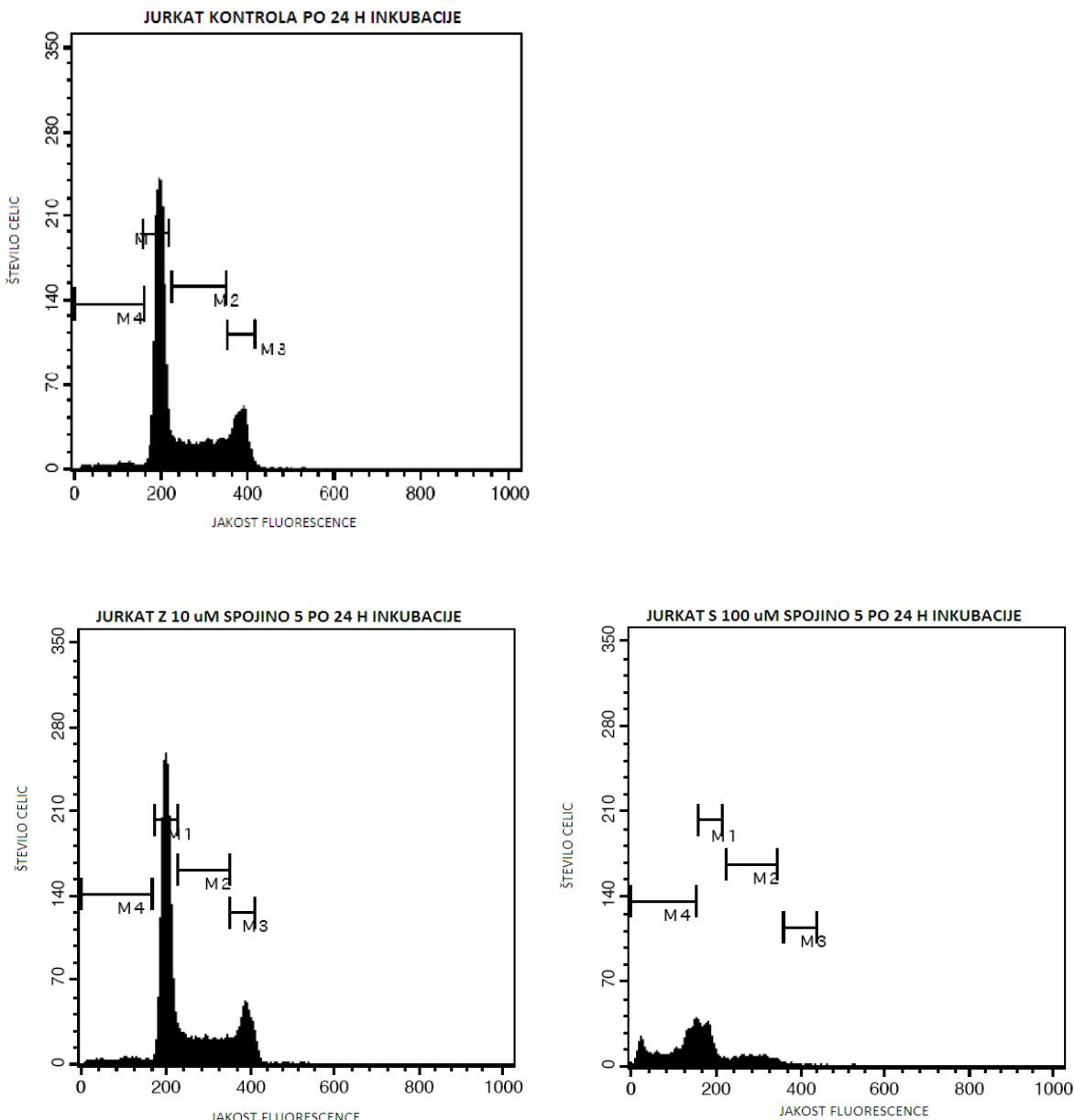
### Odstotek celic Ramos v posameznih fazah celičnega cikla med živimi po 48 h



**Slika 26: Odstotek stimuliranih celic Ramos v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 48 h**

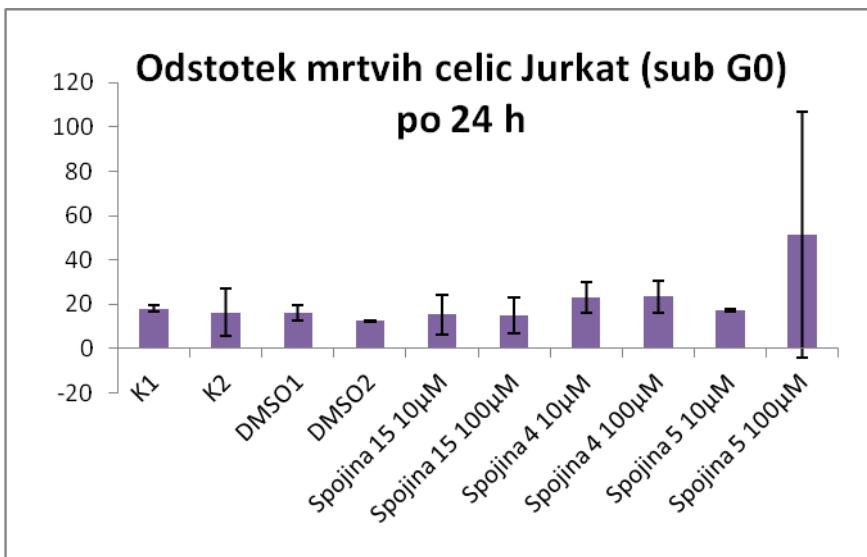
Graf prikazuje razporeditev populacije živih celic v fazah celičnega cikla G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (temno modri stolpci), S (srednje modri stolpci) in G<sub>2</sub>/M (svetlo modri stolpci) po 48 h stimulacije.

Po 48 h stimulacije smo opazili povečanje odstotka mrtvih celic, predvsem pri vzorcu, ki je bil stimuliran s 100 µM spojino 4. To kaže na počasnejše delovanje spojine 4 v primerjavi s spojino 5. Odstotek celic v fazi S se je pri vseh stimuliranih vzorcih povečal v primerjavi s kontrolnimi celicami, stimuliranimi samo z DMSO, za približno 10 %.



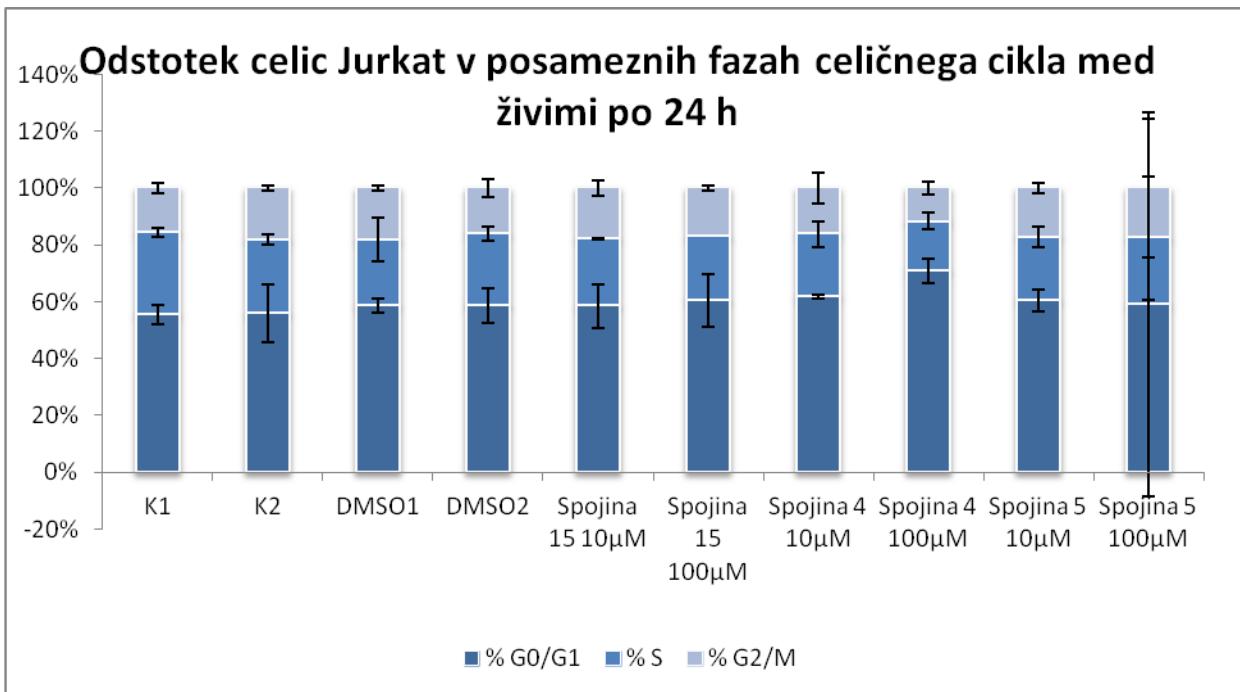
**Slika 27: Vpliv spojine 5 na potek celične delitve celic Jurkat**

Na sliki so histogrami, pridobljeni z analizo na pretočnem citometru. Prikazujejo primer histograma kontrolnega vzorca, z  $10 \mu\text{M}$  spojino 5 stimuliranih celic in z  $100 \mu\text{M}$  spojino 5 stimuliranih celic. Posamezen histogram prikazuje število celic v odvisnosti od jakosti fluorescence propidijevega jodida. Analizirano celično kulturo lahko razdelimo v štiri skupine, ki predstavljajo faze celičnega cikla, v katerih se celice nahajajo: M1 - faza  $G_0/G_1$ , M2 – faza S, M3 – faza  $G_2/M$  in M4 – faza sub  $G_0$ /mrtve celice.



**Slika 28: Odstotek mrtvih celic Jurkat po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 24 h**

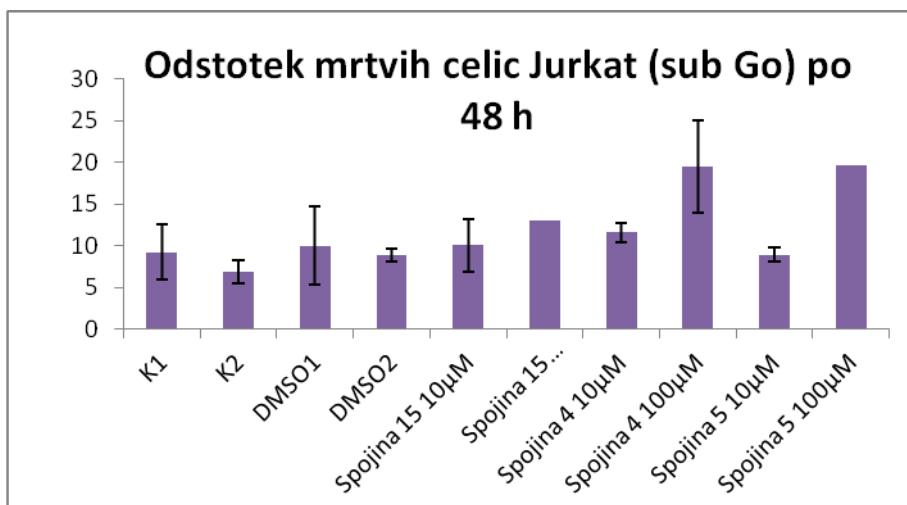
$2,5 \times 10^5$  celic Jurkat na mL smo inkubirali ob prisotnosti spojin 15, 4 in 5 v 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji 24 h in opazovali njihov vpliv na celični cikel. Graf prikazuje odstotek mrtvih celic v celičnih ciklih tretiranih celic.



**Slika 29: Odstotek stimuliranih celic Jurkat v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 24 h**

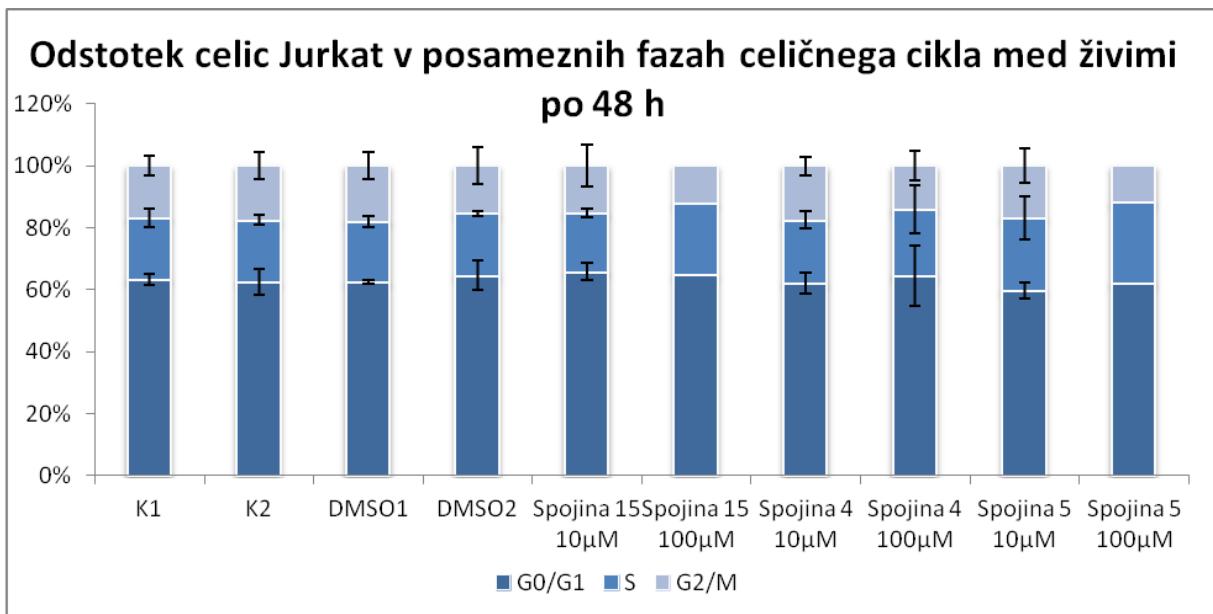
Graf prikazuje razporeditev populacije živih celic v fazah celičnega cikla G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (temno modri stolpci), S (srednje modri stolpci) in G<sub>2</sub>/M (svetlo modri stolpci) po 24 h stimulacije.

Na celicah Jurkat smo opazili podoben vpliv izbranih spojin, vendar je bilo povečanje odstotka mrtvih celic manjše kot na celicah Ramos. Pri vzorcu, tretiranem s  $100 \mu\text{M}$  spojino 5, je bilo odstopanje med ponovitvama zelo veliko, zato težko sklepamo na dejanski vpliv te spojine pri tej koncentraciji na celični cikel. Za razliko od celic Ramos pri celicah Jurkat ni prišlo do povečanja odstotka celic v fazi S, kvečjemu se je odstotek v tej fazi zmanjšal. Vse spremembe v fazah celičnega cikla so znotraj intervala napake, zato sklepamo, da ja učinek zanemarljiv.



**Slika 30: Odstotek mrtvih celic Jurkat po stimulaciji s spojinami 15, 4 in 5 po 48 h**

$2,5 \times 10^5$  celic Jurkat na mL smo inkubirali ob prisotnosti spojin 15, 4 in 5 v  $10 \mu\text{M}$  in  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji 48 h in opazovali njihov vpliv na celični cikel. Graf prikazuje odstotek mrtvih celic v celičnih ciklih tretiranih celic.



**Slika 31: Odstotek stimuliranih celic Jurkat v različnih fazah celičnega cikla med živimi po 48 h**

Graf prikazuje razporeditev populacije živih celic v fazah celičnega cikla G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (temno modri stolpci), S (srednje modri stolpci) in G<sub>2</sub>/M (svetlo modri stolpci) po 48 h stimulacije.

Po 48 h stimulacije se je po pričakovanjih tudi na celicah Jurkat povečal odstotek mrtvih celic. Večjih sprememb v drugih fazah celičnega cikla nismo opazili.

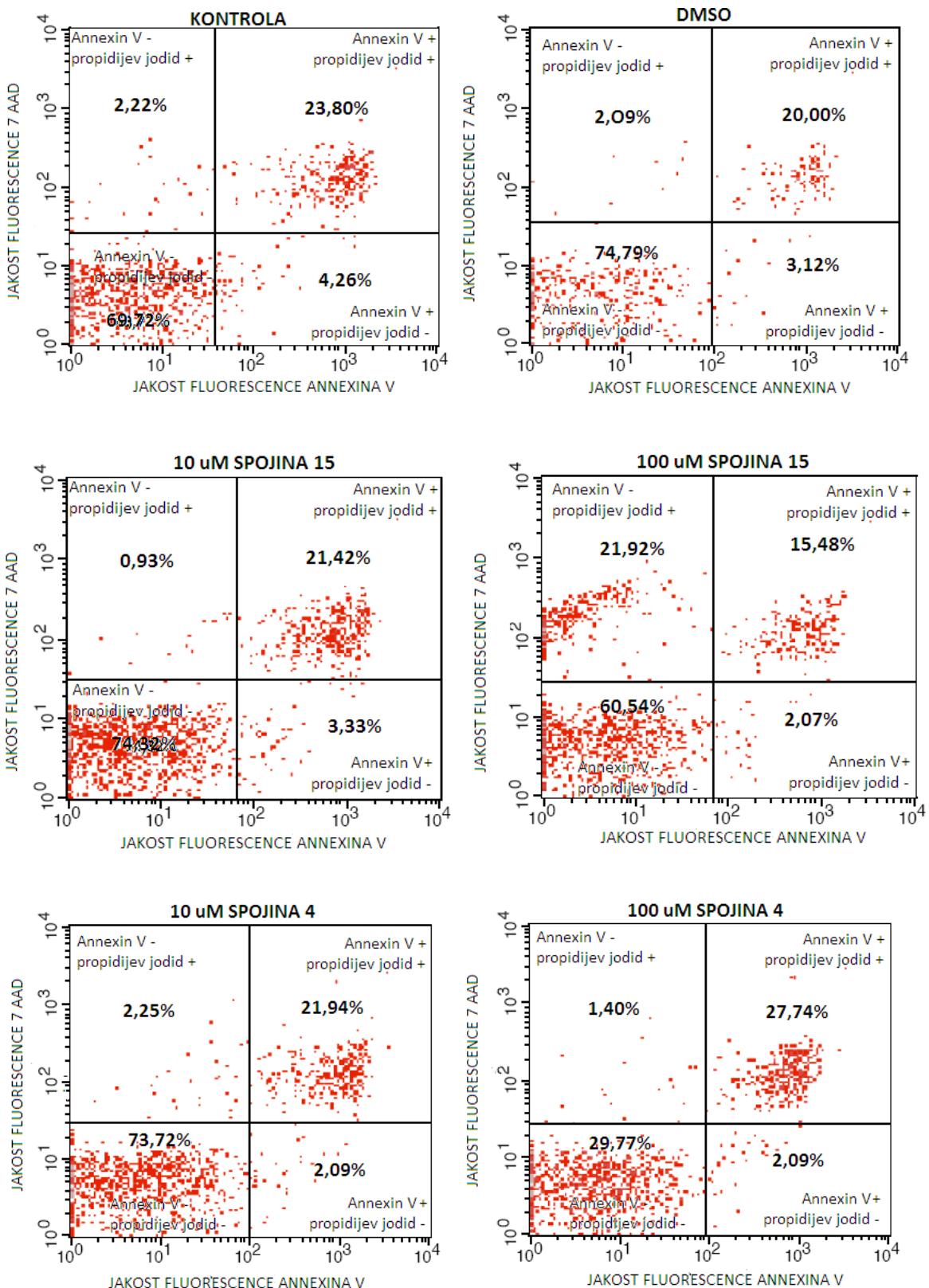
## **4.2 Vpliv derivatov cimetne kisline na programirano celično smrt v celicah Ramos**

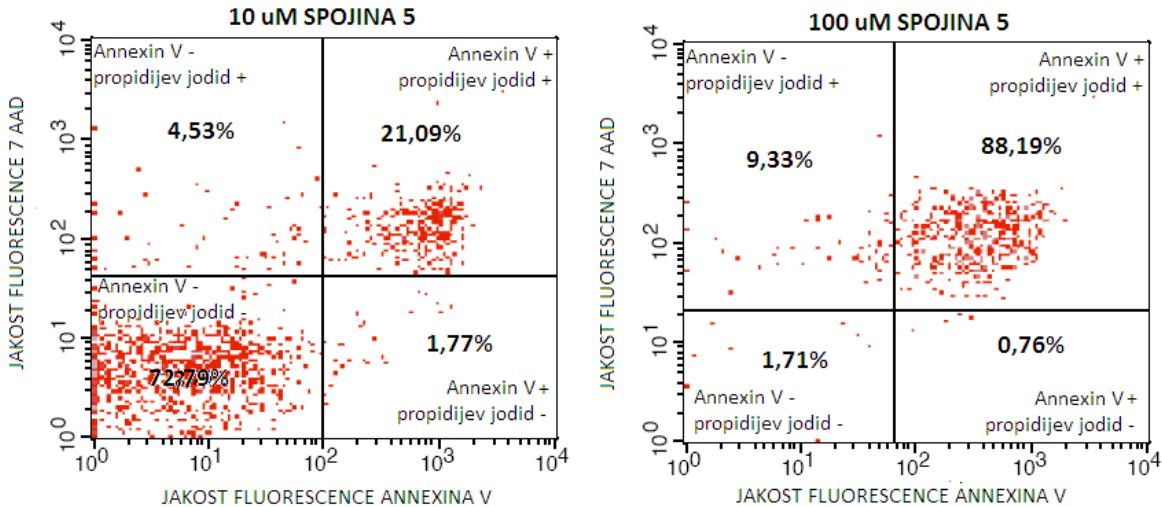
V predhodnih eksperimentih smo dokazali, da spojini 4 in 5 povzročita znatno zmanjšanje metabolne aktivnosti in celično smrt celic Ramos in Jurkat pri 100 µM koncentraciji. Spojina 5 je vplivala tudi na podaljšanje faze S celičnega cikla pri celicah Ramos. Spojina 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni povzročila nobene spremembe niti v metabolni aktivnosti niti na faze celičnega cikla, zato smo jo uporabili kot kontrolno spojino. Tako pri testu MTS kot pri analizi celičnega cikla smo opazili določeno mero selektivne toksičnosti, saj so bile celice Jurkat manj občutljive na spojine kot celice Ramos. Zaradi večjega učinka spojin na celice Ramos smo za nadaljnje raziskave uporabili le to celično kulturo, ker smo želeli raziskati, za katero vrsto celične smrti gre. Test MTS in spremembe v celičnem ciklu celic nam namreč tega ne povejo.

### **4.2.1 Ugotavljanje apoptoze z Annexinom V**

Ko celica stopi v proces apoptoze je eden najzgodnejših dogodkov nestabilnost celične membrane. V tem procesu pride do translokacije fosfolipida fosfatidilserina iz notranje strani membrane na njeno zunanjo površino. Protein, ki se z visoko afiniteto veže na fosfatidilserin, se imenuje Annexin V, in nam označen s fluorokromom (v našem primeru PE) služi kot občutljiva sonda za apoptotične analize na pretočnem citometru. Fosfatidilserin se eksternalizira v zelo zgodnji fazi apoptoze, zato z PE Annexinom V lahko apoptozo določimo prej kot z drugimi testi, kot je na primer fragmentacija DNA. PE Annexin V barva tudi celice v poznih stopnjah nekroze, zato celice hkrati kot z PE Annexinom V barvamo tudi s 7-AAD. 7-AAD prehaja samo v mrtve celice in tako lahko ločimo žive celice, ki so v procesu apoptoze (7-AAD negativne, PE Annexin V pozitivne) od mrtvih celic, ki so pozitivne na obe barvili (24).

Celice Ramos smo stimulirali s spojinami 15, 4 in 5 v koncentracijah 10 µM in 100 µM. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI oziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO. Vzorce smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> 24 h, nato pa jih ovrednotili s pomočjo pretočnega citometra, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.2.2.7.2.





**Slika 32: Ugotavljanje apoptoze z Annexinom V na celicah Ramos, stimuliranih 24 h z 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  spojinami 15, 4 in 5**

Na histogramih vidimo dve populaciji celic: v spodnjih dveh kvadrantih žive (negativne za 7-AAD) in v zgornjih dveh kvadrantih mrtve (pozitivne za 7-AAD). Žive celice razdelimo na Annexin V negativne (spodaj levo) in Annexin V pozitivne celice (spodaj desno), ki so v procesu apoptoze.

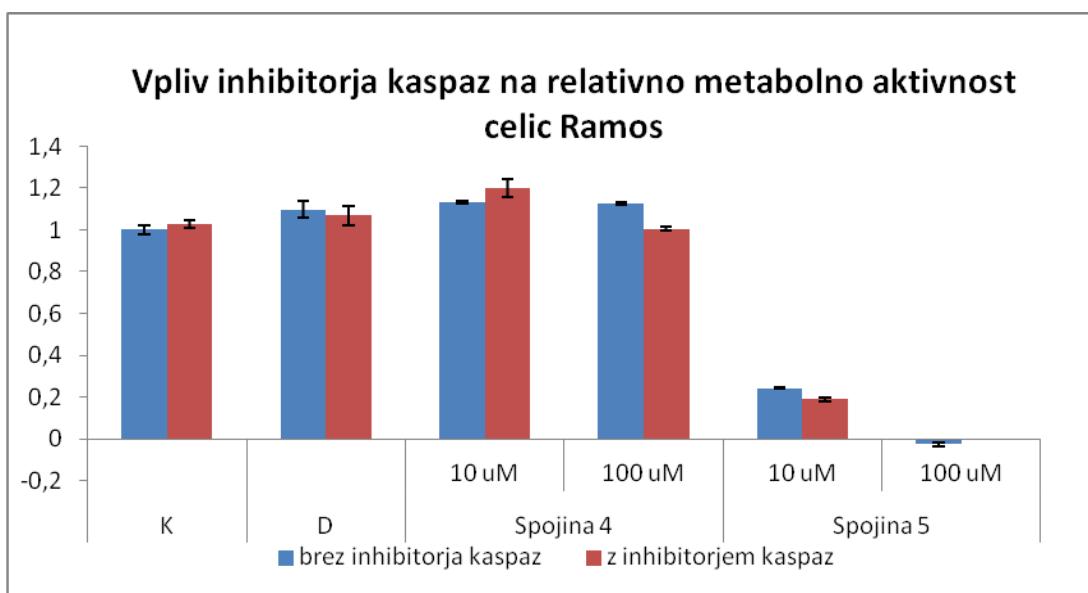
Namen tega eksperimenta je bil ugotoviti mehanizem smrti celic Ramos pod vplivom spojin 4 in 5. Odstotek celic, ki predstavljajo žive celice v postopku apoptoze (negativne za barvilo 7-AAD in pozitivne za barvilo Annexin V), je ne glede na spojino in njeno koncentracijo enak ali celo manjši kot pri kontrolnih vzorcih. Odstotek mrtvih celic se ob prisotnosti spojin 4 in 5 poveča in je pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji večji kot pri 10  $\mu\text{M}$  koncentraciji, kar smo ugotovili že s prejšnjimi testi (test MTS, analiza celičnega cikla). Zaključimo lahko, da spojine ne povzročijo apoptoze celic, ampak le-te najverjetneje umrejo po mehanizmu nekroze ali autofagije.

#### 4.2.2 Ugotavljanje metabolne aktivnosti ob prisotnosti inhibitorja kspaz

Apoptoza je od kspaz odvisna celična smrt (1). Kspaze so proteolitični encimi, ki so odgovorni za izvršitev apoptoze. Kspaza 3 in kspaza 7 spadata med izvršilne kspaze, ki se po kaskadi reakcij aktivirajo preko ekstrinzične in intrinzične poti. Če njun aktivnost zavremo, zavremo celično smrt po mehanizmu apoptoze (2). S primerjavo metabolne aktivnosti celic s testom MTS ob prisotnosti inhibitorja kspaz 3 in 7 in brez njega lahko sklepamo na to, ali spojine sprožijo v njih apoptozo ali kakšno drugo obliko celične smrti, ki

ne vključuje aktivacije kaspaz. Pri apoptozi je metabolna aktivnost celic, ki so bile inkubirane ob prisotnosti inhibitorja kaspaz, večja kot pri celicah, ki niso bile izpostavljene inhibitorju kaspaz.

Celice Ramos smo inkubirali ob prisotnosti spojin 4 in 5 v 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI oziroma ob prisotnosti ustrezne količine DMSO. Celice smo razdelili na dve seriji in eno serijo inkubirali še ob prisotnosti 50  $\mu\text{M}$  specifičnega inhibitorja kaspaz 3 in 7. Pripravljene stimulirane kulture smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Celice smo dali v inkubator in po 24 in 48 urah izvedli test MTS, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.2.2.6.



**Slika 33: Vpliv inhibitorja kaspaz na relativno metabolno aktivnost s spojinama 4 in 5 stimuliranih celic Ramos**

$1 \times 10^5$  celic Jurkat na mL smo inkubirali s spojinama 4 in 5 v 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji in inhibitorjem kaspaz v 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji. S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic. Z modro barvo so predstavljene vrednosti brez prisotnosti inhibitorja kaspaz, z rdečo pa vrednosti ob prisotnosti inhibitorja kaspaz.

Relativna metabolna aktivnost celic Ramos, stimuliranih s spojinama 4 in 5 se glede na graf na sliki 33 ni signifikantno razlikovala ob prisotnosti inhibitorja kaspaz in brez njega. Iz tega lahko zaključimo, da kaspaze ne sodelujejo pri celični smrti pod vplivom teh spojin.

## 5 SKLEP

Učinkovine, ki jih uporabljam v terapiji levkemij imajo mnogo hudih neželenih učinkov, zato je razvoj usmerjen proti bolj specifično delujočim spojinam (11). Predvsem je zanimiva strategija sproženja apoptoze rakavih celic, kar ima za posledico odstranitev rakavega tkiva brez spremljajočega vnetja (2). Derivati cimetne kisline so v naravi široko razširjeni in v splošnem nizko toksični (15). Potrditev, da v levkemičnih celicah sprožijo apoptozo, bi lahko vodila v razvoj boljših učinkovin za zdravljenje.

V prvem delu diplomske naloge smo sintetizirali dve seriji estrov in amidov cimetne kisline in ovrednotili njihov vpliv na metabolno aktivnost celic Burkittovega limfoma in T-celične levkemije. Ugotovili smo, da na aktivnost spojin vplivajo naslednje strukturne značilnosti spojin:

- substitucija na aromatskem obroču cimetne kisline neugodno vpliva na aktivnost,
- monosubstitucija na aromatskem obroču pri fenolih ozziroma anilinih je bolj ugodna kot disubstitucija,
- elektronprivlačni substituenti na fenolnem delu cinamatov povečajo aktivnost spojin,
- estri cimetne kisline so bolj aktivni kot amidi,
- pri cinamatih je na fenolu *ortho* položaj ciano skupine bolj ugoden kot *meta* in *para*,
- *meta* substitucija trifluorometilne skupine na fenolovem obroču je bolj ugodna kot *para* substitucija.

V drugem delu diplomske naloge smo ugotovili, da najbolj aktivni spojini (spojina **4** in spojina **5**) odvisno od koncentracije povečata odstotek mrtvih celic v celičnem ciklu. Spojina **5** v celicah Ramos podaljša fazo S in verjetno inhibira sintezo DNA. Nadalje smo ugotovili, da celice Ramos pod vplivom spojin **4** in **5** ne umrejo po mehanizmu apoptoze.

Kljub temu, da naša hipoteza, da derivati cimetne kisline v levkemičnih celicah sprožijo apoptozo, ni bila potrjena, so spojine vseeno zanimive, saj povzročijo celično smrt v levkemičnih celicah. Z optimizacijo strukture spojin bi lahko dobili še bolj učinkovite spojine,

zato derivati cimetne kisline predstavljajo pomembno izhodišče pri razvoju novih učinkovin za zdravljenje levkemij.

## **6 LITERATURA**

1. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach*, second edition. Washington, D.C.: Sinauer Associates, Inc., 2000. ISBN: 0-87893-106-6.
2. Jin Z, El-Deiry W S: Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy* 2005; 4: 139-163.
3. Ricci M S, Zong W X: Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist* 2006; 11: 342-357.
4. Speirs C K, Hwang M, Kim S, Li W, Chang S, Varki V, Mitchell L, Schleicher S, Lu B: Harnessing the Cell Death Pathway for Targeted Cancer Treatment. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 43-61.
5. Fernandez-Luna J L: Apoptosis Regulators as Targets for Chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 555-562.
6. Fesik S W: Promoting Apoptosis as a Strategy for Cancer Drug Discovery. *Nature* 2005; 5: 876-885.
7. Osorio L M, Aguilar-Santelises M: Apoptosis in B-chronic Lymphocytic Leukaemia. *Medical Oncology* 1998; 15: 234 – 240.
8. Fischer U, Schulze-Osthoff K: Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 2005; 21(S1): 942-961.
9. Glaser M: Konične levkemije. *Medicinski razgledi* 2005; 44: 33-41.
10. Zver S: Akutne levkemije. Onkologija – raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka, Novaković S, et al. Mladinska knjiga, 1. izdaja, Ljubljana, 2009: 382-389.
11. Ratner L: Human T Cell Lymphotropic Virus-Associated Leukemia/Lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 469-473.
12. Tallman M S, Gilliland D G, Rowe J M: Drug Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 2005; 106: 1154-1163.

13. Hallek M, Cheson B D, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating M J,Montserrat E, Rai K R, Kipps T J: Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia Updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 Guidelones. *Blood* 2008; 111: 5446-5456.
14. De P, Baltas M, Bedos-Belval F: Cinnamic acid Derivatives as Anticancer Agents – A Review, *Curr Med Chem* 2011; 18: 1672-1703.
15. Lafay S, Gil-Izquierdo A: Bioavailability of Phenolic Acids, *Phytochem Rev* 2008; 7: 301-311.
16. Sova M: Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini Rev Med Chem* 2012; 12 (v tisku)
17. Hoskins J: The Occurrence, Metabolism and Toxicity of Cinnamic Acid and Related Compounds. *J Appl Toxicol.* 1984; 4: 283-292.
18. Clifford N M: Chlorogenic Acids and Other Cinnamates- Nature, Occurrence and Dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 362-372.
19. Mosmann T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Jour of Immun Methabol* 1983; 65: 55-63.
20. [http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-non\\_radioactive-cell-proliferation-assay-\\_mts\\_/](http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mts_/) (dostopno: april 2012)
21. American Type Culture Collection (ATCC), specifikacije produktov: <http://www.atcc.org/attachments/17463.pdf>, <http://www.atcc.org/attachments/17408.pdf> (dostopno: april 2012)
22. <http://www.abdoserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf> (dostopno: april 2012)
23. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_cycle](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle), (dostopno: april 2012)
24. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp01304.pdf> (dostopno: april 2012)

25. [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/cell\\_bio/live/web\\_enabled/6900KK\\_559763.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6900KK_559763.pdf) (dostopno: april 2012)
26. Sova M, Žižak Ž, Antić Stanković J A, Prijatelj M, Turk S, Juranić Z D, Mlinarič Raščan I, Gobec S: Cinnamic Acid Derivatives Induce Cell Cycle Arrest in Carcinoma Cell Lines (rokopis v recenziji)
27. Diplomsko delo, Ana Oreški (v izdelavi)