

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA OREŠKI

**SINTEZA IN VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI DERIVATOV CIMETNIH  
KISLIN NA CELIČNIH LINIJAH MONONUKLEARNIH CELIC**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANA OREŠKI

**SINTEZA IN VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI DERIVATOV CIMETNIH  
KISLIN NA CELIČNIH LINIJAH MONONUKLEARNIH CELIC**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF CINNAMIC ACID DERIVATIVES  
CYTOTOXICITY ON MONONUCLEAR CELL LINES**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo (NMR, IR), na Kemijskem inštitutu (NMR) in na Centru za masno spektroskopijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani (masna spektroskopija, elementna analiza).

## ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Mateju Sovi za potrpežljivost, vodenje, kolegialnost in strokovne nasvete tekom vseh let raziskovanja. Prav tako se zahvaljujem dr. Matevžu Prijatelju za dolgoletno pomoč pri eksperimentalnem delu, prijaznost in sodelovanje tudi potem, ko je že zapustil svoje delovno mesto na fakulteti. Hvala asist. Tijani Marković za strokovne nasvete, vsekakor pa tudi družini in prijateljem za podporo in lepe trenutke tekom študijskih let.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Ljubljana, Januar 2014

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Članica komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO SLIK</b>	<b>III</b>
<b>POVZETEK</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cimetna kislina</b>	<b>1</b>
1.1.1 UČINKI	1
1.1.1.1 Protitumorno delovanje	3
<b>1.2 Maligne bolezni monocitov</b>	<b>4</b>
1.2.1 LEVKEMIJA	4
1.2.1.1 Akutna mieloična levkemija	5
1.2.1.2 Kronična mieloična levkemija	5
<b>1.3 Terapija malignih bolezni monocitov</b>	<b>5</b>
1.3.1 OBLIKE CELIČNE SMRTI	5
1.3.1.1 Apoptoza	6
1.3.1.2 Avtofagija	8
1.3.1.3 Nekroza	9
1.3.2 TERAPIJA KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE	10
1.3.3 TERAPIJA AKUTNE MIELOIČNE LEVKEMIJE	10
1.3.4 NOVE TERAPEVTSKE STRATEGIJE ZA ZDRAVLJENJE AML	11
<b>2. NAMEN DELA</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Materiali</b>	<b>13</b>
3.2.1 MATERIALI PRI SINTEZI SPOJIN	13
3.2.2 MATERIALI PRI CELIČNIH TESTIH	14
<b>3.3 Metode</b>	<b>16</b>
3.3.1 METODE PRI SINTEZI SPOJIN	16
3.3.1.1 Kromatografske metode	16
3.3.1.2 Spektroskopske metode	17
3.3.1.3 Elementna analiza	17
3.3.1.4 Določevanje tališč	17
3.3.1.5 Risanje formul spojin	17
3.3.2 METODE PRI CELIČNIH TESTIH	18
3.3.2.1 Odmrzovanje celic	18
3.3.2.2 Gojenje celic	19
3.3.2.3 Subkultiviranje celičnih kultur	19

3.3.2.4	Štetje celic	19
3.3.2.5	Priprava raztopin derivatov cimernih kislin v DMSO	20
3.3.2.6	Test MTS	20
3.3.2.7	Aktivacija PBMC s PMA	21
3.3.2.8	Pretočna citometrija	23
<b>4.</b>	<b>EKSPERIMENTALNO DELO</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Sinteza derivatov cimetine kisline</b>	<b>25</b>
4.1.1	SINTEZA FENIL CINAMATA (Spojina 1)	25
4.1.2	SINTEZA 4-NITROFENIL CINAMATA (Spojina 2)	26
4.1.3	SINTEZA 4-CIANO-3-FLUOROFENIL CINAMATA (Spojina 3)	27
4.1.4	SINTEZA FENIL CINAMIDA (Spojina 4)	29
4.1.5	SINTEZA 4-CINAMIDOBENZOJSKE KISLINE (Spojina 5)	30
4.1.6	SINTEZA 4-SULFANILFENIL CINAMIDA (Spojina 6)	33
<b>5.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Komentar sinteze spojin</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>Vpliv sintetiziranih spojin na metabolno aktivnost celic THP1</b>	<b>36</b>
5.2.1	VPLIV PRVE SERIJE DERIVATOV CIMETNE KISLINE	37
5.2.2	VPLIV DRUGE SERIJE DERIVATOV CIMETNE KISLINE	39
<b>5.3</b>	<b>Vpliv spojin na celični cikel linije THP1</b>	<b>41</b>
5.3.1	CELIČNI CIKEL	41
5.3.2	VPLIV SPOJIN 6, 12, 13 NA CELIČNI CIKEL	42
<b>5.4</b>	<b>Ugotavljanje selektivnosti delovanja spojin</b>	<b>44</b>
5.3.1	VPLIV SPOJIN 6, 12 in 13 NA CELIČNO KULTURO BREZ DODATKOV	45
5.3.2	VPLIV SPOJIN 6, 12 in 13 NA CELIČNO KULTURO Z DODATKOM PMA	46
<b>6.</b>	<b>SKLEP</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>49</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Strukturne formule cimetne kisline in njenih v naravi najpogosteje prisotnih derivatov. ....	1
<b>Slika 2:</b> Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze. ....	7
<b>Slika 3:</b> Od grancima B odvisna pot apoptoze. ....	8
<b>Slika 4:</b> Na celičnem modelu prikazano dogajanje tekom avtofagije. ....	9
<b>Slika 5:</b> Delovanje imatiniba. ....	10
<b>Slika 6:</b> Enačba za izračun števila celic/mL. ....	19
<b>Slika 7:</b> Reakcijska shema pretvorbe MTS-a. ....	20
<b>Slika 8:</b> Enačba za izračun deleža metabolno aktivnih celic. ....	21
<b>Slika 9:</b> Pretočni citometer. ....	24
<b>Slika 10:</b> Sinteza fenil cinamata (Spojina <b>1</b> ). ....	25
<b>Slika 11:</b> Sinteza 4-nitrofenil cinamata (Spojina <b>2</b> ). ....	26
<b>Slika 12:</b> Sinteza 4-ciano-3-fluorofenil cinamata (Spojina <b>3</b> ). ....	27
<b>Slika 13:</b> Sinteza cinamoil klorida ( <b>V</b> ). ....	29
<b>Slika 14:</b> Sinteza fenil cinamida (Spojina <b>4</b> ). ....	29
<b>Slika 15:</b> Sinteza etil 4-aminobenzoata ( <b>IX</b> ). ....	30
<b>Slika 16:</b> Sinteza etil 4-cinamidobenzoata ( <b>X</b> ). ....	31
<b>Slika 17:</b> Sinteza 4-cinamidobenzojske kisline (Spojina <b>5</b> ). ....	32
<b>Slika 18:</b> Sinteza 4-sulfanilfenil cinamida (Spojina <b>6</b> ). ....	33
<b>Slika 19:</b> Strukturne formule prve serije testnih spojin. ....	37
<b>Slika 20:</b> Deleži metabolno aktivnih celic linije THP1, stimuliranih s prvo serijo spojin, po 24 in 48 urah. ....	38
<b>Slika 21:</b> Strukturne formule druge serije testnih spojin. ....	39
<b>Slika 22:</b> Deleži metabolno aktivnih celic linije THP1, stimuliranih z drugo serijo spojin, po 24 in 48 urah. ....	40
<b>Slika 23:</b> Strukturne formule iz druge serije izbranih spojin za analizo celičnega cikla. ..	42
<b>Slika 24:</b> Deleži mrtvih celic (subG <sub>0</sub> ) 24 in 48 ur po stimulaciji. ....	42
<b>Slika 25:</b> Deleži živih celic v posamezni fazi celičnega cikla 24 ur po stimulaciji. ....	43
<b>Slika 26:</b> Deleži živih celic v posamezni fazi celičnega cikla 48 ur po stimulaciji. ....	44
<b>Slika 27:</b> Strukturne formule iz druge serije izbranih spojin za proučevanje selektivnosti. ....	45
<b>Slika 28:</b> Deleži metabolno aktivnih celic linije PBMC 24 in 48 ur po stimulaciji. ....	45
<b>Slika 29:</b> Deleži metabolno aktivnih celic linije PBMC z dodatkom PMA 24 in 48 ur po stimulaciji. ....	46

## POVZETEK

Maligna obolenja celic granulocitne vrste so posledica sprememb v genetskem materialu celic. Dandanes obstajajo že uveljavljene terapije tako za akutne, kot za kronične oblike levkemičnih obolenj, vendar pa zaradi širokega spektra obstoječih mutacij v veliko primerih niso uspešne. Iskanje novih učinkovin je tako ključno za izboljšanje možnosti za preživetje pacientov.

V zadnjem času se v študijah pogosto pojavljajo cimetna kislina in njeni derivati. Gre za spojine z mnogo biološkimi učinki, hkrati pa z nizko toksičnostjo za organizem. Posebno pozornost smo posvetili njihovemu antikarcinogenemu delovanju. Sintetizirali smo dve seriji estrov in amidov cimetne kisline z različno substituiranimi fenoli in anilini. Strukture prve serije spojin smo načrtovali na podlagi izsledkov predhodno izvedenih študij ter nato na humani monocitni celični liniji pacienta z akutno monocitno levkemijo (THP1) preverili njihov vpliv na metabolno aktivnost stimuliranih kultur (test MTS).

Ugotovili smo, da je najugodnejša substitucija z elektron privlačno skupino na *para* mestu fenilnega obroča v alkoholnem delu cinamata in da je potrebno izboljšati topnost testnih spojin. Nato smo sintetizirali novo serijo spojin z izboljšanimi lastnostmi in tudi njihovo delovanje proučili z opazovanjem metabolne aktivnosti stimuliranih kultur. Z metodo celične citometrije smo ugotavljali vpliv treh spojin druge serije na trajanje faz celičnega cikla, nato pa s stimulacijo linije mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC), brez ali z dodatkom forbol 12-miristat-13-acetata (PMA), še selektivnost njihovega delovanja.

Pri 3-(trifluorometil)fenil cinamatu (spojina **13**) smo tako opazili znatno povišanje deleža celic linije THP1 že pred prvo kontrolno točko celičnega cikla ( $G_0/G_1$ ). Med spojinami, ki so bile testirane na liniji PBMC, je na rakavi celični liniji (THP1) največji učinek pokazal 4-sulfanilfenilcinamid (spojina **6**). Ker je bolj citotoksično deloval na nerakavo celično linijo, kot na rakavo, zaključujemo, da nima dovolj ugodnih lastnosti za nadaljnje testiranje. Ugotovili smo, da spojine v večji meri resda delujejo citotoksično na rakavo linijo THP1, vendar pa njihovo selektivno delovanje ni zadovoljivo. Estrski derivati cimetne kisline so bili veliko aktivnejši od amidov, zato bi bilo smiselno raziskavo nadaljevati z optimiziranimi derivati, ki so strukturno bolj sorodni spojinam prve serije.

## ABSTRACT

Malignant diseases of granulocytes occur as a consequence of changes in cell's genetic material. Nowadays many established therapies for chronic and acute forms of leukemic disorders exist, however, because of a wide variety of possible mutations in many cases they are not very successful. Therefore, the search for new effective drugs is essential for improving the survival rates of patients. Cinnamic acid and its derivatives are compounds with low toxicity and many biological effects. In our research we focused on their anticarcinogenic effects. We synthesized two series of esters and amides of cinnamic acid with differently substituted phenols and anilines. The compounds from the first series were synthesized based on previous studies and tested on a humane monocytic cell line, derived from an acute myeloid leukemia patient (THP1) for their influence on metabolic activity of the stimulated culture (MTT assay).

Based on the results we determined that the most effective compounds are substituted with an electron withdrawing group in the *para* position on the phenyl ring in the alcoholic part of cinnamate. At the same time we needed to improve the solubility of our compounds by introducing polar substituents into the structures. This led us to the synthesis of the second series of compounds. Their activity was once again tested by observing their influence on the metabolic activities of the stimulated cell culture. Using cell citometry we determined the effects of three compounds, synthesized in the second series, on the duration of the phases of the cell cycle. At the end, we examined the influence of the same three compounds on the metabolic activity of stimulated culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without the additon of PMA to determine their selectivity.

In the case of 3-(trifluoromethyl)phenyl cinnamate (compound **13**) we noticed a significant increase of percentage of cells in the phase G<sub>0</sub> of the cell cycle. Among the substances, tested on the cell line PBMC, the greatest cytotoxic effect on malignant cell line was observed for 4-sulfanylphenyl cinnamide (compound **6**). Due to its more significant effect on the metabolic activity of non-cancerous cells (PBMC), the substance isn't suitable for further testing. To conclude, our compounds mainly show a cytotoxic effect on the malignant THP1 cell line, however, their selectivity is very low. Since the esters of cinnamic acid showed a much greater cytotoxic effect on the malignant cell line, the future synthesized compounds should be structurally related to the first series of the compounds.



## SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

**AIF** ~ flavoprotein, apoptozo inducirajoč dejavnik (angl. apoptosis-inducing factor)

**Atg13** ~ faktor, udeležen pri tvorbi fagosoma (angl. autophagy-related protein 13)

**Atk** ~ protein kinaza B (angl. protein kinase B)

**Bad** ~ proapoptotični član genske družine Bcl-2 (angl. Bcl-2-associated death promoter)

**Bax** ~ proapoptotični član genske družine Bcl-2 (angl. Bcl-2-associated X protein)

**Bcl-2** ~ družina apoptozo regulirajočih proteinov (angl. B-cell lymphoma 2)

**Bcl-X<sub>L</sub>** ~ protiapoptotični član genske družine Bcl-2 (angl. B-cell lymphoma-extra large)

**Beclin-1** ~ sesalski ortolog glivnega gena Atg

**BID** ~ proapoptotični član genske družine Bcl-2 (angl. BH3 interacting-domain death agonist)

**Bif 1** ~ endofilin B1

**Bim** ~ proapoptotični član družine Bcl-2 (angl. B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death)

**Bmf** ~ proapoptotični član družine Bcl-2 (angl. Bcl-2 modifying factor)

**c-FLIP** ~ inhibitor aktivacije kaspaze 8 (angl. FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein)

**DIABLO** ~ antagonist inhibitorjev apoptoznih proteinov (angl. direct IAP binding protein with low pI; tudi Smac)

**DCC** ~ *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

**DISC** ~ signalni kompleks, ki sproža celično smrt (angl. death-inducing signalling complex)

**DMAP** ~ 4-dimetilaminopiridin

**DMF** ~ *N,N*-dimetilformamid

**DNA** ~ deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)

**EI** ~ masna spektroskopija z ionizacijo z elektroni (angl. electron impact ionization)

**ETR** ~ reagent za prenos elektronov (angl. electron transfer reagent)

**FAB** ~ ionizacijska tehnika v masni spektroskopiji (angl. fast atom bombardment)

**FADD** ~ molekula, ki povezuje receptor Fas in druge receptorje celične smrti s kaspazo 8 (angl. Fas-associating protein with death domain)

**Fas** ~ površinska molekula celic T<sub>c</sub>, tarča za TNF

**FBS** ~ zarodni goveji serum (angl. fetal bovine serum)

**FIP200** ~ protein, potreben za aktivacijo apoptosoma v sesalskih celicah (angl. focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kD)

**FLICE** ~ kaspaza 8

**FTIR** ~ infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. Fourier transform infrared spectroscopy)

**HLA** ~ humani levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)

**HEPA** ~ zračni filter v komori LAF (angl. high-efficiency particulate arresting)

**HIV** ~ virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)

**LAF** ~ laminarni pretok zraka (angl. laminar air flow)

**Mcl-1** ~ protiapoptotični protein iz družine Bcl-2

**mTOR** ~ sesalska tarča za rapamicin (angl. mammalian target of rapamycin)

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

**Noxa** ~ proapoptotični član družine Bcl-2 (angl. phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)

**PBMC** ~ celice periferne krvi z okroglim jedrom (angl. peripheral blood mononuclear cells)

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

**PI3K** ~ družina encimov, vpletenih v kancerogenezo (angl. phosphatidylinositide 3-kinases)

**PMA** ~ forbol 12-miristat-13-acetat (angl. phorbol 12-myristat 13-acetat)

**PUMA** ~ proapoptotični član družine Bcl-2 (angl. p53 upregulated modulator of apoptosis)

**RF** ~ retencijski faktor

**Ras** ~ družina majhnih GTP-az

**RNAza** ~ encim, ki cepi RNA

**Smac** ~ antagonist inhibitorjev apoptoznih proteinov (angl. second mitochondrial activator of caspases; tudi DIABLO)

**THF** ~ tetrahidrofuran

**THP1** ~ celična linija humane akutne monocitne levkemije

**TMS** ~ tetrametilsilan

**TNF** ~ dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)

**TNF-R** ~ receptor, na katerega se veže faktor TNF

**TRAIL** ~ TNF-u soroden apoptozo inducirajoči ligand (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand)

**TRAIL-R** ~ receptor, na katerega se veže TRAIL

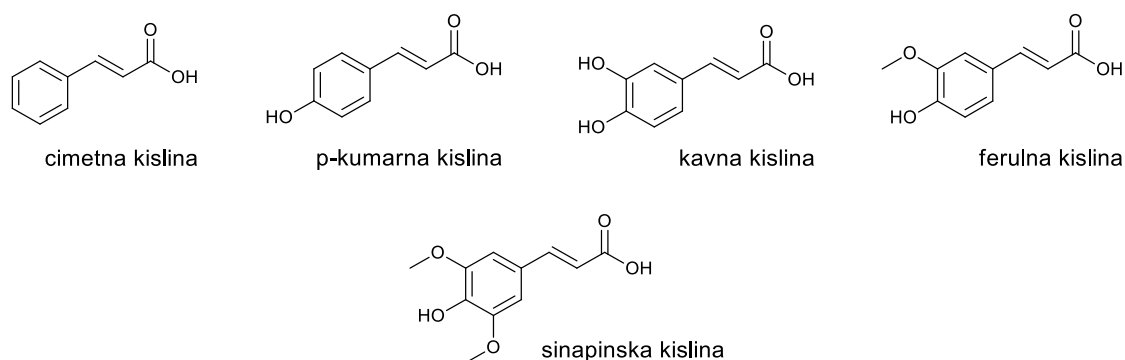
**Ulk1** ~ serin/treonin proteinska kinaza (angl. Unc-51-like kinase 1)

# 1. UVOD

## 1.1 Cimetna kislina

Cimetna kislina je spojina z dolgo zgodovino uporabe, tako zaradi pogoste pojavnosti v hrani kot tudi zaradi prijetnega vonja. Četudi ima dandanes v farmakopeji le vlogo arome v farmacevtskih pripravkih, ji farmakologi in toksikologi posvečajo vedno več pozornosti. Zanimiva je namreč zato, ker v primerjavi z njej strukturno podobnimi spojinami (stiren, kumarin) kaže izrazito manjšo toksičnost, hkrati pa je nosilka mnogih bioloških učinkov. Tako že vrsto let predstavlja obetavno naravno spojino pri iskanju novih učinkovin (1, 2).

V naravi je cimetna kislina najbolj zastopana v cimetu. Najdemo jo tudi v raznih rastlinskih izločkih, saj predstavlja ključni intermediat v šikimatni in fenilpropanoidni poti kot prekursor pri nastanku flavonoidov in lignina. Pripada razredu auksinov, rastlinskih hormonov, ki uravnava celično rast in diferenciacijo. Tudi derivati cimetne kisline so večinoma naravnega izvora. Najpogosteje gre za derivate hidroksicimetne kisline: *p*-kumarno, kavno, ferulno in sinapinsko kislino (Slika 1). Najdemo tudi njihove estre s kininsko kislino, vinsko kislino in ogljikovimi hidrati (2, 3).



Slika 1: Strukturne formule cimetne kisline in njenih v naravi najpogosteje prisotnih derivatov.

### 1.1.1 UČINKI

Spekter delovanja cimetne kisline zajema protibakterijske, protivirusne, protiglivne, antioksidativne, citotoksične ter celo hipoholesterolemične, hepatoprotektivne in protiaterosklerotične učinke.

Derivati hidroksicimetne kisline so dobro poznani antioksidanti. Med derivati cimetne kisline z antioksidativnim delovanjem so najpogosteje omenjene hidroksicimetna, p-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska kislina. Bistven strukturni fragment za antioksidativno delovanje je fenolna –OH skupina, ki reagira z oksidanti in pri tem tvori resonančno stabiliziran fenoksi radikal. K njegovi stabilizaciji pripomore tudi propenojska stranska veriga. Zaradi induktivnega učinka prenilnega fragmenta so zelo dobri antioksidanti nekateri prenilni derivati cimetne kisline, heksilni estri in amidi kavne in ferulne kisline pa so dovolj lipofilne spojine, da lahko prehajajo krvno-možgansko pregrado, zato jih smatramo za obetavne kandidate za preventivo ali zmanjšanje oksidativnega stresa, povezanega z nevrodegenerativnimi boleznimi.

Že dolgo je znano, da ima cimetna kislina tudi protimikrobno aktivnost. Zaradi nizke topnosti so veliko bolj uporabni njeni bolj hidrofilni derivati, še posebej estri z nesubstituiranimi fenoli. Cimetna, ferulna, kumarna in sinapinska kislina imajo protibakterijsko delovanje (zavirajo rast nekaterih Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij), nekateri drugi derivati cimetne kisline pa kažejo obetavno protimikobakterijsko delovanje in so zato posebej zanimive spojine v razvoju tuberkulostatikov. Dihidrokafeilni analogi so učinkoviti celo proti na vankomicin in meticilin odpornim sevom bakterije *Staphylococcus aureus* (VRSA in MRSA).

Med protivirusnimi učinki cinamatov je najbolj odmevno inhibitorno delovanje na HIV-1 integraze, vendar pa ne gre zanemariti virustatične aktivnosti proti mnogim drugim virusom ali njihovim taksonomskim skupinam. Tako cinamoilni in hidroksicinamoilni amidi glavnica delujejo proti enterovirusom, humanim rinovirusom, virusom influenze in respiratornemu sincicijskemu virusu, cimetni derivati tieno[2,3-d]oksazinov pa proti virusu Herpes simplex tipa 2, virusu Varicella zoster in citomegalovirusnim proteazam.

Cimetna kislina in njeni derivati so pogoste sestavine losionov in šamponov za zdravljenje infekcij lasišča z *Melicope Ovalis* (naglavna uš). Pri zatiranju rasti gliv je zelo učinkovita tudi kombinacija cimetnih kislin z inhibitorji celičnega dihanja. Inkluzijski kompleks cimetne kisline z ureo je učinkovit proti glivam *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aaspergillus flavus* in *Neurospora crassa*. Amidni derivati cimetne kisline, substituirani z nižjimi alkilnimi skupinami na amino- skupini so proti glivam *Phytum sp.* primerljivo učinkoviti kot komercialno dostopni fungicidi (2).

Vedno bolj aktualno postaja tudi protitumorno delovanje tovrstnih spojin. V zadnjih dveh desetletjih so začele naravne derivate cimetne kisline izpodrivati sintetizirane molekule (2, 4).

#### 1.1.1.1 Protitumorno delovanje

Cimetna kislina in njeni naravni analogi se že stoletja uporabljajo kot protirakave učinkovine s citotoksičnimi, antiproliferativnimi, protiangeogenimi, protilevkemičnimi učinki in aktivnostjo proti trdnim tumorjem. Inhibirajo različne encime (transglutaminazo, aminopeptidazo N, histonske deacetilaze) in povzročajo poškodbe DNA. Prenilirani derivati cimetne kisline inhibirajo preniltransferaze (farneziltransferaza, geraniltransferaza I), majhne pripadnice družine Ras, vpletene v neoplastično transformacijo. Farneziloksi- in geraniloksicimetne kisline predstavljajo pomembne predstavnike novega razreda selektivnih inhibitorjev geraniltransferaze I. Najbolj učinkovit je farneziloksi derivat *trans-p*-kumarne kisline.

Med naravno prisotnimi estri kažeta rožmarinska in kavna kislina šibko citotoksičen učinek na celice akutne mieloične levkemije. Metil kafeat inhibira invazivnost melanomskih celic B16, fenetilni ester kavne kisline pa deluje inhibitorno na tumorsko rast in inducira apoptozo pri humani mieloični levkemični liniji U937. Zaradi prooksidativnega učinka posreduje pri apoptotični fragmentaciji DNA, zato je obetavna ojačevalna učinkovina v radiacijski terapiji. Pri holangiokarcinomu inhibira nuklearni transkripcijski faktor kapa beta (NF- $\kappa$ B), ki sicer preprečuje apoptozno smrt rakavih celic in pospešuje njihovo rast.

Nekateri dikarbonil cinamati (*N*-metilbutiramidometilcinamat, cinamoiloksimetil tio-butarat, butiroiloksimetiltiocinamat) so inhibitorji histonske deacetilaze, saj tvorijo kelat s cinkom v njenem aktivnem mestu. Gre za encime, ki odstranjujejo  $\epsilon$ -*N*-acetilno skupino z lizinskih preostankov histonov in tako omogočijo tesnejše ovijanje DNA. Med najmočnejše inhibitorje histonske deacetilaze tipa 1 in 2 spadajo derivati hidroksamske kisline (4, 5).

Cinamoil distamicin je analog talimustina z zelo dobro protilevkemično aktivnostjo. Pri tem ima protonirana amidinska skupina ključno vlogo pri vezavi molekule na DNA in pri njeni biološki uporabnosti. Med cinamidnimi derivati v naravi najdemo tudi 2-metilcinamid, ki izkazuje protinvazivni učinek. Protitumorski antibiotiki duokarmicin A in njegovi analogi

delujejo močno inhibitorno proti liniji humanih celic raka materničnega vratu (HeLa) in zmerno proti širokemu spektru trdnih tumorjev, v strukturi pa vsebujejo tudi cinamoilni fragment.

*Trans*-cinamoil benzotriazolilni derivati reverzibilno inhibirajo transglutaminazo 2. Ti od kalcija odvisni encimi katalizirajo znotrajmolekulsko povezovanje določenih proteinov in so vpleteni v proces endocitoze, apoptoze in regulacije celične rasti. Antramicinski derivati cimetine kisline delujejo kot protitumorni antibiotiki. Z DNA reagirajo kovalentno, pri tem pa tvorijo N2-gvaninski adukt v majhnem žlebu verige in povežejo najmanj tri bazne pare (4).

## **1.2 Maligne bolezni monocitov**

### **1.2.1 LEVKEMIJA**

Pri levkemiji govorimo o skupini malignih obolenj kostnega mozga, ki se kaže kot neinhibirana delitev enega klona prekursorjskih celic. Okvarjene celice iz zdravega kostnega mozga in zdravih organov izpodrinejo normalne celice in tako povzročijo še večjo škodo v organizmu. Pravi vzrok nastanka še ni znan, obstaja pa več dejavnikov tveganja za sproženje bolezni: izpostavljenost določenim kemikalijam (benzen), ionizirajočemu sevanju, citostatikom, onkogenim virusom (humani T-limfotropni virus 1, Eppstei-Barr virus). Pojavi se lahko tudi kot posledica prirojenih genetskih motenj (Downov sindrom) (6, 7).

Glede na klinični potek razdelimo levkemije na akutne in kronične. Pri akutni obliki gre za nepravilno dozorevanje krvnih celic in hiter razvoj bolezni, pri kronični pa povečano proizvodnjo določene vrste vrste celic in dolgotrajnejši razvoj bolezni. Okvarjena sta lahko tako limfatični, kot mieloični tip celic. Pri okvarjenem limfatičnem tipu so v krvi prisotne nenormalne oblike limfocitov B ali T. V to skupino spadata tudi atipični obliki - levkemija lasastih celic in levkemija plazemskih celic. Nenormalni limfociti pridejo v kri tudi pri izplavljanju celic iz malignih limfomov (levkemični folikularni limfom, Hodgkinovi limfomi celic T). Pri mieloični levkemiji pride do kopičenja spremenjenih celic mieloične vrste. Lahko gre za bazofilce, eozinofilce in monocite pri kronični različici ali njihove predhodnike, predhodnike eritrocitov (eritroblasti) in predhodnike trombocitov (megakarioblasti) pri akutni.

Možen je alevkemični potek bolezni, ko v periferni krvi ni prisotnih levkemičnih celic, sublevkemični potek, ko opazimo manjši delež levkemičnih celic in normalno ali znižano število normalnih levkocitov, ter levkemični potek, ko v periferni krvi opazimo povišan delež levkemičnih celic in povišano število normalnih levkocitov (6).

### **1.2.1.1 Akutna mieloična levkemija**

Gre za podvrsto malignih obolenj celic mieloične vrste, za katere je značilna nekontrolirana klonaska delitev okvarjenih krvotvornih prekuzorskih celic v različnih stopnjah razvoja. Klinično se kaže v oslABLjeni hematopoezi (nevtropenija, anemija, trombocitopenija) in nabiranju levkemičnih celic v kostnem mozgu, krvi in ekstramedularno. Začne se s pretvorbo matične celice, tej pa sledi nastanek klonalnih potomcev z dodatnimi genetskimi spremembami. Bistveno vlogo imajo onkogeni in tumor supresorji. Pri skoraj tretjini primerov je levkemija povezana z mutacijo onkogenega *Ras* (7).

### **1.2.1.2 Kronična mieloična levkemija**

Gre za maligno motnjo na nivoju kostnega mozga in sicer za povečano proizvodnjo celic mieloične vrste, usmerjene v tvorbo granulocitov. Celice pri tem ohranijo sposobnost dozorevanja in diferenciacije. V periferni krvi se bolezen kaže s povečanim številom levkocitov. Nezdravljeni kronični fazi sledi pospešeno obdobje, ki sčasoma preide v blastno krizo. Za sproženje bolezni je ključen pojav kromosoma Philadelphia, ki v levkemičnih celicah nastane s kromosomsko translokacijo t(9;22). Posledica njegovega nastanka je fuzijski onkogen *BCR-ABL*, ki kodira tirozinsko kinazo BCR-ABL, novonastali protein pa vodi v nenadzorovano delitev enega klona celic (8).

## **1.3 Terapija malignih bolezni monocitov**

### **1.3.1 OBLIKE CELIČNE SMRTI**

Normalno delovanje organizma temelji na ravnotežju med celično delitvijo in celično smrtjo. Porušenje tega ravnotežja vodi v razvojne abnormalnosti, degenerativne bolezni ali

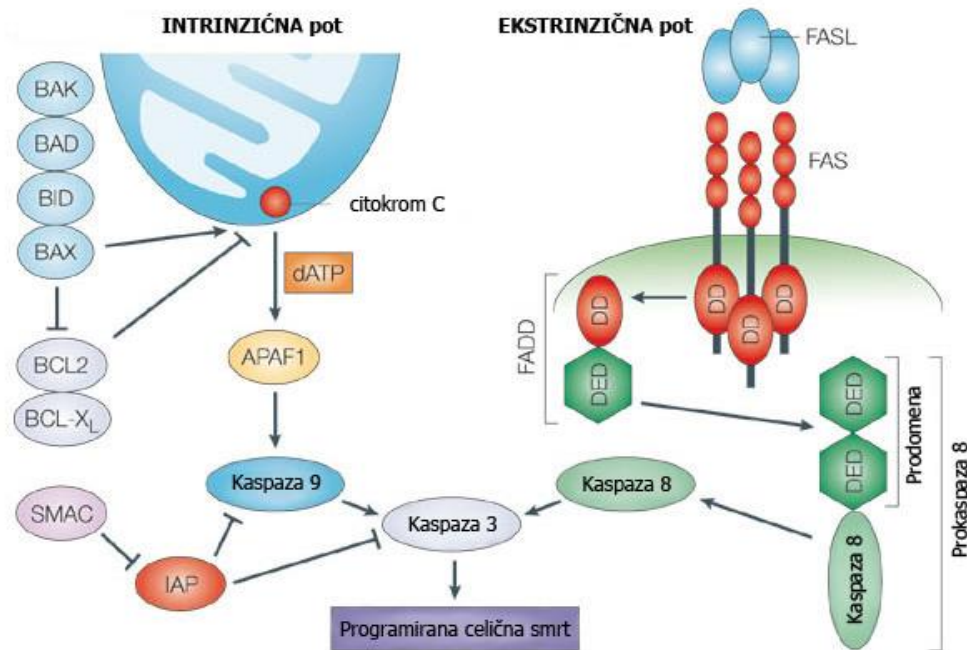


neoplastične transformacije. Celice pri življenju ohranja skupek signalov, ki preprečuje, da bi izvršile svoj program umiranja (kontaktna inhibicija, izločanje nekaterih snovi). Do blokade teh signalov pride v celicah, ki so stare in okvarjene, v celicah, ki predstavljajo presežek zahtevam tkiva, ali v celicah, ki so utrpeli poškodbe, nezdržljive s preživetjem. Razlikujemo tri oblike celične smrti: apoptozo, nekrozo in avtofagijo. Ker so med seboj tesno povezane, se vse bolj uveljavlja teorija o enotnem mehanizmu celične smrti. Pri tem so apoptoza, nekroza in avtofagija zgolj trije deli mehanizma, ki med seboj sodelujejo in drug drugega regulirajo. Celica tako umre po poti, ki je glede na pogoje najbolj izvedljiva (9).

### **1.3.1.1 Apoptoza**

Gre za dobro reguliran in aktiven proces, ki odstrani iztrošeno celico, pri tem pa ne vpliva na celice v njeni okolici. Opazimo značilne morfološke spremembe: skrčenje celic, prekinitev medceličnih stikov, zaobljenje celic, notranje membrane in organeli postanejo bolj skoncentrirani, plazma vizualno potemni. Metabolna aktivnost celic ostane znatna še dolgo v proces apoptoze. Jedro, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat in ostale organele, bistvene za preživetje, endonukleaze razgradijo v posamezne fragmente, temu pa sledi še razpad celice na številne manjše delce – apoptotska telesca. Gradniki citoplazme ne iztečejo iz celice, zato apoptozi ne sledi vnetni odgovor, saj fragmentaciji sledi fagocitna odstranitev. Do izvršitve apoptoze lahko pride preko aktivacije kaspaz ali neodvisno od kaspaz preko apoptozo inducirajočega faktorja (AIF). Obstajajo tri poti aktivacije kaspaz: ekstrinzična, intrinzična in od grancima B odvisna pot (9).

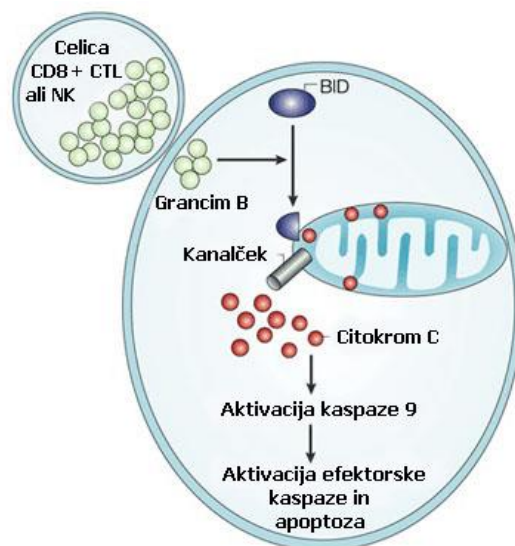
V ekstrinzični poti (Slika 2) pride do združitve receptorjev smrti (Fas, TNF-R, TRAIL-R) in njihovih ligandov (FasL, TNF, TRAIL). To inducira tvorbo smrt inducirajočega oligomernega kompleksa (DISC) na citoplazemski strani plazemske membrane, ki vsebuje smrtno domeno FADD, kaspazo 8 in kaspazo 9. DISC aktivira kaspaze 3, 6 in 7, to pa privede do celične smrti. Antagonist celične smrti je FLICE inhibitorni protein (c-FLIP), encimatsko neaktiven sorodnik kaspaz 8 in 10, ki se veže na DISC in tako prepreči apoptozo (9, 10).



Slika 2: Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze; povzeto po (11).

Intrinzično pot (Slika 2) sprožijo različni znotraj- in zunajcelični stresni dejavniki (pomanjkanje ravnega faktorja, poškodbe DNA, indukcija onkogenov, hipoksija, citotoksične učinkovine). Poglavitni dogodek je povečanje prepustnosti mitohondrijske membrane. Prepustnost nadzorujejo proapoptotični in protiapoptotični člani družine proteinov Bcl-2, pri tem pa slednji prožijo ali zavirajo heterodimerizacijo proapoptotičnih članov. Med proapoptotične proteine spadajo proteini Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bmf, NOXA in PUMA, med protiapoptotične proteine pa proteini Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> in Mcl-1. Serija biokemičnih dogodkov privede do poškodbe mitohondrijske membrane, ki ji sledi sprostitvev citokroma C in drugih proapoptotičnih molekul (Smac/DIABLO) iz notranje membrane v citosol. Citokrom C, apoptotično proteazo aktivirajoči faktor 1 (APAF-1) in kaspaza 9 tvorijo apoptosom, ki aktivira eksekutorske kaspaze, te pa izvršijo celično smrt (9, 10).

Od grancima B odvisna pot aktivacije kaspaz (Slika 3) se sproži z dostavo grancimov v tarčne celice. Dosežena je s pomočjo specializiranih granul, ki jih sprostijo citotoksični limfociti T ali celice naravne ubijalke. Granule vsebujejo tudi protein perforin, ki tvori pore v membrani mitohondrija in tako omogoči vstop grancimom. Grancim B cepi proapoptotični protein Bid ter kaspazi 3 in 7 in tako sproži apoptozo (9).



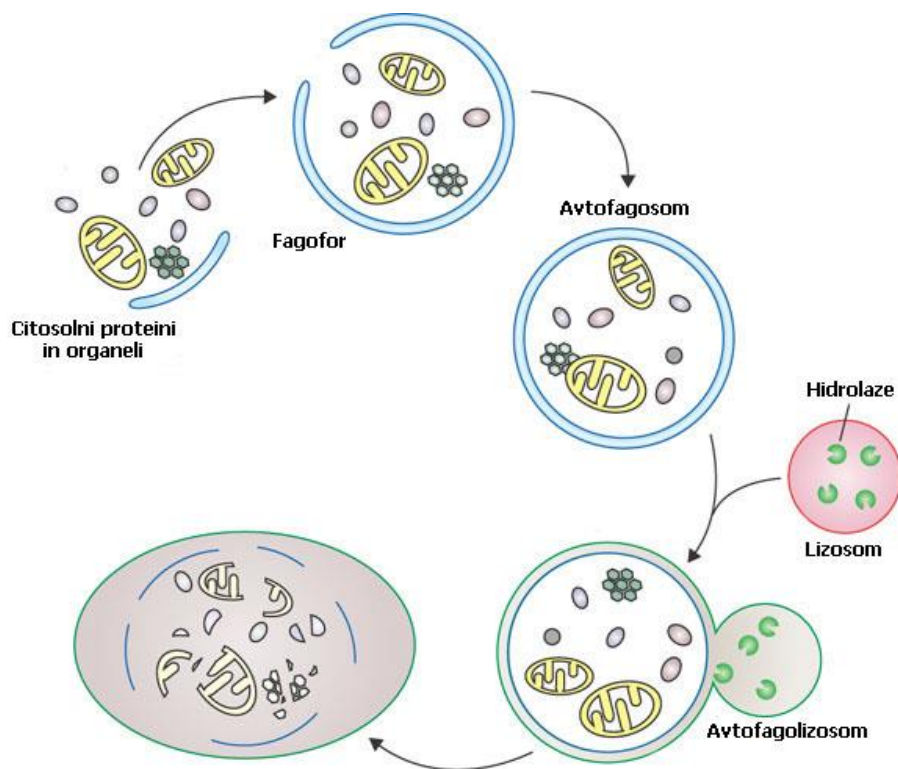
Slika 3: Od grancima B odvisna pot apoptoze; povzeto po (11).

### 1.3.1.2 Avtofagija

Avtofagija je proces razgradnje celičnih komponent ali celotne celice za potrebe reciklaže celičnega materiala ali izvršitve celične smrti. Razgradne produkte v citoplazmi zajamejo avtofagosomi, ki se nato z lizosomi zlijejo v avtofagolizosome. V njih poteka hidrolizni razpad zajetih delcev. Do razgradnje celičnih organelov pride zgodaj, citoskelet pa ostane intakten še dolgo v proces. V veliki meri je avtofagija regulirana s tarčo rapamicina (mTOR), ki je pomemben regulator proteinske sinteze, ribosomske biogeneze ter avtofagije v sesalskih celicah, in z iniciatorjem tvorbe avtofagosoma Beclin-1. Pri tem je Beclin-1 tumor supresor, ki aktivira avtofagijo, ko je povezan z genom UVRAG in endofilinom B1 (Bif1). Tvorbo avtofagosoma vodi kompleks Atg13/Ulk1/FIP200. Skozi fosforilacijo proteina Atg13 ga destabilizira aktivacija poti PI3K/Akt/mTOR (9, 13).

Avtofagiji (Slika 4) pripisujemo tumorsupresorske in tumorpromotorske lastnosti. Tumorsupresorsko deluje z eliminacijo poškodovanih organelov in s tem preprečuje nabiranje reaktivnih kisikovih zvrsti v celici. Preprečuje tudi, da bi prišlo do nekroze pri metabolnem stresu, ter eliminira nukleoporin p62 in tako preprečuje prenos signala v poteh, ključnih za onkogenezo. Njeno tumorpromotorsko delovanje se kaže v rakavih celicah znotraj trdnih tumorjev, ki se zaradi pomanjkanja hranil preživljajo z reciklažo lastnih organelov.

Študije kažejo, da sta avtofagija in apoptoza tesno povezani, prav tako pa obstajajo tesne povezave med specifičnimi stimuli, ki ju sprožijo, in regulatornim mehanizmom, ki oba procesa povezuje. To pomeni, da regulatorji avtofagije lahko nadzorujejo apoptozo in obratno. Tako naj pri uporabi kemoterapevtikov ne bi prišlo le do apoptoze, pač pa tudi do autofagične oblike celične smrti (14).



Slika 4: Na celičnem modelu prikazano dogajanje tekom avtofagije; povzeto po (15).

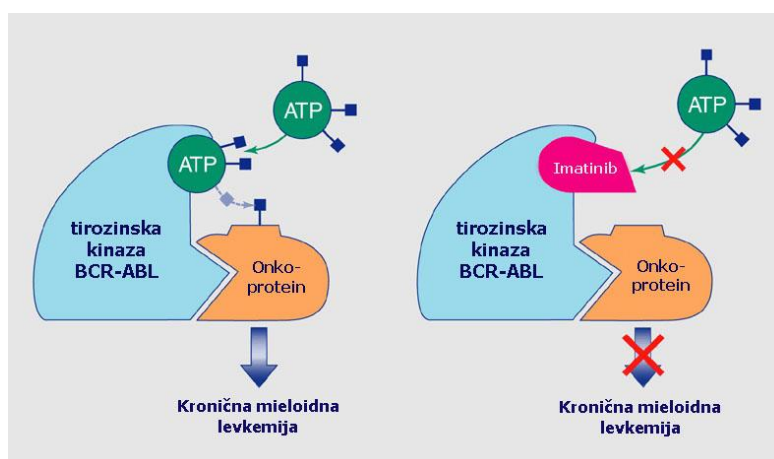
### 1.3.1.3 Nekroza

Nekrotična oblika celične smrti je posledica stresnih stanj, ki niso združljiva s preživetjem (patogeni, hude poškodbe). V primerjavi z apoptozo in avtofagijo velja za vsiljen in slabo reguliran proces. Sprožijo jo inhibicija celične proizvodnje energije, porušeno ravnotežje znotrajceličnega pretoka kalcija, nabiranje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in aktivacija neapoptotičnih proteaz. Na mikroskopskem nivoju opazimo skupke celic, ki sočasno otečejo. Jedrna DNA se predvsem na robu jedra skoncentrira (kariopiknoza), sledi fragmentacija jedra in njegov razpad. Opazimo eozinofilno obarvanje citoplazme, celični organeli pa se prično hitro in v naključnem vrstnem redu razgrajevati, zato celica kmalu ne kaže več znakov metabolne aktivnosti. Vsebina celice izteče in sproži vnetni proces. Ključni

dogodek tega procesa je izločitev skupine alarminov, molekul, ki stimulirajo vzorčno-spoznavna mesta na makrofagih, dendritičnih celicah in celicah ubijalkah. To privede do aktivacije limfocitov T in sproženja imunskega odziva. Sistem, ki želi zajezi infekcijo in nadaljne poškodbe tkiva, je tako poplavljen z vnetnimi limfociti, ostanke celic pa pogoltnejo in odstranijo makrofagi (9).

### 1.3.2 TERAPIJA KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE

Že leta jo uspešno zdravimo s selektivnimi zaviralci tirozinske kinaze. Najpogosteje uporabljana učinkovina je imatinib (Slika 5), industrijsko Glivec®, vedno bolj pa se uveljavljajo tudi zaviralci druge generacije (nilotinib, dasatinib) z bolj izrazitim učinkom. Popolna ozdravitev je možna le z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic, vendar pa je zaradi možnih zapletov tekom zdravljenja smrtnost pri tovrstni terapiji relativno visoka (do 30 %) (8).



Slika 5: Mehanizem delovanja imatiniba; povzeto po (16).

### 1.3.3 TERAPIJA AKUTNE MIELOIČNE LEVKEMIJE

Cilj terapije je odstranitev levkemičnih klonov in vzpostavitev normalne hematopoeze. Zdravljenje se prične z indukcijsko mielosupresivno terapijo, ki je namenjena dosegu popolne remisije (prisotnost manj kot 5 % blastov v kostnem mozgu) in vzpostavitvi normalnega števila celic. Sledi ji konsolidacijska terapija, namenjena preprečevanju ponovitve bolezni. Standardni režim za indukcijsko fazo novodiagnosticirane akutne

mieloične levkemije sestoji iz citarabina (citozin arabinozid) v kombinaciji z idarubicinom ali daunorubicinom (antraciklina). Če popolna remisija ni dosežena, lahko vpeljemo drug krog indukcijske terapije, ki lahko vsebuje visok odmerek citarabina (HDAC) ali kombinacije mitoksantron-etopozid (NOVE), vendar pa je možnost uspeha terapije manjša. V kolikor pacienti ne dosežejo popolne remisije niti po dveh poskusih indukcijskega zdravljenja, jih imenujemo za obolele s primarno refraktorno boleznijo in je njihova prognoza slaba. Tekom konsolidacijske terapije pacienti praviloma prejmejo dva cikla IDAC (idarubicin-citozin), NOVE ali redkeje HDAC. Pri izbiri upoštevamo stanje bolnika in režim zdravljenja v indukcijski fazi. Trajanje remisije lahko izboljšata alogenična presaditev kostnega mozga (soroden HLA tip tkiva) ali transplantacija avtolognega kostnega mozga (po 50. letu starosti in brez ustreznega darovalca) (7, 16).

#### 1.3.4 NOVE TERAPEVTSKE STRATEGIJE ZA ZDRAVLJENJE AML

V veliko primerih akutnih mieloičnih levkemij so prisotne kromosomske spremembe, ki so vpletene v tvorbo specifičnih fuzijskih genov. Ti kodirajo fuzijske proteine in vplivajo na celično delitev, preživetje in apoptozo celic. Vse bolj narašča interes za terapevtske strategije, ki ubijajo levkemične celice po ekstrinzični poti apoptoze. Nekateri člani družine TNF (TNF- $\alpha$ , FasL in TRAIL) sprožijo apoptozo direktno, njihovo aktivacijo pa bi lahko uporabili za indukcijo smrti tumorskih celic. Zaradi vnetnega učinka TNF- $\alpha$  in hepatotoksičnih protiteles proti Fas je najugodnejša terapija s TRAIL. Pri tem inhibitorji histonskih deacetilaz inducirajo s TRAIL posredovano apoptozo celic akutne mieloične levkemije. V različnih fazah kliničnih raziskav najdemo tudi mnoge druge perspektivne učinkovine: »multidrug resistance« inhibitorje, inhibitorje farnesil transferaze, inhibitorje histonskih deacetilaz, proteosomske inhibitorje, inhibitorje apoptoze in druge (17, 18).

## 2. NAMEN DELA

Študije kažejo, da imajo estri in amidi cimetne kisline z različno substituiranimi fenoli in anilini izrazit citotoksični učinek na rakave celice (19). Tako na intenziteto kot tudi na selektivnost njihovega delovanja lahko vplivamo z vpeljavo različnih substituent na fenolni/anilinski aromatski obroč. Visoko citotoksičnost, hkrati pa tudi izrazito selektivno delovanje za levkemične celice, dosežemo z vpeljavo ciano skupine na *para* mesto fenilnega obroča (19).

Namen diplomskega dela je sintetizirati različne derivate cimetne kisline in ovrednotiti njihov vpliv na celice levkemične in nelevkemične celične linije.

Eksperimentalni del bomo razdelili na tri dele:

- V prvem delu bomo ovrednotili citotoksično delovanje spojin na humani monocitni celični liniji THP1, pridobljeni iz krvi pacienta z akutno monocitno levkemijo. Uporabili bomo spojine, ki so bile že učinkovite na celičnih linijah HeLa, K526, Fem-6 in MCF-7 (19), testirali pa bomo tudi nekaj na novo sintetiziranih spojin. S testom MTS bomo proučili biološko aktivnost stimuliranih celic ob prisotnosti naših spojin in na podlagi dobljenih rezultatov sintetizirali nov set spojin z izboljšanimi lastnostmi.
- Na novem setu spojin bomo ponovno proučili metabolno aktivnosti stimuliranih celic THP1, nato pa izbrali spojine, ki najbolj inhibirajo njihovo delitev. Z metodo celične citometrije bomo ugotavljali, kako te spojine vplivajo na potek celičnega cikla.
- Spojinam, ki bodo pokazale najbolj obetavno citotoksično delovanje na celice linije THP1, bomo preverili še citotoksičnost na mononuklearnih celicah periferne krvi (PBMC) in z opazovanjem metabolne aktivnosti stimuliranih celičnih kultur določili selektivnost njihovega citotoksičnega delovanja.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.2.1 MATERIALI PRI SINTEZI SPOJIN

###### Reagenti in topila

Pri delu smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Aldrich, Chemika, Fluka, Jansen, Lek in Merck.

###### Sinteza

<b>Reagenti</b>	~ <i>trans</i> -cimetna kislina, cinamoil klorid, fenol, 4-nitrofenol, 4-ciano-3-fluorofenol, anilin, 4-aminobenzojska kislina, 4-aminobenzensulfonamid, DCC, DMAP, oksalil klorid, tionil klorid, brezvodni etanol, DMF, trietilamin in NaOH
-----------------	---

<b>Topila</b>	~ diklorometan, toluen, etilacetat, heksan, THF in dioksan
---------------	--

###### Izolacija

<b>Topila</b>	~ diklorometan, etilacetat, heksan in brezvodni etanol ( <i>pro analysi</i> )
---------------	---

<b>Spiranje</b>	~ 1M raztopina NaOH, koncentrirana HCl, 10% raztopina citronske kisline, nasičena raztopina NaHCO <sub>3</sub> in nasičena raztopina NaCl
-----------------	---

<b>Sušenje organske faze</b>	~ brezvodni Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
------------------------------	---



## Laboratorijska oprema

<b>Tehtnica</b>	~ Mettler Toledo PB403-S
<b>Rotavapor</b>	~ Büchi Rotavapor R-114
<b>Kromatotron</b>	~ Harrison Research Chromatotron HR 5146
<b>UV svetilka</b>	~ Lamag UV-CABINET II

### 3.2.2 MATERIALI PRI CELIČNIH TESTIH

#### Kemikalije

<b>Štetje celic</b>	~ raztopina tripanskega modrila (Sigma – Aldrich)
<b>Test MTS</b>	~ DMSO (Merck Chemicals) in Cell Titer 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (reagent, Promega)
<b>Celični cikel</b>	~ absolutni etanol (KEFO) in Propidijev jodid (Invitrogen)
<b>Selektivnost</b>	~ forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma-Aldrich), DMSO (Merck Chemicals) in Cell Titer 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (reagent, Promega)

#### Pufri

<b>Celični cikel</b>	~ fosfatni pufer s soljo (PBS), sestavljen iz NaCl, KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ultračiste vode
----------------------	--

## Encimi

**Celični cikel** ~ RNAza

## Celične kulture

**THP1** ~ Humana monocitna celična linija, pridobljena iz pacienta z akutno monocitno levkemijo.

**PBMC** ~ Mononuklearne celice periferne krvi z okroglim jedrom.

## Gojišče

Obe celični liniji smo gojili v mediju RPMI 1640 (Roswel Park Memorial Institute medium, Sigma - Aldrich) z dodatkom 10 % zarodnega govejega seruma (FBS), 1 % glutamina, 1 % mešanice antibiotikov (streptomicina in penicilina) in antimikotika (amfotericina B) v raztopini ter 0,1 % 2-merkaptetanola (Sigma – Aldrich).

## Laboratorijska oprema

**Analitska tehtnica** ~ Exacta 300 EB Tehtnica

**Centrifuga** ~ Centric 332A Tehtnica

**Inkubator** ~ Sanyo Incusafe MCO 18 AICI

**Komora LAF** ~ Iskra PIO M12TPP

**Mikrotitrne plošče** ~ TPP

**za gojenje kultur**

6, 12, 24 in 24 vdolbinic

<b>Mikrotitrski čitalec</b>	~ Tecan GENious
<b>Nastavki za pipete</b> do 10, 200, 300 ali 1000 $\mu\text{L}$	~ Sarstedt
<b>Pipete</b>	~ Biohit, Eppendorf Research plus
<b>Pretočni citometer</b>	~ BD FACS Calibour Flow cytometer
<b>Programska oprema za Tecan</b>	~ Magellan V3.X IVDTPP
<b>Stekleničke za gojenje celičnih kultur</b> s 25, 75 in 150 $\text{cm}^2$ rastne površine	~ TPP
<b>Svetlobni mikroskop</b>	~ Olympus CKX41
<b>Vodna kopel</b>	~ Memmert
<b>Vorteks</b>	~ Biosan Combi-spin

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 METODE PRI SINTEZI SPOJIN

##### 3.3.1.1 Kromatografske metode

Izvajali smo tankoplastno, kolonsko in radialno kromatografijo.

Tankoplastno kromatografijo smo izvajali na ploščicah z aluminijastim nosilcem in z 0,20 mm nanosom silikagela Silica gel 60 F254 (Merck). Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda = 254$  in 366 nm) in orositvene reagente (bromtimol modro, ninhidrin).

Kolonsko kromatografijo smo izvajali na silikagelu z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm (Merck).

Radialno kromatografijo smo izvajali na ploščah za Chromatotron®, ki smo jih pripravljali sami. Pri tem smo uporabljali silikagel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck).

### **3.3.1.2 Spektroskopske metode**

Identiteto sintetiziranih spojin smo potrjevali z <sup>1</sup>H NMR, masnimi in IR spektri.

<sup>1</sup>H NMR spettri so bili posneti v DMSO ali CDCl<sub>3</sub> na dveh inštrumentih: Bruker Avance DPX 300 v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani (300 MHz) in Bruker Avance III 400 MHz (400 MHz) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot interni standard je bil uporabljen TMS.

Masni spektri so bili posneti v tehnikah FAB in EI na inštrumentu Varian-MAT 311 A na Inštitutu Jožefa Stefana.

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

### **3.3.1.3 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.

### **3.3.1.4 Določevanje tališč**

Določali smo nekorrigirana tališča in sicer na mikroskopu z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A.

### **3.3.1.5 Risanje formul spojin**

Za risanje strukturnih formul smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw, verzijo 12.0, Cambridge Soft 1986-2009.

### 3.3.2 METODE PRI CELIČNIH TESTIH

Subkultiviranje celičnih kultur in pripravo vzorcev za štetje celic, teste metabolne aktivnosti in pretočno citometrijo smo izvajali v aseptičnih pogojih v komori LAF. Sterilnost v njej je zagotovljena mehansko, s stalnimi pretokom skozi filtre HEPA prečiščenega zraka. Postavljena je v prostor s strožjim režimom čistote. Vanj lahko vstopamo oblečeni v posebna zaščitna oblačila in z obutvijo, ki je ne uporabljamo v drugih prostorih. Pred pričetkom dela za pol ure vklopimo obsevanje z UV svetlobo, da uničimo morebitne kontaminante. Površino komore pred pričetkom in po koncu dela razkužimo s 70 % etanolom. Predmete, ki jih želimo v komoro vnesti, pred vnosom vsakokrat razkužimo s 70 % etanolom. Ploščice in stekleničke za gojenje celičnih kultur, mikrocentrifugirke, epruvete s pokrovčki in ovite steklene pipete, katerih notranja površina mora ostati sterilna, vnašamo originalno zaprte in jih odpiramo šele v komori. Pri delu uporabljamo rokavice, ki jih pred vsakim vstopom v komoro razkužimo s 70 % etanolom.

Pipetiranje vzorcev v komoro za štetje celic, merjenje absorbance pri testih za določevanje metabolne aktivnosti in meritve na pretočnem citometru smo izvajali v nesterilnih pogojih.

#### 3.3.2.1 Odmrzovanje celic

Obe celični liniji shranjujemo po postopku krioprezervacije v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom pri  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kot medij uporabljamo dimetilsulfoksid (DMSO), ker zmanjša nastanek ledenih kristalčkov tekom procesa, hkrati pa zniža koncentracijo topljencev in s tem zmanjša vpliv ionskega stresa na celico. Upoštevati moramo, da gre za hipertonično snov, ki lahko povzroči osmotske poškodbe celic, zato moramo biti pri zamrzovanju in odtaljevanju celičnih kultur še posebej previdni.

Pred začetkom odtaljevanja smo medij RPMI ogreli na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Krioampulo smo vzeli iz Dewarjeve posode in jo pomočili v vodno kopel, ogreto na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Med taljenjem smo jo potresali, da se je njena vsebina hitreje raztopila. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko in ji dodali segret medij, najprej 2 mL počasi po kapljicah, nato pa še preostanek. Suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 1200 obratih/min in odpipetirali supernatant. Preostanek smo resuspendirali v ustreznem volumnu ogretega medija RPMI, suspenzijo prenesli v sterilno ploščico za gojenje celičnih kultur in celice inkubirali v inkubatorju pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ .

### 3.3.2.2 Gojenje celic

Celice smo gojili v mediju RPMI z dodatkom 10 % FBS, 1 % glutamina, 1 % mešanice antibiotika in antimikotika ter 0,1 % 2-merkaptoetanol. Suspenzije celic smo shranjevali v stekleničkah in ploščicah za gojenje celičnih kultur in sicer v inkubatorju pri 37 °C in v 5 % atmosfere CO<sub>2</sub>.

### 3.3.2.3 Subkultiviranje celičnih kultur

Za optimalno rast celice v svojem okolju potrebujejo zadostno količino hranilnih snovi in čim manjšo količino toksičnih metabolnih produktov. Ker se tekom življenjskega cikla intenzivno delijo, jim nespremenjeno okolje z omejeno količino hranilnih snovi in prostora za rast kmalu ne more več nuditi ugodnih pogojev za preživetje. Da bi zavoljo zmanjšanja variabilnosti pri kasnejšem testiranju zagotovili optimalne pogoje za celično rast, smo celično kulturo trikrat tedensko redčili z medijem.

Celice smo najprej prešteli pod mikroskopom, nato pa preračunali, koliko medija moramo dodati določeni koncentraciji celic, da bomo dobili končno koncentracijo 1 x 10<sup>6</sup> celic/mL (0,5 x 10<sup>6</sup> celic/mL ob koncih tedna). Kulture smo redčili v stekleničkah ali ploščicah za gojenje celičnih kultur z medijem RPMI. Celice smo shranjevali v inkubatorju pri 37 °C in v 5 % atmosfere CO<sub>2</sub>.

### 3.3.2.4 Štetje celic

Celično kulturo smo najprej dobro premešali in se s tem znebili skupkov celic. Nato smo 10 µL celične kulture dodali 10 µL tripsanskega modrila, ki vdre skozi poškodovano membrano mrtvih celic in jih obarva modro, žive pa pusti neobarvane. Rastopino smo ponovno premešali in 10 µL nastale mešanice odpipetirali v komorico za štetje celic. Pod mikroskopom smo prešteli celice v vseh štirih kvadrantih in dobljeno število preračunali v število celic/mL celične kulture (Slika 6).

$$\frac{A + B + C + D}{4} \times DF \times 10^4 = \text{število celic/mL}$$

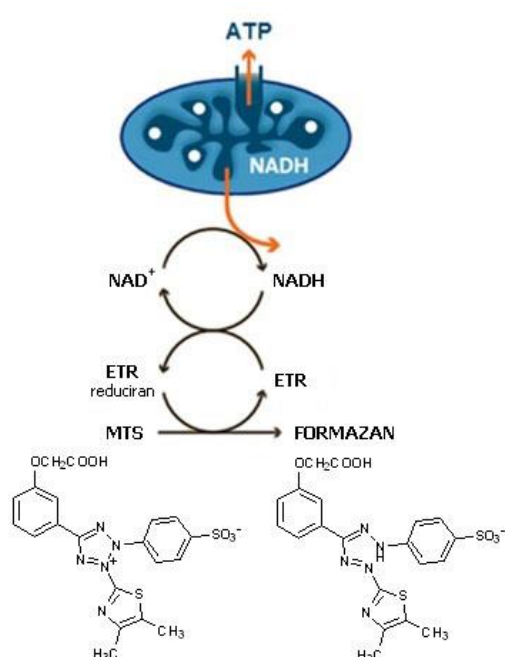
**Slika 6: Enačba za izračun števila celic/mL.**  
A, B, C in D predstavljajo število celic v posameznem kvadrantu označenega polja komorice  
DF predstavlja faktor redčenja celične kulture.

### 3.3.2.5 Priprava raztopin derivatov cimetnih kislin v DMSO

Pripravili smo 100 mM »stock« raztopine derivatov cimetnih kislin, ki smo jih kasneje razredčili na 0,1 mM, 1,0 mM in 10,0 mM.

Najprej smo na analitski tehtnici stehali zaprte sterilne prazne in označene mikrocentrifugirke. V komori LAF smo mikrocentrifugirke odprli, v vsako dali nekaj kristalčkov ustrezne spojine in jih ponovno zaprli. Takšne smo ponovno stehali in določili maso spojine v mikrocentrifugirkah. Iz dobljenega podatka smo izračunali, koliko  $\mu\text{L}$  DMSO je potrebno dodati, da bo končna koncentracija raztopine 100 mM, in koliko topila je potrebno dodati 100 mM raztopini, da bomo dobili preostale tri redčitve.

### 3.3.2.6 Test MTS



Slika 7: Reakcijska shema pretvorbe MTS-a;  
povzeto po (22).

Gre za kolorimetrično metodo določevanja števila metabolno aktivnih celic, ki se pogosto uporablja pri proučevanju celične delitve ali kemosenzitivnosti celic. Reagenčna raztopina, ki jo pri testiranju uporabljamo, vsebuje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevo sol (MTS) in fenazin etosulfat (phenazine ethosulfate, PES). Pri tem je MTS indikator celične viabilnosti, PES pa prenašalec elektronov in kemijski stabilizator reagenčne raztopine. Tetrazolni obroč cepijo hidrolaze v aktivnih mitohondrijih. MTS pretvorijo v vijolično obarvane formazanske produkte, topne v celičnem mediju

(Slika 7). Količina nastalih produktov je sorazmerna količini živih celic. Določimo jo tako, da z ELISA čitalcem izmerimo absorbanco z MTS obarvane negativne kontrole in absorbanco z MTS obarvanega stimuliranega vzorca pri valovni dolžini 492 nm, nato pa izračunamo razliko med izmerjenima vrednostima (20, 21).

## POSTOPEK

V ploščico s 24 vdolbinicami smo odpipetirali po 500  $\mu\text{L}$  suspenzije s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL, pri tem smo določili vdolbinico za negativno kontrolo, vdolbinico za negativno kontrolo z dodatkom DMSO in vdolbinice za stimulacijo celic s testnimi spojinami. Celice v vdolbinici za negativno kontrolo smo inkubirali brez dodatkov, celicam v vdolbinici za negativno kontrolo z dodatkom DMSO smo dodali 5  $\mu\text{L}$  DMSO, v vdolbinice za stimulacijo celic pa posamezno po 5  $\mu\text{L}$  testnih spojin v koncentracijah 0,1  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  in 10,0  $\mu\text{M}$ . Tako pripravljene ploščice smo inkubirali v inkubatorju v 5 % atmosfere  $\text{CO}_2$  pri 37 °C.

Za merjenje absorbance smo po 24 in 48 urah iz vdolbinic s tretirano celično kulturo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami prenesli vsakokrat po dva 100  $\mu\text{L}$  alikvota. Vsakemu alikvotu smo dodali 10  $\mu\text{L}$  reagenčne raztopine, nato pa mikrotitrsko ploščico inkubirali pri 37 °C in v atmosferi 5 %  $\text{CO}_2$ . Po 2 urah smo na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan izmerili absorbance vzorcev. Absorbance slepega vzorca smo odšteli od absorbance vzorcev stimulirane celične kulture, absorbance negativne kontrole in absorbance negativne kontrole z dodatkom DMSO. Izračunali smo deleže metabolno aktivnih celic (Slika 8), dobljene podatke pa nato statistično ovrednotili in jih grafično prikazali.

$$\text{Delež metabolno aktivnih celic} = \frac{\bar{A}_{vz} - A_{sl}}{\bar{A}_{neg} - A_{sl}}$$

**Slika 8: Enačba za izračun deleža metabolno aktivnih celic.**

$\bar{A}_{vz}$  predstavlja povprečje izmerjenih absorbanc alikvotov vzorcev s spojinami stimulirane kulture ali alikvotov negativne kontrole z dodatkom DMSO.

$\bar{A}_{neg}$  predstavlja povprečje izmerjenih absorbanc alikvotov negativne kontrole.

$A_{sl}$  predstavlja absorbance slepega vzorca.

Tako smo iz rezultatov za stimulirane vzorce ugotovili vpliv testnih spojin na metabolno aktivnost celic, iz rezultata za negativno kontrolo z dodatkom DMSO pa vpliv DMSO na metabolno aktivnost celic. Slednje je pomembno, ker DMSO izkazuje citotoksične lastnosti. Ker smo ga uporabili kot topilo za raztapljanje testnih spojin, bi lahko prispeval k citotoksičnim učinkom testiranih spojin.

### 3.3.2.7 Aktivacija PBMC s PMA

PBMC ali mononuklearne celice periferne krvi so del populacije belih krvnih celic, odgovoren za protitumorni imunski odgovor. Pomembne so tako v prisotnosti proonkogenih



dejavnikov, kot v prisotnosti citostatikov. Na podlagi učinkov spojin na celice PBMC in na rakave celice lahko ovrednotimo protitumorni potencial spojin. Kot spojine z visokim protitumornim potencialom smatramo tiste, ki imajo dobro izražen citostatični učinek na rakave celice, hkrati pa slabo izražen ali ničn citostatični učinek na celice PBMC. S tem se ohrani naravna sposobnost celic PBMC za ubijanje rakavih celic (18).

Citostatični učinek spojin na nerakavo celično linijo PBMC smo prav tako določali z metodo MTS. Spojine smo hkrati testirali na celični liniji brez dodatkov in na celični liniji, ki smo ji predhodno dodali stimulator celične delitve PMA. Gre za diester forbola, forbol 12-miristat 13-acetat. Njegov učinek izvira iz podobnosti z diacil glicerolom, ki je znan aktivator signalnega prenosa encima protein kinaza C (PKC). Iz sočasnega testiranja celic, stimuliranih s PMA, in nestimuliranih celic tako ugotovimo, ali je testirana spojina sposobna zatreti stimulacijo proliferacije s PMA. V primeru, da jo zatira, lahko sklepamo, da vsaj delno zavira tudi nespecifično imunsko stimulacijo (19, 23).

## **POSTOPEK**

V dveh stekleničkah za gojenje celičnih kultur smo pripravili za posamezno testno paralelko dovoljšen volumen celične kulture s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL. V eno izmed stekleničk smo dodali toliko raztopine PMA (2  $\mu\text{g/mL}$ ), da je bila končna koncentracija PMA v celični kulturi 3  $\text{ng/mL}$ . Suspenzijo smo dobro premešali in 500  $\mu\text{L}$  alikvote prepipetirali v ploščico s 24 vdolbinicami. Dobro premešano suspenzijo v netretiranem flasku smo prav tako porazdelili v 500  $\mu\text{L}$  alikvote in obe ploščici do nadaljevanja testiranja inkubirali pri 37  $^{\circ}\text{C}$  v atmosferi 5 %  $\text{CO}_2$ .

Po 6 urah smo na obeh ploščicah ponovno določili vdolbinico za negativno kontrolo, vdolbinico za negativno kontrolo z dodatkom DMSO in vdolbinice za stimulacijo celic s testnimi spojinami. Prvo smo pustili brez dodatkov, v vdolbinico za negativno kontrolo z dodatkom DMSO smo dodali 5  $\mu\text{L}$  DMSO, v preostale pa po 5  $\mu\text{L}$  testnih spojin s koncentracijami 0,1  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  in 10,0  $\mu\text{M}$ . Tako pripravljene ploščice smo vrnili v inkubator.

Po 24 in 48 urah smo iz vdolbinic ploščic s tretirano celično kulturo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami prenesli vsakokrat po tri 100  $\mu\text{L}$  alikvote posameznega vzorca. Vsakemu alikvotu smo dodali 10  $\mu\text{L}$  reagenčne raztopine, nato pa mikrotitrski ploščici še dve uri

inkubirali pri 37 °C v 5 % atmosfere CO<sub>2</sub>. Na čitalcu mikrotitrskih ploščic smo izmerili absorbanco vzorcev in rezultate meritev prikazali na enak način kot v prejšnjem primeru.

### 3.3.2.8 Pretočna citometrija

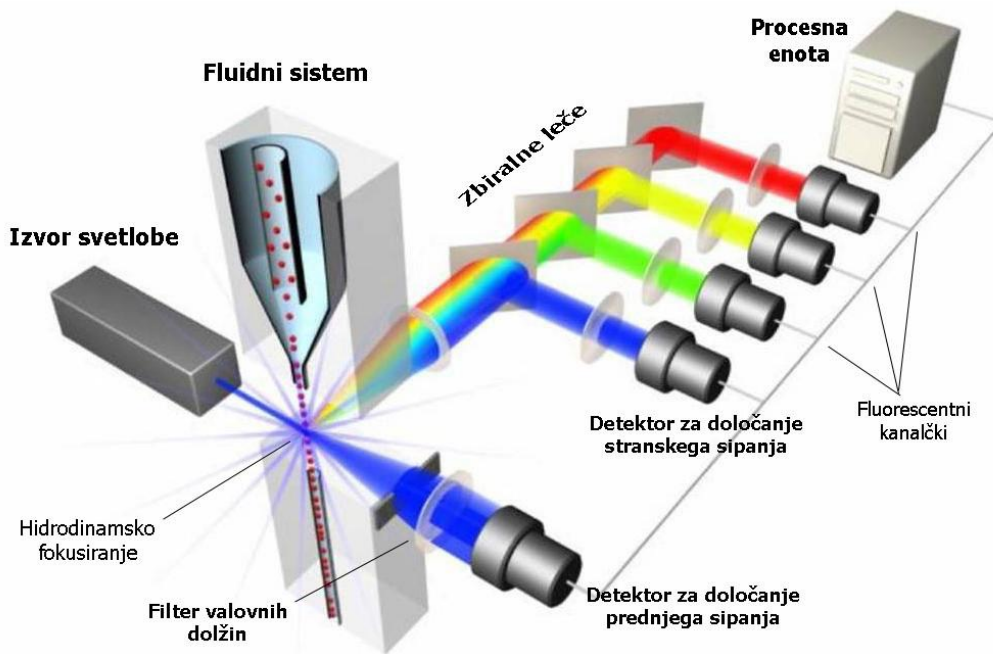
Pretočna citometrija je tehnologija, ki sočasno meri in nato analizira mnoge fizikalne lastnosti posameznih delcev v velikosti med 0,2 in 150 µm, najpogosteje celic. Z njo določamo relativno velikost delcev, relativno zrnatost ali notranjo kompleksnost celic in relativno intenziteto fluorescence. Navedene karakteristike določamo glede na to, kako se žarek vpadne svetlobe razprši ob stiku s celico ali delcem.

Citometer (Slika 9) sestavljajo trije sistemi: tekočinski, optični in elektronski. Namen tekočinskega sistema je vodenje delcev do laserskega žarka. Za optimalne meritve mora biti tok delcev nameščen v center laserskega žarka, prav tako pa moramo zagotoviti, da skozi pretočno celico naenkrat potuje samo en delec. To dosežemo s hidrodinamskim fokusiranjem – v pretočni celici se z veliko hitrostjo pretaka krovna tekočina (“sheath fluid”), vanjo pa počasi injiciramo vzorčno raztopino. Optični sistem sestavljajo laserji in optični filtri. Laserji osvetljujejo delce v vzorcu, optični filtri pa usmerjajo dobljene svetlobne signale k ustreznim detektorjem. Ko se žarek in vzorčni delec srečata, pride do sipanja svetlobe. Na celoten obseg sipanja vplivajo celična membrana, jedro, granuliranost celice, njena oblika in njena površina.

Ločimo prednje in stransko sipanje svetlobe. Prednje sipanje (“forward angle light scatter” ali FALS) je sorazmerno površini celice in njeni velikosti. Stransko sipanje (“right angle light scatter” ali RALS) je sorazmerno zrnatosti celice oziroma njeni notranji kompleksnosti. Za razliko od prednjega sipanja, ki ga zbiramo nasproti izvoru svetlobe, stransko sipanje zbiramo z zbiralno lečo pravokotno na potek žarka in ga nato preusmerimo na detektor. Kombinacija meritev na detektorjih “forward scatter channel” (FSC) in “side scatter channel” (SSC) omogoči razlikovanje tipov celic v heterogeni celični populaciji in jo s pridom uporabljamo pri določevanju glavnih podskupin levkocitov.

Elektronski sistem prevede detektirano svetlobo v elektronski signal, ki ga nadalje procesiramo s pomočjo računalnika. Detektorji v pretočnem citometru so silikonske fotodiode in fotopomnoževalke. Pri tem se silikonske fotodiode ponavadi uporabljajo za

merjenje prednjega sipanja, saj je v tem primeru dobimo močan signal. Fotopomnoževalke so bolj občutljive, zato se uporabljajo za merjenje stranskega sipanja in emitirane svetlobe pri fluorescenci (24, 25).



Slika 9: Pretočni citometer; povzeto po (26).

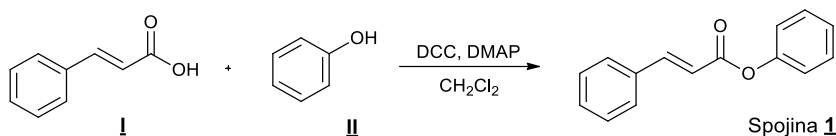
## POSTOPEK

Pripravili smo suspenzijo s koncentracijo  $2,5 \times 10^5$  celic/mL in odpipetirali po 500  $\mu$ L celične kulture v epruvete z zamaški, primerne za pretočno citometrijo. Pri 1200 obratih/min smo jih centrifugirali 5 min, supernatant odlili in celice resuspendirali v 2 mL hladnega 80 % etanola. Epruvete smo za 2 uri postavili v zmrzovalnik ( $-20$  °C), nato pa še 5 min centrifugirali pri 1200 obratih/min. Supernatant smo odlili in celicam dodali zmes barvila, RNAze in pufra (20  $\mu$ L propidijevega jodida, 5  $\mu$ L RNAze in 500  $\mu$ L PBS na vzorec). Vsebino epruvetk smo dobro premešali in jih inkubirali še 30 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorce analizirali na pretočnem citometru, rezultate pa grafično prikazali.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Sinteza derivatov cimetne kisline

#### 4.1.1 SINTEZA FENIL CINAMATA (Spojina **1**)



Slika 10: Sinteza fenil cinamata (Spojina **1**).

Cimetno kislino (0,741 g; 5,0 mmol) **I**, DCC (1,135 g; 5,5 mmol) in DMAP (0,061 g; 0,5 mmol) natehtamo v bučko, raztopimo v diklorometanu (25 mL) in mešamo 25 min na ledeni kopeli. Dodamo fenol (0,518 g; 5,5 mmol) **II**. Ko se kristalčki raztopijo, odstranimo ledeno kopel in mešamo pri sobni temperaturi še 48 ur. Reakcijsko zmes nato filtriramo, odparimo topilo in preostanek raztopimo v etil acetatu (50 mL). Raztopino speremo s hladno 0,1 M raztopino NaOH (2x25 mL), prečiščeno vodo (1x25 mL), 10 % citronsko kislino (2x25 mL), ponovno z vodo (1x25 mL) in na koncu z nasičeno vodno raztopino NaCl (1x25 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in odparimo topilo. Spojino očistimo z radialno kromatografijo (Chromatotron®). Razmerje sestavin mobilne faze tekom izpiranja postopoma spreminjamo od etilacetat : heksan = 1:10 do etilacetat : heksan = 1:5.

<b>Opis:</b>	beli kristali
<b>Izkoristek:</b>	57 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 5	0,47
<b>Tališče:</b>	68 – 72 °C (v literaturi (27): 72 – 73 °C)
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, CDCl <sub>3</sub>	<b>6,67</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO)

7,19 – 7,22 (m, 2H, H-Ar)

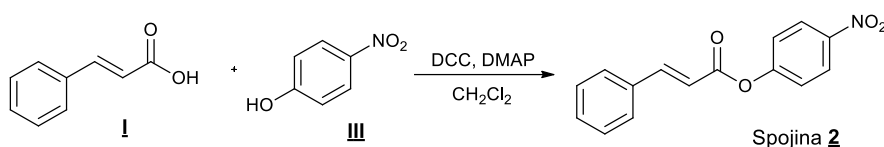
7,26 – 7,31 (m, 1H, H-Ar)

7,42 – 7,47 (m, 5H, H-Ar)

7,61 – 7,64 (m, 2H, H-Ar)

7,90 (d,  $J= 16,0$  Hz, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}$ )

#### 4.1.2 SINTEZA 4-NITROFENIL CINAMATA (Spojina 2)



Slika 11: Sinteza 4-nitrofenil cinamata (Spojina 2).

Cimetno kislino (2,222 g; 15 mmol) **I**, DCC (3,404 g; 16,5 mmol) in DMAP (0,183 g; 1,5 mmol) natehtamo v bučko, raztopimo v diklorometanu (75 mL), nato pa mešamo 30 min na ledeni kopeli. Dodamo 4-nitrofenol (2,087 g; 15 mmol) **III**. Ko se kristalčki raztopijo, odstranimo ledeno kopel in spojino mešamo na sobni temperaturi še 48 ur. Reakcijsko zmes filtriramo, odparimo topilo in preostanek raztopimo v etil acetatu (250 mL). Raztopino speremo s hladno 0,1 M raztopino NaOH (2x75 mL), s prečiščeno vodo (1x75 mL), z 10 % citrnsko kislino (2x75 mL), ponovno z vodo (1x75 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1x75 mL). Organsko fazo posušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in odparimo topilo. Spojino očistimo z radialno kromatografijo (Chromatotron®), pri čemer razmerje sestavin mobilne faze tekom izpiranja postopoma spreminjamo od etilacetat : heksan = 1:10 do etilacetat : heksan = 1:5.

**Opis:**

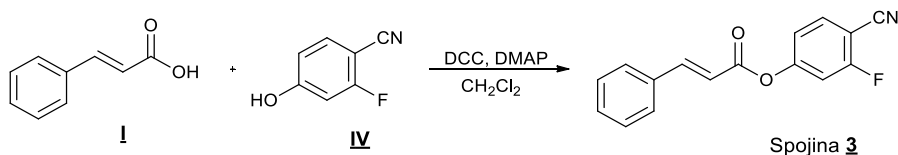
Beli igličasti kristali

**Izkoristek:**

78 %

<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 5	0,32
<b>Tališče:</b>	143 – 147 °C (v literaturi (28): 144 – 145 °C)
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, CDCl <sub>3</sub>	<b>6,65</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO) <b>7,38 – 7,43</b> (m, 2H, H-Ar) <b>7,45 – 7,50</b> (m, 3H, H-Ar) <b>7,60 – 7,66</b> (m, 2H, H-Ar) <b>7,94</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH) <b>8,30 – 8,35</b> (m, 2H, ArH)

#### 4.1.3 SINTEZA 4-CIANO-3-FLUOROFENIL CINAMATA (Spojina 3)



**Slika 12:** Sinteza 4-ciano-3-fluorofenil cinamata (Spojina 3).

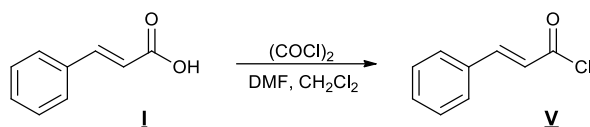
Cimetno kislino (0,187 g; 1,26 mmol) **I**, DCC (0,268 g; 1,3 mmol) in DMAP (0,024 g; 0,2 mmol) natehtamo v bučko, raztopimo v diklorometanu (25 mL) in mešamo 25 min na ledeni kopeli. Dodamo 4-ciano-3-fluorofenol (0,173 g; 1,26 mmol) **III**. Ko se kristalčki raztopijo, odstranimo ledeno kopel in spojino mešamo pri sobni temperaturi še 48 ur. Reakcijsko zmes filtriramo, odparimo topilo in preostanek raztopimo v etil acetatu (50 mL). Raztopino speremo z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2x50 mL), s prečiščeno vodo (1x50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Organsko fazo posušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in odparimo topilo. Spojino očistimo z radialno kromatografijo (Chromatotron®),

pri čemer razmerje sestavin mobilne faze tekom izpiranja postopoma spreminjamo od etilacetat : heksan = 1:10 do etilacetat : heksan = 1:5.

<b>Opis:</b>	beli kristali	
<b>Izkoristek:</b>	67 %	
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 2 : 1	0,29	
<b>Tališče:</b>	68 – 71 °C	
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, CDCl <sub>3</sub>	<b>6,62</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO) <b>7,15 – 7,22</b> (m, 2H, H-Ar) <b>7,44 – 7,50</b> (m, 3H, H-Ar) <b>7,61 – 7,64</b> (m, 2H, H-Ar) <b>7,66 – 7,72</b> (m, 1H, H-Ar) <b>7,93</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)	
<b>IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):</b>	3446,6; 2237,5; 1734,9; 1629,9; 1609,4; 1498,1; 1431,8; 1306,6; 1255,4; 1123,7; 981,0; 872,5; 773,9; 709,1; 682,0; 613,4; 490,0	
<b>ESI-MS: m/z:</b>	268 (M+H <sup>+</sup> )	
<b>Elementne analiza za</b> <b>C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>2</sub>:</b>	<b>% C<sub>izr.</sub> = 71,90</b>	<b>% C<sub>izm.</sub> = 71,70</b>
	<b>% H<sub>izr.</sub> = 3,78</b>	<b>% H<sub>izm.</sub> = 3,65</b>
	<b>% N<sub>izr.</sub> = 5,24</b>	<b>% N<sub>izm.</sub> = 5,23</b>

#### 4.1.4 SINTEZA FENIL CINAMIDA (Spojina 4)

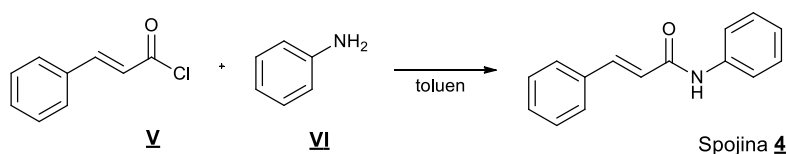
##### 1. Stopnja: Sinteza cinamoil klorida (**V**)



Slika 13: Sinteza cinamoil klorida (**V**).

V bučko zatehtamo cimetno kislino (1,755 g; 11,8 mmol) **1** in jo raztopimo v diklorometanu (40 mL). Raztopino ohladimo na 0 °C in ji dodamo dimetilformamid (2 kapljici) in oksalil klorid (1,21 mL; 18,7 mmol). Odstranimo ledeno kopel in eno uro segrevamo pri 45 °C. Produktu odparimo topilo, prebitni oksalilklorid pa azeotropno odstranjujemo z dodajanjem diklorometana (50 mL) in naknadnim odparevanjem mešanice topil (ponovimo dvakrat). Nastali produkt uporabimo takoj v naslednji stopnji sinteze.

##### 2. Stopnja: Sinteza fenil cinamida (Spojina **4**)



Slika 14: Sinteza fenil cinamida (Spojina **4**).

Toluenu (40 mL) v bučki dodamo anilin (3,22 mL; 35,4 mmol) **V**, nato pa ob mešanju počasi dokapavamo raztopino cinamoil klorida **VI**, sintetiziranega v prejšnji stopnji, v brezvodnem toluenu (20 mL). Reakcijsko zmes segrevamo 2 uri pri 90 °C, ohladimo na sobno temperaturo in pustimo reakcijo teči še 48 ur. Nastalo usedlino odstranimo s filtracijo z odesavanjem, bistri filtrat pa speremo z 1M raztopino HCl (2x50 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2x50 mL), s prečiščeno vodo (1x50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Spojino očistimo z radialno kromatografijo (Chromatotron®), pri tem pa razmerje sestavin mobilne faze tekom izpiranja spreminjamo od etilacetat : heksan = 1:10 do etilacetat : heksan = 1:5.

Opis:

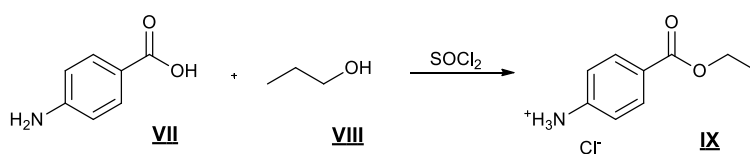
beli kristali



<b>Izkoristek:</b>	56 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 2	0,41
<b>Tališče:</b>	150 - 152° C (v literaturi (29): 150 – 152 °C)
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, CDCl <sub>3</sub>	<b>6,61</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, CH=CH-CO) <b>7,12 – 7,17</b> (t, 1H, H-Ar) <b>7,34 – 7,39</b> (m, 4H, H-Ar) <b>7,51 – 7,54</b> (m, 2H, H-Ar) <b>7,64 – 7,67</b> (d, 3H, H-Ar) <b>7,78</b> (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H, Ar-CH=CH)

#### 4.1.5 SINTEZA 4-CINAMIDOBENZOJSKE KISLINE (Spojina **5**)

##### 1. Stopnja: Sinteza etil 4-aminobenzoata (**IX**)

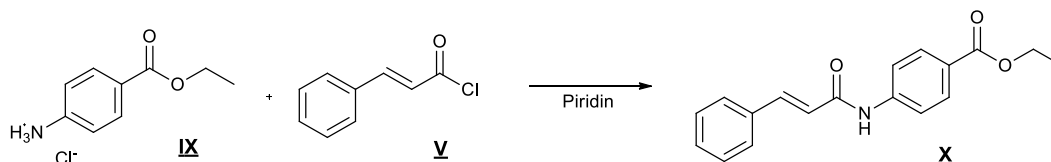


Slika 15: Sinteza etil 4-aminobenzoata (**IX**).

V bučko zatehtamo 4-aminobenzojsko kislino (5,485 g; 40 mmol) **VII**, jo raztopimo v brezvodnem etanolu (80 mL) **VIII** in raztopino ohladimo na ledeni kopeli. Med mešanjem dokapavamo tionil klorid ( $\text{SOCl}_2$ ; 6 mL; 82 mmol). Mešamo še 15 min, nato pa ledeno kopal odstranimo, počakamo, da se reakcijska zmes segreje na sobno temperaturo, jo 2 uri segrevamo pri 80 °C, ohladimo nazaj na sobno temperaturo in pustimo reakcijo teči še 36 ur. Dodamo toliko dietil etra, da izpade produkt. Kristale ločimo od raztopine s filtracijo z odsesavanjem in jih posušimo.

<b>Opis:</b>	beli kristali
<b>Izkoristek:</b>	89 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 2 : 1	0,62
<b>Tališče:</b>	102 – 105 °C (v literaturi (30): 99 – 101 °C)
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, DMSO	<b>1.29</b> (t, $J = 7,09$ Hz, 3H, -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <b>4.24</b> (q, $J = 7,09$ Hz, 2H, -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <b>6.69</b> (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-Ar) <b>7.80</b> (d, $J = 8.6$ Hz, 2H v H-Ar in 3H v Ar-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )

## 2. Stopnja: Sinteza etil 4-cinamidobenzoata (**X**)

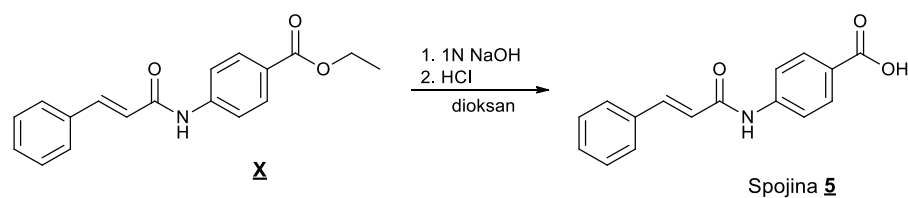


Slika 16: Sinteza etil 4-cinamidobenzoata (**X**).

V bučko zatehtamo etil 4-aminobenzoat (1,500 g; 6,2 mmol) **3** in ga raztopimo v piridinu (8 mL). Med mešanjem na ledeni kopeli po obrokih dodajamo cinamoil klorid (1,417g; 8,6 mmol) **4**, nato še 7 dni mešamo pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes razredčimo z etilacetatom (300 mL) in speremo z 10 % raztopino citronske kisline (1x50 mL), s prečiščeno vodo (1x50 mL), ponovno z 10 % raztopino citronske kisline (1x50 mL), ponovno z vodo (1x50 mL) in na koncu z nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Organsko fazo posušimo nad brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in odparimo topilo. Preostanek prekristaliziramo iz metanola.

<b>Opis:</b>	beli kristali
<b>Izkoristek:</b>	73 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 2	0,31
<b>Tališče:</b>	115 – 119 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, CDCl <sub>3</sub>	<p><b>1,40 – 1,43</b> (m, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)</p> <p><b>4,36 – 4,42</b> (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)</p> <p><b>6,60</b> (d, <i>J</i> = 15,5 Hz, 1H, CH=CH-CO)</p> <p><b>7,40 – 7,41</b> (m, 3H, H-Ar)</p> <p><b>7,53 – 7,55</b> (m, 2H, H-Ar)</p> <p><b>7,74 – 7,78</b> (m, 2H v H-Ar in 1H v CH=CH-CO)</p> <p><b>8,05 – 8,07</b> (m, 2H, H-Ar)</p>
<i>Analize ustrezajo spojini, objavljene v literaturi (31).</i>	

### 3. Stopnja: Sinteza 4-cinamidobenzojske kisline (Spojina 5):



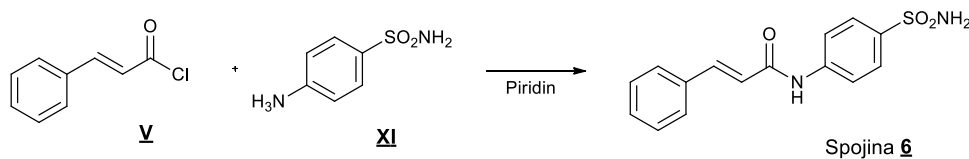
Slika 17: Sinteza 4-cinamidobenzojske kisline (Spojina 5).

V 1 M raztopino NaOH (15 mL) suspendiramo etil 4-cinamidobenzoat (1,000 g; 3,4 mmol) **X**, dodamo dioksan (10 mL) in 48 ur mešamo pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes

nakisamo s koncentrirano HCl do pH med 2 in 3. Nastalo oborino izoliramo s filtracijo z odsesavanjem in produkt posušimo.

<b>Opis:</b>	beli kristali
<b>Izkoristek:</b>	58 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 5	0,53
<b>Tališče:</b>	236 – 239 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR δ(ppm):</b> 300 MHz, DMSO	<p><b>6,87</b> (d, <math>J = 15,7</math> Hz, 1H, CH=CH-CO)</p> <p><b>7,44 – 7,47</b> (m, 3H, H-Ar)</p> <p><b>7,62 – 7,67</b> (m, 1H v CH=CH-CO in 3H v H-Ar)</p> <p><b>7,82</b> (d, <math>J = 8,8</math> Hz, 2H, H-Ar)</p> <p><b>7,93</b> (d, <math>J = 8,8</math> Hz, 2H, H-Ar)</p> <p><b>10,54</b> (s, 1H, CONH)</p> <p><b>12,78</b> (s, 1H, COOH)</p>
<i>Analize ustrezajo spojini, objavljeni v literaturi (32).</i>	

#### 4.1.6 SINTEZA 4-SULFANILFENIL CINAMIDA (Spojina **6**)



Slika 18: Sinteza 4-sulfanilfenil cinamida (Spojina **6**).

Sulfanilamid (1,362 g; 6,6 mmol) **V** suspendiramo v piridinu (8 mL). Suspenziji dodamo cinamoil klorid (1,105 g; 6,0 mmol) **XI** in reakcijsko zmes mešamo 5 dni pri sobni temperaturi. Nastalo oborino odstranimo s filtracijo z odsesavanjem, jo speremo z malo etil acetata in posušimo.

<b>Opis:</b>	bel amorfna snov
<b>Izkoristek:</b>	76 %
<b>RF:</b> etilacetat : heksan = 1 : 1	0,16
<b>Tališče:</b>	271 – 275 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> $\delta$ (ppm): 300 MHz, DMSO	<b>6,90</b> (d, $J = 15,7$ Hz, 1H, CH=CH-CO) <b>7,28</b> (s, 2H, SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ) <b>7,44 – 7,49</b> (m, 3H, H-Ar) <b>7,62 – 7,66</b> (m, 2H v H-Ar in 1H v CH=CH-CO) <b>7,78 – 7,81</b> (m, 2H, Ar- H) <b>7,87 – 7,89</b> (m, 3H, Ar-H) <b>10,67</b> (s, 1H, CONH)
<b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> ):	3354,9; 3070,3; 1672,5; 1620,6; 1589,9; 1523,4; 1399,8; 1328,3; 1249,4; 1148,8; 1095,1; 968,9; 902,3; 835,1; 703,1; 630,3; 586,9
<b>ESI-MS:</b> m/z:	303 (M+H <sup>+</sup> )

**Elementne analiza za**  
 **$C_{15}H_{14}N_2O_3S \times H_2O$ :**

**%  $C_{izr.}$  = 56,24**

**%  $C_{izm.}$  = 56,00**

**%  $H_{izr.}$  = 5,03**

**%  $H_{izm.}$  = 4,89**

**%  $N_{izr.}$  = 8,74**

**%  $N_{izm.}$  = 8,65**

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Komentar sinteze spojin

S sintezo derivatov cimetine kisline ne reguliramo samo biološke učinkovitosti, pač pa si prizadevamo tudi izboljšati njeno vodotopnost (2). Molekula cimetine kisline vsebuje tri reaktivna mesta: omogoča substitucijo na fenilnem obroču, reakcije karboksilne skupine in Michaelovo adicijo na mestu  $\alpha,\beta$ -nenasičenja. Ker obenem v organizmu ne kaže mutagenih lastnosti, je zelo zaželen fragment pri oblikovanju novih učinkovin (19).

Pripravili smo estre in amide cimetine kisline z različno substituiranimi fenoli in anilini. Spojine **1**, **2** in **3** so bile pripravljene iz cimetine kisline in fenolov (**II**, **III**, **IV**) ob prisotnosti sklopitvenega reagenta (DCC) in nukleofilnega katalizatorja (DMAP). Spojina **4** je amid cimetine kisline z nesubstituiranim anilinom. Tvorili smo ga tako, da smo cimetano kislino z dodatkom oksalil klorida ((COCl)<sub>2</sub>) najprej pretvorili v bolj reaktiven cinamoil klorid (**V**), temu pa nato dodali prebitno količino anilina (**VI**). **VI** je tako služil kot reagent in kot baza za nevtralizacijo pri reakciji nastale klorovodikove kisline (HCl).

Sintezo spojine **5** smo izvedli v treh stopnjah. V prvi smo karboksilno skupino p-aminobenzojske kisline (**VII**) zaščitili v obliki etilnega estra (**VIII**). Pri tem smo karboksilno skupino s tionil kloridom (SOCl<sub>2</sub>) najprej pretvorili v bolj reaktiven kislinski klorid, ki je takoj reagiral naprej s hidroksilno skupino etanola. Pri reakciji se je sproščala HCl, zato smo dobili produkt v obliki soli na amski skupini (**IX**). V naslednji stopnji smo tvorili amidno vez med **IX** in cinamoil kloridom (**V**) v piridinu, ki je služil kot topilo in kot baza za nevtralizacijo sproščene HCl. V zadnji stopnji smo z dodatkom 1 N NaOH odščitili zaščiteno karboksilno skupino in dobili končni produkt.

Tudi spojina **6** je amid cimetine kisline. Ker je sulfanilna skupina v danih pogojih dovolj nereaktivna, je pred reakcijo nismo zaščitili, tvorbo amida pa smo tudi tokrat izvedli z dodatkom kislinskega klorida cimetine kisline v piridinu.

### 5.2 Vpliv sintetiziranih spojin na metabolno aktivnost celic THP1

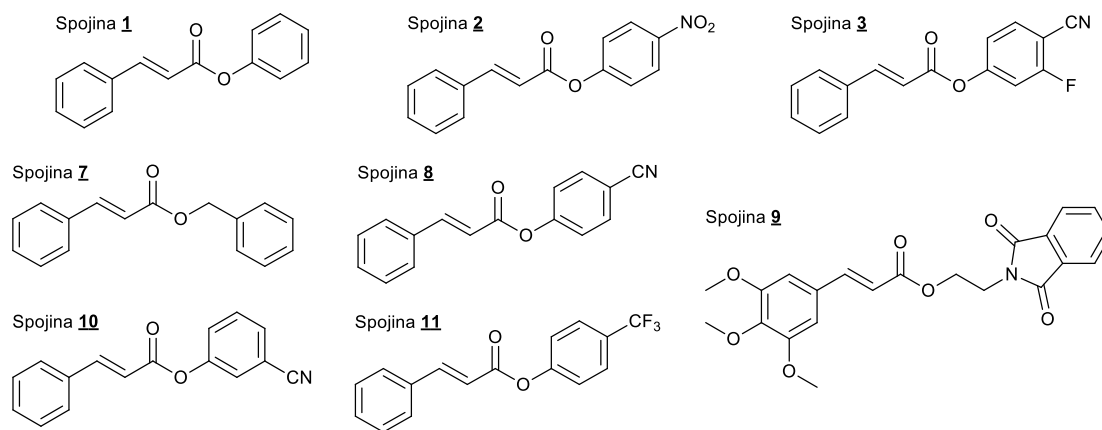
Študije na celičnih linijah adenokarcinoma materničnega vratu (HeLa), mieloične levkemije (K562), malignega limfoma (Fem-6) in raka dojke (MCF-7) so pokazale, da imajo

estri in amidi cimetne kisline z različno substituiranimi fenoli in anilini znatne citotoksične lastnosti. Pri tem pa spojine, ki imajo na aromatskem obroču fenolnega ali anilinskega dela pripete elektron privlačne funkcionalne skupine (predvsem ciano skupino), kljub citotoksičnosti proti rakavim celičnim linijam, ne kažejo bistvenega citotoksičnega učinka na nerakave celice (PBMC) (19).

V prvo serijo derivatov cimetne kisline smo tako vključili nekaj zelo aktivnih spojin iz prejšnje študije (19). Gre za spojine **1**, **7**, **8** in **9**, ki smo jih za potrebe testiranja resintetizirali. Ker se je spojina **8** izkazala za najbolj aktivno in selektivno delujočo na rakave celice, smo jo izbrali za modelno spojino naših eksperimentov.

### 5.2.1 VPLIV PRVE SERIJE DERIVATOV CIMETNE KISLINE

Pri načrtovanju novih spojin (Slika 19) smo izhajali iz dejstva, da ima glavno vlogo pri učinkovitosti spojine **8** elektron privlačna ciano skupina. Tako smo jo v primeru spojine **2** in **11** zamenjali z drugima elektron privlačnima funkcionalnima skupinama (NO<sub>2</sub> in CF<sub>3</sub>), v primeru spojine **3** pa smo na mesto *meta* aromatskega obroča modelne molekule vključili dodatno elektron privlačno skupino (F).

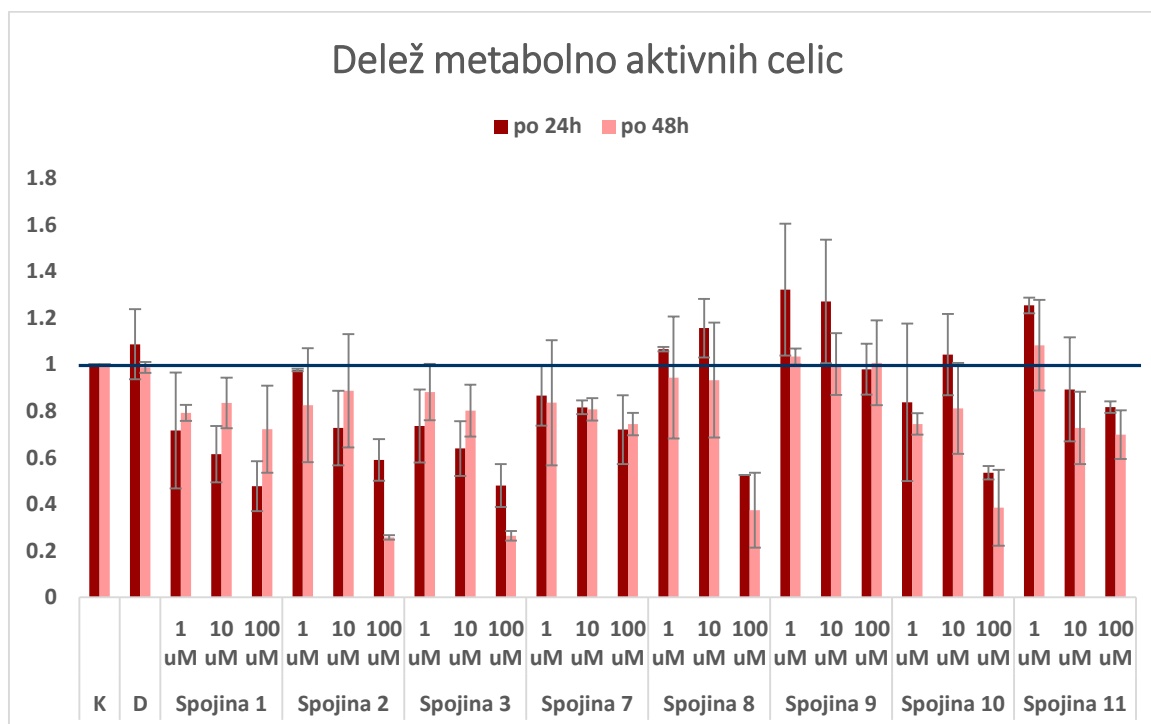


Slika 19: Strukturne formule prve serije testnih spojin.

Celično kulturo s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL smo inkubirali s spojinami **1**, **2**, **3**, **7**, **8**, **9**, **10** in **11** v koncentracijah 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M in 100  $\mu$ M. Po 24 in 48 urah smo dodali reagent MTS in 2 uri po dodatku izmerili absorbanco stimuliranih vzorcev ter negativne kontrole in negativne kontrole z dodatkom DMSO. Graf (Slika 20) prikazuje relativno metabolno



aktivnost celic, normalizirano na izsledke meritev metabolne aktivnosti nestimuliranih celic (negativna kontrola).



Slika 20: Deleži metabolno aktivnih celic linije THP1, stimuliranih s prvo serijo spojin, po 24 in 48 urah.

Pričakovali smo, da bodo spojine **1**, **7**, **8** in **9** pokazale podobno učinkovitost, kot pri testiranju na linijah HeLa, K562, Fem-6 in MCF-7. Rezultati meritev kažejo, da je opazno citotoksično aktivnost ohranila le spojina **1**, spojina **7** je manj učinkovita, spojina **9** pa na metabolno aktivnost celic nima vpliva. Spojina **8** je izrazit citotoksični učinek pokazala šele pri najvišji koncentraciji (100  $\mu$ M) in sicer po 48 urah, ko je delež metabolno aktivnih celic znižala na tretjino.

Od spojin **2** in **11** smo pričakovali podoben ali celo večji citotoksični učinek, kot je bil v študiji pripisan spojini **8**, saj imata obe molekuli elektron privlačno skupino na enakem mestu kot spojina **8**. Spojina **2** je tako res pokazala primerljivo in koncentracijsko odvisno aktivnost, medtem ko je bil učinek pri spojini **11** veliko manjši od učinka izvorne molekule. Ker se je spojina **2** tekom testiranja v celičnem mediju oborila, sklepamo, da so k zmanjšani relativni metabolni aktivnosti z njo stimuliranih vzorcev prispevale tudi mehanske poškodbe celic.

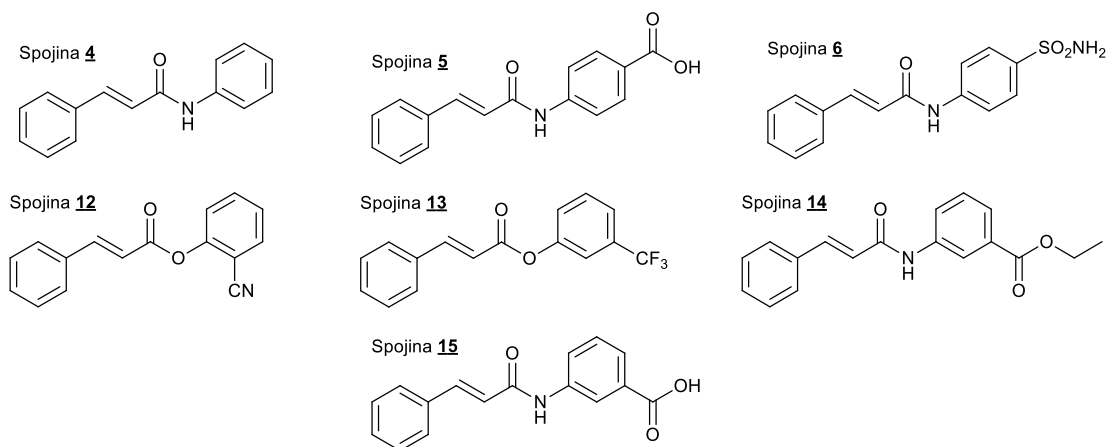
V primerjavi s spojino **8** ima spojina **3** zgolj dodan elektron privlačni atom fluor na *meta* mestu fenilnega obroča. Iz rezultatov meritev lahko razberemo, da disubstituiran derivat deluje bistveno bolj citotoksično kot spojina **8**, ima pa tudi ugodnejši profil koncentracijske odvisnosti.

Preverili smo še vpliv 1 % prisotnosti DMSO v celični kulturi, saj je bil v tolikšni meri kot topilo za testne spojine prisoten v vseh stimuliranih vzorcih. Rezultati meritev so pokazali, da ne prispeva k citotoksičnosti testnih spojin.

### 5.2.2 VPLIV DRUGE SERIJE DERIVATOV CIMETNE KISLINE

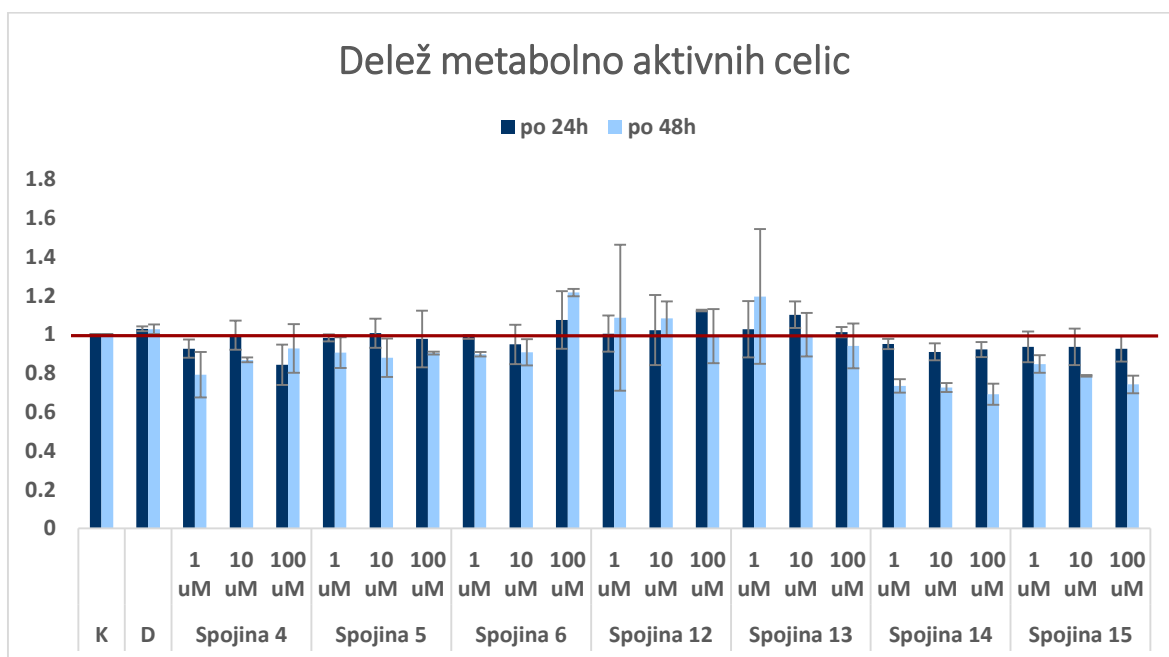
Na podlagi rezultatov testiranja prejšnje serije spojin smo sintetizirali nove spojine (Slika 21). Poleg izboljšanja citotoksičnih lastnosti smo želeli izboljšati tudi njihovo topnost, zato smo v strukturo uvedli določene hidrofilne fragmente. Namesto estrske vezi smo v spojine **4**, **5**, **6**, **14** in **15** uvedli bioizosterno amidno vez in s tem povečali stabilnost spojin. V primeru spojin **5**, **6** in **15** smo v strukturo vpeljali hidrofilno funkcionalno skupino (COOH, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Ker so se spojine z elektron privlačnima skupinama CN in CF<sub>3</sub> v prejšnji seriji izkazale za precej aktivne, smo ju uporabili tudi pri novih molekulah, vendar s spremenjeno lego na fenolnem obroču (spojini **12** in **13**). Sintezo disubstituiranih derivatov cimetine kisline smo zaradi vpeljave večjih funkcionalnih skupin opustili.

Pri uvajanju hidrofilnih fragmentov v molekulo smo upoštevali, da morajo biti uvedene funkcionalne skupine elektron akceptorji, hkrati pa polarne in sposobne tvoriti vodikove vezi. Vse tri pogoje najbolje izpolnjujejo spojine **5**, **6** in **15**.



Slika 21: Strukturne formule druge serije testnih spojin.

Celično kulturo s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL smo inkubirali s spojinami **4**, **5**, **6**, **12**, **13**, **14** in **15** v koncentracijah  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  in  $100 \mu\text{M}$ . Po 24 in 48 urah smo dodali reagent MTS in 2 uri po dodatku izmerili absorbanco stimuliranih vzorcev ter negativne kontrole in negativne kontrole z dodatkom DMSO. Graf (Slika 22) prikazuje relativno metabolno aktivnost celic, normalizirano na izsledke meritev metabolne aktivnosti nestimuliranih celic (negativna kontrola).



Slika 22: Deleži metabolno aktivnih celic linije THP1, stimuliranih z drugo serijo spojin, po 24 in 48 urah.

Spremembe v strukturi se pri spojinah znatno odražajo v izboljšani topnosti. Citotoksični učinek je bil najbolj opazen pri spojinu **15**, prav tako njen profil koncentracijske odvisnosti. Spojini **5** in **6** sta bistveno manj zavrla metabolno aktivnost celic.

Pri spojinu **4**, ki je amidni analog spojine **1** iz prejšnje serije, smo si želeli enakega ali večjega citotoksičnega učinka, hkrati pa izboljšane topnosti. Spojina je resda bolj topna, vendar pa je zavrlo zamenjave estrske vezi z amidno veliko manj citotoksična od spojine **1**.

Spojini **12** in **13** sta strukturna izomera spojin **8** in **11** iz prejšnje serije, vendar pa v nasprotju s svojima prednikoma ne izkazujeta vpliva na metabolno aktivnost celic.

Spojina **14** je etilni ester spojine **15** in izkazuje večjo citotoksičnost kot kislina. Sklepamo, da zato, ker gre za bolj lipofilno spojino, ki lažje preide celično membrano in je njena

koncentracija v celici verjento večja od koncentracije spojine **14**. Ker so estri dobro poznana predzdravila, je možno, da v celici lahko pride do hidrolize in tvorbe spojine **14**.

Izkazalo se je, da so v povprečju estrski derivati cimetne kisline veliko bolj aktivni od amidov. Druga serija spojin je tako pokazala manj vpliva na metabolno aktivnost celic.

Glede na rezultate meritev negativne kontrole z dodatkom DMSO 1 %, prisotnost DMSO v celični kulturi tudi tokrat ni vplivala na spremembo v metabolni aktivnosti celic.

### **5.3 Vpliv spojin na celični cikel linije THP1**

Odločili smo se za nadaljevanje z analizo celičnega cikla. Spojine **6**, **12** in **13** so sicer pokazale komaj opazen vpliv na metabolno aktivnost celic linije THP1, vendar pa smo jih v analizo celičnega cikla vključili, ker so učinkovito zatrle metabolno aktivnost limfocitnih celičnih linij (Ramos, Jurkat) (34), ki smo jih testirali sočasno.

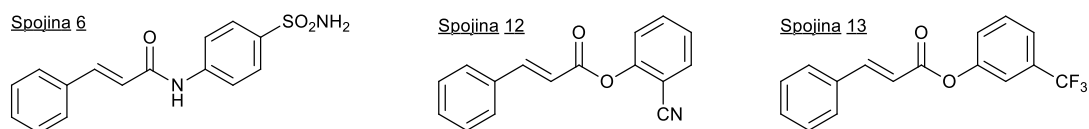
#### **5.3.1 CELIČNI CIKEL**

Gre za zaporedje faz celičnega zorenja in celične delitve. Razdelimo ga na fazo G<sub>1</sub>, fazo S, fazo G<sub>2</sub> in fazo M. Pri tem dogajanje v fazah G<sub>1</sub>, S in G<sub>2</sub> skupno imenujemo interfaza oziroma obdobje, ko se celica pripravlja na celično delitev. Faza G<sub>1</sub> nastopi po mitozu in je za fazo celične rasti. V njej poteka priprava na sintezo RNA in proteinov ter delitev centriol. Če je ob koncu faze surovin za podvajanje celičnega materiala dovolj (»check point«), nastopi faza S. Če ne, sledi faza mirovanja. Celice v tem primeru izstopi iz ciklusa in se ne deli (faza G<sub>0</sub>).

V kolikor faza sinteze oziroma faza S nastopi, pride do intenzivne sinteze proteinov in dednega materiala (iz enokromatidnih ponovno nastanejo dvokromatidni kromosomi). Faza G<sub>2</sub>, tudi polsintezna faza, je kratko obdobje pred mitozo. Celični stiki se prekinejo, izvaja se pospešena sinteza proteinov, specifičnih za mitozo, in RNA. V kolikor celica ob koncu te faze zadosti potrebam za delitev (»check point«), sledi mitoza. Faza M je faza celične delitve. V njej pride do delitve dednega materiala in prepolovitve celica. Nastaneta dve diploidni hčerinski celici z enokromatidnimi kromosomi. Trajanje enega cikla imenujemo generacijski čas. Opazovanje celičnega cikla je posebej pomembno pri terapiji tumorskih obolenj, ko želimo ustaviti delitev celic (33).

### 5.3.2 VPLIV SPOJIN **6**, **12**, **13** NA CELIČNI CIKEL

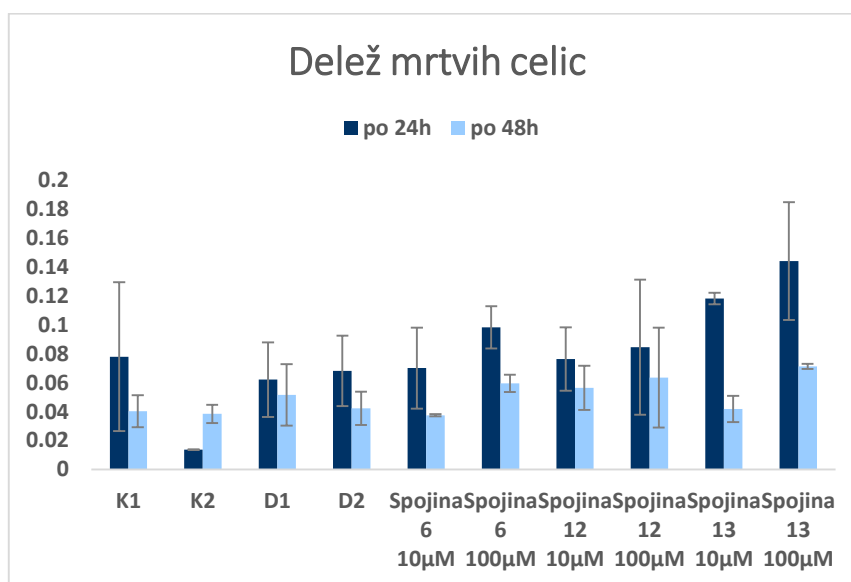
Glede na rezultate testa MTS v okviru proučevanja citotoksičnega delovanja druge serije sintetiziranih spojin smo za izbrane spojine (Slika 23) pričakovali nizek delež umrljivosti celic, le malo povečan pri vzorcih, stimuliranih s spojino **6**.



Slika 23: Strukturne formule iz druge serije izbranih spojin za analizo celičnega cikla.

Celično kulturo z dodatkom spojin **6**, **12** in **13** v koncentracijah 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  ter negativno kontrolo in negativno kontrolo z dodatkom 1 % DMSO smo inkubirali in po 24 in 48 urah ovrednotili vpliv spojin na celični cikel. Dobljene podatke smo statistično obdelali in jih prikazali kot delež celic v posamezni izmed štirih faz:  $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$  in sub  $G_0$ . Pri tem delež celic v sub  $G_0$  predstavlja delež mrtvih celic.

Graf (Slika 24) predstavlja delež mrtvih celic oziroma celic v fazi sub  $G_0$  v stimuliranih vzorcih ter v vzorcih za negativno kontrolo in negativno kontrolo z 1 % dodatkom DMSO.

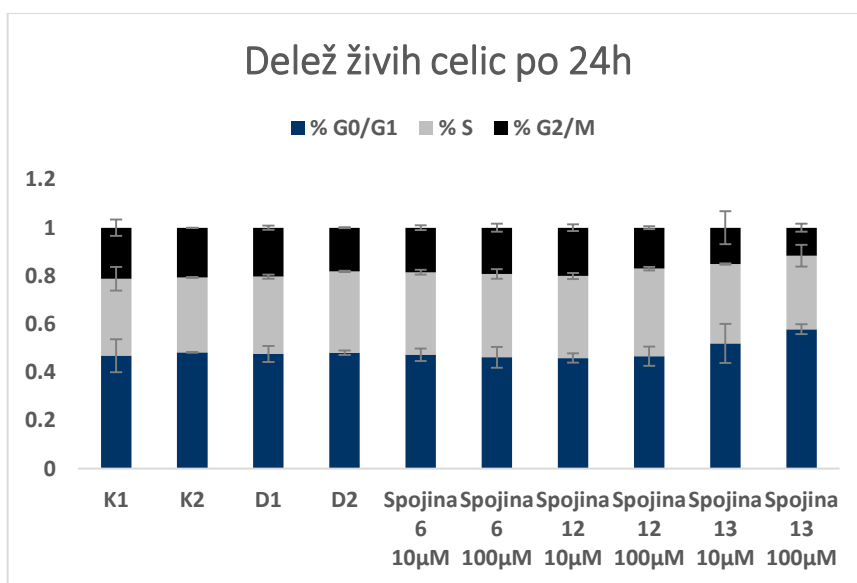


Slika 24: Deleži mrtvih celic (sub $G_0$ ) 24 in 48 ur po stimulaciji.

Glede na delež mrtvih celic v kontrolnem vzorcu smo znatno povečan delež mrtvih celic tako ugotovili v primeru spojine **6**, vendar šele v prisotnosti višje koncentracije spojine (100

$\mu\text{M}$ ). V primerjavi s kontrolnim vzorcem smo rahlo povišan delež mrtvih celic opazili tudi pri stimulaciji vzorca s  $100 \mu\text{M}$  spojine **13**. Tudi to je skladno z rezultati meritev metabolne aktivnosti celic, saj je na enak način stimuliran vzorec pri testu MTS privedel do sorazmerno nižje metabolne aktivnosti.

Po 48 urah v vseh vzorcih opazimo znižan delež mrtvih celic, ki ga lahko pripišemo veliki variabilnosti rezultatov meritev, izvedenih po 24 urah. Prispevek prisotnosti 1 % DMSO v vzorcih k umrljivosti celic je, kot vsakokrat poprej, ničen.



Slika 25: Deleži živih celic v posamezni fazi celičnega cikla 24 ur po stimulaciji.

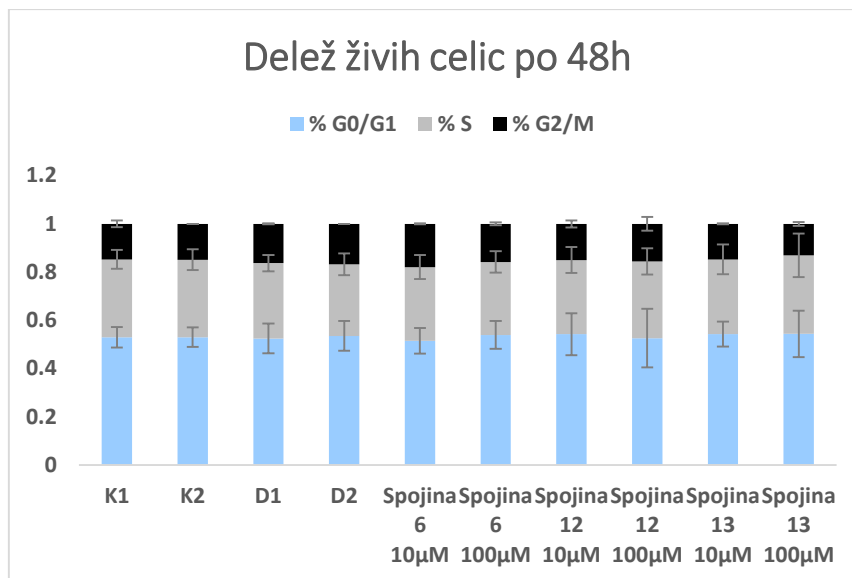
Na podlagi rezultatov dosedanjih meritev smo največje spremembe v celičnem ciklu pričakovali pri vzorcih, stimuliranih s spojino **6**. V primerjavi s kontrolo smo po 24 urah (Slika 25) tako res ugotovili približno enak delež celic na prehodu iz faze  $G_0$  v fazo  $G_1$ , majhno povečanje števila celic v fazi S in sorazmerno zmanjšanje števila celic na prehodu iz faze  $G_2$  v mitozo.

Pri vzorcih, stimuliranih s spojino **12**, smo v primerjavi s kontrolo prav tako ugotovili približno enak delež celic na prehodu iz faze  $G_0$  v fazo  $G_1$ , manjše povečanje števila celic v fazi S in povečanju sorazmerno zmanjšanje števila na prehodu iz faze  $G_2$  v mitozo.

Pri vzorcih, ki smo jim dodali spojino **13**, smo ugotovili bistveno povečanje števila celic na prehodu iz faze  $G_0$  v fazo  $G_1$ , še posebej pri  $100 \mu\text{M}$  koncentraciji spojine v vzorcu. V fazi S opazimo približno enak delež celic kot v nestimuliranem vzorcu. Na prehodu iz faze  $G_2$  v

mitozo je delež celic opazno manjši. Glede na rezultate meritev sklepamo, da spojina **13** relativno uspešno ustavlja celični cikel že pred prvo kontrolno točko.

Pri vzorcih z dodatkom samo 1 % DMSO ne opazimo posebnih sprememb.



Slika 26: Deleži živih celic v posamezni fazi celičnega cikla 48 ur po stimulaciji.

Po stimulaciji vzorcev s spojino **6** opazimo po 48 urah (Slika 26) približno enak delež celic na prehodu iz faze G<sub>0</sub> v fazo G<sub>1</sub> kot v kontrolnem vzorcu. Manjše znižanje deleža celic opazimo v fazi sinteze (S) in sorazmerno povišanje na prehodu iz faze G<sub>2</sub> v mitozo.

Podobno je tudi pri vzorcih, stimuliranih s spojinama **12** in **13**, vendar pa sta v tem primeru znižanje deleža celic v fazi S in zvišanje na prehodu iz faze G<sub>2</sub> v mitozo še manj očitna.

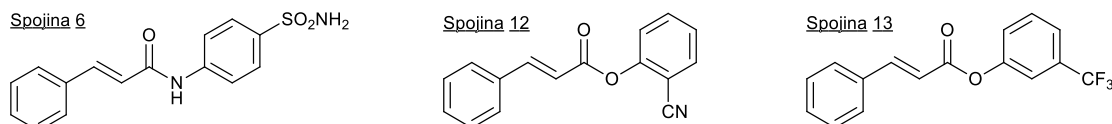
Pri vzorcih z dodatkom 1 % DMSO tudi tokrat ne opazimo posebnih sprememb.

#### 5.4 Ugotavljanje selektivnosti delovanja spojin

Spojine, ki jih je kot obetavne protirakave učinkovine smiselno razvijati naprej, morajo imeti tako izrazit citostatičen učinek kot tudi sposobnost selektivnega delovanja na rakave celice. Pri testiranju takšnih spojin z metodo MTS na rakavih celičnih linijah pričakujemo v končni fazi bistveno zmanjšan delež metabolno aktivnih celic, nasprotno pa pri testiranju spojin na nerakavih celičnih linijah čim višjega (19).

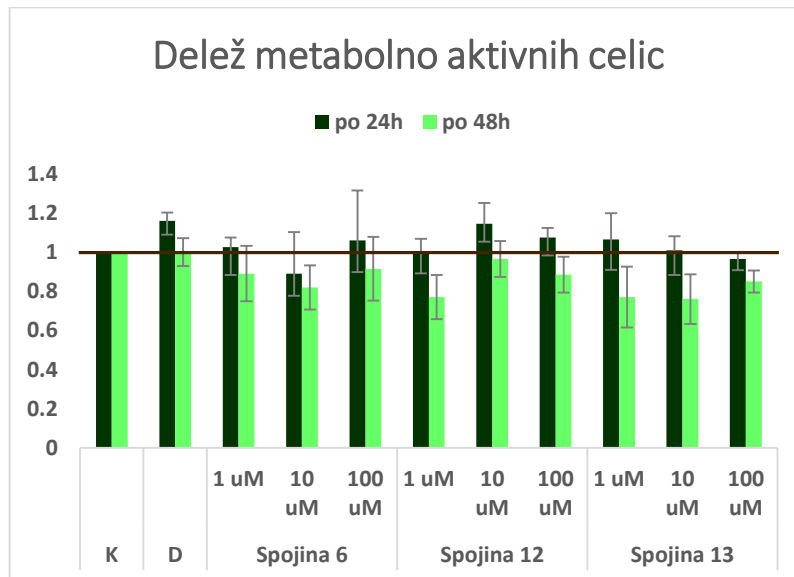
### 5.3.1 VPLIV SPOJIN **6**, **12** in **13** NA CELIČNO KULTURO BREZ DODATKOV

Preverili smo tudi vpliv spojin **6**, **12** in **13** (Slika 27) na metabolno aktivnost s spojinami stimuliranih vzorcev celične kulture PBMC, nato pa jo primerjali z metabolno aktivnostjo s spojinami stimuliranih vzorcev z dodatkom stimulatorja proliferacije (PMA).



Slika 27: Strukturne formule iz druge serije izbranih spojin za proučevanje selektivnosti.

Celično kulturo s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL smo inkubirali s spojinami **6**, **12** in **13** v koncentracijah  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  in  $100 \mu\text{M}$ . Po 24 in 48 urah smo dodali reagent MTS in 2 uri po dodatku izmerili absorbanco stimuliranih vzorcev ter negativne kontrole in negativne kontrole z dodatkom DMSO. Graf (Slika 28) prikazuje relativno metabolno aktivnost celic, normalizirano na izsledke meritev metabolne aktivnosti nestimuliranih celic (negativna kontrola).



Slika 28: Deleži metabolno aktivnih celic linije PBMC 24 in 48 ur po stimulaciji.

Med testiranimi spojinami metabolno aktivnost celic najbolj zniža spojina **13**. Rezultati meritev so si bili pri vseh spojinah precej podobni, pri tem pa odstotek metabolno aktivnih



celic v vzorcu nikjer ni padel pod 70 %. Citotoksična aktivnost spojin na celice PBMC se je pokazala šele po 48 urah, po 24 urah v nobenem vzorcu ne opazimo izrazitih sprememb.

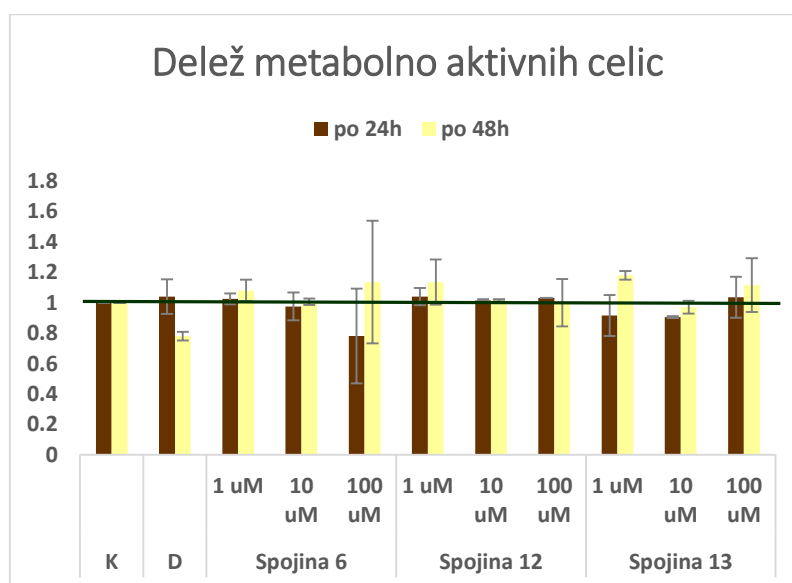
V primeru spojine **6** je bil delež metabolno aktivnih celic nižji pri stimuliranih vzorcih nerakave celične linije (PBMC) kot pri stimuliranih vzorcih rakave celične linije (THP1), zato spojina ne ustreza profilu selektivne protitumorne spojine.

Delež metabolno aktivnih celic je izrazito upadel tudi v vzorcih, stimuliranih s spojinama **12** in **13**. Ker ti spojinini že v osnovi nista pokazali dovoljšnjega citotoksičnega učinka, za nadaljne raziskave na celični liniji THP1 nista zanimivi.

Tudi tokrat smo ugotovili ničen vpliv 1 % prisotnosti DMSO v celični kulturi.

### 5.3.2 VPLIV SPOJIN **6**, **12** in **13** NA CELIČNO KULTURO Z DODATKOM PMA

V celično kulturo s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL smo 6 ur pred dodatkom spojin stimulirali s PMA, nato smo dodali **6**, **12** in **13** v koncentracijah 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M in 100  $\mu$ M in vzorce inkubirali. Po 24 in 48 urah smo dodali reagent MTS in 2 uri po dodatku izmerili absorbanco stimuliranih vzorcev ter negativne kontrole in negativne kontrole z dodatkom DMSO. Graf (Slika 29) prikazuje relativno metabolno aktivnost celic, normalizirano na izsledke meritev metabolne aktivnosti nestimuliranih celic z dodatkom PMA (negativna kontrola).



Slika 29: Deleži metabolno aktivnih celic linije PBMC z dodatkom PMA 24 in 48 ur po stimulaciji.

Delež metabolno aktivnih celic se je v vseh primerih bistveno povišal. Najnižjega opazimo pri vzorcu, stimuliranem s 100  $\mu$ M spojine **6**, vendar pa zaradi velikega odstopanja rezultatov rezultat ni merodajen. Tudi razlike med rezultati po 24 in 48 urah so izrazito manjše kot pri testiranju brez dodatka PMA v prejšnjem primeru.

Ker spojina **6** ni zavrla stimulirane celične delitve, lahko sklepamo, da pri uporabi v organizmu ne bi dodatno zavirala nespecifične imunske stimulacije. Enako je pri spojini **12**, medtem ko pri vzorcih z dodatkom spojine **13** opazimo največja znižanja metabolne aktivnosti celic.

Glede na rezultate meritev negativne kontrole z dodatkom DMSO 1 % prisotnost DMSO v celični kulturi tudi tokrat ni vplivala na spremembo v metabolni aktivnosti celic.

## 6. SKLEP

Zaradi relativno nizke odzivnosti pacientov z akutno mieloično levkemijo na terapijo (50 do 70 %) stremimo k iskanju novih in izboljšanih učinkovin (7). Zaenkrat je v kliničnih raziskavah veliko potencialnih protilevkemičnih učinkovin, vendar pa morata biti njihova učinkovitost in varnost za vpeljavo v terapijo še dokazani. Z aspektom učinkovitosti potencialnih protilevkemičnih učinkovin smo se ukvarjali tudi v naši raziskavi.

Ugotovili smo, da na linijo THP1 najbolj citotoksično delujeta spojini prve serije: *p*-nitrofenil cinamat (spojina **2**) in 4-ciano-3-fluorofenil cinamat (spojina **3**). Obe imata večji učinek od modelne spojine (*p*-cianofenil cinamat, spojina **8**) in njenega strukturnega izomera (*m*-cianofenil cinamat, spojina **10**). Z drugo serijo spojin smo poskusili izboljšati topnost testnih spojin. To smo res dosegli, vendar na račun močno poslabšanega citotoksičnega učinka na rakavi celični liniji THP1. Spojine **6**, **12** in **13** smo tako za nadaljnje teste izbrali na podlagi veliko boljših rezultatov na limfocitnih celičnih linijah (Ramos, Jurkat) (34). V skladu z rezultati testa MTS na monocitni liniji (THP1) pri nobenem izmed s spojinami stimuliranih vzorcev nismo opazili bistvenih sprememb v celičnem ciklu, vse tri spojine pa so tudi opazno zavrle metabolno aktivnost nerakavih celic (PBMC).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko opredelimo odnos med strukturo in citotoksičnim delovanjem sintetiziranih spojin na rakavo linijo THP1:

- ~ Aktiven je že nesubstituiran fenolni ester cimetne kisline (spojina **1**).
- ~ Estri cimetne kisline so bolj aktivni od amidov.
- ~ Z elektron privlačnimi skupinami na mestu 3,4 disubstituirani derivati so bolj aktivni od njihovih monosubstituiranih analogov.
- ~ Med monosubstituiranimi derivati je najugodnejša substitucija z elektron privlačno skupino na mestu 4 (NO<sub>2</sub>, tudi CN in CF<sub>3</sub>).
- ~ Estri so bolj aktivni od izvornih karboksilnih kislin (spojini **14** in **15**).

Kljub slabšim rezultatom druge serije derivatov sklepamo, da bi z optimizacijo spojin lahko še izboljšali njihovo učinkovitost, vendar pa bi se morali pri načrtovanju novih spojin bolj približati spojinam prve serije. Rezultati so vsekakor dovolj vzpodbudni, da lahko derivate cimetne kisline ovrednotimo kot spojine s pomembno vlogo pri iskanju novih protilevkemičnih učinkovin.

## 7. LITERATURA

- (1) Hoskins J A: The Occurrence, Metabolism and Toxicity of Cinnamic Acid and Related Compounds. *Journal of Applied Toxicology* 1984; 4(6):283-292.
- (2) Sova M: Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini Rev Med Chem* 2012; 12: 749-767.
- (3) Lafay S, Gil-Izquierdo A: Bioavailability of Phenolic Acids. *Phytochem Rev* 2008; 7: 301-311.
- (4) De P, Baltas M, Bedos-Belval F: Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents – A Review. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 1672-1703.
- (5) [http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Mehanizem\\_modifikacije\\_histonov](http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Mehanizem_modifikacije_histonov)  
(03.12.2013)
- (6) Dierman J, Hartmut L, Wedi B, Diehm C, Braun V, Schiele V et al.: Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2013. Walter de Gruyter, 264. izdaja, Berlin/Boston, 1193-1194.
- (7) <http://www.cancercare.ns.ca/site-cc/media/cancercare/Acute%20Myelogenous%20Leukemia.pdf> (03.12.2013)
- (8) Bokal U, Južnič Šetina T: Kronična mieloinčna levkemija. *Onkologija/pregledi* 2001; 16(1):10-13.
- (9) Campo M L: Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca<sup>+</sup> Homeostasis. *Springer Science + Business Media B. V.* 2009, 17-55.
- (10) Ricci M C, Zong W X: Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist* 2006, 11:342-357.
- (11) Fesik S F: Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5:876-885.
- (12) Hersey P, Zhang X D: How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1:142-150.

- (13) Speirs C K, Hwang M, Kim S, Li W, Chang S, Varki V et. al: Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am J Cancer Res* 2011; 1(1):43-61.
- (14) Notte A, Leclere L, Michiels C: Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical Pharmacology* 2011; 82:427-434.
- (15) Xie Z, Klionski D J: Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 2007; 9:1102-1109.
- (16) [http://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/documents/6ac3a026-8c6c-4a0f-97b0-df63d9f8ef92/poster\\_gleevec.gif](http://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/documents/6ac3a026-8c6c-4a0f-97b0-df63d9f8ef92/poster_gleevec.gif) (03.12.2013)
- (17) Tallman M S, Gilliland D G, Rowe J M: Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106:1154-1162.
- (18) Testa U, Riccioni R: Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematological/the hematology journal* 2007; 92:81-94.
- (19) Sova M, Žižak Ž, Antić Stanković J A, Prijatelj M, Turk S, Juranić Z D et. al: Cinnamic Acid Derivatives Induce Cell Cycle Arrest in Carcinoma Cell Lines (rokokip v recenziji).
- (20) <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-nonradioactive-cell-proliferation-assay-protocol/> (03.12.2013)
- (21) Mosmann T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65:55-63.
- (22) <http://www.lambda.sk/baner/atc267693.pdf> (03.12.2013)
- (23) Niedel J E, Kuhn L J, Vandebark G R: Phorbol diester copurifies with protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982; 80:36-40.
- (24) [http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/as-set/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/as-set/med_80691.pdf) (03.12.2013)

- (25) <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html> (03.12.2013)
- (26) [http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page\\_id=852](http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852) (03.12.2013)
- (27) Keshavamurthy K S, Vankar Y D, Dhar D N: Preparation of Acid Anhydrides, Amides, and Esters Using Chlorosulfonyl Isocyanate as a Dehydrating Agent. *Synthesis* 1982; 1982(6):506-508.
- (28) Nishikubo T, Takahashi E, Miyaji T, Iizawa T: Convenient Synthesis of  $\beta$ -Truxinic Acid via Photodimerization of p-Nitrophenyl Cinnamate in the Crystalline State. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1985; 58(11):3399-3400.
- (29) El-Fahm A, Abdul-Ghani M: TFFH as a useful reagent for the conversion of carboxylic acids to anilides, hydrazides and azides. *Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis* 2003; 35(4):369-374.
- (30) Gupta M, Upmanyu N, Pramanik S, Kishore Tyagi C, Chandekar A: Synthesis and antimicrobial evaluation of 3,5-pyrazolidine-dione substituted 4-quinolone derivatives. *International Journal of Drug Development & Research* 2011; 3(2):233-239.
- (31) Saraf A s, Simonyan A V: Synthesis and antiallergic activity in a series of cinnamic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 1992; 26(7-8):598-602.
- (32) Pellón R F, Docampo M L: Synthesis of novel cinnamoyl amides using a solvent-free microwave method. *Synthetic Communications* 2013; 43(4):537-552.
- (33) Dierman J, Hartmut L, Wedi B, Diehm C, Braun V, Schiele V et. al: Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2013. Walter de Gruyter, 264. izdaja, Berlin/Boston, 2284.
- (34) Glavnik T: Sinteza derivatov cimetine kisline. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; 2013.