

# Klonogena analiza nesteroidnih protuupalnih lijekova

---

**Butumović, Lara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:090245>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Lara Butumović**  
7504/BT

**KLONOGENA ANALIZA NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:** Biotehnologija 4

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

**Zagreb, 2020.**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na vodstvu, strpljenju i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Također, hvala mojoj obitelji na podršci tijekom školovanja i svima koji su vjerovali u mene!*

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### **Klonogena analiza nesteroidnih protuupalnih lijekova**

*Lara Butumović, 0058211405*

**Sažetak:** Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, eng. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) u posljednje se vrijeme sve više istražuju zbog niza farmakoloških djelovanja, posebno kao potencijalni antikancerogeni lijekovi. Sposobni su inhibicijom enzima ciklooksigenaze umanjiti ili potpuno zaustaviti proliferaciju stanica, koja može dovesti do razvoja karcinoma. No, njihov mehanizam djelovanja još nije potpuno objašnjen zbog čega je potrebno provoditi dodatna ispitivanja vezana uz sigurnost, učinkovitost i toksičnost, ali i zbog pojave nuspojava uzrokovanih primjenom ovih lijekova. U ovom radu ispitan je učinak pet različitih nesteroidnih protuupalnih lijekova (ibuprofen, vedaprofen, fluniksin, diklofenak i tolfenamata kiselina) koristeći se *in vitro* metodom i kulturom stanica. Određivana je vijabilnost HeLa i HaCaT stanica nakon tretmana navedenim nesteroidnim protuupalnim lijekovima primjenom MTS kolorimetrijske metode i antikancerogena sposobnost NSAID-a primjenom klonogenog testa. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako navedeni lijekovi posjeduju antiproliferativni učinak na tumorsku staničnu liniju, ali imaju utjecaja i na normalnu staničnu liniju, zbog čega su potrebna daljnja istraživanja u tu svrhu. Inhibitorni učinak ovisan je o koncentraciji ispitanog lijeka.

**Ključne riječi:** citotoksičnost, HaCaT stanična linija, HeLa stanična linija, klonogena analiza, nesteroidni protuupalni lijekovi

**Rad sadrži:** 29 stranica, 10 slika, 3 tablice, 17 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** Izv. prof. dr.sc. Kristina Radošević

**Datum obrane:** 1. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENT CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering  
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Clonogenic analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs**

*Lara Butumović, 0058211405*

**Abstract:** Lately non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) have been more researched due to their pharmacological activity, especially its potential as anticancer drugs. NSAIDs are capable of inhibiting the cyclooxygenase enzyme, by which they can completely stop the cell proliferation. Cell proliferation is the key process that contributes to development of tumor growth. But, their mechanism of action is not completely explained which raises the need to implement additional safety, efficiency and toxicological researches because of side effects caused by these drugs. In this work, five different non-steroidal anti-inflammatory drugs (ibuprofen, vedaprofen, flunixin, diclofenac and tolfenamic acid) were tested using the *in vitro* method and cell culture. The viability of HeLa and HaCaT cells treated by selected NSAIDs was determined by the colorimetric MTS method and the anticancer ability using a clonogenic test. Obtained results indicate that tested drugs possess antiproliferative effect on the tumor cell line, as well as on the normal cell line. Observed inhibitory effect is dose dependent.

**Keywords:** cytotoxicity, clonogenic assay, HaCaT cell line, HeLa cell line, nonsteroidal antiinflammatory drugs

**Thesis contains:** 29 pages, 10 figures, 3 tables, 17 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ph.D. Kristina Radošević, Associate professor

**Thesis delivered:** September 1, 2020

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi.....	3
2.1.1 Mehanizam djelovanja NSAID-ova .....	4
2.1.2 Antikancerogeno djelovanje.....	5
2.2. Kultura životinjskih stanica.....	6
2.2.1. Uvjeti za uzgoj životinjskih stanica .....	8
2.2.2. Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica .....	9
2.2.3. Primjena <i>in vitro</i> testova citotoksičnosti.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Kemikalije .....	14
3.1.2. Otopine i puferi .....	14
3.1.3. Uređaji i oprema.....	15
3.1.4. Stanične linije .....	15
3.1.5. Nesteroidni protuupalni lijekovi.....	17
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. Uzgoj humanih staničnih linija .....	17
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	17
3.2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje djelovanja NSAID-a .....	18
3.2.5. Klonogena analiza.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
4.1. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova na preživljenje HeLa i HaCaT stanica .....	21
4.2. Klonogena analiza učinka NSAID-ova na HeLa staničnu liniju.....	24
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	27
<b>6. LITERATURA</b> .....	28

## 1. UVOD

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, eng. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) su prema definiciji lijekovi analgetskog, protuupalnog i antipiretskog djelovanja. Upravo zbog svoje višestruke funkcije, ovi lijekovi se smatraju jednim od najčešće korištenih u svijetu. Njihov je učinak prvi puta opisan 1971. godine od strane dva znanstvenika, John Vanea i Priscille Piper. Oni su u svom eksperimentu pokazali kako na aorti kunića acetilsalicilna kiselina inhibira vazoaktivne tvari, a kasnije je Vane identificirao kako je inhibitorna aktivnost NSAID-ova usmjerena na sintezu prostaglandina, odnosno na enzim ciklooksigenazu. Ciklooksigenaza je enzim odgovoran za biosintezu eikozanoida, to jest lipidnih signalnih molekula derivata arahidonske kiseline koji su uključeni u kontrolu mnogih fizioloških funkcija. U podskupinu eikozanoida spadaju prostanoide, koje dijelimo na prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Prostaglandini nastaju gotovo u svim tkivima, a po prirodi su nezasićene masne kiseline s 20 ugljikovih atoma. Svrstavaju se u šest skupina označenih slovima, a broj pridružen slovu označava broj dvostrukih veza u molekuli. Fiziološki najvažniji prostaglandini pripadaju skupinama E i I. Prostaglandini imaju raznovrsne učinke, a oni koji pripadaju različitim skupinama mogu imati i suprotna djelovanja, pa tako npr. PGE<sub>2</sub> djeluje vazodilatacijski (proširuje krvne žile), a PGF<sub>2</sub> vazokonstriksijski (sužava krvne žile). E<sub>2</sub> sudjeluje u nastanku upalnih simptoma poput crvenila, boli i gubitka funkcije. NSAID-i inhibiraju nastajanje eikozanoida na način da inhibiraju sintezu enzima ciklooksigenaze, pa samim time ne dolazi do sinteze prostaglandina, zbog čega se smatraju učinkovitim protuupalnim lijekovima. Ciklooksigenaza se javlja u dvije izoforme, COX-1 i COX-2: COX-1 je konstitutivno eksprimirana i katalizira proizvodnju prostaglandina, dok je COX-2 inducirana faktorima rasta, onkogenima, te prekomjerno eksprimirana u tumorima kod sisavaca, što ju povezuje s procesom tumorigeneze. Zbog potencijalne primjene NSAID-ova kao antikancerogenih lijekova, u posljednje vrijeme sve više se provode eksperimentalna istraživanja u tu svrhu. No, NSAID-ovi često uzrokuju i nepoželjne nuspojave, te se njihovo prekomjerno korištenje povezuje sa želučanim tegobama, kao što su žgaravica, bol u trbuhu, mučnina i gubitak apetita, a u težim slučajevima i sa nastajanjem čireva na želudcu. Za predviđanje toksikološkog učinka, bilo koje kemikalije ili lijeka, na ljude i životinje služimo se *in vivo* i *in vitro* testovima, pa tako i za ispitivanje djelovanja NSAID-a. Kultura životinjskih stanica predstavlja alternativu *in vitro* testovima za ispitivanje učinka NSAID-ova na organizam, odnosno služi kao preliminarni test kako bi se smanjio broj *in vivo* testova, količina toksičnog otpada i broj pokusnih životinja potrebnih za provođenje istih.

Cilj ovog rada je bio ispitati učinak pet različitih NSAID-a na vijabilnost i morfološke karakteristike tumorske HeLa stanične linije i na normalnu HaCaT staničnu liniju. Ispitano je djelovanje pet različitih NSAID-ova: ibuprofena, diklofenaka, fluniksina, vedaprofena i tolfenamatne kiseline, *in vitro* metodom određivanja preživljenja stanica MTS testom te se željelo primjenom klonogene analize ispitati antitumorski potencijal navedenih NSAID-a.

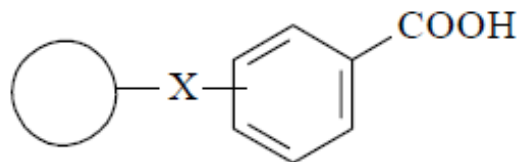


## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi

Nesteroidni protuupalni lijekovi su široko rasprostranjeni lijekovi korišteni kao analgetici, antipiretici ili protuupalni agensi. Pacijenti koriste NSAID-ove za smanjenje tegoba i simptoma kod raznih bolesti kao što su artritis, bol u donjem dijelu leđa i bolovi u mišićima. Upotreba NSAID-ova se iz godine u godinu povećava, a razlikuje se po dobi i spolu, pri čemu je češća upotreba kod odraslih osoba starijih od 40 godina. Također, pacijenti sa kroničnim bolestima kao što su kardiovaskularne bolesti, reumatoidna oboljenja ili peptički ulkus su najčešći korisnici NSAID-ova. Budući da se neki od ovih lijekova mogu izdavati i bez recepta, njihova upotreba se znatno povećala za uobičajene bolove posebno kod pacijenata sa ozljedama mišićno-koštanog sustava koji ih uzimaju kao analgetike, odnosno protiv bolova.

Osnovnu strukturu nesteroidnih lijekova čini kiseli dio (karboksilna kiselina) na koji se veže planarna, aromatska funkcionalna grupa. Neki analgetici iz te skupine također mogu imati polarnu skupinu, koja veže planarni dio na dodatnu lipofilnu skupinu, tako da se opća struktura nesteroidnih protuupalnih lijekova može prikazati kao što je vidljivo na Slici 1.



**Slika 1.** Opća struktura nesteroidnih protuupalnih lijekova (*DeRuiter, 2002.*)

Svi spojevi iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova imaju nekoliko zajedničkih kemijskih/farmakoloških karakteristika: svi su relativno jake organske kiseline sa pKa vrijednosti u rasponu od 3-5. Najčešće se radi o karboksilnoj kiselini čija je kiselina skupina odgovorna za inhibicijsko djelovanje COX-a, budući da se ona ionski veže sa proteinima plazme, što je nužno za interakciju lijekova. NSAID-i se obično metaboliziraju u jetri i izlučuju urinom.

NSAID-ovi se razlikuju po lipofilnosti temeljenoj na lipofilnom karakteru njihovih arilnih skupina te ostalih lipofilnih ostataka i supstituenata. Na osnovu kemijske strukture NSAID-i su podijeljeni u nekoliko skupina: salicilati, propionske kiseline (profen), arilne i

heteroaricelatne kiseline, antralinati (fenamati), oksikami („enolne kiseline“), fenilpiralozoni, anilidi.

### 2.1.1 Mehanizam djelovanja NSAID-ova

Osnovni mehanizam putem kojeg NSAID-ovi iskazuju svoj terapijski učinak jest inhibicija sinteze prostaglandina. Prostaglandini su fiziološki aktivne lipidne tvari slične hormonima koje sudjeluju u raznim tjelesnim funkcijama među kojima su kontrakcija i relaksacija glatkog mišićja, dilatacija i vazokonstrukcija krvnih žila, kontrola krvnog tlaka i modulacija upale. Konkretno, NSAID-ovi (uglavnom) kompetitivno inhibiraju ciklooksigenaze, enzime koji kataliziraju sintezu prostaglandina ciklizacijom endoperoksidaza iz arahidonske kiseline. Otkrivena su dva izoenzima ciklooksigenaza, nazvanih COX-1 i COX-2. Strukturno se razlikuju po jednoj aminokiselini, odnosno COX-1 ima izoleucin gdje COX-2 ima valin, zbog čega kod COX-2 nastaje hidrofilno proširenje što omogućuje vezanje selektivnih COX-2 inhibitora (Ćoso i sur, 2009.). COX-1, konstitutivno eksprimiran, se sintetizira kontinuirano i prisutan je u svim tkivima i vrstama stanica, ponajviše u trombocitima, endotelnim stanicama, gastrointestinalnom traktu i bubrežnoj mikrovaskulaturi. Prema tome, COX-1 je važan za stvaranje prostaglandina pri održavanju homeostaze, kao što je agregacija trombocita, regulacija protoka krvi u bubrezima i trbušnoj šupljini te regulira izlučivanje želučane kiseline. Inhibicija aktivnosti COX-1 može biti jedan od razloga zašto NSAID-ovi djeluju iritabilno na gastrointestinalni trakt, pa se često koriste u kombinaciji sa gastroprotektivnim lijekovima kako bi se smanjile takve nuspojave. COX-2 se smatra inducibilnim izoenzimom, iako se u nekim organima, kao što su bubrezi, mozak, kosti, ženski reproduktivni sustav i gastrointestinalni trakt, konstitutivno eksprimira. COX-2 izoenzim igra važnu ulogu u djelovanju NSAID-a kako kod bolova tako i u upalnim procesima. Prema načinu djelovanja, NSAID-e možemo podijeliti na selektivne i neselektivne. Neselektivni NSAID-ovi općenito inhibiraju oba izoenzima, no postoje i selektivni NSAID-ovi (koksibi) koji pretežno djeluju samo na COX-2 izoenzim. Na primjer, diklofenak i meloksikam djeluju jače na COX-2, indometacin i ketoprofen na COX-1, dok ibuprofen i naproksen djeluju podjednako na obje izoforme. Analgetski i antipiretski učinci ovih lijekova prvobitno su posljedica inhibicije COX-2, dok su nuspojave vezane uz gastrointestinalni sustav posljedica COX-1 inhibicije. Selektivni COX-2 inhibitori pokazuju manje gastrointestinalnih nuspojava, a ujedno su se pokazali kao potencijalni lijekovi u liječenju bolesti poput Parkinsonove ili Alzheimerove, pa čak i u liječenju karcinoma dojke i debelog crijeva. No kod selektivnih COX-2 inhibitora je veći rizik za razvoj kardiovaskularnih nuspojava (Rang i sur, 2016) zbog čega ih je većina povučena sa tržišta. Najveća analgetska aktivnost prisutna je kod NSAID-ova kao što su diklofenak,

ibuprofen, indometacin i ketaprofen. NSAID-ovi su uglavnom efektivni protiv tipa bolesti u kojem prostaglandini senzibiliziraju receptore za bol uključujući bolove uzrokovane artritisom, burzitisom, bolove mišićnog i vaskularnog podrijetla i dismenoreje. Učinkovitost protiv glavobolje može biti rezultat njihove sposobnosti inhibiranja vaskularne dilatacije posredovane prostaglandinima. Antipiretička aktivnost ovih lijekova dolazi od inhibicije sinteze prostaglandina E2(PGE2) u arahidonskoj kiselini.

Ostali mehanizmi koji doprinose protuupalnoj aktivnosti NSAID-a uključuju redukciju superoksidnih radikala, indukciju apoptoze, inhibiciju ekspresije molekula adhezije, smanjenje sinteze dušikovog oksida, smanjenje razine protuupalnih citokina, modifikaciju aktivnosti limfocita, te promjenu funkcije stanične membrane.

### **2.1.2 Antikancerogeno djelovanje**

Posljednjih godina provedene su mnoge studije koje ukazuju na obećavajuća anti-kancerogena svojstva NSAID-ova. Nakon otkrića izoforme COX-2, ustanovljeno je da je njegova ekspresija visoka u brojnim kancerogenim tkivima, uključujući debelo crijevo, dojke, prostatu i gušteraču. Također je zapaženo da COX-2 sudjeluje i u kontroli određenih staničnih procesa, stoga se selektivni NSAID-i, inhibitori COX-2, opsežno izučavaju zbog njihove potencijalne uloge u sprječavanju i liječenju različitih tumora.

Visoka razina prostaglandina E2 (PGE2) prisutna je u tumorskim tkivima i ima ključnu ulogu u tumorogenezi tako što reguliraju raznovrsna stanična ponašanja povezana sa tumorskim fenotipom. Tako je ustanovljeno da PGE2 stimulira proliferaciju i zaustavlja apoptotičnu staničnu smrt tumorskih stanica, dovodeći do ekspanzije tumorske mase. Također promovira angiogenezu, proces formiranja novih krvnih žila koje opskrbljuju tumor sa hranjivim tvarima i kisikom, te omogućuju metastaziranje tumorskih stanica. Za PGE2 je također ustanovljeno kako je povezan sa invazijom stanica i rezistencijom prema kemoterapijskim lijekovima.

Postoje epidemiološki dokazi koji sugeriraju kako je povremeno korištenje aspirina i drugih NSAID-ova učinkovito u sprječavanju razvoja raka jednjaka i smanjenju rizika od karcinoma želuca, dok redovita uporaba aspirina povoljno djeluje na prevenciju raka debelog crijeva, kod kojeg je najviše ekspresiran COX-2. Također je dokazano kako su učestalost i stopa smrtnosti uzrokovana rakom debelog crijeva značajno smanjene kad se uzima 75 mg aspirina dnevno tijekom nekoliko godina. No, česta upotreba aspirina može izazvati unutarnje krvarenje, pa čak i hemoragične moždane udare kao najteži oblik nuspojave njegovog dugotrajnog uzimanja, dok se učestalost neželjenih simptoma povećava sa godinama unosa

tog lijeka. Određene doze sulindaka, koji je neselektivni COX inhibitor, uzrokuju povlačenje tumora kod pacijenata sa obiteljskom adenomatoznom polipozom (eng. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP), dok celekoksib smanjuje pojavu sporadičnih kolorektalnih adenoma. Unatoč tome, 18-mjesečno ispitivanje kojim se istraživala efikasnost rofekoksiba u smanjenju rizika od ponovnih adenomatoznih polipa kod pacijenata koji su imali rak debelog crijeva, moralo je biti ranije zaustavljeno zbog povećanja štetnih kardiovaskularnih tegoba, zbog čega je rofekoksib povučen s tržišta.

Nedavna studija pokazala je kako diklofenak i sulindak induciraju apoptozu i inhibiraju rast tumora u pacijenata sa rakom jajnika, dok diklofenak ujedno inhibira rast tumora gušterače. Ukratko, brojna eksperimentalna, epidemiološka i klinička istraživanja ukazuju na to da su NSAID-ovi (i djelomično selektivni COX-2 inhibitori) obećavajući antikancerogeni agensi, ali točan mehanizam njihovog djelovanja još je nejasan. Iako postoji niz dokaza kako NSAID-ovi smanjuju rizik od nekih vrsta tumora, još uvijek nisu preporučeni općoj populaciji za upotrebu pri prevenciji karcinoma, niti postoje prikladne informacije o efektivnoj dozi i optimalnom vremenu uzimanja tog lijeka za tu namjenu. Obzirom da svi NSAID-i u određenoj mjeri nadražuju sluznicu gornjeg dijela probavnog trakta te mogu uzrokovati ulkuse (Brune i Patrignani, 2015) te dokle god postoji nedostatak ispitanika za evaluaciju prednosti i rizika korištenja NSAID-ova u sprječavanju razvoja tumora, nikakvi populacijski programi NSAID-ova se ne bi smjeli provoditi. Stoga je od iznimne važnosti i nadalje istraživati i razumjeti mehanizme kojima NSAID-i djeluju, čime bi novi lijekovi bili podnošljiviji i sigurniji te istovremeno više usmjereni na ciljano djelovanje.

## **2.2. Kultura životinjskih stanica**

Pojam stanična kultura odnosi se na uzgoj stanica uzetih iz originalnog tkiva, primarne kulture ili stanične linije u umjetnom hranjivom mediju. Prvo iskustvo sa kulturom stanica može se smatrati izolacija i kultivacija tkiva žabljeg embrija sa početka 20. stoljeća koju je proveo Ross Harrison. Nakon njega, francuski kirurg Alexis Carrel uspješno kultivira uzorak tkiva srca pilećeg embrija i uspijeva ga sačuvati nekoliko desetljeća. No, kao eksperimentalna metoda kultura stanica prihvaćena je tek 1952. godine kada je uzgojena prva humana stanična linija HeLa stanica, nazvana po Henrieti Lacks iz čijeg su tumora vrata maternice stanice izolirane.

Primjena kulture stanica polazi od tvrdnje da su pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa sposobne za održavanje u umjetnom okolišu i mogu se smatrati zasebnim

organizmom u *in vitro* uvjetima. Stanice koje se direktno izoliraju iz tkiva ili organa nazivamo primarnim kulturama. One su obično heterogene, a po morfološkim i funkcionalnim svojstvima te su stanice najslabije onima u originalnom tkivu. Subkultivacijom, to jest precjepeljivanjem primarne kulture stanica dobivamo stanične linije. Precjepeljivanje se provodi kako bi se stanicama osigurao svjež i hranjivi medij i omogućio prostor za daljnji rast. Nadalje, subkultivirane stanice se mogu selekcionirati za formiranje populacija stanica jedne vrste, pri čemu dobivamo stanične linije koje mogu biti konačne i kontinuirane. Konačne stanične linije su stanice sposobne za ograničen broj generacija, za razliku od kontinuiranih staničnih linija koje su transformirane na način da se mogu neograničeno uzgajati. Da bi se uspostavila kontinuirana (besmrtna) stanična linija, provodi se postupak imortalizacije. Unatoč poželjnim karakteristikama kontinuiranih staničnih linija kao što su veći stupanj rasta, manja potreba za serumom, neograničen životni vijek te rast u monosloju i suspenziji, kontinuirane stanične linije mogu podleći dediferencijaciji što dovodi do gubitka specijaliziranih staničnih funkcija, odnosno kromosomske nestabilnosti, fenotipske različitosti od izvornog tkiva te gubitak specifičnih tkivnih markera (Freshney, 2005). Normalno tkivo obično daje konačne kulture, dok kulture uzgojene iz tumora mogu odmah po izolaciji rezultirati kontinuiranim staničnim linijama (besmrtnim). Nužna svojstva potrebna za svakodnevni rad s kulturama stanica su njihova besmrtnost i klonalnost, odnosno sve stanice moraju imati sposobnost neograničenog broja djeljivosti i stanice iz iste stanične linije moraju biti genotipski identične.

Kultura stanica korisna je u mnogim područjima biotehničkih, prirodnih i medicinskih znanosti, a praktično se primjenjuje pri transplataciji organa, staničnoj i genskoj terapiji, *in vitro* toksikologiji i fiziologiji, proizvodnji biopesticida, nanotehnologiji te proizvodnji rekombinantnih glikoproteina, monoklonskih protutijela, virusnih cjepiva, hormona, faktora rasta. No, upotreba tehnologije životinjskih stanica kao što su virusni vektori u genskoj terapiji, proizvodnja antitumorskih cjepiva, stanična terapija ili regenerativna medicina je zasad u početnoj fazi, budući da je potrebno mnogo znanstvenih istraživanja koji će omogućiti potrebne tehnologije i odgovore na kompleksna regulatorna i etička pitanja.

Prema načinu uzgoja, razlikujemo dvije vrste stanica: adherentne i suspenzijske stanice. Adherentne stanice za rast trebaju čvrstu podlogu, a moguće je koristiti materijale poput stakla, plastike, želatine ili metala koji će stanicama pružiti mehaničku sigurnost, no ne smiju ugrožavati stanicu na bilo koji fizikalno-kemijski način. Tek kada se stanice uspješno prihvate za površinu, kreće njihov rast i razmnožavanje. Ovaj način uzgoja podrazumijeva lakše vršenje izmjene hranjivog medija za uzgoj stanica, jednostavniju perfuziju zbog

imobiliziranosti stanica i lakše izlučivanje produkata. No, rad s adherentnim stanicama je zahtjevniji zbog potrebe tripsinizacije prilikom precijepljivanja ili uzorkovanja, dok je praćenje rasta stanica i kontrola raznih parametara otežana, te je prijenos u veće mjerilo složen i skup. S proizvodnog, biotehnološkog aspekta za rad i uzgoj u bioreaktoru pogodnije su suspenzijske kulture. Suspenzijske stanice rastu neovisno o površini u cijelom volumenu medija za uzgoj stanica, a njihova upotreba olakšava provedbu procesa, ponajviše radi jednostavnijeg praćenja rasta stanica, nije potreban tretman tripsinom i stoga je lakši prijenos u veće mjerilo. Stanične linije HeLa i HaCaT korištene u ovome radu su adherentnog tipa.

### **2.2.1. Uvjeti za uzgoj životinjskih stanica**

Uvjeti koje treba osigurati za uspješan rast stanica moraju biti što sličniji prirodnim uvjetima koje su stanice imale u organizmu iz kojeg su izolirane. Velika prednost kulture stanica je mogućnost upravljanja kako fizikalno-kemijskim (temperatura, pH, osmotski tlak, postotak kisika i ugljikovog dioksida) tako i fiziološkim parametrima (koncentracija hormona, faktora rasta i drugih hranjivih tvari) koji omogućavaju proliferaciju stanica.

pH vrijednost pri kojoj raste većina životinjskih stanica je 7.4, no može varirati u rasponu pH 7.0 -7.7, ovisno o tipu stanica. Moguće je pratiti promjenu pH pomoću pH indikatora koji je najčešće sastavni dio medija za uzgoj stanica, pri čemu se obično koristi fenol-crveno, koje je roze boje kod pH 7.8, crveno na pH 7.4, narančasto na pH 7.0, te žuto na pH 6.5. Na pH 6,5 i manje stanice gube sposobnost za život. Održavanje pH u kulturi povezano je sa kontrolom koncentracije CO<sub>2</sub> u inkubatoru. Puferski sistem bikarbonat-CO<sub>2</sub> koji prirodno postoji u stanicama je najčešće korišten za reguliranje koncentracije CO<sub>2</sub> zbog svoje niske toksičnosti. Pad pH medija uslijed povećanja CO<sub>2</sub> u plinskoj fazi neutralizira se djelovanjem natrij bikarbonata, pri čemu se pH stabilizira na 7.4. Gustoća stanica također ima utjecaja na potrebe za CO<sub>2</sub>. Kad stanice rastu malom gustoćom ili su u *lag* fazi, ne proizvode CO<sub>2</sub> u dovoljnim količinama da održavaju pH na optimalnoj vrijednosti. Smanjenje količine CO<sub>2</sub> u plinovitoj fazi rezultira povećanjem pH ravnoteže u kulturi.

Temperatura je također bitan faktor koji utječe na topljivost kisika i ugljikovog dioksida koji su niske topivosti. Konstantna temperatura, kao i koncentracija CO<sub>2</sub> i vlažnost održavaju se pomoću inkubatora. Temperatura inkubacije ovisi o vrsti stanica koje se kultiviraju. Većina humanih stanica i stanica sisavaca održavaju se na temperaturi od 36 °C do 37 °C za optimalan rast. Općenito, većina staničnih linija se održava u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, 95% zraka i 99% vlažnosti.

Većina staničnih linija ima visoku toleranciju na osmotski tlak. Osmolalnost humane plazme ( $290 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ) se može smatrati kako optimalnom za humane stanice kultivirane *in vitro*, iako može biti drugačije za stanice druge vrste. Općenito je pravilo da je optimalna osmolalnost stanica sisavaca u kulturi od  $260 \text{ mOsm kg}^{-1}$  do  $320 \text{ mOsm kg}^{-1}$ . U laboratorijskoj i industrijskoj praksi važno je provjeriti osmolalnost svih medija za kulture stanica ako se mijenja njihova osnovna formulacija zbog dodataka otopina soli, suplemenata, lijekova, hormona i velikih količina puferskih agenasa. Također, metaboličke promjene koje se javljaju tijekom uzgoja stanične kulture mogu uzrokovati promjene u osmolalnosti. Da se izbjegnu velike razlike u osmolalnosti tijekom kulture, relativna vlažnost okoline bi se trebala održavati blizu zasićenja.

### **2.2.2. Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica**

Uzgoj stanica izvan organizma iz kojeg potječu omogućen je korištenjem odgovarajućeg medija za uzgoj stanica, koji sadrži smjesu hranjivih tvari u čvrstom ili tekućem obliku. Izbor medija je specifičan za tip stanice te ne postoji opći medij prikladan za sve. Karakteristike i sastojci medija variraju ovisno o potrebama stanica. Hranjivi medij mora sadržavati sve potrebne hranjive tvari koje će služiti kao prikladan izvor energije te supstrate potrebne za uspostavljanje i regulaciju staničnog ciklusa. Da bi se održali uvjeti koji su prisutni u originalnom tkivu iz kojeg potječe određena stanica, nužno je da medij sadržava anorganske soli, šećere, aminokiseline, vitamine, lipide, organske kiseline, proteine, hormone, izvore ugljika i dušika, mikronutrijente (ione i minerale) te vodu kao i stanično-specifične tvari. Često je potrebno dodati i serum te antibiotike, a kulturu je potrebno zaštititi od inhibirajućih i toksičnih agenasa. Kontaminacija može biti uzrokovana bakterijama, kvascima, gljivicama i mikoplazmama te se prenosi atmosferom, preko radne površine ili osobljem. Za zaštitu od kontaminacije primjenjuje se strogo aseptična tehnika rada, koja podrazumijeva rad u laminaru ili komori za sterilan rad te održavanje čistoće radnih površina sa 70%-tnim etanolom.

Osnovna komponenta medija za uzgoj stanica jesu ugljikohidrati, odnosno glukoza. Ona je glavni izvor energije i ugljika te se dodaje u medij u koncentracijama od 5 do 25 mM. Metabolizira se glikolizom, pri čemu nastaje piruvat koji se dalje prevodi u laktat ili acetyl-CoA koji može ući u ciklus limunske kiseline i dati  $\text{CO}_2$  i vodu. Stvaranje laktata u mediju kulture upućuje na to da ciklus limunske kiseline ne funkcionira jednako u *in vitro* i *in vivo* uvjetima te u kulturama visoke gustoće može stvarati probleme, jer uzrokuje zakiseljavanje

medija. Također, laktat u visokim koncentracijama djeluje toksično na stanice inhibirajući njihov rast. Moguće je djelomično zamjeniti glukozu s nekim drugim izvorom ugljika (manozom, fruktozom, galaktozom ili maltozom) čime se smanjuje stopa potrošnje glukoze i posljedično nastaje manje laktata, ali cjelokupna zamjena nije preporučljiva zbog promjena koje se javljaju u proteinima.

Aminokiseline potrebne za uzgoj su esencijalne aminokiseline, ali dodaju se i neesencijalne. U esencijalne aminokiseline, one koje organizam ne može sintetizirati, spadaju cistein i tirozin, ali potrebe variraju ovisno o staničnoj liniji. Aminokiseline su nužne za sintezu proteina, nukleotida i lipida, a osim toga mogu se koristiti kao izvor energije. Ove komponente se mogu osigurati kao definirana smjesa ili u obliku proteinskih hidrolizata, kao što je laktoalbumin, ili kao hidrolizati biljnog porijekla, kao što su uljana repica, soja i riža. Suplementacija sa kvašćevim ekstraktom također osigurava dodatne aminokiseline. Obično se u medij za uzgoj dodaje 0,1 do 1 mM svake aminokiseline. Glutamin, metionin i serin su limitirajući faktori za rast (Freshney, 1992). Glutamin djeluje kao izvor ugljika, dušika i energije te se obično dodaje u većim koncentracijama (oko 2 mM) u odnosu na ostale aminokiseline. Budući da je podložan termičkoj degradaciji potrebno ga je dodavati po potrebi. Glavni metabolit metabolizma glutamina je amonijak, koji slično kao laktat toksično djeluje na rast stanica i pri povećanoj koncentraciji inhibira njihov rast. Može se enzimski prevesti u glutaminsku kiselinu, leucin i izoleucin putem enzima prisutnih u stanicama te također u serumu dodanom mediju za uzgoj (Freshney, 1992).

Većina stanica zahtjeva medij koji sadrži vitamine B kompleksa, dok su ostali vitamini osigurani dodatkom seruma u medij za uzgoj. Unatoč tome, kada se upotrebljava medij bez seruma, treba osigurati i vitamine topljive u vodi kao što su biotin, folna kiselina, niacin, pantotenska kiselina, tiamin, askorbinska kiselina, ali i one topljive u mastima, vitamine B12, A, D, E i K. Vitamini se koriste u vrlo niskim količinama kao enzimski kofaktori, esencijalni za opći stanični metabolizam. Dok askorbinska kiselina djeluje pri sintezi kolagena, vitamin A djeluje na rast stanica i diferencijaciju. Vitamin K je potreban za gama-karboksilaciju i pravilno procesiranje proteina. Vitamin E je antioksidans, dok vitamin D regulira transport iona kalcija i djeluje kao hormon, no toksičan je ako se doda u suvišku. Osim seruma kao efektivna doprema vitamina u mediju za uzgoj može se koristiti kvašćev ekstrakt.

Najčešće soli koje se dodaju su  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HCO}_3^-$ . Ovi ioni su važni za održavanje ionske ravnoteže i osmotskog tlaka, osim što djeluju kao enzimski kofaktori. Soli su komponente koje doprinose najviše povećanju osmolalnosti medija.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  bitan



su dio u regulaciji membranskog potencijala, dok su  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{HCO}_3^-$  važni za sintezu makromolekula, kao i za regulaciju intracelularnog naboja (Freshney, 2005). Za suspenzijske kulture, koncentracija kalcija i magnezija bi se trebala održavati niskima da bi se spriječila agregacija i adhezija stanica. Ostali metali, poput željeza, mangana, selenija, vanadija, zinka, bakra i molibdena se obično dodaju u medij, ali u manjim koncentracijama, i to uglavnom ako medij nije suplementiran sa životinjskim serumom.

Dodavanje antibiotika je potrebno ako je otežano održavanje dobrih sterilnih uvjeta, ali u pravilu bi se trebalo izbjegavati zbog pojave mikrobiološke rezistencije (Freshney, 1992.). U prisutnosti antibiotika, kontaminacija je smanjena, ali može doći do promjene fenotipa i genotipa stanica, jer su antibiotici toksični i mogu mijenjati biokemiju stanica. Preventivne mjere protiv kontaminacije obuhvaćaju sterilne procedure (autoklaviranje), provjeravanje sterilnosti komora za sterilni rad, odnosno laminara, redovito provjeravanje kultura, uklanjanje kontaminiranih kultura umjesto pokušavanja dekontaminiranja istih.

Serum je bestanična krvna komponenta dobivena zgrušavanjem krvi životinja, a koristi se kao dodatak mediju za pravilan rast. Mnogi su izvori seruma koji se mogu koristiti pri uzgoju, među kojima su konjski, fetusa teleta i teleći. Mnoge kontinuirane kulture upotrebljavaju teleći serum, ali obično fetalni teleći serum (*fetal-bovine serum*, FBS) osigurava najbolje uvjete za rast. Serum je izvor aminokiselina, peptida, proteina, hormona, vitamina, faktora rasta, minerala i drugih tvari, čiji dodatak u medij može dovesti do smanjenja stanične smrti uzrokovane apoptozom, što omogućava produljenje stanične vijabilnosti. Glavna uloga seruma jest stimulacija rasta i ostalih staničnih aktivnosti preko hormona i faktora rasta, a također i povećanje stanične adhezije preko specifičnih proteina i opskrbe proteina za transport hormona, minerala i lipida (Freshney, 2005). Unatoč prednostima, ne smije se zanemariti činjenica kako je za dobivanje 1L seruma potrebno ubiti 44-144 životinja, što otvara brojna etička pitanja (Van der Walk et al., 2004). U skladu s time, niski prinosi seruma čine ovaj dodatak jednim od najskupljih komponenti potrebnih za uzgoj. Nadalje, serum može biti kontaminiran mikoplazmama, bakterijama, fungama koji ne samo da su loši za uzgajanje kulture, nego i za ljude koji s njima rade. Također, postoje razlike u sastavu ovisno o proizvođaču što otežava standardizaciju.

Trenutno je zbog široke upotrebe staničnih kultura u biofarmaceutskim, terapijskim i dijagnostičkim područjima, nužan razvoj novih formulacija medija, u svrhu smanjenja broja sastojaka, poboljšanja efikasnosti ili pojednostavljivanja procesa pročišćavanja. Tako se razvijaju mediji koji su u potpunosti bez životinjskih sastojaka, neki mediji su bez dodatka

seruma, ali ponekad zahtijevaju dodavanje neke proteinske frakcije ili sadrže malu količinu točno definiranih proteina. Druga vrsta je serum bez dodanih proteina, koji može uključivati komponente dobivene iz životinja, biljaka ili hidrolizata kvasca. Dok su neki mediji napravljeni tako da promoviraju razmnožavanje stanica, ostali samo održavaju staničnu i metaboličku postojanost (medij za održavanje), ali ne potiču dijeljenje stanica. Medij pripremljen s visoko pročišćenim komponentama i poznatim sastavom su označeni kao kemijski definirani mediji. Oni su manje podložni kontaminaciji i kontrola kvalitete je olakšana, no zbog visoke cijene imaju ograničenu upotrebu.

### 2.2.3. Primjena *in vitro* testova citotoksičnosti

Razvoj *in vitro* testova citotoksičnosti potaknut je zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Razumijevanjem mehanizama kojima kemikalije stvaraju oštećenja na stanicama i tkivima značajno se poboljšava mogućnost pretpostavke posljedica istih na čovjeka i/ili okoliš. Osim toga, najveća prednost *in vitro* testova pred *in vivo* testovima je smanjenje broja pokusnih životinja potrebnih za njihovo provođenje. Nekoliko je metoda kojima se želi smanjiti ili zamijeniti ispitivanja na pokusnim životinjama, primjenjujući 3R pristup (*Reduce, Refine, Replace*) ili koristeći se QSAR metodom (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*), te metaboličkim i kinetičkim modeliranjem. *In vitro* testovi imaju još neke prednosti uporabe, među kojima je niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i brzina izvođenja, gdje u kratkom vremenu možemo ispitati velik broj tvari u širokom rasponu koncentracija. Usprkos tome, *in vitro* metoda ima i svoje nedostatke, primjerice ispitivana tvar se nedovoljno ili uopće ne može metabolički aktivirati u stanici, niti reagirati sa sastojcima medija za uzgoj, u odnosu na *in vivo* stanice koje za razliku od njih nemaju izmjenjena svojstva. Zbog nemogućnosti odgovora na tkivno-specifičnu toksičnost i metaboličke promjene i dalje je nužna uporaba *in vivo* testova.

Nužna je daljna optimizacija *in vitro* testova kako bi bili što vjerodostojniji *in vivo* ispitivanjima, iako je između njih dokazana podudarnost za oko 80 % rezultata istraživanja toksičnosti (Fent, 2001).

Dvije najveće banke stanica koje sadržavaju humane kontinuirane stanične linije i od kuda se najčešće nabavljaju stanice korištene u laboratorijima jesu *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Pri izvođenju *in vitro* testova citotoksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost, odnosno učinak nastao

međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995). Za određivanje citotoksičnosti kemikalija u upotrebi je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se određuje metabolička aktivnost mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983), no to nije jedina kolorimetrijska metoda koja se primjenjuje za praćenje vijabilnosti i preživljenje stanica. Kombiniranjem više metoda možemo odrediti mehanizam djelovanja toksičnosti. Osim inhibitornog djelovanja, ovim testom možemo odrediti i pozitivan učinak na rast stanica ispitivanjem antitumorskog ili antioksidacijskog učinka biološki aktivnih tvari.

1990. godine je Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) predložio primjenu *in vitro* testa koji bi se koristio za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija, a sadržava listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija. Pomoću ovog i sličnih *in vitro* testova izabiru se željeni spojevi koji bi mogli imati antitumorski potencijal i primjenjuju se kao potencijalni antitumorski lijekovi u *in vivo* istraživanjima.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

FBS (eng. *Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Kristal ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Nesteroidni protuupalni lijekovi: fluniksin (FLU), ibuprofen (IBP), vedaprofen (VDP), tolfenamatna kiselina (TFA), diklofenak (D); Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

The Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS reagens), Promega, SAD

##### 3.1.2. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g

Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4 % otopina tripan-plavo:

boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20,00 mL

0,2 % otopina kristal-ljubičasto:

boja kristal-ljubičasto	0,2 g
2 % etanol	10,00 mL

### 3.1.3. Uređaji i oprema

Čitač mikrotitarskih pločica, Tecan, Mannedorf, Švicarska

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, Eppice)

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Neubauer komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Petrijeve posude za kulture stanica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

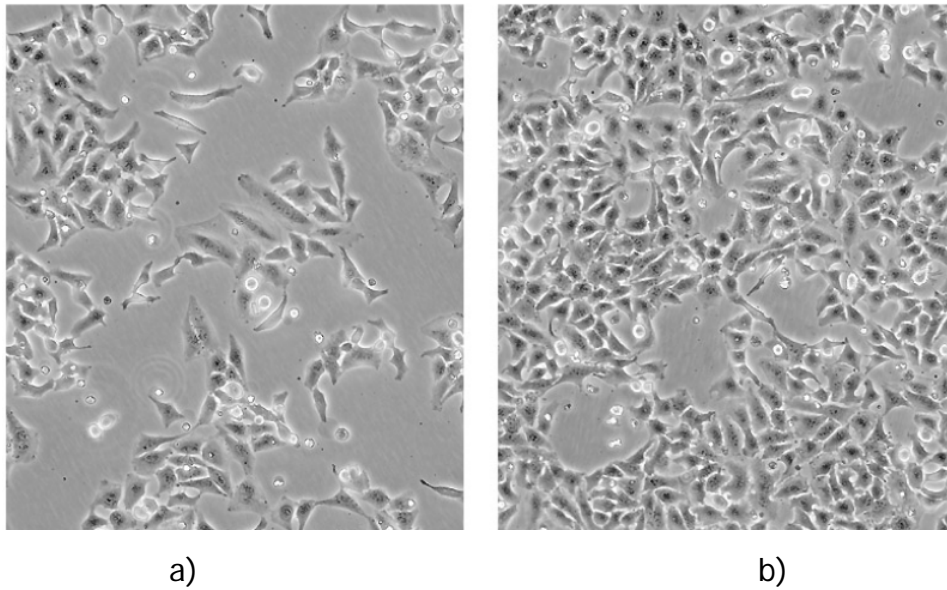
Ploče s 6 jažica, Corning, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

### 3.1.4. Stanične linije

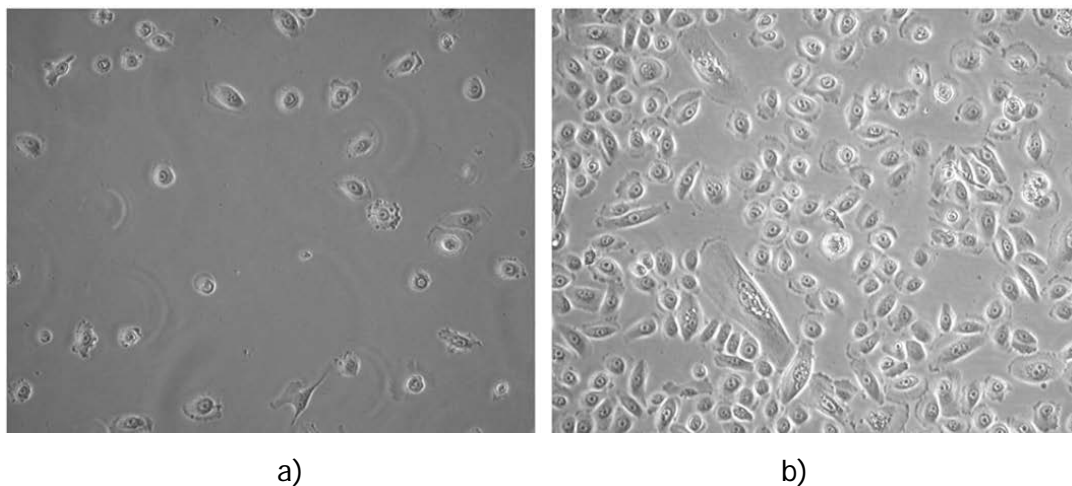
U ovom radu koristili smo se dvijema humanim staničnim linijama, tumorska stanična linija (HeLa) i normalna stanična linija (HaCaT).

HeLa stanična linija je prva uspostavljena stanična kultura i jedna od najčešće korištenih u svijetu. Stanice su izolirane iz tumora vrata maternice Henriette Lacks 1952. godine. HeLa staničnu liniju karakterizira visoka stabilnost genoma, izdržljivost i prilagodljivost različitim uvjetima.



**Slika 2.** Mikroskopski prikaz HeLa stanične linije: a) mala gustoća i b) velika gustoća stanica (The Global Biorescue Center - ATCC, <<https://www.lgcstandards-atcc.org>> Pristupljeno 29. srpnja 2020.)

HaCaT stanična linija dobivena je iz kože odraslog čovjeka, to je transformirana aneuploidna stanična linija besmrtnih keratinocita koja se pokazala kao dobar *in vitro* model u istraživanjima, budući da ima visoku sposobnost diferencijacije i proliferacije.



**Slika 3.** Mikroskopski prikaz HaCaT stanične linije: a) mala gustoća i b) velika gustoća stanica (The Global Biorescue Center - ATCC, <<https://www.lgcstandards-atcc.org>> Pristupljeno 29. srpnja 2020.)

Obje stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

### 3.1.5. Nesteroidni protuupalni lijekovi

U ovom radu korišteni su nesteroidni protuupalni lijekovi navedeni u Tablici 1:

**Tablica 1.** NSAID-ovi korišteni u radu te njihove kratice i molekulske mase

NSAID	Molekulska masa (g mol <sup>-1</sup> )
Ibuprofen (IBP)	206,290
Fluniksini (FLU)	296,240
Diklofenak (DC)	296,148
Tolfenamatna kiselina (TFA)	261,707
Vedaprofen (VDP)	282,380

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Uzgoj humanih staničnih linija

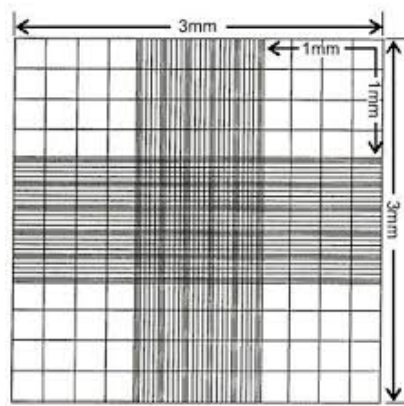
Uzgoj humanih staničnih linija provodi se u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i kontroliranoj atmosferi sa 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub>. Stanice se obično održavaju u T-bocama ili Petrijevim zdjelicama za uzgoj kultura stanica. Stanice se svakodnevno promatraju pod inverznim mikroskopom, čime se prati brojnost stanica, njihova morfologija i pričvršćenost za podlogu. Kada prekrivenost podloge prijeđe otprilike 80%, stanice je potrebno precijepiti kako ne bi došlo do inhibicije njihova rasta uslijed nedostatka površine za rast ili tzv. kontaktne inhibicije. Stanice je osim navedenog, potrebno precijepiti i kada se potroše hranjive tvari u mediju ili se nakupe toksični metaboliti.

### 3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Ova metoda podrazumijeva bojanje stanica bojom tripan-plavo, nakon čega slijedi brojanje stanica pomoću Neubaerove komorice. Bojom tripan-plavo obojaju se samo mrtve stanice, jer njihova membrana gubi oblik i postaje propusna za bojilo, dok žive stanice ostaju neobojene. Uzorak za brojanje se pripremi tako da se sterilnom pipetom ukloni hranjivi medij

iz jažica te doda 1 mL tripsina radi odvajanja stanica od podloge. Uspješnost odvajanja se prati pod inverznim mikroskopom, a kada se stanice zaokruže odvojene su od podloge. Odvojenim stanicama se dodaje 2 mL medija sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina, a stanice se zatim resuspendiraju i uzima se 20  $\mu\text{L}$  suspenzije stanice te 20  $\mu\text{L}$  boje tripan-plavo. Zatim se od tako pripremljenog uzorka uzima alikvot ( $V=20 \mu\text{L}$ ) i nanosi u Neubauerovu komoricu. Komorica se dijeli na četiri velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu se nalazi 16 malih kvadratića (Slika 4). Broje se stanice unutar četiri velika kvadrata, a koncentracija stanica se računa prema formuli:

$$\text{Broj stanica mL suspenzije}^{-1} = (\text{zbroj stanica izbrojenih u 4 kvadrata}) \times 5 \times 10^3 \quad (1)$$



**Slika 4.** Prikaz velikih i malih kvadrata Neubaerove komorice

### 3.2.3. *In vitro* ispitivanje djelovanja NSAID-a

Nakon brojanja stanica u Neubaerovoj komorici izračunat je potreban volumen za naciepljivanje stanica u ploču s 96 jažica, pri čemu je njihova početna koncentracija iznosila oko  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . U svaku jažicu naciepljeno je 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica, koje su dalje inkubirane 24h i potom tretirane NSAID-ovima u koncentracijama od 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  i 250  $\mu\text{M}$ . Stanice su potom inkubirane dan (24 sata) ili dva (48 sati) nakon čega je provedena MTS metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Nakon navedenog vremena inkubacije s ispitivanom tvari, stanicama se uklanja medij s NSAID-ovima te u svaku jažicu doda svježi medij s MTS reagensom (10  $\mu\text{L}$  MTS reagensa u 100  $\mu\text{L}$  medija za uzgoj). Nakon toga ploče sa stanicama se vraćaju natrag u inkubator na naredna 3-4 sata te se potom očitavaju na čitaču ploča.



The Cell Titer 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test) za određivanje vijabilnosti stanica je kolorimetrijska metoda koja se provodi na principu dokazivanja aktivnosti dehidrogenaze u živim stanicama, odnosno stanične vijabilnosti. Aktivna stanica posjeduje dehidrogenaze koje imaju sposobnost redukcije MTS-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol). Redukcijom nastaje topljivi spoj formazan, zbog čega dolazi do promjene boje iz žute u ljubičastu. Broj živih stanica proporcionalan je intenzitetu obojenja medija, to jest što je obojenje jače, prisutno je više živih stanica. Intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm, a očitani su primjenom čitača ploča.

Prema dobivenim apsorbancijama, određuje se postotak preživljenja stanica prema formuli:

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\text{Auzorak}}{\text{Akontrola}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.5. Klonogena analiza

Prema definiciji, klonogeni test je *in vitro* metoda kojom se određuje preživljenje stanica temeljeno na sposobnosti pojedinačne stanice da formira koloniju. Test ispituje sposobnost neograničenog rasta svake stanice u kulturi, što je glavno obilježje tumorskih stanica. Pomoću ove metode moguće je mjeriti utjecaj ionizirajućeg zračenja na staničnu proliferaciju i sposobnost formiranja kolonija, ali i odrediti učinkovitost ostalih citotoksičnih agenasa.

Postupak započinje nacjepljivanjem prethodno uzgojenih HeLa stanica na dvije ploče sa 6 jažica (200 stanica u 2 mL medija). Stanice je potrebno inkubirati 24h, nakon čega su tretirane NSAID-ovima u koncentracijama od 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ . Također, nužno je imati i kontrolne stanice koje nisu tretirane NSAID-ovima. Nakon tretmana, koji je bio dva dana, ukloni se hranjivi medij i zamjeni svježim DMEM-om, te se nastavlja inkubacija stanica u inkubatoru do porasta vidljivih kolonija. Potrebno je određeno vrijeme za formiranje kolonija (obično 2-3 tjedna). Kada kolonije postanu vidljive, slijedi bojanje stanica bojom kristal ljubičasto. Bojanje se provodi tako da se ukloni medij te se stanice isperu PBS puferom. Nakon toga, dodaje se metanol za fiksaciju stanica, koji se uklanja nakon 10 minuta. Ploču je potrebno ostaviti na zraku kako bi dno jažica bilo potpuno suho te se potom dodaje boja kristal ljubičasto koja se inkubira otprilike 10-tak minuta. Konačno, boja se uklanja i jažice se ispiru s PBS puferom i deioniziranom vodom nakon čega se može izbrojati broj poraslih

kolonija u svim uzorcima. Prema broju poraslih kolonija računa se učinkovitost nacijepivanja (eng. *plating efficiency*, PE), koju definiramo kao omjer broja poraslih kolonija u odnosu na broj stanica koje smo nacijepili. Računa se i frakcija preživljenja (eng. *surviving fraction*, SF), to jest udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima.

$$\text{Učinkovitost nacijepivanja (PE)} = \frac{\text{broj kolonija porasli u kontroli}}{\text{broj nacijepjeni stanica}} \times 100 \quad (3)$$

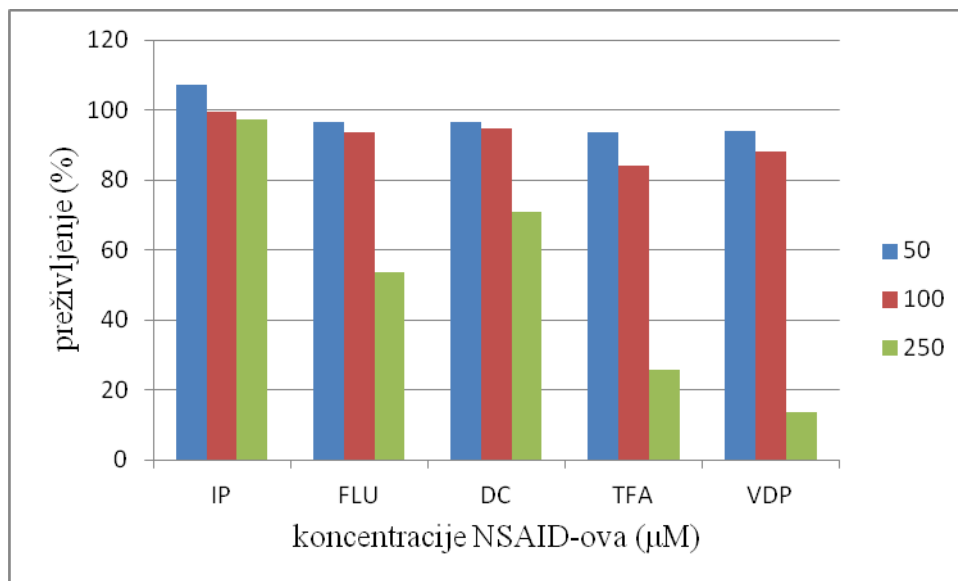
$$\text{Frakcija preživljenja (SF)} = \frac{\text{broj kolonija porasli nakon tretmana}}{\text{broj nacijepjeni stanica}} \times 100 \quad (4)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

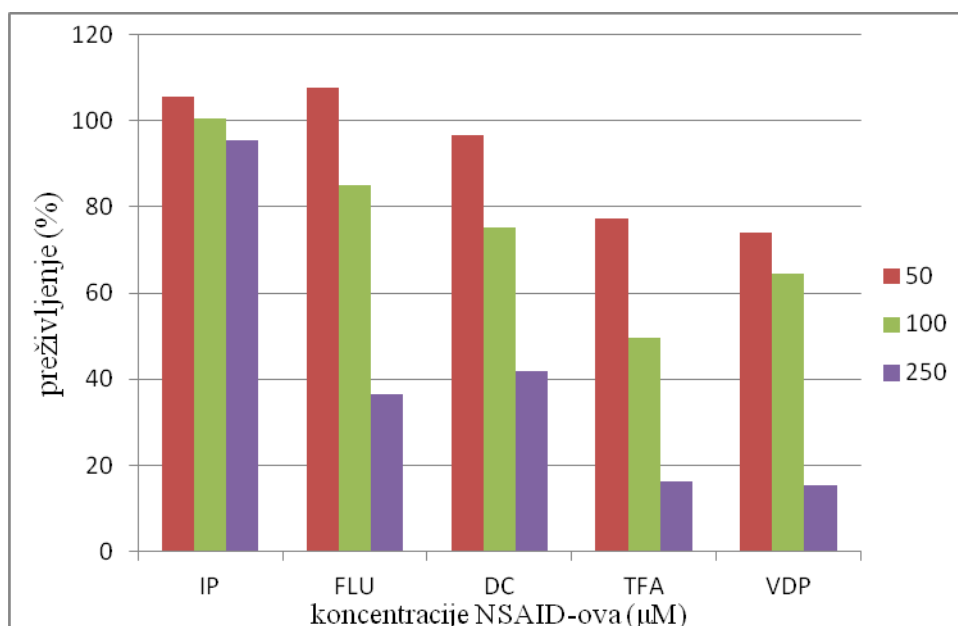
Nesteroidni protuupalni lijekovi su jedni od najčešće korištenih lijekova u svijetu. Zbog svojeg višestrukog djelovanja (analgetskog, antipiretskog i protuupalnog) pronašli su primjenu u liječenju raznih bolesti, najviše kod osoba starije životne dobi. Unatoč širokoj rasprostranjenosti, povezuju se sa nizom štetnih nuspojava, stoga se i nadalje istražuju kako bi se poboljšala njihova svojstva i primjena. Osim toga, zbog njihovog potencijalnog antikancerogenog djelovanja, zadnje desetljeće provode se brojne studije u svrhu istraživanja i primjene NSAID-ova kao antikancerogenih sredstava. U ovom radu ispitan je učinak pet različitih NSAID-ova (ibuprofena, fluniksina, vedaprofena, tolfenamatne kiseline i diklofenaka) na humane stanične linije HeLa (tumorska stanična linija) i HaCaT (normalna stanična linija). Učinak je ispitan primjenom *in vitro* metode određivanja preživljenja stanica, tzv. MTS testom, dok je njihov antitumorski potencijal ispitan primjenom klonogene analize.

### 4.1. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova na preživljenje HeLa i HaCaT stanica

HeLa i HaCaT stanice nacijepljene su u ploče s 96 jažica te nakon 24h inkubacije tretirane sa određenim koncentracijama NSAID-ova (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  i 250  $\mu\text{M}$ ) u 5 paralela za svaku koncentraciju, a pokus je ponovljen 2x za svaku staničnu liniju. Tretman se provodio u trajanju od 24 i 48 sati. Nakon 24 h, odnosno 48h, provedena je MTS metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Iz očitanih apsorbancija za pojedine uzorke izračunate su srednje vrijednosti te je određen postotak preživljenja tretiranih u odnosu na kontrolne stanice. Rezultati su prikazani grafički, kao ovisnost postotka preživljenja stanica o koncentraciji NSAID-a kojim su tretirane (Slika 5 i 6).



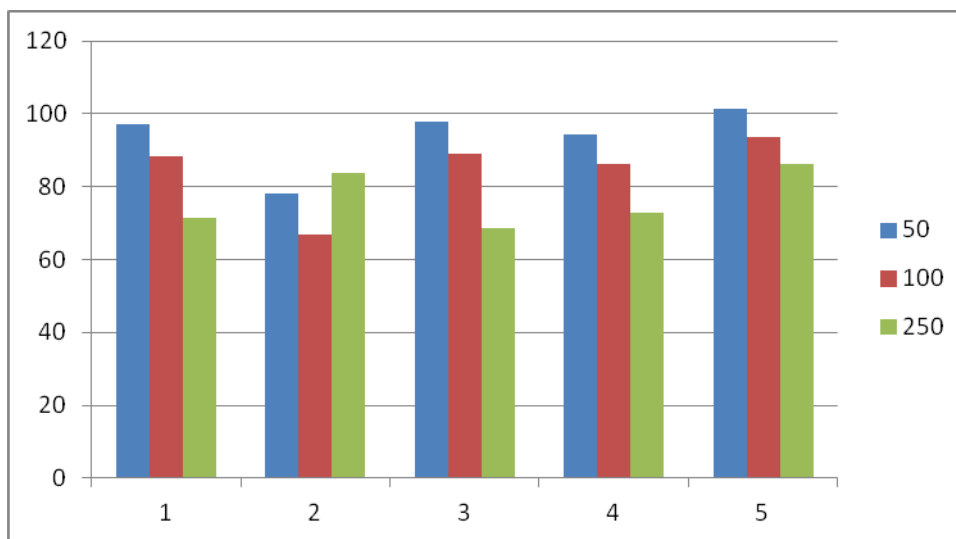
**Slika 5.** Preživljenje HeLa stanica nakon 24-satnog tretmana NSAID-ovima različitih koncentracija.



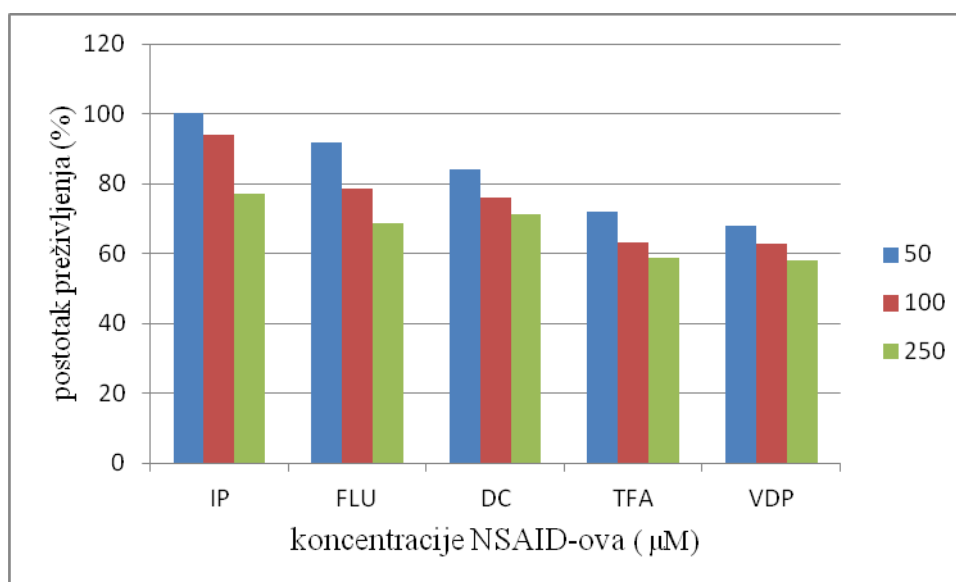
**Slika 6.** Preživljenje HeLa stanica nakon 48-satnog tretmana NSAID-ovima različitih koncentracija.

Prema dobivenim rezultatima, može se uočiti kako svi NSAID-i djeluju citotoksično na obje stanične linije, to jest da postoji inhibitorni učinak svih pet NSAID-ova kako na HeLa staničnu liniju, tako i na HaCaT. Najjači inhibitorni učinak na HeLa staničnu liniju iskazuju tolfenamatna kiselina i vedaprofen pri svim koncentracijama, pri čemu najveći inhibitorni učinak pokazuje vedaprofen pri koncentraciji od 250 μM, gdje je postotak preživljenja

13,71%. Najslabiji učinak na stanice imaju ibuprofen (95,52% pri 250  $\mu\text{M}$ ) i diklofenak (41,76% pri 250  $\mu\text{M}$ ) za koje su zabilježene najviše vrijednosti preživljenja. Postotak preživljenja stanica se linearno smanjuje sa povećanjem koncentracije određenog lijeka, odnosno učinak svih pet ispitanih NSAID-ova ovisan je o dozi.



**Slika 7.** Preživljenje HaCaT stanične linije nakon 24-satnog tretmana NSAID-ovima različitim koncentracija.



**Slika 8.** Preživljenje HaCaT stanične linije nakon 48-satnog tretmana NSAID-ovima različitim koncentracija.

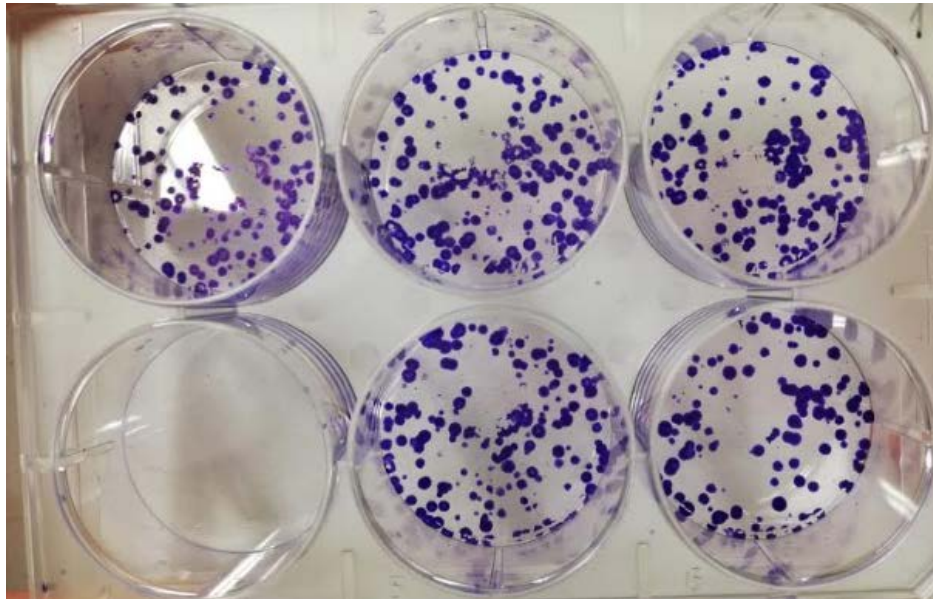
Slični rezultati, u smislu da je učinak svih pet ispitanih NSAID-ova ovisan o primjenjenoj dozi, dobiveni su sa HaCaT staničnom linijom. Ibuprofen je pokazao najslabiji inhibitorni učinak, dok vedaprofen iskazuje najjači inhibitorni učinak na HaCaT stanice pri najvećoj koncentraciji, uz postotak preživljenja stanica od 58,05 % (Slika 8).  $IC_{50}$  vrijednosti za ispitivane spojeve na HaCaT stanicama nisu izračunate jer u rasponu ispitanih koncentracija (50  $\mu$ M - 250  $\mu$ M) nije postignuta 50 %-tna inhibicija staničnog rasta, stoga njihove  $IC_{50}$  vrijednosti smatramo većima od 250  $\mu$ M.

Zanimljivo je, da su unatoč linearnom smanjenju preživljenja stanica povećanjem koncentracije lijeka, vrijednosti preživljenja HaCaT stanica znatno veće, u usporedbi s onima dobivenim za HeLa stanice. Budući da je djelovanje NSAID-ova je znatno mnogo slabije na normalnu staničnu liniju, nego na tumorske stanice, navedeni rezultati potvrđuju antitumorski potencijal NSAID-ova.

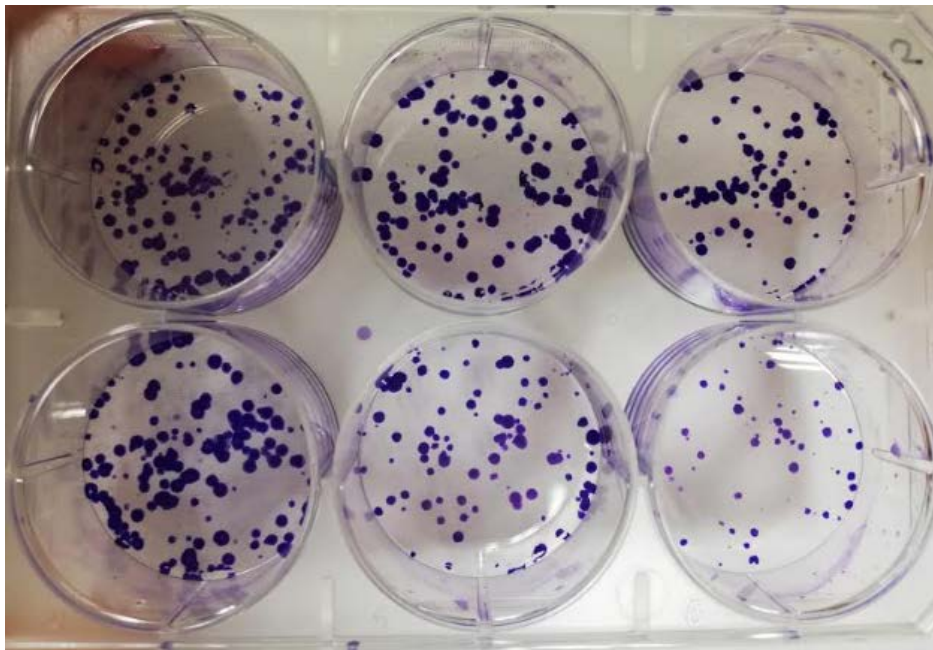
U istraživanju provedenom od strane Sankpal i sur. (2013), utvrđeno je kako tolfenamatna kiselina (TFA) selektivno inhibira proliferaciju stanica raka jetre i stanice mioblastome, te da provedeni tretman nije izazvao *in vivo* toksičnost kod laboratorijskih miševa. Prema tome, TFA pokazuje *in vitro* citotoksični učinak što je u skladu s našim dobivenim rezultatima. Najjači antiproliferativni učinak na rast stanica pokazao je vedaprofen, što se slaže sa rezultatima dobivenim u diplomskom radu iz 2017. godine (Jakopec M., 2017). Unatoč tome, za vedaprofen još uvijek ne postoje dostupni literaturni podaci o *in vitro* ispitivanjima s kojima bi mogli usporediti dobivene rezultate, zbog čega su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti ispitalo djelovanje vedaprofena i njegove moguće primjena kao antikancerogene tvari.

#### **4.2. Klonogena analiza učinka NSAID-ova na HeLa staničnu liniju**

Klonogenom analizom ispitano je djelovanje NSAID-ova na sposobnost tumorskih HeLa stanica da tvore kolonije. Postupak je proveden tako da su stanice nacijepljene u ploče sa 6 jažica, inkubirane 24h i potom tretirane određenim koncentracijama NSAID-ova (50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M). Nakon 15 dana uzgoja došlo je do pojave vidljivih kolonija u jažicama, te su stanice potom obojane bojom kristal ljubičasto. Na temelju broja izbrojanih kolonija za kontrolu te svaki uzorak, izračunata je učinkovitost nacijepljivanja (PE) i frakcija preživljenja (SF).



**Slika 9.** Rezultati klonogene analize nakon tretmana sa NSAID-ovima u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  (slijeva nadesno: gornje jažice – IBP, FLU, TFA; donje jažice – ništa, DC, VDP).



**Slika 10.** Rezultati klonogene analize nakon tretmana sa NSAID-ovima u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  (slijeva nadesno, gornje jažice: kontrola, FLU, TFA; donje jažice – IBP, DC i VDP).

**Tablica 2.** Broj poraslih kolonija nakon tretiranja stanica NSAID-ovima u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{M}$

<b>kontrola</b>	<b>Koncentracija NSAID-a</b>	<b>IBP</b>	<b>FLU</b>	<b>DC</b>	<b>VDP</b>	<b>TFA</b>
131	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	124	151	154	106	150
	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	120	114	90	54	73

**Tablica 3.** Vrijednosti učinkovitosti nacjepljivanja (PE) i frakcije preživljenja (SF) pri ispitanim koncentracijama NSAID-a

<b>PE(%)</b>	<b>Koncentracija NSAID-a</b>	<b>IBP</b>	<b>FLU</b>	<b>DC</b>	<b>VDP</b>	<b>TFA</b>
58	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,8793	0,8534	0,7931	0,5690	0,8103
	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,7845	0,6897	0,5259	0,3534	0,5172

Tablica 2 prikazuje broj poraslih kolonija nakon provođenja klonogene analize za ispitivane NSAID-e pri čemu su stanice tretirane NSAID-ovima u koncentracijama od 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ . Prema dobivenim rezultatima, najveći broj poraslih kolonija je u kontroli, što pokazuje uspješnost nacijepljivanja stanica te provedene analize. Nadalje, najveći broj poraslih kolonija nalazi izbrojan je za ibuprofen i flunixin, što je u korelaciji sa rezultatima dobivenim MTS metodom. Najmanji broj poraslih kolonija je zabilježen kod vedaprofena i tolfenamatne kiseline, što je također u skladu sa rezultatima dobivenim MTS-om. Tablica 3 prikazuje izračunate SF vrijednosti, pri čemu što je SF vrijednost manja to je manja sposobnost stvaranja kolonija nakon djelovanja ispitivane tvari, odnosno u ovom radu NSAID-a. Kao i kod MTS testa, i ovdje je za svih pet ispitanih spojeva, vidljivo da je učinak NSAID-a ovisan o dozi, odnosno SF vrijednosti su niže pri 100  $\mu\text{M}$  nego pri 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Najmanje SF vrijednosti izračunate su za spojeve vedaprofen i tolfenamatnu kiselinu pri većoj ispitivanoj koncentraciji (100  $\mu\text{M}$ ), dakle ti NSAID-i imaju najjači inhibitorski učinak na klonogeni rast tumorskih HeLa stanica. Na kraju, važno je istaknuti da u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema podataka o klonogenoj analizi za NSAID-e stoga su ovi rezultati značajni znanstveni doprinos kojim se potvrđuje antitumorski potencijal ispitanih lijekova, koji se prvenstveno koriste kao protuupalni lijekovi. Unatoč tomu, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu primjene nesteroidnih protuupalnih lijekova kao antikancerogenih tvari.



## **5. ZAKLJUČCI**

1. Učinak pet ispitanih NSAID-ova (ibuprofena, vedaprofena, diklofenaka, tolfenamatne kiseline i fluniksina) na stanične linije HeLa i HaCaT ovisan je o dozi te veća koncentracija ispitivanih tvari rezultira većim smanjenjem preživljenja stanica.

2. Citotoksični učinak svih pet ispitanih NSAID-ova zabilježen je na tumorske HeLa i na normalne HaCaT stanice, ali je jača inhibicija rasta zabilježena pri djelovanju na tumorsku staničnu liniju što ukazuje na antitumorski potencijal ispitanih spojeva.

3. Klonogenom analizom NSAID-ova na tumorske HeLa stanice potvrđen je antitumorski učinak svih pet ispitanih NSAID-ova pri čemu se vedaprofen pokazao kao najpotentniji u tom smislu.

## 6.LITERATURA

Ajani UA, Ford ES, Greenland KJ, Giles WH, Mokdad AH. (2006) Aspirin use among U.S. adults: Behavioral Risk Factor Surveillance System. *American Journal of Preventive Medicine* **30**:74-77.

Babelghaith S. D., Alarifi M. N., Wajid S., Alhawassi T. M., Alqahtani S. K., Alghadeer S. M. (2019) Knowledge of patients on safe medication use in relation to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Saudi Journal of Anaesthesia* **13**: 106–111.

Bacchi S., Palumbo P., Sponta A., Coppolino M. F. (2012) Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory & Anti-allergy agents in Medicinal Chemistry* **11**: 52–64.

Bresalier R.S., Sandler R.S., Quan H., Bolognese J.A., Oxenius B., Horgan K., Lines C., Riddel, R., Morton D.G., Lanas Á., Konstam M.A., Baron J.A. (2005) Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *The New England Journal of Medicine* **352 (11)**: 1092-102.

Castihlo L., Morales A., Augusto E., Butler M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis Group

Dai Z., Ma X., Kang H. et al. (2012) Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in *Vitro* and in *Vivo*. *Cancer Cell International* **12**: 53

DeRuiter, J. (2002) Principles of drug action 2: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. [http://www.auburn.edu/~deruija/nsaids\\_2002.pdf](http://www.auburn.edu/~deruija/nsaids_2002.pdf) Pristupljeno 14.travnja 2020.

Franken N. A., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1**: 2315–2319

Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Šrček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing and xenobiotics. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **56**: 195-204.

Majić, M. (2018) Farmakološka svojstva najčešće korištenih lijekova u (samo)liječenju boli (Diplomski rad). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:011649>

Mimica Matanović S. (2014) Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. *Medicus*, 23(1 Fenomen boli), str. 31-46. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/122391>

Nema R., Khare S. (2012) An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **3**: 219-226.

Rao P., Knaus E.E. (2008) Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **11**: 81-110.

Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.

Sankpal U. T., Lee C.M., Connelly S. F., Kayaleh O., Eslin D., Sutphin R., Goodison S., Adwan L., Zawia N. H., Lichtenberger L. M., Basha R. (2013) Cellular and organismal toxicity of the anti-cancer small molecule, tolfenamic acid: a pre-clinical evaluation. *Cell Physiol. Biochem*. **32** (3): 675-686.

Šintić A. (2019) In vitro biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, citirano: 13.06.2020.

Unchern S. (2000) Basic Techniques in Animal Cell Culture **2**: 5-19.

Wongrakpanich S., Wongrakpanich A., Melhado K., Rangaswami J. (2018) A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging and disease* **9**: 143–150

## **Izjava o izvornosti**

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Lara Butumović*