

Citotoksičnost 3-aminofenilboronične kiseline i indometacina

Bosnić, Ljubica

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:174740>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**CITOTOKSIČNOST 3-AMINOFENILBORONIČNE KISELINE I
INDOMETACINA**

DIPLOMSKI RAD

LJUBICA BOSNIĆ

Matični broj: 104

Split, svibanj 2021.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**CITOTOKSIČNOST 3-AMINOFENILBORONIČNE KISELINE I
INDOMETACINA**

DIPLOMSKI RAD

LJUBICA BOSNIĆ

Matični broj: 104

Split, svibanj 2021.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
MASTER STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTR**

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF 3-AMINOPHENYLBORONIC ACID AND
INDOMETHACINE**

DIPLOMA THESIS

LJUBICA BOSNIĆ

Parent number: 104

Split, May 2021

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemije: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada prihvaćena je na 6. elektroničkoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta održanoj 15. i 16. prosinca 2020.godine

Mentor: prof. dr. sc. Mladen Miloš

Neposredni voditelj: Dr.sc. Ivana Carev, znanstvena suradnica

Pomoć pri izradi: Anja Golemac, mag.chem i Katarina Jovanović, mag.chem

CITOTOKSIČNA AKTIVNOST 3-AMINOFENILBORONIČNE KISELINE I INDOMETACINA

Ljubica Bosnić, 104

Sažetak: Kemija borovih spojeva postaje sve veći predmet istraživanja zbog specifičnih svojstava bora i njegovih spojeva koji mogu imati primjenu u medicini i farmaciji. Boronične kiseline su kemijski spojevi koji sadrže trovalentni borov atom. Njihova blaga reaktivnost i stabilnost čine boronične kiseline atraktivnim sintetičkim međuproduktima. Borovi spojevi posjeduju značajna biološki aktivna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju mnogih bolesti. Spoj, 3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA), postoji kao bijeli kristalični prah koji je topljiv u vodi, metanolu, dimetil-sulfoksidu (DMSO). Osim 3-APBA kiseline u ovom radu ispitana je i citotoksičnost spoja indometacina. To je tvar u obliku žutog kristalnog praha, topljiva u otapalima poput kloroforma, acetona i dimetil-sulfoksida (DMSO). Indometacin je lijek koji ima protuupalna, analgetska i antipiretička svojstva, te spada u skupinu nesteroidnih protuupalnih spojeva. U ovom radu, ispitan je citotoksični učinak serije koncentracija 3-APBA i indometacina na stanične linije fibroblasta i keratinocita. Vijabilnost stanica utvrđena je pomoću MTT testa, za oba ispitana spoja u rasponu koncentracija od 0,012 mM do 0,391 mM. Za svaki pojedinačni spoj izračunate su vrijednosti koncentracije koja uzrokuje inhibiciju rasta stanica kod vijabilnosti od 50 %. Općenito, svi ispitani spojevi pokazali su veću toksičnost na staničnu liniju keratinocita nego na staničnu liniju fibroblasta. Treba uzeti u obzir i toksični učinak DMSO kao otapala. Najveću toksičnost pokazao je indometacin otopljen u DMSO dok je najnižu toksičnost pokazala 3-APBA otopljena u ultra čistoj vodi.

Glavne riječi: 3-aminofenilboronična kiselina, indometacin, MTT test, citotoksičnost

Rad sadrži: 50 stranica, 30 slika, 1 tablicu, 28 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Mila Radan, predsjednik
2. Doc.dr.sc. Franko Burčul, član
3. Prof.dr.sc. Mladen Miloš, član-mentor

Datum obrane: 27.svibnja 2021.

Rad je u tiskanom i električnom formatu (pdf format) pohranjen u knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Master study of Chemistry: Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural Science

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty of Chemistry of Chemistry and Technology Council, electronic session no.6 (from 15. i 16. December 2020)

Mentor: Mladen Miloš, PhD, associate prof.

Assistant mentor: Ivana Carev, PhD

Technical assistance: Anja Golemac, M.Sc. and Katarina Jovanović, M.Sc.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF 3-AMINOPHENYLBORONIC ACID AND INDOMETHACINE

Ljubica Bosnić, 104

Abstract: The chemistry of boron compounds is becoming increasingly investigated due to the specific properties of boron and its compounds that can be used in medicine and pharmacy. Boronic acids are chemical compounds containing a trivalent boron atom. Their mild reactivity and stability make boronic acids attractive as synthetic intermediates. Boron compounds possess significant biologically active properties that can be of exceptional benefit in the treatment of many diseases. The compound, 3-aminophenylboronic acid (3-APBA), exists as a white crystalline powder, soluble in water, methanol and dimethyl sulphoxide (DMSO). Another tested compound in this paper is called indomethacin. It is a substance in the form of a yellow crystalline powder, soluble in solvents such as chloroform, acetone, dimethyl sulphoxide (DMSO), etc. Indomethacin is a medicine that has anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties and belongs to a group of non-steroidal anti-inflammatory compounds. In this study, cytotoxic effect of a series of concentrations of 3-APBA and indomethacin on human fibroblasts and keratinocytes cells was tested. The MTT assay showed viability of cells, for both tested compounds in the concentration range of 0,012 mM to 0,391 mM. Concentration values which causes 50% inhibition of cell growth were calculated for each individual compound. All tested compounds showed higher toxicity to the keratinocyte cell line than to the fibroblasts cell line. The toxic effect of DMSO as solvent should also be taken into account. The highest toxicity was shown by indomethacin dissolved in DMSO, while the lowest toxicity was shown by 3-APBA dissolved in ultra-pure water.

Keywords: 3-aminophenylboronic acid, indomethacin, MTT assay, cytotoxicity

Thesis contains: 50 pages, 30 figures, 1 table, 28 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Prof. Mila Radan, PhD, associate prof. – committee president
2. Franko Burčul, PhD, assistant prof. - member
3. Prof. Mladen Miloš, PhD, full prof. - supervisor

Defence day: May 27th, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, a eksperimentalni dio rada u NAOS ILS laboratoriju, na Mediteranskom institutu za istraživanje života pod mentorstvom dr. sc. Ivane Carev, u razdoblju od studenog do prosinca 2020. godine.

Za početak, želim se zahvaliti neposrednoj voditeljici dr. sc. Ivani Carev što mi je pružila priliku da eksperimentalni dio svog diplomskog rada odradim na Mediteranskom institutu za istraživanje života (MEDILS).

Također, velika zahvala ide Anji Golemac, mag. chem i Katarini Jovanović, mag. chem na znanju koje su podijelile sa mnom tijekom našeg rada u laboratorijima MEDILS-a, na strpljenju, pomoći i dobroj volji koju su pokazale od prvog dana.

Zahvaljujem se i mentoru, prof. dr. sc. Mladenu Milošu, na ukazanom povjerenju te svim savjetima tijekom proteklog perioda.

Na kraju, najveću zahvalu upućujem onima koji su mi bili podrška tijekom studiranja. Hvala roditeljima, prijateljima i svim dobrim ljudima koji su mi pomogli doći do cilja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti citotoksičnost 3-aminofenilboronične kiseline otopljene u ultra-čistoj vodi, na linije stanica, fibroblasta i keratinocita.
- Odrediti citotoksičnost indometacina otopljenog u DMSO, na linije stanica fibroblasta i keratinocita.
- Odrediti citotoksičnost kontrolnog otapala DMSO na ljudske stanice, fibroblaste i keratinocite.

SAŽETAK

Kemija borovih spojeva postaje sve veći predmet istraživanja zbog specifičnih svojstava bora i njegovih spojeva koji mogu imati primjenu u medicini i farmaciji. Boronične kiseline su kemijski spojevi koji sadrže trovalentni borov atom. Njihova blaga reaktivnost i stabilnost čine boronične kiseline atraktivnim sintetičkim međuproduktima. Borovi spojevi posjeduju značajna biološki aktivna svojstva koja mogu biti od iznimne koristi u liječenju mnogih bolesti.

Spoj, 3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA), postoji kao bijeli kristalični prah koji je topljiv u vodi, metanolu, dimetil-sulfoksidu (DMSO).

Osim 3-APBA kiseline u ovom radu ispitana je i citotoksičnost spoja indometacina. To je tvar u obliku žutog kristalnog praha, topljiva u otapalima poput kloroforma, acetona, i dimetil-sulfoksida (DMSO). Indometacin je lijek koji ima protuupalna, analgetska i antipiretička svojstva, te spada u skupinu nesteroidnih protu-upalnih spojeva.

U ovom radu, ispitan je citotoksični učinak serije koncentracija 3-APBA i indometacina na ljudske stanice fibroblasta i keratinocita. Vijabilnost stanica utvrđena je pomoću MTT testa, za oba ispitana spoja u rasponu koncentracija od 0,012 mM do 0,391 mM. Za svaki pojedinačni spoj izračunate su vrijednosti koncentracije koja uzrokuje inhibiciju rasta stanica kod vijabilnosti od 50 %. Općenito, svi ispitani spojevi pokazali su veću toksičnost na staničnu liniju keratinocita nego na staničnu liniju fibroblasta. Treba uzeti u obzir i toksični učinak DMSO kao otapala. Najveću toksičnost pokazao je indometacin otopljen u DMSO dok je najnižu toksičnost pokazala 3-APBA otopljena u ultra čistoj vodi.

Ključne riječi: indometacin, 3-aminofenilboronična kiselina, MTT test, citotoksičnost

SUMMARY

The chemistry of boron compounds is becoming increasingly investigated due to the specific properties of boron and its compounds that can be used in medicine and pharmacy. Boronic acids are chemical compounds containing a trivalent boron atom. Their mild reactivity and stability make boronic acids attractive as synthetic intermediates. Boron compounds possess significant biologically active properties that can be of exceptional benefit in the treatment of many diseases.

The compound, 3-aminophenylboronic acid (3-APBA), exists as a white crystalline powder, soluble in water, methanol and dimethyl sulfoxide (DMSO). Another tested compound in this paper is called indomethacin. It is a substance in the form of a yellow crystalline powder, soluble in solvents such as chloroform, acetone, dimethyl sulphoxide (DMSO), etc. Indomethacin is a medicine that has anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties and belongs to a group of non-steroidal anti-inflammatory compounds.

In this study, cytotoxic effect of a series of concentrations of 3-APBA and indomethacin on human fibroblasts and keratinocytes cells was tested. The MTT assay showed viability of cells, for both tested compounds in the concentration range of 0,012 mM to 0,391 mM. Concentration values which causes 50% inhibition of cell growth were calculated for each individual compound. All tested compounds showed higher toxicity to the keratinocyte cell line than to the fibroblasts cell line. The toxic effect of DMSO as solvent should also be taken into account. The highest toxicity was shown by indomethacin dissolved in DMSO, while the lowest toxicity was shown by 3-APBA dissolved in ultra clean water.

Keywords: indomethacin, 3-aminophenylboronic acid, MTT assay, cytotoxicity

SADRŽAJ

1. OPĆI DIO	1
1.1. Kemija borovih spojeva	1
1.2. Boronične kiseline i njihovi derivati	1
1.2.1. Građa fenilboronične kiseline	3
1.2.2. Fizikalna svojstva	3
1.2.3. Arilboronične kiseline	3
1.2.4. Biološka aktivnost boroničnih kiselina	4
1.2.4.1. Antitumorska aktivnost	4
1.2.4.2. Antimikrobna aktivnost	5
1.2.4.3. Inhibitorna aktivnost	5
1.2.4.4. Primjena u biokonjugaciji i obilježavanju proteina i stanične površine	6
1.2.5. Primjena boroničnih kiselina i njihovih derivata u liječenju bolesti	6
1.3. 3-Aminofenilboronična kiselina (3-APBA)	7
1.4. Indometacin	8
1.4.1. Farmakodinamika indometacina	9
1.4.2. Mehanizam djelovanja indometacina	9
1.4.3. Farmakokinetika indometacina	10
1.4.4. Svojstva i dostupnost indometacina	10
1.4.5. Primjena indometacina u liječenju bolesti	11
1.5. Kultura stanica	13
1.6. Fibroblasti i keratinociti (ljudske stanice)	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO	15
2.1. Reagensi i kemikalije	15
2.2. Oprema i materijali	15
2.3. Priprema otopina ispitanih spojeva	21
2.4. Uspostavljanje kulture ljudskih stanica	23
2.5. Mjerenje citotoksičnosti spojeva na ljudske stanice – MTT test	25
2.6. Statistička obrada podataka	27
3. REZULTATI I RASPRAVA	28
4. ZAKLJUČAK	36
LITERATURA	37

1. OPĆI DIO

1.1. Kemija borovih spojeva

Od 20. stoljeća, kemija borovih spojeva postaje sve većim predmetom istraživanja. Ono što čini kemijski element bor zanimljivim svakako je njegov položaj u periodnom sustavu. S jedne strane bor je okružen nemetalima poput ugljika i dušika koji spremno dijele elektrone i stvaraju kovalentnu vezu, s druge strane, okružen je metalima poput aluminijskim i galijom koji lako otpuštaju svoje elektrone i stvaraju ionsku vezu. Bor ima snažan afinitet za elektrone zahvaljujući svojoj praznoj p orbitali, što čini njegove spojeve siromašnima s obzirom na elektrone i dovodi do nastajanja raznovrsnih struktura. Borovi spojevi skloni su stvaranju struktura zvanih „rešetke“ i „grozdovi“. Bor je esencijalan element za biljke i vrlo je važan u antibiotskoj tvari boromicinu od kojeg se proizvodi streptomycin. Bor u organizam unosimo putem hrane. Prirodni izvori bogati borom su: jabuke, kruške, naranče, orašasti plodovi itd. (1)

1.2. Boronične kiseline i njihovi derivati

Prema kemijskoj strukturi boronične kiseline su kemijski spojevi koji sadrže trovalentni atom bora. Taj atom može vezati jedan alkilni supstituent (C-B vezu) i dvije hidroksilne skupine za popunjavanje preostalih valencija na atomu bora. Za razliku od karboksilnih kiselina, njihovih analoga ugljika, boronične kiseline nisu pronađene u prirodi. To su abiotički spojevi, izvedeni sintetički iz primarnih izvora bora, poput borne kiseline, koja se proizvodi zakiseljavanjem boraksa ugljikovim dioksidom. Njihova jedinstvena svojstva, kao blage organske Lewisove kiseline i njihova blaga reaktivnost, zajedno s njihovom stabilnošću i lakoćom rukovanja, čine boronične kiseline posebno atraktivnom skupinom sintetičkih međuprodukata. Zbog niske toksičnosti i brze razgradnje, u ekološki prihvatljivu bornu kiselinu, boronične kiseline se mogu smatrati „zelenim spojevima“. Nedavno odobrenje antikancerogenog sredstva *Velcade*, prvog komercijalnog lijeka koji sadrži boroničnu kiselinu, dodatno potvrđuje status boroničnih kiselina kao važnog razreda spojeva u kemiji, farmaciji i medicini. (2)

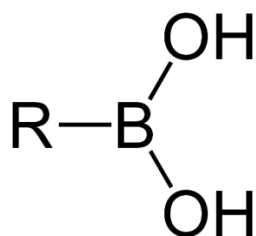


Slika 1. Prvi komercijalni lijek koji sadrži boroničnu kiselinu (3)

Prve boronične kiseline spominju se u literaturi još od 1860.godine. Boronične kiseline lako stupaju u interakcije s Lewisovim bazama zbog prazne borove p-orbitale. Taj proces se odvija preko interkonverzije sp² u sp³ hibridizaciju. Polimerne boronične kiseline mogu biti korištene u fiziološki relevantnom pH području s obzirom da dodatak različitih substituenata na fenilni prsten omogućava podešavanje pK_a vrijednosti. (2)

Boronične kiseline imaju ogroman potencijal kao samozacjeljujući materijali, terapijski agensi, inhibitori enzima, senzori za šećere, glikoproteine i antitijela koji oponašaju polisaharide na staničnoj površini. (2)

Reaktivnost i svojstva boronične kiselina jako ovise o prirodi njezinih supstituenata, prema tipu skupine (R) izravno vezan za bor. Na isti način kao i za uobičajene druge funkcijske skupine, boronične kiseline se klasificiraju u podtipove kao što su alkil-, alkenil-, alkinil-, i aril- boronična kiselina. (2)



Slika 2. Struktura boronične kiseline (4)

1.2.1. Građa fenilboronične kiseline

Kristalna struktura fenilboronične kiseline zabilježena je 1977. godine od strane Rettiga i Trottera. Kristali su orto-rombični i svaka asimetrična jedinica sastoji se od dvije različite molekule, povezane sa par vodikovih veza O—H—O. Inspiriran strukturalnim ponašanjem fenilboronične kiseline i njenom sklonošću stvaranja vodikovih veza, Wuest i suradnici nedavno su izvijestili o dizajnu novog dijamanta iz kristalizacije tetraedarski oblikovane tetraboronske kiseline. (1)

1.2.2. Fizikalna svojstva

Većina boroničnih kiselina postoji u obliku bijele kristalne krute tvari s kojima se može rukovati na zraku bez posebnih mjera opreza. Na sobnoj temperaturi, boronične kiseline kemijski su stabilne i većina pokazuje stabilnost kroz dulji vremenski period. Nemaju tendenciju disproporcioniranja u njihovu odgovarajuću bornu kiselinu, čak i pri visokim temperaturama. Kada im se ukloni voda, bilo s agensom za hvatanje vode ili kroz uparavanje, boronične kiseline tvore cikličke i linerani oligomerne anhidride. (1)

Lewisova kiselost boroničnih kiselina i sposobnost doniranja vodikove veze od njihove hidroksilne skupine, kombiniraju se dajući polarni karakter većini ovih spojeva. Iako se polaritet glave boronične kiseline može ublažiti relativno hidrofobnim repom kao supstituentom bora, većina malih boroničnih kiselina su amfifilne. Djelomična topljivost mnogih boroničnih kiselina u vodi i polarnim organskim otapalima, otežava izolaciju i pročišćavanje. (1)

1.2.3. Arilboronične kiseline

Arilboronične kiseline i dalje su najpopularnija klasa boroničnih kiselina. Njihova popularnost u medicinskoj kemiji može se pripisati njihovoj ulozi u sintezi biarilnih jedinica koje su prisutne u strukturi nekoliko farmaceutskih lijekova. (1)

Jedan od prvih, vjerovatno i dalje najjeftiniji i najčešći način sintetiziranja arilboroničnih kiselina, uključuje reakciju organometalnih spojeva (litij ili magnezij) s boratnim esterom na niskoj temperaturi. (1)

1.2.4. Biološka aktivnost boroničnih kiselina

Posljednjih 20-ak godina, posebno se istražuju boronične kiseline i njihovi derivati boroksini, koji su produkti dehidracije boroničnih kiselina. Razlog tome je moguća terapijska primjena vezana uz njihovu zanimljivu biološku aktivnost. Prvi lijek kao derivat boronične kiseline generičkog imena *bortezomib* pojavio se na tržištu 2003. godine, a služi u terapiji multiplog mijeloma. Boronične kiseline su također istraživane u sklopu bor-neutron hvatajuće terapije. Danas se ova metoda koristi kao neinvazivna terapija zračenjem za liječenje zloćudnih tumora mozga. (2)

1.2.4.1. Antitumorska aktivnost

Prema istraživanju njemačkog onkologa dr. Paula Seegera, rak može započeti slabljenjem stanične membrane. S obzirom da je bor važan za integritet stanične stijenke, moguće je da je on potencijalni inhibitor tumorskog rasta. (5)

Lijek generičkog naziva *bortezomib* sadrži borov spoj i djeluje na proteasom. Proteinski kompleksi koji se nalaze u jezgri i koji razgrađuju nefunkcionalne proteine se nazivaju upravo proteasomom. Bor se veže na katalitičko mjesto proteasoma 26 S i na taj način blokira njegovu aktivnost. Inhibicijom proteasoma pokušava se spriječiti razgradnja proapoptičkih proteina, koji kod pojačane ekspresije nefunkcionalnih proteina aktiviraju mehanizam programirane stanične smrti. (5)

Sve više se istražuje i „Terapija hvatanja neutrona“ (engl. *Boron neutron capture therapy*, BNCT). Rad u ovome području tek je nedavno dosegao fazu kliničkog ispitivanja. Ova terapija se koristi nuklearnom reakcijom. Ta reakcija se zbiva kada borov izotop 10 bude ozračen nisko energetskim neutronima. Prednost ove metode je u tome što se nuklearna reakcija zbiva samo unutar stanica u kojima su akumulirani borovi spojevi. Dakle, možemo zaključiti da se na taj način ne oštećuju ostale stanice. Tumorske stanice preferiraju nakupljanje borovih spojeva te dolazi do stvaranja citotoksičnog efekta. (5)

1.2.4.2. Antimikrobna aktivnost

Michaelis i Becker primijetili su toksičnost fenilboronične kiseline protiv mikroorganizama i njezinu relativnu neškodljivost za više životinje prije više od jednog stoljeća. Antimikrobna svojstva jednostavnih derivata arilboronične kiseline dodatno su ispitana 1930-ih. Zanimljivo je da je aktivnost arilboroničnih kiselina u biljaka bila temeljito istražena, a za nekoliko njih je utvrđeno da potiču rast korijenja. Razne boronične kiselina i njeni derivati ocjenjeni su kao sredstva za sterilizaciju u kućanstvu. Nekoliko boroničnih kiselina i estera pokazuju snažno antifungalno djelovanje. Na primjer, obitelj diazoborina odavno je poznata kao moćna tvar protiv širokog spektra na Gram negativne bakterije. Diazoborini su prvi spojevi bora koji su se ispitivali kao terapeutici te ukazali na potencijal izoelektronske veze B-N. (6)

1.2.4.3. Inhibitorna aktivnost

Lipaze su enzimi odgovorni za hidrolizu netopljivih hidrofobnih lipida. Lipaze hidroliziraju lipide, i na taj način omogućavaju njihovu apsorpciju u probavnom traktu. Fenilboronične kiseline pokazale su se kao inhibitori enzima hidrolaza i proteaza. To inhibitorsko djelovanje posljedica je prelaska trigonske boronične kiseline u negativno nabijen tetraedarski kompleks sa serin hidroksilnim grupama u aktivnom mjestu lipaza. Afinitet enzima prema boroničnim kiselinama puno je veći nego za tipične lipidne supstrate. Lipazni inhibitori mogu se koristiti u svrhu prevencije hidrolize lipida i redukcije apsorpcije masti. Na taj način, neprobavljeni trigliceridi se lako izbacuju iz tijela. (6)

Boronične kiseline inhibiraju hidrolitičke enzime poput serinskih proteaza, a dokazana je učinkovitost sorbenta arilboronične kiseline na bazi sefaroze u kromatografskom pročišćavanju ove klase enzima. U razvoju inhibitora enzima na bazi borne kiseline kao farmaceutskih lijekova, ciljna specifičnost unutar široke obitelji presudna je kako bi se izbjegle nuspojave. Uobičajeni mehanizam inhibicije je stvaranje tetrakoordinatnog boronatnog kompleksa, koordinacijom hidroksilnog nukleofila bočnog lancaaktivnog ostatka serina. Međutim, identificirani su i drugi načini inhibicije, poput stvaranjakovalentnih adukta s ostacima serina ili histidina aktivnog mjesta. (6)

Istraživani su kinetički parametri i mehanizam inhibicije enzima katalaze u prisutnosti dikalijeveg-trioksohidroksitetrafluorotriborata. Pokazano je da enzim katalaza slijedi Michaelis-Menteničinu kinetiku u odsutnosti i prisutnosti inhibitora. Prisutnost inhibitora reducirala je maksimalnu brzinu, a ostavila Michaelis-Menteničinu konstantu nepromijenjenom. To dovodi do zaključka da se inhibitor podjednako veže za slobodni oblik enzima, kao i na enzim-vodikov peroksid kompleks. Pokazano je da mM koncentracije inhibitora umanjuju aktivnost katalaze. (5)

1.2.4.4. Primjena u biokonjugaciji i obilježavanju proteina i stanične površine

Proteini i enzimi mogu se kovalentno povezati s 3-aminofenilboroničnom kiselinom. Dobiveni konjugati su pokazali vezivanje na male molekule cis-diola i glikozilirani hemoglobin. Nosači borne kiseline mogu se koristiti za pročišćavanje glikohemoglobina. Prije više od dva desetljeća izvijestilo se, da se arilboronična kiselina obilježena dansilom, veže na staničnu stijenu bakterije *Bacillus subtilis*, vjerojatno putem stvaranja boronatnog estera sa šećernom prevlakom. Nedavno su Smith i suradnici dizajnirali liposome sa fosfolipidima koji sadrže arilboroničnu kiselinu i pokazali vezanje tih liposoma na eritrocite, vjerojatno interakcijom s glikokaliksom. (1)

1.2.5. Primjena boroničnih kiselina i njihovih derivata u liječenju bolesti

Danas se ulaže jako mnogo sredstava za razvoj lijekova baziranih na borovim spojevima. Naime, zahvalni možemo biti narodnoj medicini. Još od davnina, savjetuje se uzimanje boraksa za liječenje kandidaze. Također, kopriva kao biljka izuzetno bogata borom preporuča se za liječenje reume i artritisa. Agencija za hranu i lijekove 2014. je godine odobrila antifungalni lijek generičkog naziva *tavaborol* s borovim spojem kao aktivnom tvari.(6) Sindrom stečene imunodeficijencije ili SIDA je virusna bolest koju uzrokuje HIV virus. Opsežna istraživanja u svrhu liječenja ove bolesti dovela su do spoznaje o potencijalnoj biomedicinskoj primjeni boronične kiseline. Boronične kiseline formiraju dinamički ukriženo povezan hidrogel reverzibilnom kovalentnom interakcijom sa salicilnom hidroksamičnom kiselinom unutar važnog pH područja. Hidrogelovi mogu

poslužiti kao pH-osjetljivi vaginalni mikrobicidi, kao takvi sprječavaju napad virusa na stanice. Polimeri boroničnih kiselina jako su važni u biotehnologiji. Korištenjem polimera, moguće je povećanje aktivnosti lijekova kao posljedica multivalencija. Moguće je usporeno i kontrolirano otpuštanje lijekova s ciljanom biodistribucijom, a moguća je i priprava makromolekularnih lijekova. (6)

Šećerna bolest je posljedica smanjenog lučenja inzulina. Pacijentima oboljelim od dijabetesa, vrlo važnu ulogu u kontroliranju bolesti, osim čestih praćenja krvnog šećera, igra i uzimanje inzulina. Polimeri boroničnih kiselina danas se ispituju i po tom pitanju. Najveće nade polažu se u njihovu osobinu mijenjanja hidrofилnosti zbog već bezbroj puta spomenute konverzije iz neutralne boronične kiseline u anionski boronatni ester. (6)

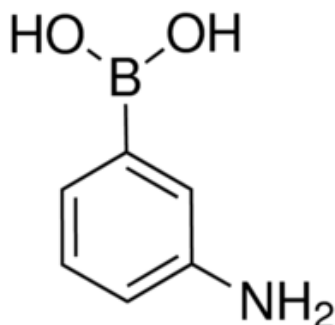
1.3. 3-Aminofenilboronična kiselina (3-APBA)

Spoj 3-aminofenilboronična kiselina, samo je jedan u nizu od svih spojeva boroničnih kiselina koji su danas zanimljivi za razvoj medicine i novih ljekovitih tvari. Molekulska masa 3-APBA iznosi 136,95 g/mol. Postoji kao bijeli kristalični prah s kojim je lako rukovati na zraku, bez posebnih mjera predostrožnosti. Što se tiče topljivosti, ova kiselina je topljiva u vodi kao i u dimetil-sulfoksidu (DMSO) te metanolu. Na sobnoj temperaturi, 3-aminofenilboronična kiselina kemijski je stabilna, te pokazuje zadržavanje stabilnosti kroz duži vremenski period. (7)

U slučaju njene dehidracije, bilo s agensom za hvatanje vode ili kroz uparavanje, boronična kiselina tvori cikličke i linearne oligomerne anhidride. Nakon izrazito dugog izlaganja zraku, 3-APBA može biti podložna razgradnji. Upravo iz tog razloga, bolje je 3-aminofenilboroničnu kiselinu skladištiti u blago vlažnom stanju. Inače, komercijalni uzorci obično sadrže mali postotak vode koja pomaže u dugoročnom očuvanju. Ova kiselina ne predstavlja posebnu prijetnju za okoliš. (8)

U mnogim istraživanjima, 3-aminofenilboronična kiselina je korištena u svrhu otkrivanja bakterija, upravo zbog svog afiniteta za reverzibilno vezanje za diolne skupine na bakterijskim staničnim zidovima. Za primjenu senzora, 3-APBA je bila često korištena jer se lako može imobilizirati na metalnoj podlozi putem samo-sastavljajućeg monosloja. Otkriveni spojevi koji sadrže diole bili su, na primjer, saharidi, nukleotidi i dr. Iako su ti senzori osjetljivi, 3-APBA ne posjeduje određenu specifičnost te će se vezati na sve

spojeve koji sadrže diolne skupine. Budući da se stanični zid bakterije sastoji od polisaharida s diolnim skupinama koje se mogu kemoselektivno vezati za 3-APBA, bilo bi korisno primijeniti upravo 3-APBA za brzo otkrivanje svih bakterija. (9)

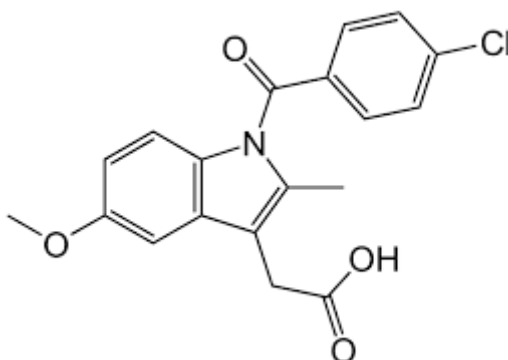


Slika 3. Strukturna formula 3-aminofenilboronične kiseline (10)

1.4. Indometacin

Indometacin je lijek koji ima protuupalna, analgetska i antipiretska svojstva. Pripada skupini nesteroidnih protuupalnih analgetika (NSAID). NSAID skupina sastoji se od više različitih reaktivnih skupina i postoji u nekoliko kategorija. Indometacin spada u derivate indolactene kiseline. IUPAC naziv indometacina je 2-[1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il] octena kiselina. (11)

Indometacin je otkriven 1963. godine, zajedno sa još nekoliko derivata octene kiseline kao što je diklofenak. Farmakološki učinak indometacina je neselektivna inhibicija enzima ciklooksigenaze (COX), glavnog enzima odgovornog za katalizu biosintetskog puta prostaglandina i tromboksana preko arahidonske kiseline. (11)



Slika 4. Strukturna formula indometacina (11)

1.4.1. Farmakodinamika indometacina

Indometacin svoje djelovanje usmjerava na način da inhibira sintezu faktora koji utječu na stvaranje upale, temperature i boli. Terapijsko djelovanje indometacina ne uključuje hipofizno-adrenalnu stimulaciju. Glavni način djelovanja je smanjivanje upale kod reumatoidnog artritisa. Učinkovitost protuupalnog djelovanja može se uočiti u obliku smanjenja natečenosti i jutarnje ukočenosti zglobova. Korištenje indometacina povezano je sa rizikom pojave ozbiljnih kardiovaskularnih tromboičnih stanja, uključujući infarkt miokarda. Moguće su i pojave gastrointestinalnih komplikacija kao što su: krvarenje, ulceracija, perforacija stomaka i crijeva. U usporedbi s ostalim nesteroidnim protuupalnim lijekovima (engl. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID), smatra se da je indometacin jači vazokonstriktor koji trajnije djeluje na smanjenje cerebralnog protoka krvi i inhibira reaktivnost ugljikovog (IV) oksida. (12)

1.4.2. Mehanizam djelovanja indometacina

Indometacin je neselektivni inhibitor ciklooksigenaza COX - 1 i COX - 2, enzima koji su uključeni u sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Prostaglandini su molekule slične hormonima koje se nalaze u organizmu, gdje imaju široku paletu djelovanja i efekata. Prostaglandini uzrokuju kontrakcije (grčeve) maternice kod trudnica. Indometacin je efektivno sredstvo za odlaganje preranog porođaja, tako što reducira kontrakcije maternice putem inhibicije sinteze prostaglandina u maternici. Indometacin ima dva dodatna načina djelovanja koji imaju klinički značaj. Prvi od njih je inhibicija pokretljivosti polimorfonuklearnih leukocita (granulocita). Drugi predstavlja isključivanje oksidativne fosforilacije u mitohondrijama hrskavice i jetre. (13)

Izozim COX - 1 prisutan je u gotovo svim tkivima u tijelu te je uključen u sintezu prostaglandina i tromboksana A₂. Izozim COX – 2 izlučuje se kao odgovor na ozljedu ili upalu. . Izozim COX-1 ima ulogu zaštite probavne sluznice i funkcije bubrega katalizirajući pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandin G₂ (PGG₂), te PGG₂ do prostaglandin H₂ (PGH₂). Izozim COX – 2 prisutan je u centralnom živčanom sustavu, bubrezima, maternici i dr. COX-2 također katalizira pretvorbu arahidonske kiseline do PGG₂ te PGG₂ do PGH₂. U slučaju djelovanja COX-2, PGH₂ se prevodi dalje u

prostaglandin E2 (PGE2) i prostaglandin I2 (PGI2- prostaciklin). Štetne nuspojave korištenja indometacina koje se odnose na gastrointestinalni sustav dokaz su da indometacin ima jače djelovanje na COX-1 izozim. (13)

1.4.3. Farmakokinetika indometacina

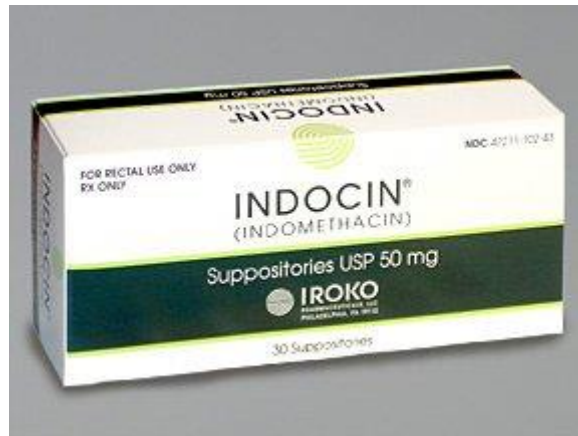
Indometacin se ponaša prema tzv. linearnoj kinetici. Kod ove vrste farmakokinetike, koncentracija tvari u plazmi je proporcionalna. Molekula indometacina se vrlo lako i brzo apsorbira u gastrointestinalnom traktu. Unutar četiri sata bude apsorbirano oko 90% primijenjene doze. Indometacin se metabolizira u jetrima, konjugacijom sa glukuronskom kiselinom. Eliminacija indometacina odvija se preko urina, žuči te preko fecesa. Otprilike 33% doze indometacina izlučuje se u demetiliranom, nekonjugiranom obliku pomoću fecesa; 1,5% se izlučuje u obliku indometacina. Oko 60% primijenjene doze izlučuje se urinom kao metaboliti indometacina ili kao nepromijenjena molekula. (12)

1.4.4. Svojstva i dostupnost indometacina

Indometacin se kao kemikalija nalazi u obliku žutog kristalnog praha. Kod indometacina je prisutan polimorfizam, tj. postojanje tvari u više kristalnih oblika. Prema nekim istraživanjima, indometacin postoji u nekoliko oblika. Sigurno je potvrđeno da postoje dva oblika indometacina, γ -oblik i α -oblik. Termodinamički stabilniji je γ -oblik što se može zaključiti zbog činjenice da ima višu točku tališta i slabiju topljivost. Topljivost indometacina u vodi je vrlo mala te ona iznosi 0,937 mg/L pri temperaturi od 25 °C. Prema *United States Pharmacopoeia* (USP), indometacin spada u „praktički netopljive spojeve“ u vodi. Indometacin je topljiv u otapalima kao što su kloroform, aceton, etanol, dimetil-sulfoksid (DMSO) i dr. (12)

Indometacin je na tržištu dostupan u više oblika koje proizvode razne farmaceutske tvrtke. Neki od dostupnih oblika indometacina su: kapsule (oralno), kapsule sa odgođenim/produženim djelovanjem (oralno), otopina kapi (za oftalmološku primjenu), liofilizirani prašak za injekcijsku otopinu (intravenozno), supozitoriji (rektalno), krema

(vanjski, lokalno). Na tržištu se može naći pod različitim marketinškim imenima: *Indocin*, *Indolar*, *Indoxenitd*.(12)

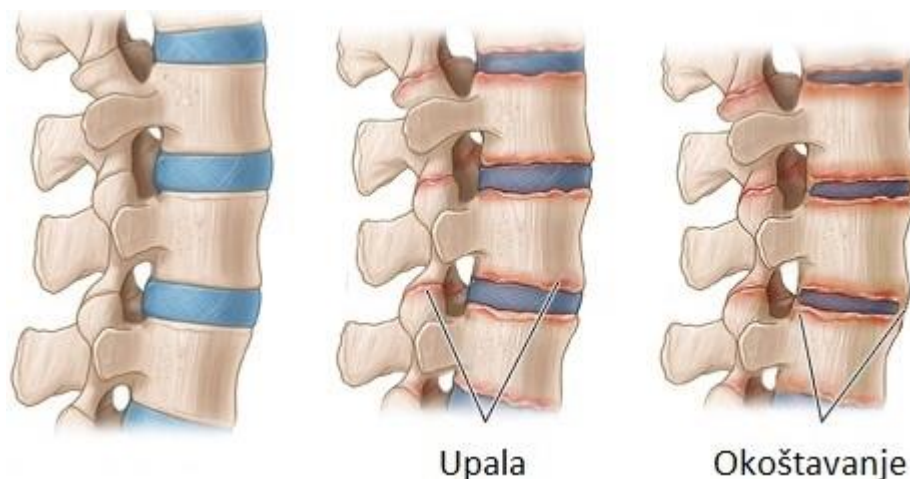


Slika 5. Jedno od komercijalnih imena indometacina (14)

1.4.5. Primjena indometacina u liječenju bolesti

Znanstvenici su obavili mnogobrojna klinička ispitivanja u svrhu otkrivanja djelotvornosti indometacina u liječenju reumatskih bolesti. Još uvijek ne postoji jasan razlog zašto bi se npr. ovaj lijek koristio više od aspirina u svrhu liječenja reumatoidnog artritisa. Lijek ima ozbiljne nuspojave i treba ga koristiti s oprezom. Objavljeno je samo nekoliko osnovnih farmakoloških studija o indometacinu. Pregled istih je koristan u tumačenju kliničkih izvještaja. Indometacin je sintetiziran od strane Shena i njegovih kolega. Hucker i Zacchei su proučavali fiziološku dispoziciju indometacina. Lijek, koji ima poluživot od približno 24 sata, brzo se izbacio iz plazme. Izlučivao se preko žuči kod pasa, majmuna i zamoraca. Kod pasa, cijela eksperimentalna doza bila je eliminirana preko fecesa. Većina izlučenog lijeka bila je prisutna kao konjugat glukuronske kiseline. (15)

Provedena su mnoga klinička ispitivanja na određenom uzorku pacijenata. Što se tiče *ankilozantnog spondilitisa*, oko 70% pacijenata je imalo dobre ili odlične odgovore na terapiju. Michotte i Wauters su primjetili da su bolesnici s ankiloznim spondilitisom imali trenutne recidive kada su dobivali placebo nakon liječenja indometacinom. Hart i Boardman su usporedili indometacin sa fenilbutazonom u 32 bolesnika; 19 ih je preferiralo indometacin, a 9 fenilbutazon. (15)



Slika 6. Prikaz razvoja bolesti kod ankilozantnog spondilitisa: s lijeve strane je prikazana zdrava kralježnica, u sredini je prikazana rana faza bolesti s upalom, s desne strane je prikazana napredna faza bolesti s popratnim okoštavanjem (16)

Kod *osteoartritisa*, lijek je također prijavljen kao učinkovit u otprilike 70 % slučajeva. U kliničkim ispitivanjima liječenja osteoartritisa, Wanka i Dixon pronašli su prednost u liječenju indometacinom u odnosu na placebo, kod 14 od 18 pacijenata. (15)

Također, indometacin se koristi za sprječavanje *prijevremenog porođaja*. Indometacin je snažno sredstvo u liječenju prijevremenih porođaja ali njegova upotreba je bila ograničena zbog njegovih konstriktivnih učinaka na fetalni *ductus arteriosus*. Najveći rizik prijevremenog poroda je nedovoljna zrelost fetalnih pluća, odnosno razvoj respiratornog distres sindroma u novorođenčeta (engl. *Respiratory Distress Syndrome*, RDS), pa tokoliza ma za cilj produljiti trudnoću barem toliko dugo da trudnica dobije glukokortikoidnu terapiju za maturaciju fetalnih pluća, tj. barem dva dana. Jedan od lijekova koji ima funkciju i tokolitika je indometacin, negdje čak i kao tokolitik prvog izbora. Tokolitik je lijek koji sprječava ili umanjuje jakost i učestalost kontrakcija maternice. Preporučljiv je u trudnica s prijetućim prijevremenim porodom do 30-og tjedna gestacije. U funkciji tokolitika, indometacin ne treba davati dulje od 48 sati. (17)

Što se tiče *psorijaze*, nije zabilježena neka veća korist u liječenju indometacinom u odnosu na korištenje placeba. Kern i njegovi suradnici proveli su klinička ispitivanja na 6 muških sudionika i 6 ženskih sudionika, starosti od 35 do 63 godine, s psorijazom u trajanju od 4 do 29 godina te s problemom otpornosti na prethodnu terapiju. Pacijenti su imali lezije, ali ne-eksfolijativne, te je njihovo stanje klasificirano kao stanje umjerene

težine. Uz rutinsku terapiju, jedna polovica pacijenata je uzimala placebo u razdoblju od 3 tjedna, zatim 1 tjedan bez uzimanja terapije te 3 tjedna uzimanja indometacina. Raspored je bio obrnut za drugu polovicu pacijenata. Lijek i placebo su pokazali identične rezultate. (18)

1.5. Kultura stanica

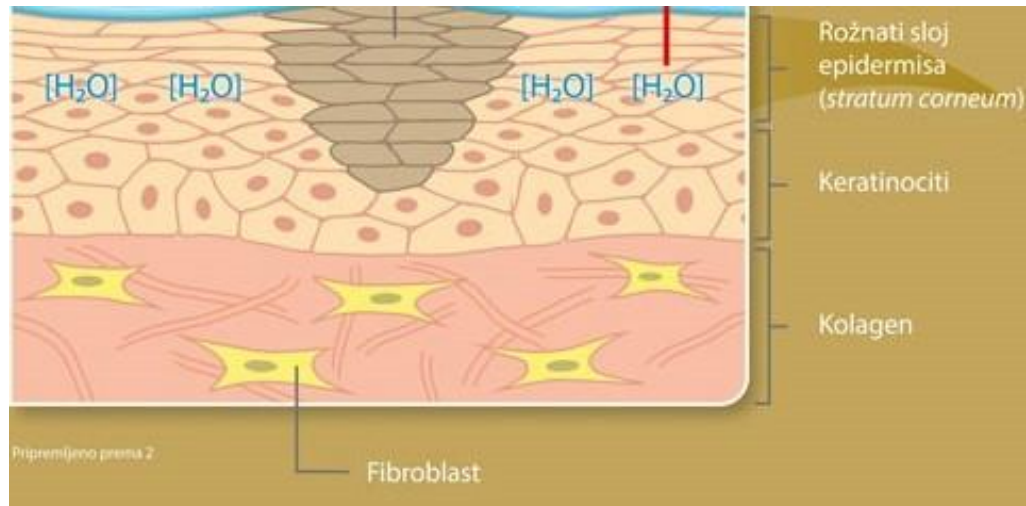
Stanična linija ili stanična kultura je proces u kojem stanice raste pod kontroliranim uvjetima, uglavnom izvan njihovog prirodnog okruženja. Nakon što se željene stanice izoliraju iz živog tkiva, neprestano trebaju biti zbrinute po posebnim uvjetima. Po klasifikaciji, postoje primarne kulture i sekundarne kulture. Primarne kulture predstavljaju stanice izolirane iz tkiva i stavljene u kulturu, dok sekundarne kulture predstavljaju trajno uspostavljenu staničnu kulturu iz primarne stanične kulture. Sekundarna kultura nastaje nakon prvog pasaža primarne kulture. Stanice mogu ući u ograničen broj dioba nakon kojih umiru apoptozom. Također, postoje adherentne i suspenzijske stanične kulture. Adherentne kulture su većina animalnih linija dok suspenzijske kulture predstavljaju npr. linije insekata i sl.(19)

1.6. Fibroblasti i keratinociti (ljudske stanice)

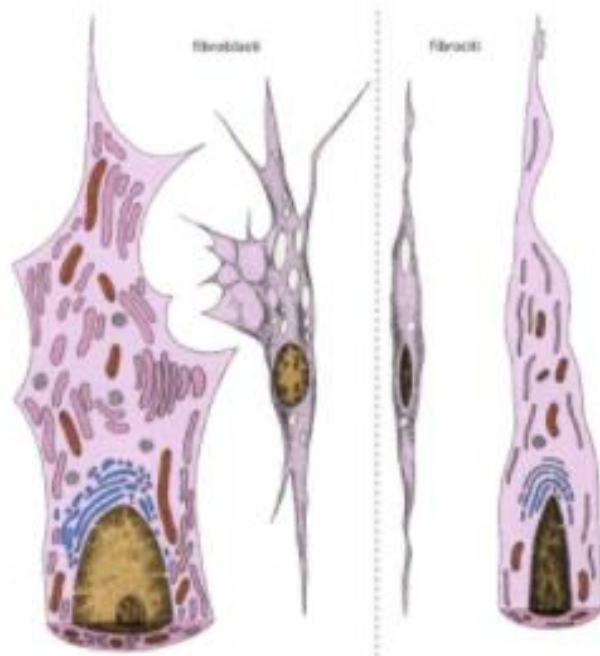
Fibroblasti su najbrojnije stanice vezivnog tkiva koje sintetiziraju kolagen, elastin, glikozaminoglikane, proteoglikane, adhezivne glikoproteine, fibronektin i druge proteine izvanstaničnog matriksa. Fibroblasti imaju dva stadija aktivnosti; aktivno stanje i stanje mirovanja. Aktivni fibroblast ima veliku ovalnu jezgru te obilnu citoplazmu koja sadrži hrapavi endoplazmatski reikulum i dobro razvijeni Golgijev kompleks. Fibroblast je naziv za fibroblast u mirovanju koji je puno manji od fibroblasta u aktivnom stanju te je vretenastog oblika. Ima acidofilnu citoplazmu s malo endoplazmatskog retikuluma. Na odgovarajući podražaj, fibroblast se vraća u aktivno stanje te obnavlja svoju staničnu aktivnost. (20)

Epiderma je vidljivi, gornji sloj kože i odgovorna je za mnoge zaštitne funkcije kože. Keratinociti čine 90-95% stanica epiderme. Donji ili bazalni sloj epiderme čine nediferencirani keratinociti koji se stalno dijele i stvaraju nove stanice koje će

nadomjestiti oljuštene stanice s površine kože. Jednom kad keratinociti napuste bazalni sloj epiderme, započinje proces njihove diferencijacije koji se naziva keratinizacija. Tijekom keratinizacije stanice prolaze promjene koje rezultiraju sintezom jedinstvenih proteina (keratin) i lučenjem specifičnih lipida, a koji su ključni za zaštitnu ulogu epidermalnog sloja. (21)



Slika 7. Prikaz stanica fibroblasta i keratinocita na presjeku ljudske kože (22)



Slika 8. Lijeva slika – prikaz aktivnog stanja fibroblasta; desna slika – prikaz fibroblasta u mirovanju (fibrocit) (20)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

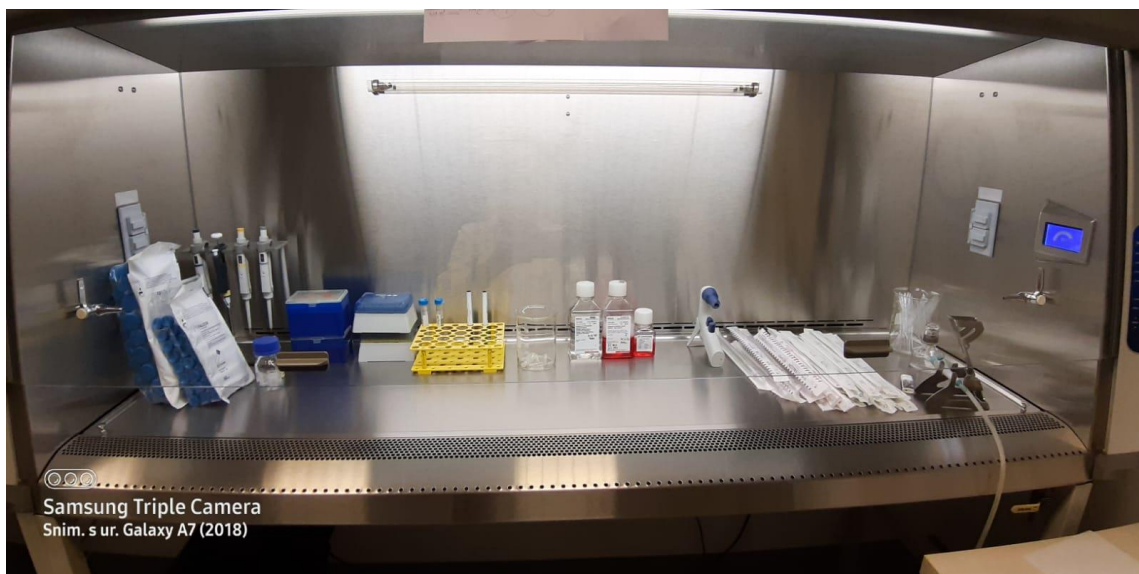
2.1. Reagensi i kemikalije

- 3-aminofenilboronična kiselina monohidrat (3-APBA·H₂O) (Sigma-Aldrich)
- Indometacin (Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich)
- Fetalni goveđi serum (FBS, Gibco)
- Penicilin-streptomycin (Pen/Strep)
- Tripsin-EDTA (0,25%) u HBSS s fenol crvenim (100 mL) (TRYPSIN, TRY-3B, Capricorn Scientific)
- Dulbecco fosfatni puffer (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered saline, Sigma-Aldrich)
- Dimetil sulfoksid (DMSO, Lachner)
- Tiazol plavi tetrazolij bromid (Sigma-Aldrich)
- Trypan blue bojilo (Sigma-Aldrich)
- Čista destilirana voda (Molecular Biology Water AccuGENE, ddH₂O, Lonza)
- Stanice fibroblasta - HDF68FBP (Biopredic)
- Stanice keratinocita – HaCaT (Elabscience)

2.2. Oprema i materijali

Jedan dio eksperimentalnog dijela odrađen je u Laboratoriju za staničnu kulturu na institutu MEDILS, dok je drugi dio odrađen u NAOS-ILS laboratoriju, također na institutu. Ljudske stanice korištene u ovom radu su čuvane u zamrzivačima pri -80 °C. Nacjepeljivanje stanica u hranjivom mediju obavlja se u Logic hood-u (Labconco Biological Safety Cabinet) laboratorija za staničnu kulturu. Stanice je potrebno i centrifugirati kako bi odvojili pelet, u kojem se nalaze stanice, od supernatanta (tekućina koja se izdvoji iznad peleta). To se radi u laboratorijskim centrifugama. Na automatskom brojaču stanica LUNA – II (Logos Biosystems) broje se stanice. Na mikroploču s ravnim dnom stanice se nasade. Navedena mikroploča sadrži 96 jažica (engl. *96-well plate with lid*). Posađene stanice se inkubiraju u inkubatoru Hera cell 150. Na svjetlosnom mikroskopu Zeiss provjerava se uspješnost sadnje stanica. U NAOS-ILS laboratoriju, od

opreme je korištena analitička vaga Nimbus Adam, multipipete Eppendorf raznih volumena, vortex tresilica IKA MS2 te spektrofotometar mikrotitarskih pločica EnSight (PerkinElmer, SAD).



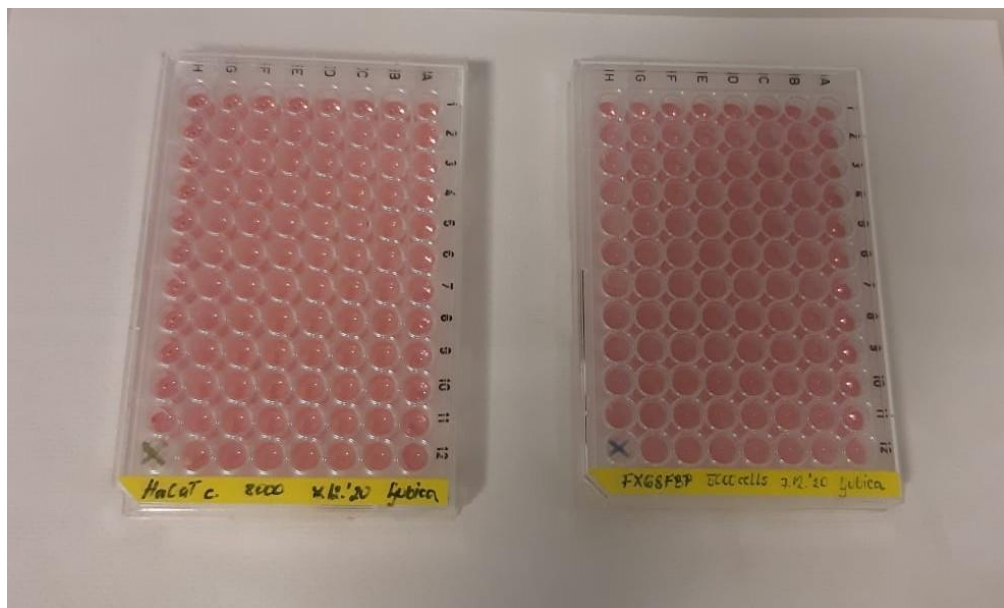
Slika 9. Kultura stanica – Logic hood Labconco (Autor: Ljubica Bosnić)



Slika 10. Centrifuga (Autor: Ljubica Bosnić)



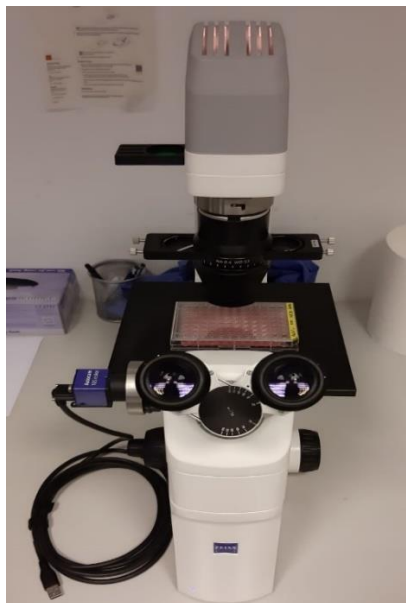
Slika 11. Automatski brojač stanica (Autor: Ljubica Bosnić)



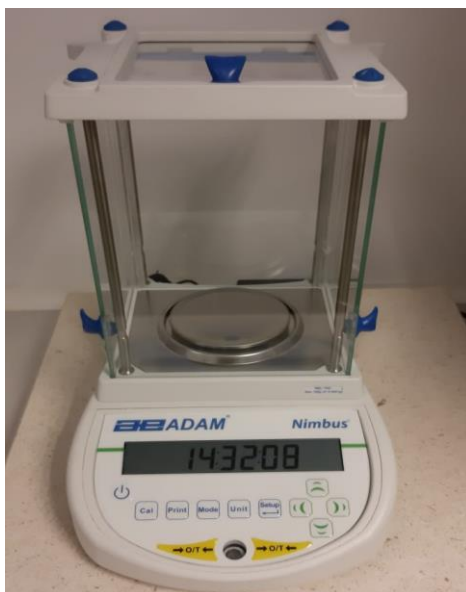
Slika 12. Mikroploče s 96 jažica (Autor: Ljubica Bosnić)



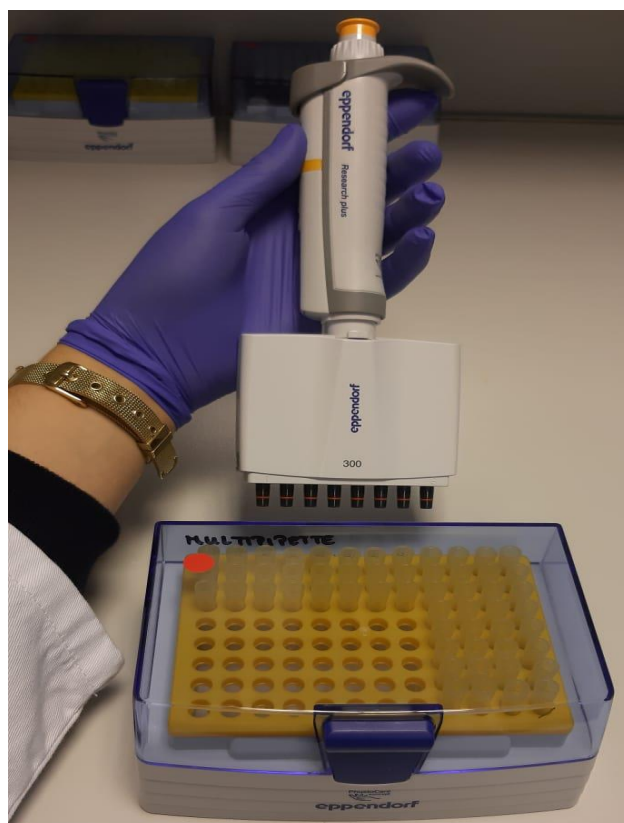
Slika 13. Inkubator (Autor: Katarina Jovanović)



Slika 14. Svjetlosni mikroskop – provjera posađenih stanica (Autor: Ljubica Bosnić)



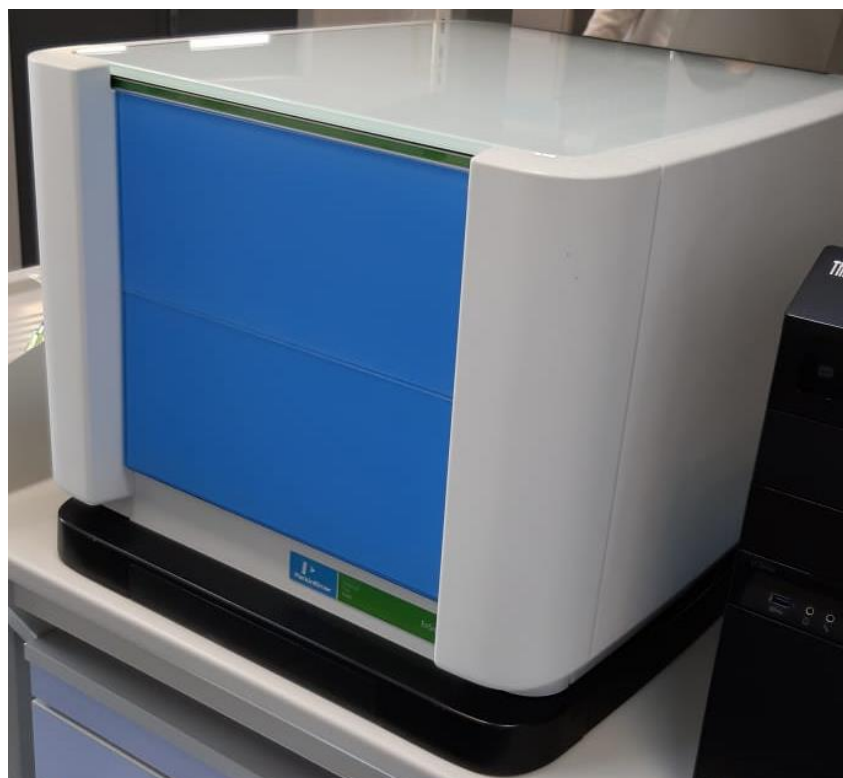
Slika 15. Analitička vaga (Autor: Ljubica Bosnić)



Slika 16. Multipipeta (300 ml) (Autor: Ljubica Bosnić)



Slika 17. Vortex tresilica (Autor: Ljubica Bosnić)



Slika 18. Spektrofotometar (Autor: Ljubica Bosnić)

2.3. Priprema otopina ispitanih spojeva

Pripremljene su koncentracije spojeva indometacina od 50 mM otopljenog u DMSO te 3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA) otopljena u ultračistoj vodi u koncentraciji od 31 mM. S obzirom na molarnu koncentraciju, izračunata je masa svakog spoja koju je trebalo otopiti u otapalu (DMSO ili voda).

- **3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA) u vodi**

Početna koncentracija molekule 3-APBA bila je 31 mM. Radna koncentracija s kojom je započeto tretiranje stanica fibroblasta i keratinocita iznosila je 25 mM. Budući da je 3-APBA otopljena u ultračistoj vodi, potrebno je izračunati koju količinu 3-APBA početne koncentracije od 31 mM treba uzeti i otopiti s medijem (DMEM) da bi se dobila radna koncentracija od 25 mM.

$$V = \frac{25 \text{ mM} \times 1500 \mu\text{L}}{31 \text{ mM}} = 1210 \mu\text{L}$$

Priprema:

- 25 mM radna koncentracija 3-APBA: 1210 μL (31 mM) + 290 μL medija (DMEM)

- **Indometacin u DMSO**

Početna koncentracija molekule indometacina bila je 50 mM. Radna koncentracija s kojom je započeto tretiranje stanica fibroblasta i keratinocita iznosila je 25 mM. Budući da je ova molekula indometacina otopljena u 100% DMSO (c=50 mM), već znamo koliki postotak DMSO je zastupljen u 25 mM radnoj koncentraciji.

$$50 \text{ mM} \rightarrow 100\%$$

$$25 \text{ mM} \rightarrow X$$

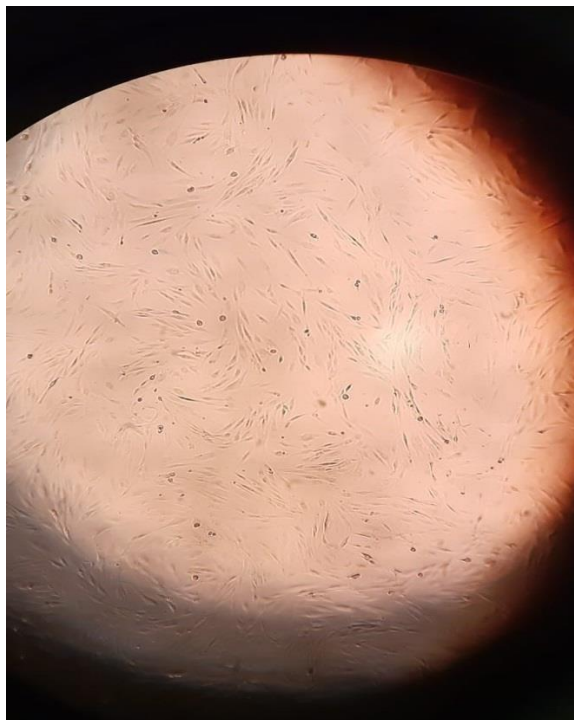
$$X = 50 \%$$

Priprema:

- 25 mM radna koncentracija indometacina: 750 μ L otopine koncentracije 50 mM + 750 μ L medija (DMEM)
- 50 % DMSO: 750 μ L DMSO + 750 μ L medija (DMEM)

2.4. Uspostavljanje kulture ljudskih stanica

Prvi korak u eksperimentalnom radu je uspostavljanje primarne kulture ljudskih stanica, odnosno izolacija stanica iz organizma te nacjepljivanje u hranjivom mediju kao i održavanje kulture u *in vivo* uvjetima. Kada primarna kultura stanica fibroblasta i keratinocita dosegne konfluenciju od 80 – 100 %, stanice se tripsiniziraju (Trypsin-EDTA, 0,25%) u Logic hoodu (Slika 9.). Zatim se centrifugiraju u vremenskom periodu od 3 minute, na 2300 rpm i pri 4 °C (Slika 10). Iza toga slijedi brojanje stanica na automatskom brojaču stanica LUNA – II (Logos Biosystems) (Slika 10). Nakon toga, stanice se nasade na mikroploču s ravnim dnom s 96 jažica (engl. *96-well plate with lid*) (Slika 12). Posađeno je 5000 stanica fibroblasta HDF68FBP u svaku jažicu jedne mikroploče. Na drugoj mikroploči posađeno je 8000 stanica keratinocita HaCaT u svaku jažicu. Posađene stanice, zajedno s medijem, inkubiraju se minimalno 24 sata u inkubatoru (Slika 13), na 37 °C i 5% CO₂ te se testiraju kroz 24 ili 48 sati otapalima i dvama biološki aktivnim molekulama, 3-aminofenilboroničnom kiselinom i indometacinom.



Slika 19. Prikaz ljudskih stanica fibroblasta nakon inkubacije od 24 sata (Autor: Ljubica Bosnić)



Slika 20. Prikaz ljudskih stanica keratinocita nakon inkubacije od 24 sata (Autor: Ljubica Bosnić)

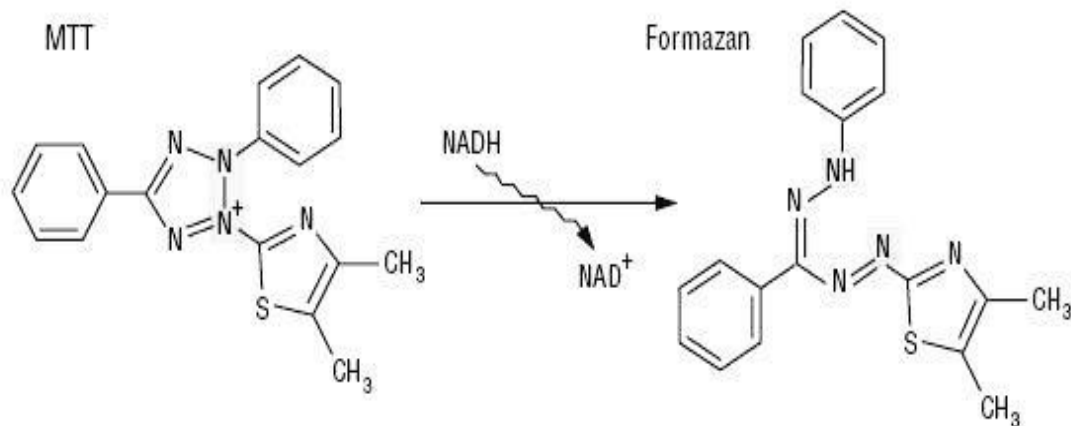
Nakon 24 sata inkubacije, slijedi uklanjanje medija s vakuum sisaljkom te dodavanje 100 μL PBS-a u svaku jažicu. Uloga PBS-a je ispiranje stanica. Nakon 1 minute, slijedi uklanjanje PBS-a te dodavanje ispitivanih spojeva. Na mikroploču s 96 jažica dodano je 6 različitih koncentracija biološki aktivnih spojeva indometacina i 3-APBA, kao i otapala u kojem je indometacin otopljen, a to je DMSO. Kontrolu za vodu nije potrebno imati s obzirom da se radi o ultračistoj vodi koja nema nikakvog utjecaja na rezultate. Rađeni su duplikati za svaki testirani spoj. Dodano je 300 μL indometacina u prvi red u kojem je testiran i 300 μL 3-APBA, također u prvi red. Potom slijedi serijsko razrijeđivanje te se nakon provedenog postupka u svakoj jažici nalazi po 150 μL ispitivanog spoja. Nakon toga slijedi 24-satna inkubacija.

Tretiranje stanica keratinocita i fibroblasta provodi se na slijedeći način:

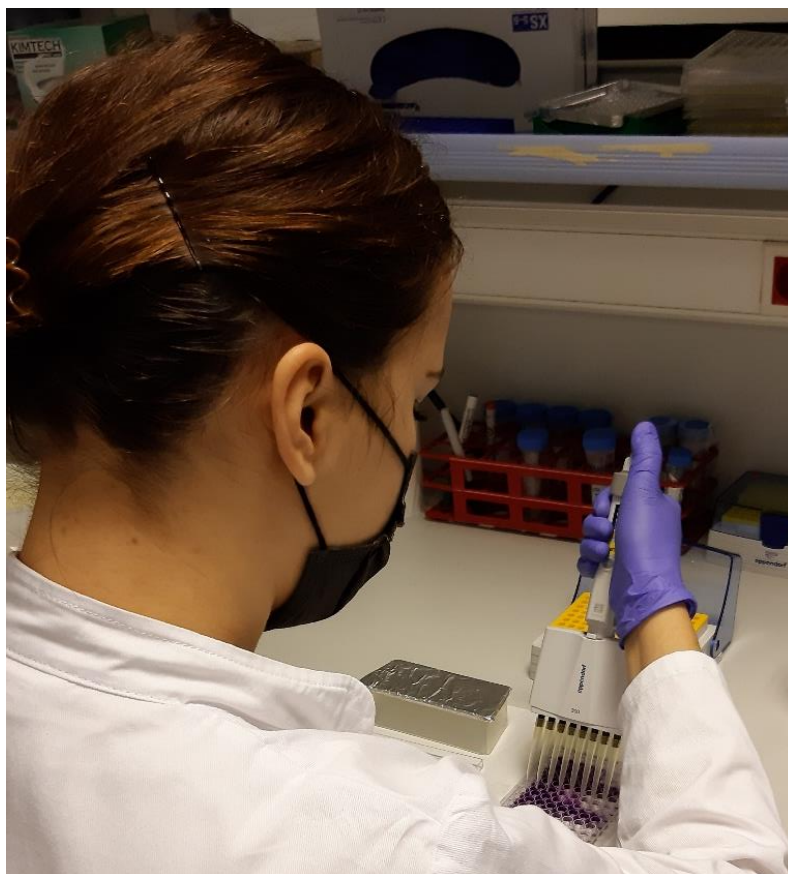
- 3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA) otopljena u ultračistoj vodi; početna koncentracija joj iznosi 31 mM, radna koncentracija iznosi 25 mM
- Indometacin otopljen u DMSO; početna koncentracija mu iznosi 50 mM, radna koncentracija iznosi 25 mM

2.5. Mjerenje citotoksičnosti spojeva na ljudske stanice – MTT test

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) predstavlja kalorimetrijsku metodu koja služi za mjerenje citotoksičnosti *in vitro*, kao i za proliferaciju stanica. Brojevi vijabilnih stanica koje rastu u jažicama na mikropločici mogu se očitati spektrofotometrom za skeniranje mikropločica. Mjeri se redukcija topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Ljubičasti kristali se moraju otopiti u nekom otapalu, kako bi se mogao kvantificirati nastali produkt. To otapalo je DMSO. (23) Dehidrogenaze reduciraju 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazolij bromid, žutu tetrazolijsku boju topivu u vodi, u ljubičasti formazanski produkt netopiv u vodi. Intenzitet obojenja se detektira spektrofotometrom i direktno je proporcionalan broju živih stanica. (24)

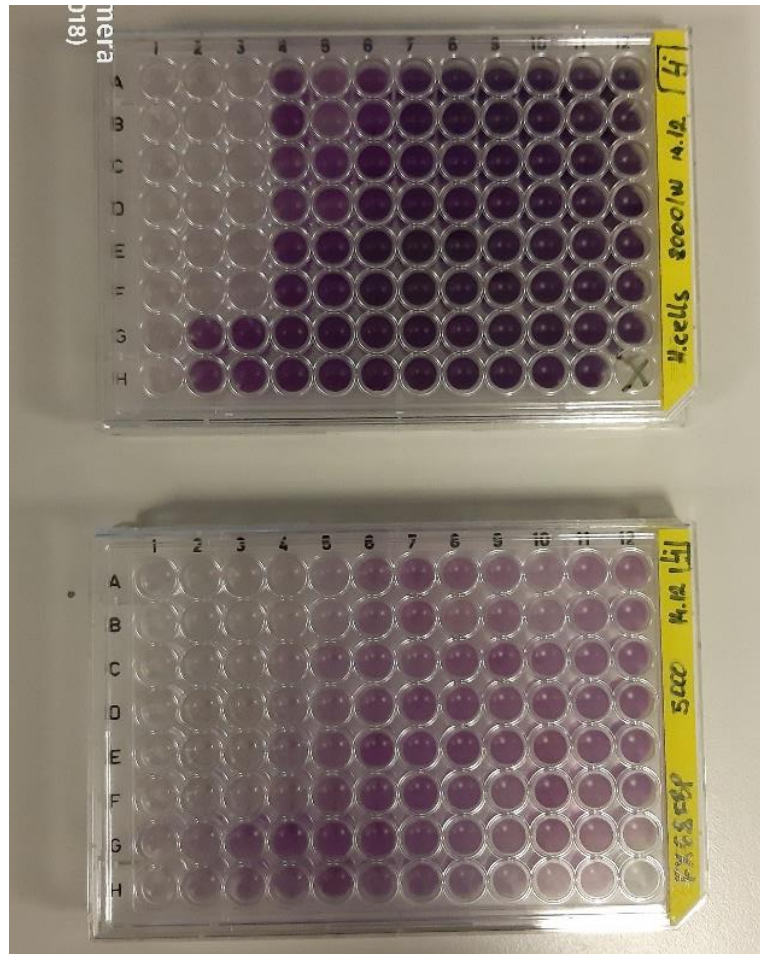


Slika 21. Redukcija 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazolij bromida u formazan
(25)



Slika 22. Rad u laboratoriju – otapanje kristala s DMSO (Autor: Katarina Jovanović)

Nakon inkubacije od 24 sata, prvo slijedi uklanjanje kompletne tekućine koja se nalazi u jažicama. Tu tekućinu sačinjavaju medij i stresori koji su dodani prethodni dan (indometacin i 3-APBA). Zatim slijedi ispiranje stanica sa 100 μL PBS-a u svakoj jažici te njegovo uklanjanje. Slijedeći korak je otapanje MTT-a te njegovo dodavanje u mikroploče na kojima su posađeni fibroblasti i keratinociti. MTT se otapa na način da se 10 mg praha otopi u 2 mL ultračiste vode. Postupak otapanja je potrebno provesti dva puta jer imamo dvije mikroploče s različitim stanicama. Dodaje se 200 μL medija u svaku jažicu te 20 μL MTT-a u svaku jažicu. Nakon inkubacije od 4 sata, slijedi ručno uklanjanje cijelog medija i MTT-a. Uklanjanje MTT-a vakuum pumpom nije moguće zbog njegove toksičnosti. Zatim slijedi već spomenuti korak otapanja kristala s DMSO-om. Na kraju, apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru mikrotitarskih pločica EnSight (PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 595 nm pri kojoj formazanski produkt pokazuje maksimum apsorbcije.



Slika 23. Mikrotitarske pločice, s posadenim stanicama fibroblasta i keratinocita, tretirane s različitim stresorima (indometacin, 3-APBA, DMSO) (Autor: Ljubica Bosnić)

2.6. Statistička obrada podataka

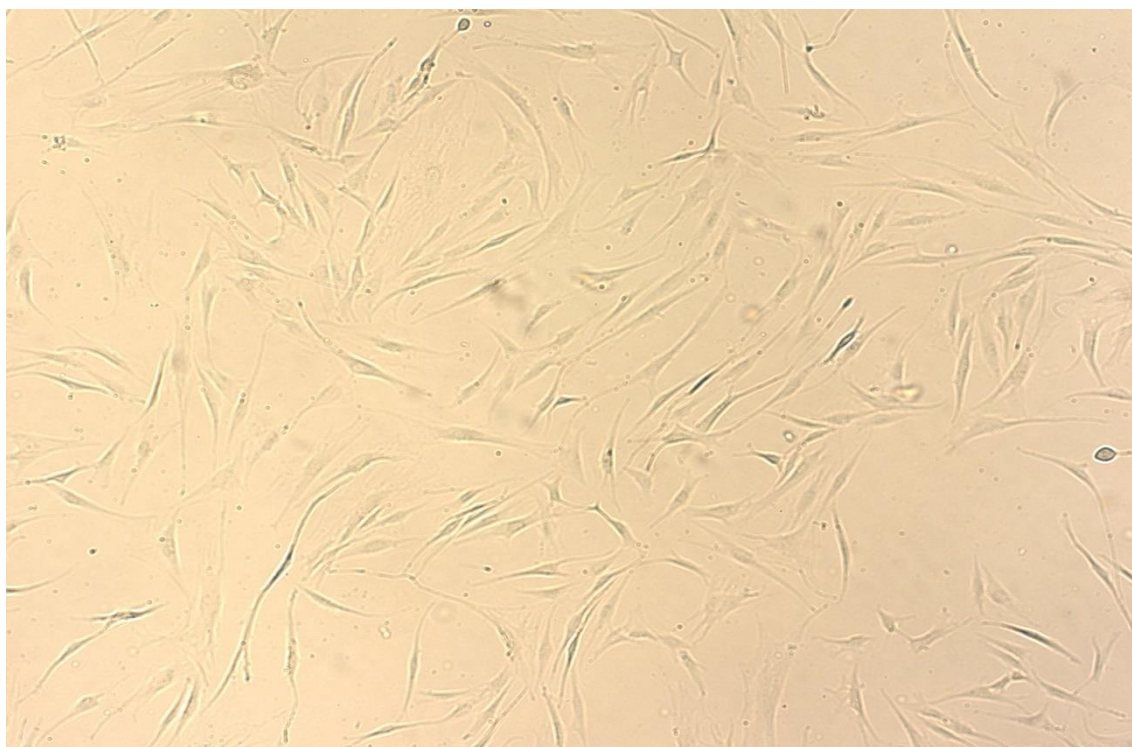
Dobiveni laboratorijski podaci obrađeni su korištenjem dostupnih alata u Microsoft Office paketu, Excel.

3. REZULTATI I RASPRAVA

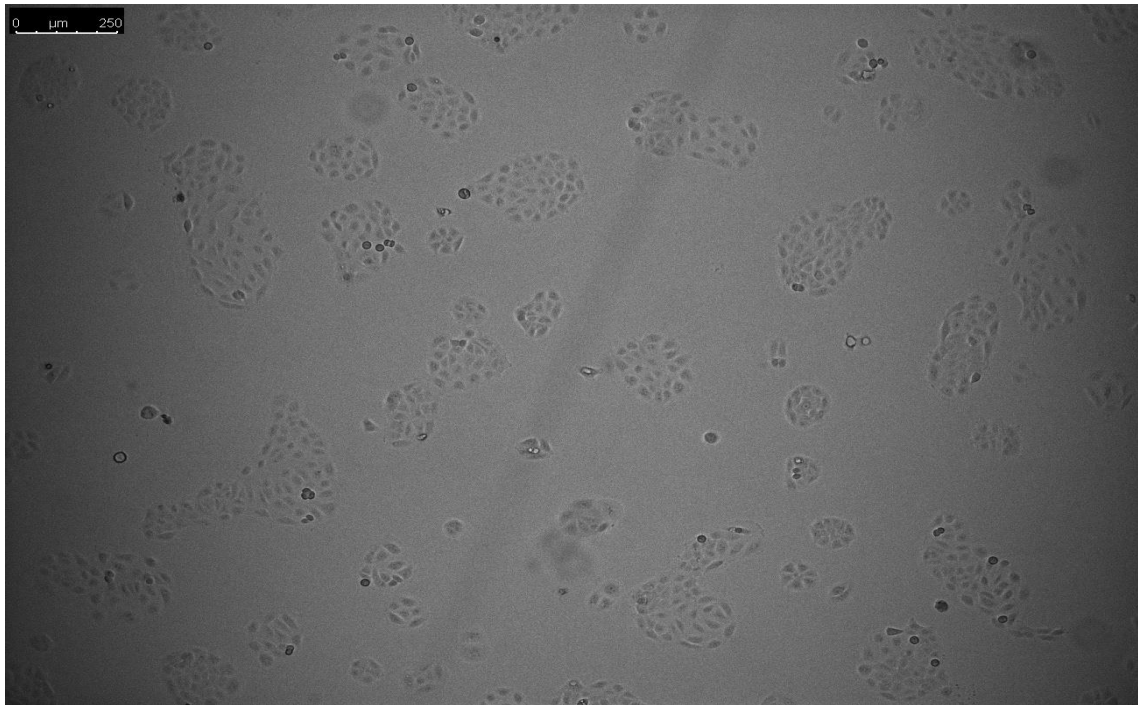
Citotoksična aktivnost indometacina i 3-aminofenilboronične kiseline testirana je na staničnim linijama fibroblasta (HDF68FBP) i keratinocita (HaCaT).

Spojevi indometacin i 3-APBA otopljeni su u seriji koncentracija, u rasponu od 0.012 – 25 mM. Budući da indometacin nije bilo moguće otopiti u vodi, kao otapalo korišten je DMSO. Nakon provedenog eksperimenta i obrade rezultata, uočeno je kako je u prvih 6 koncentracija (od 25 mM do 0,781 mM) prevelik postotak korištenog DMSO otapala (od 50% do 1,6%) te su stanice keratinocita i fibroblasta uglavnom bile pobijene. Zaključeno je da su rezultati puno vjerodostojniji u rasponu koncentracija od 0,391 mM do 0,012 mM gdje je postotak DMSO manji od 1% pa su isti i prikazani na grafovima.

Citotoksična aktivnost testiranih spojeva indometacina i 3-APBA na fibroblaste i keratinocite određena je pomoću MTT testa. Neposredno prije mjerenja apsorbancije, stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom kako bi se vizualno utvrdilo stanje stanica i njihova spremnost za testiranje (Slike 24. i 25.)

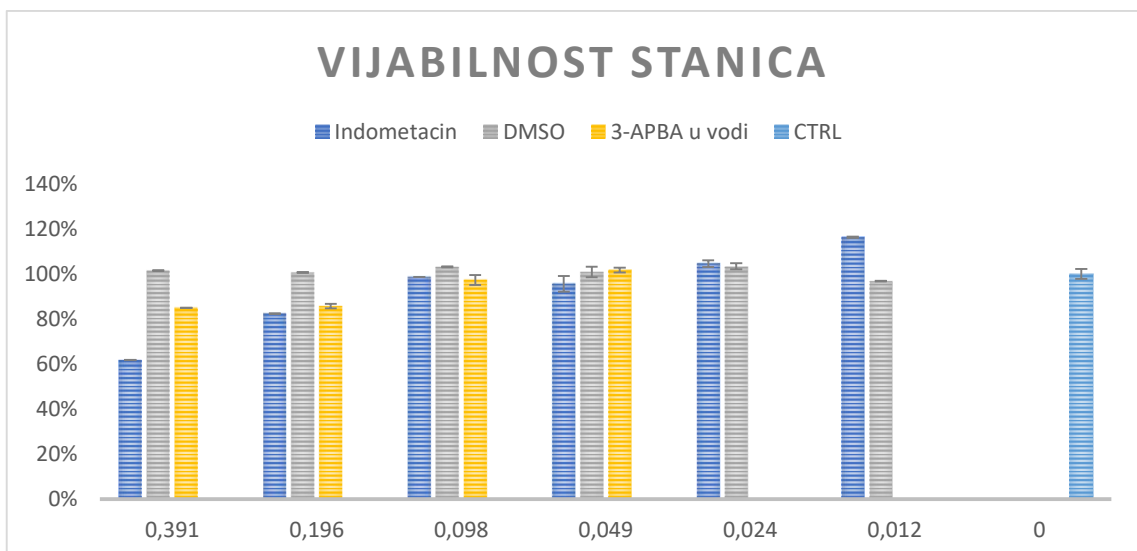


Slika 24. Stanice fibroblasta pod mikroskopom spremne za eksperiment



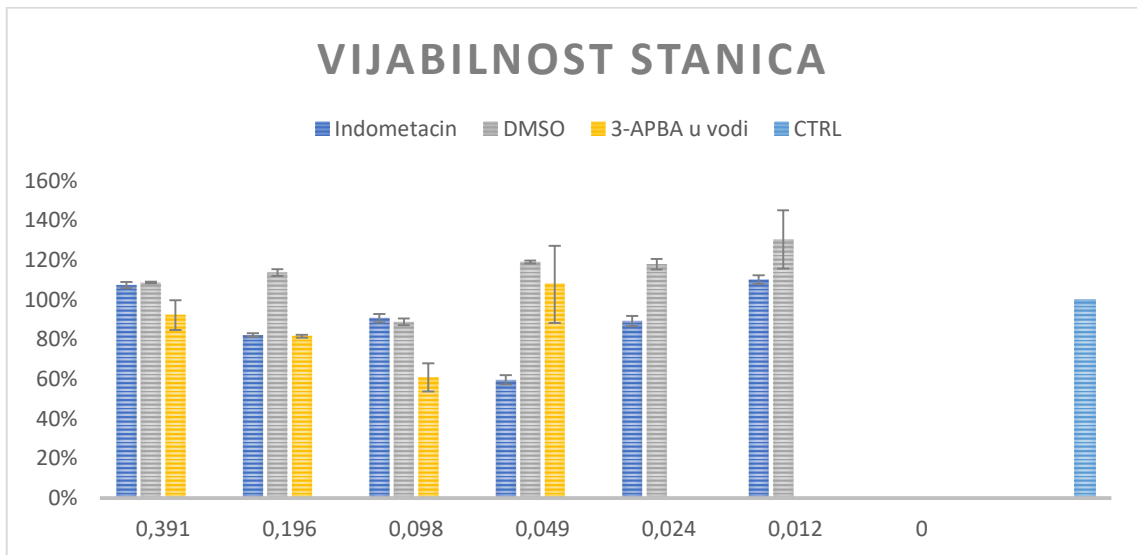
Slika 25. Stanice keratinocita pod mikroskopom spremne za eksperiment

Vijabilnost stanica izmjerena je spektrofotometrijski korištenjem mikrotitarskih pločica EnSight na spektrofotometru PerkinElmer (SAD), pri valnoj duljini od 595 nm. Vijabilnost stanica odgovara vrijednosti apsorbancije pri kojoj formazanski produkt maksimalno apsorbira svjetlost. Rezultati vijabilnosti stanica fibroblasta i keratinocita prikazani su na Slikama 26. i 27.



Slika 26. Rezultati citotoksičnosti 3-APBA, indometacina i DMSO na stanice ljudskih keratinocita ispitane MTT testom

Iz priloženih slika, vidljivo je da postoji razlika u vijabilnosti stanica tretiranih indometacinom i 3-APBA-om otopljenim u različitim otapalima, DMSO-u i ultra-čistoj vodi. Osim što je vidljiva razlika između vijabilnosti stanica fibroblasta i keratinocita, tretiranih spojevima indometacin i 3-APBA, vidljiva je i razlika između svakog pojedinog spoja ovisno o otapalu u kojem je otopljeno prilikom testiranja vijabilnosti bilo fibroblasta ili keratinocita.



Slika 27. Rezultati citotoksičnosti 3-APBA, indometacina i DMSO na stanice ljudskih fibroblasta ispitane MTT testom.

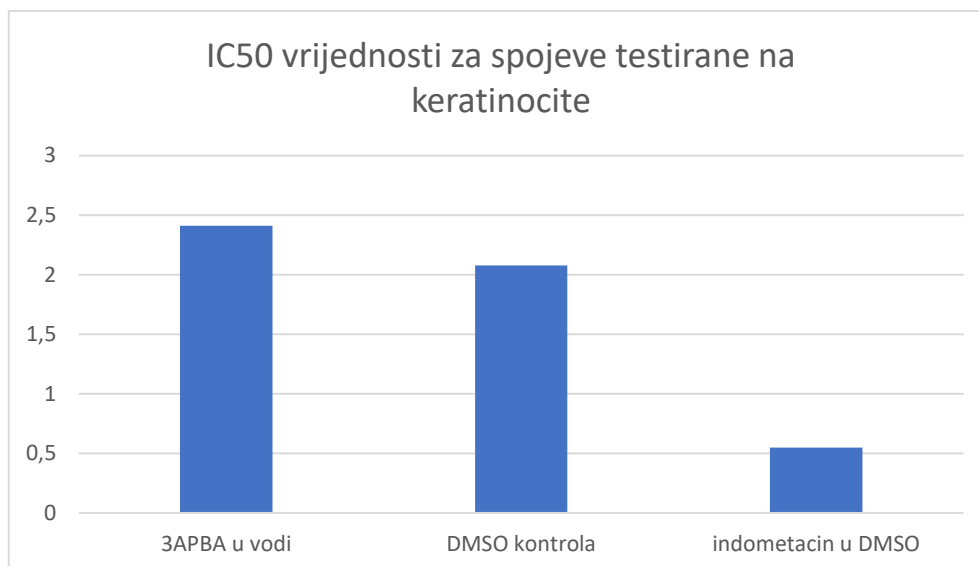
Iz prethodna dva grafa može se vidjeti da u prvih nekoliko koncentracija vijabilnost stanica, bilo keratinocita bilo fibroblasta, ne prelazi vrijednost od 100%. Za primjer možemo uzeti koncentraciju 0,391 mM kod stanica keratinocita. Vijabilnost stanica tretiranih indometacinom iznosi 60%. Vijabilnost stanica tretiranih samo otapalom (DMSO) iznosi 100% dok vijabilnost stanica tretiranih 3-APBA-om otopljenom u vodi iznosi 85%. Iznos vijabilnosti od 100 % nam pokazuje kako pri koncentraciji od 0,391 mM, DMSO nije djelovao inhibicijski na stanice keratinocita.

Izračunate su vrijednosti inhibicije rasta stanica kod vijabilnosti od 50% te su rezultati prikazani u Tablici 1.

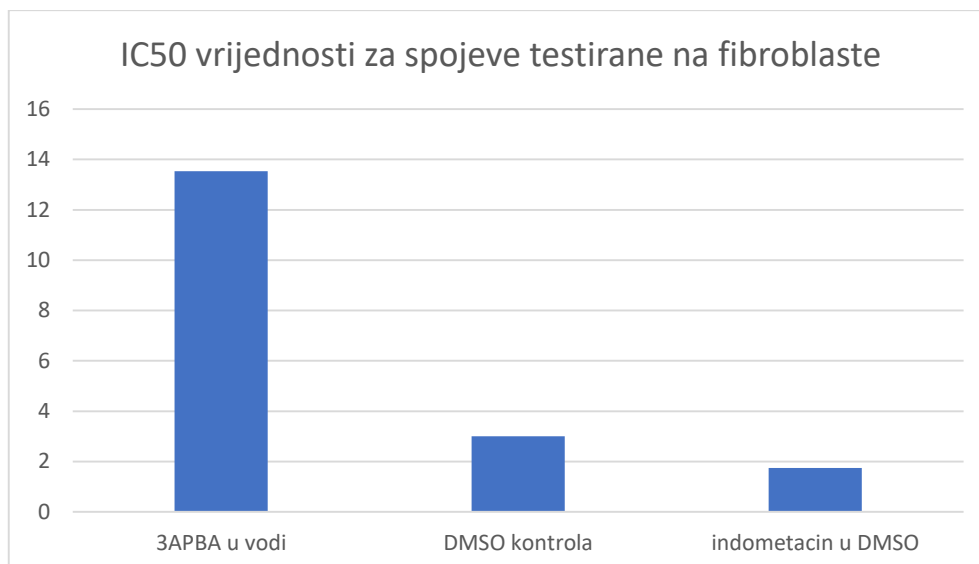
Tablica 1. Vrijednosti IC₅₀ za testirane kemijske spojeve

IC ₅₀ /mM	3-APBA u H ₂ O	Indometacin u DMSO	DMSO kontrola
Keratinociti	2,41	0,55	2,08
Fibroblasti	13,54	1,75	3,00

Kako bismo napravili usporedbu toksičnosti spojeva indometacina i 3-APBA ovisno o staničnoj liniji na kojoj su spojevi testirani, vrijednosti inhibicije rasta stanica kod vijabilnosti od 50% prikazani za keratinocite (Slika 28.), te za fibroblaste (Slika 29.).



Slika 28. Vrijednosti IC₅₀ za spojeve testirane na keratinocite.

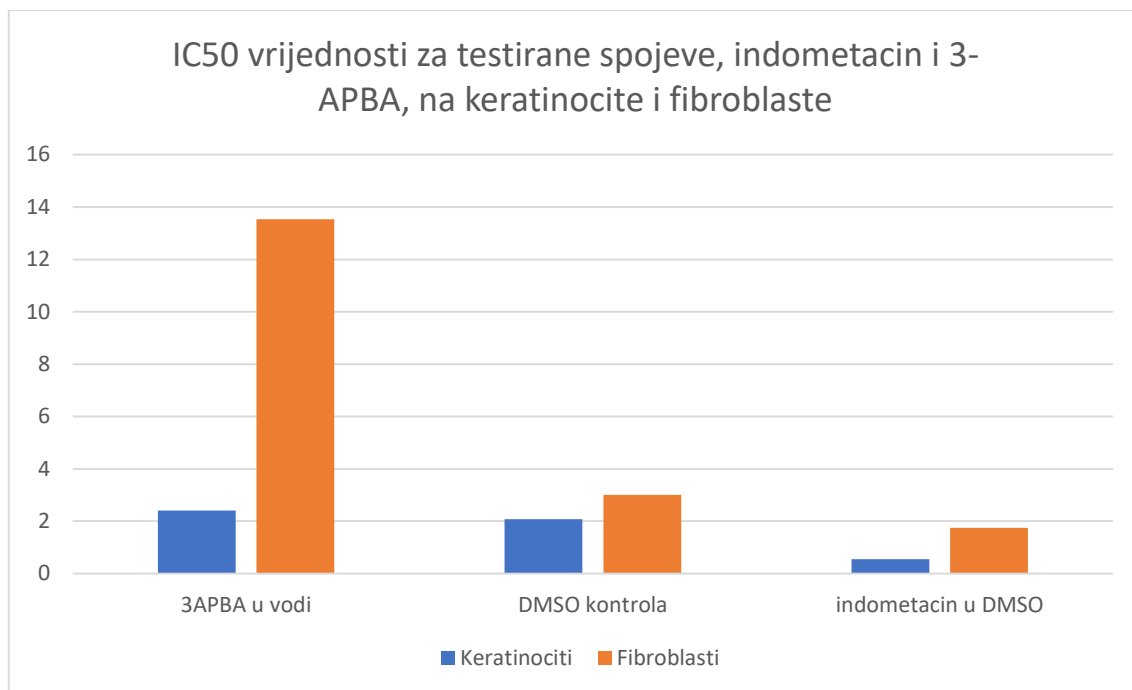


Slika 29. Vrijednosti IC₅₀ za spojeve testirane na fibroblaste.

Iz podataka za vrijednosti inhibicije rasta stanice kod vijabilnosti od 50% za spojeve indometacin i 3-APBA, vidljivo je da općenito govoreći, svi testirani spojevi imaju veći toksični učinak na stanice keratinocita nego na stanice fibroblasta.

Iz podataka za vrijednosti inhibicije rasta keratinocita, kod vijabilnosti od 50% za spojeve indometacin i 3-APBA, vidljivo je da najveću toksičnost pokazuje spoj indometacin otopljen u DMSO, gdje je IC₅₀=0,55mM. Isti zaključak vrijedi i za spojeve testirane na fibroblaste, gdje je indometacin otopljen u DMSO pokazao najveću toksičnost i vrijednost od IC₅₀=1,75mM.

Potrebno je istaknuti, da je trend toksičnosti, kod obje testirane stanične linije isti, gdje 3-APBA otopljena u vodi ima najmanju toksičnost na obje stanične linije, zatim kontrola DMSO otapala i najtoksičniji učinak ima indometacin u DMSO. Iz navedenog zaključujemo kako su rezultati toksičnosti autentični s obzirom da pokazuju jednaki trend prilikom testiranja na dvije različite stanične linije.



Slika 30. IC₅₀ vrijednosti za indometacin i 3-APBA testirane na keratinocite i fibroblaste

Marasović M., Ivanković S. i njihovi suradnici napravili su zanimljive studije o borovim spojevima, kao novom razredu antitumorskih lijekova. Istraživanja na životinjama otkrila su moguće uloge boroničnih kiselina kao kemoterapijskih agensa. Boronične kiseline su blage organske Lewisove kiseline sa strukturnim značajkama sličnim ugljiku što im omogućuje djelovanje poput konkurentnog inhibitora mnogih susprata koji sadrže ugljik. Nekoliko studija ukazalo je na fenilboroničnu kiselinu kao kiselinu koja je snažnija od boronične kiseline u ciljanju metastatskih i proliferativnih svojstava stanica karcinoma. Njihova istraživanja su pokazala da fenilboronična kiselina može selektivno inhibirati migraciju karcinomskih stanica kod raka prostate i raka dojke kod čovjeka. Nedavno, *in vivo* antitumorski pregledi pokazali su da nanočestice obogaćene fenilboroničnom kiselinom imaju superiornu učinkovitost u ograničavanju rasta tumora te u produljenju vremena preživljavanja kod mišea koji nose tumore. (2)

Baker S., Ding C. i njihovi suradnici istraživali su terapijski potencijal spojeva koji sadrže bor. U odnosu na ugljik, vodik, dušik i kisik, trenutno se o boru u terapeutici vrlo malo toga zna. Uz to, do danas je utvrđeno vrlo malo prirodnih proizvoda koji sadrže bor i koji mogu poslužiti kao lijekovi. Percipirani rizici upotrebe bora i nedostatak sintetičkih metoda za rukovanje spojevima bora dovelo je do toga da brojni medicinski kemičari izbjegavaju upotrebu ovog atoma. Fizikalna, kemijska i biološka svojstva bora nude medicinskim kemičarima jedinstvenu priliku za istraživanje spojeva bogatih borom. Dok

su razmatrali zašto bor nije istraživao među populacijom medicinskih kemičara, Baker S. i njegovi suradnici došli su do zaključka da šira populacija bor smatra toksičnim. Uvjereno je da je bor otrovan, najvjerojatnije potječe iz činjenice da je borna kiselina sastojak otrova za mrave. Međutim, borna kiselina ima LD₅₀(letalna doza 50%) 2660 mg/kg (štakor, oralno) što je slično vrijednosti LD₅₀ za kuhinjsku sol koja iznosi 3000 mg/kg (štakor, oralno). Drugi izvor zabrinutosti može proizaći iz toksičnosti *Velcade*-a, jedinog terapijskog agensa koji sadrži bor i koji je trenutno na tržištu te ga onkolozi masovno prepisuju pacijentima. *Velcade* dokazano djeluje kod liječenja multiplog mijeloma te radi na princip inhibicije proteasoma. Nedavna istraživanja su pokazala da je za toksičnost *Velcade*-a zaslužan njegov mehanizam djelovanja, a ne nužno to što sadrži bor u svojoj strukturi. Potrebno je spomenuti i podatke koji idu u prilog boru. Bornu kiselinu je glavni sastojak „Goopa“, mekane igračke žarkih boja koju djeca protiskuju kroz prste. Bornu kiselina se koristi kao konzervans u tvarima za ispiranje očiju te u vaginalnim kremama. Bor se također nalazi u visokim koncentracijama u voću, povrću i orašastim plodovima. Konzumiramo ga u rasponu od 0,3 do 4,2 mg po danu. (26)

Marionnet C., Pierrard C. i njihovi suradnici došli su do nekih zaključaka vezano za otpornost stanica fibroblasta i keratinocita tijekom eksperimenta koji su provodili, a radi se o biološkim učincima prilikom izlaganja suncu. Upravo to kronično izlaganje suncu zaslužno je za dugoročne kliničke kožne promjene kao što su starenje i oboljenja od raka. (27)

Njihovi rezultati su ukazali na veću osjetljivost dermalnih fibroblasta, iako se nalaze dublje u koži, te su otvorili prostor za razmišljanje o novim spoznajama o biološkim događajima kože, koja je svakodnevno izložena UV zračenju. Konačni rezultati njihovog istraživanja pružili su jasne dokaze o različitim reakcijama na oksidativni stres između fibroblasta i keratinocita, što bi moglo odražavati razlike u bazalnoj antioksidativnoj obrambenoj opremi. Prijašnji podaci također su pokazali da je sposobnost preživljavanja dermalnih fibroblasta manja u usporedbi s epidermalnim keratinocitima nakon izloženosti čistom UVA. Pokazalo se da je taj učinak povezan s apoptotičkim procesom koji se javlja samo kod dermalnih fibroblasta u usporedbi s epidermalnim keratocitima. (27)

Russo B. i suradnici su došli do zaključka da su fibroblasti pod utjecajem različitih drugih vrsta stanica, koje su posebno nastanjene u tkivu podvrgnutom fibrotičnim promjenama ili profesionalnim upalnim stanicama koje popunjavaju tkiva. (28)

Treba naglasiti da relativno mali broj radova, posvećen ovoj temi, odražava složenost eksperimentalnih postavki potrebnih za istraživanje ove dvije vrste stanica.

Provedena istraživanja predstavljaju nove, do sada neutvrđene spoznaje o biološkoj aktivnosti 3-APBA. Važnost dobivenih informacija nalazi se u njihovoj potencijalnoj primjeni u farmaciji i medicini.

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu, cilj je bio ispitati citotoksični učinak 3-aminofenilboronične i indometacina na linijama stanica fibroblasta i keratinocita. Indometacin je zbog svoje jako slabe topljivosti u vodi, otopljen u DMSO te je 3-APBA otopljena u ultra-čistoj vodi, u rasponu koncentracija od 0,012 mM do 0,391 mM. Vijabilnost stanica je izmjerena korištenjem MTT testa, pri čemu odgovara vrijednosti apsorbancije pri kojoj formazanski produkt maksimalno apsorbira svjetlost.

Rezultati nas dovode do par različitih zaključaka:

1. Postoji razlika citotoksičnosti oba testirana spoja u odnosu na testirane ljudske stanice keratinocita i fibroblasta.
2. Postoji toksičnost i samog DMSO-a kao otapala.
3. Najveću toksičnost pokazao je indometacin, otopljen u DMSO, testiran na ljudskim stanicama keratinocita ($IC_{50} = 0,55$ mM).
4. Najnižu toksičnost pokazala je 3-aminofenilboronična kiselina (3-APBA), otopljena u ultra-čistoj vodi, testirana na ljudskim stanicama fibroblasta ($IC_{50} = 13,54$ mM).

Iz podataka koji su dobiveni za vrijednosti inhibicije rasta stanice kod vijabilnosti od 50% za spojeve indometacin i 3-APBA, možemo zaključiti kako su oba testirana spoja pokazala veći toksični učinak na stanice keratinocita nego na stanice fibroblasta.

Prilikom interpretiranja rezultata, u obzir treba uzeti i samu toksičnost DMSO koji ima ulogu otapala. DMSO se uobičajno koristi u postotku ispod 1 %. Koncentracija DMSO koja premašuje taj iznos je izrazito toksična te ubija uglavnom sve stanice.

Promatrajući staničnu liniju i keratinocita i fibroblasta, vidljivo je iz vrijednosti IC_{50} da je najveću toksičnost pokazao indometacin otopljen u DMSO ($IC_{50} = 0,55$ mM) dok je najnižu toksičnost od svih testiranih spojeva pokazala 3-aminofenilboronična kiselina otopljena u ultra čistoj vodi. ($IC_{50} = 13,54$ mM).

LITERATURA

1. Dennis G. Hall. Boronic acids. Dennis G. Hall, editor. Edmonton: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 568 p.
2. Marasovic M, Ivankovic S, Stojkovic R, Djermic D, Galic B, Milos M. In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017;32(1):1299–304.
3. Velcade [Internet]. Available from: <https://www.fiercepharma.com/special-report/3-velcade> (10.05.2021.)
4. Boronična kiselina [Internet]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Boronic_acid (10.05.2021.)
5. Marasovic M. Biološka aktivnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata. 2019;
6. Rošić A. Određivanje antioksidacijskog karaktera odabranih boroničnih kiselina i boroksins pomoću Spartan računalne podrške u usporedbi sa standardnim antioksidacijskim metodama. 2021;
7. 3-APBA [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Aminophenylboronic-acid> (03.05.2021.)
8. Barba V, Hernández R, Höpfl H, Santillan R, Farfán N. 3-Aminophenylboronic acid as building block for the construction of calix- and cage-shaped boron complexes. *J Organomet Chem.* 2009;694(14):2127–33.
9. Wannapob R, Kanatharana P, Limbut W, Numnuam A, Asawatreratanakul P, Thammakhet C, et al. Affinity sensor using 3-aminophenylboronic acid for bacteria detection. *Biosens Bioelectron.* 2010;26(2):357–64.
10. 3-APBA [Internet]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/900988?lang=en®ion=HR> (02.05.2021.)
11. Indometacin [Internet]. Available from: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Indometacin> (28.04.2021.)
12. Juraj J. Sveučilište J . J . Strossmayera u Osijeku Odjel za kemiju Preddiplomski studij kemije Zvonimir Perković Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije indometacina (Potentiometric characterization of indomethacin nanosuspension). 2020;
13. Mimica Matanović S. Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Analgesics. Medicus.* 2014;23(1):31–46.
14. Indocin [Internet]. Available from: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-10968/indocin-rectal/details> (28.04.2021.)
15. O'Brien WM. Indomethacin: A survey of clinical trials. *Clin Pharmacol Ther.*

- 1968;9(1):94–107.
16. Ankilozantni spondilitis [Internet]. Available from: <http://hr.medicine-en.info/traumatology/spine/bolest-ankilozantni-spondilitis-prognoza-zazivot.html> (28.04.2021.)
 17. Melish, Marian E MD et al. Indomethacin in the treatment of premature labor. *N Engl J Med.* 1974;319(13):802–5.
 18. Kern AB. Indomethacin for Psoriasis. *Arch Dermatol.* 1966;93(2):239–40.
 19. Kultura stanica. Available from: [http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2018-19/Farmacija Molekularna biologija s genetikom/Vjezba 8 - Stanične kulture.pdf](http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2018-19/Farmacija_Molekularna_biologija_s_genetikom/Vjezba_8_-_Stanicne_kulture.pdf) (26.04.2021.)
 20. Skendžić L. Degenerativne promjene fibroblasta i kolagena uzrokovane kronološkim i fotostarenjem kože. 2016;97.
 21. Epiderma [Internet]. Available from: <https://www.mikeda.hr/znanost/> (02.05.2021.)
 22. Fibroblasti i keratinociti [Internet]. Available from: <https://www.dermatix.com.hr/hr-hr/dermatix/mehanizam-djelovanja-silikona> (22.04.2021.)
 23. Ilić N. Učinak različitih makrocikličkih spojeva na proliferaciju stanica tumora in vitro Nataša Ilić Učinak različitih makrocikličkih spojeva na proliferaciju stanica tumora in vitro. 2009;63.
 24. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci Mater Med.* 1994;5(3):154–9.
 25. MTT. Available from: <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html> (20.04.2021.)
 26. Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem.* 2009;1(7):1275–88.
 27. Marionnet C, Pierrard C, Lejeune F TM. Different oxidative stress response in keratinocytes and fibroblasts of reconstructed skin exposed to non extreme daily-ultraviolet radiation. *PLoS One.* 2010;
 28. B, Russo CC. Interplay Between Keratinocytes and Fibroblasts: A Systematic Review Providing a New Angle for Understanding Skin Fibrotic Disorders. *Front Immunol.* 2020;