

In vitro istraživanje adjuvantnog učinka quisinostata na citotoksičnost 5-fluorouracila na tumorske stanice mliječne žlijezde miša

Moslavac, Leonina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:032637>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Leonina Moslavac
1012/MB

***IN VITRO* ISTRAŽIVANJE
ADJUVANTNOG UČINKA
QUISINOSTATA NA
CITOTOKSIČNOST
5-FLUOROURACILA NA
TUMORSKE STANICE MLIJEČNE
ŽLIJEZDE MIŠA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za imunologiju Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu pod neposrednim voditeljstvom dr.sc. Kreše Bendelje te pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Lidije Šver iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno - biotehnoškog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IN VITRO ISTRAŽIVANJE ADJUVANTNOG UČINKA QUISINOSTATA NA CITOTOKSIČNOST 5-FLUOROURACILA NA TUMORSKE STANICE MLJIJEČNE ŽLIJEZDE MIŠA

Leonina Moslavac, 1012/MB

Sažetak:

Tumori su osnovni predmet istraživanja velike većine eksperimentalnih radova zbog pojave rastuće smrtnosti, neovisno o dobi i spolu. Tumor dojke najzastupljeniji je oblik kod ženske populacije te je kao takav predmet istraživanja ovog rada, s ciljem ispitivanja osjetljivosti stanica tumora mliječne žlijezde miša na primijenjeni lijek 5-fluorouracil (5-FU) te pomoćno sredstvo quisinostat (inhibitor histon deacetilaza), u obliku 2D i 3D staničnih kultura. Pritom, određena je koncentracija lijeka koja daje približno 50% preživljenja stanica te efikasnost istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom te predtretmana quisinostatom uz dodatak lijeka. Ispitan je utjecaj različitih koncentracija lijeka 5-FU te koncentracije quisinostata. Za određivanje 2D staničnih kultura korišten je resazurin test, dok su za 3D stanične kulture korišteni *CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* test. Zaključno, 3D stanična kultura pokazala je veću osjetljivost na istovremeni tretman u odnosu na 2D staničnu kulturu, koji se pokazao kao najbolja opcija primjene u tretiranju stanica tumora mliječne žlijezde miša.

Ključne riječi: tumor mliječne žlijezde miša, 2D stanična kultura, 3D stanična kultura, 5-fluorouracil, quisinostat

Rad sadrži: 55 stranica, 18 slika, 18 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Lidija Šver*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Krešo Bendelja, viši znanstveni suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Dr. sc. Krešo Bendelja, viši znanstveni suradnik
2. Izv. prof. dr. sc. Lidija Šver
3. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
4. Doc. dr. sc. Tomislav Vladušić (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

***IN VITRO* STUDY OF THE ADJUVANT EFFECT OF QUISINOSTAT ON THE CYTOTOXICITY OF 5-FLUOROURACILE ON MOUSE MAMMARY GLAND TUMOR CELLS**

Leonina Moslavac, 1012/MB

Abstract:

Tumors are the main subject of research in the vast majority of experimental studies due to the onset of increasing mortality, regardless of age and gender. Breast cancer is the most prevalent form in the female population, and as such is the subject of research in this study, with the aim of examining the sensitivity of mouse mammary gland tumor cells to the drug 5-fluorouracile (5-FU) and the adjuvant quisinostat (histone deacetylase inhibitor), in the form of 2D and 3D cell cultures. The concentration of the drug giving approximately 50% cell survival and the efficacy of combination treatment with 5-FU and quisinostat and pretreatment with quisinostat with drug addition were determined. The effect of different concentrations of 5-FU and the concentrations of quisinostat were examined. Resazurin assay was used to determine viability in 2D cell cultures, whereas CellTox™ Green Cytotoxicity, RealTime-Glo MT Cell Viability and CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay were used for 3D cell cultures. To conclude, 3D cell culture showed greater sensitivity to combination treatment than 2D cell culture, which has proven to be the best application option in the treatment of mouse mammary gland tumor cells.

Keywords: *breast cancer, 2D cell culture, 3D cell culture, 5-flourouracile, quisinostat*

Thesis contains: 55 pages, 18 figures, 18 tables, 48 references,

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ph.D. Lidija Šver, Assistant Professor

Technical support and assistance: Ph.D. Krešo Bendelja, Senior research associate

Reviewers:

1. Ph.D. *Krešo Bendelja*, Senior Research Associate
2. Ph.D. *Lidija Šver*, Associate professor
3. Ph.D. *Višnja Gaurina Srček*, Full professor
4. Ph.D. *Tomislav Vladušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 25th, September 2019

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Tumori.....	2
2.1.1. Tumor dojke.....	3
2.2. Kancerogeneza.....	4
2.2.1. Vanjski faktori nastanka tumora	6
2.2.2. Unutarnji faktori nastanka tumora	6
2.2.2.1. Protoonkogeni i tumor supresorski geni.....	7
2.2.2.2. Mehanizmi popravka DNA.....	7
2.2.2.3. Epigenetski mehanizmi	8
2.2.2.3.1. Acetilacija/ deacetilacija histona.....	9
2.3. Stanične kulture	10
2.3.1. 2D stanična kultura.....	10
2.3.1.1. Određivanja vijabilnosti stanica u 2D staničnim kulturama.....	11
2.3.1.1.1. Resazurin test	11
2.3.2. 3D stanična kultura.....	11
2.3.2.1. Metode određivanja vijabilnosti stanica u 3D staničnim kulturama.....	12
2.3.2.1.1. CellTox Green Cytotoxicity test	12
2.3.2.1.2. RealTime-Glo MT Cell Viability test	13
2.3.2.1.3. CellTiter-Glo 3D Cell Viability test.....	14
2.4. Istraživanje utjecaja antitumorskog lijeka (citotoksičnost).....	14
2.4.1. Antitumorski lijek 5-fluorouracil	15
2.4.2. Quisinostat	16
3. Eksperimentalni dio.....	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Stanična linija.....	17

3.1.2.	Kemikalije.....	17
3.1.3.	Lijekovi.....	18
3.1.4.	Medij i otopine	19
3.1.5.	Pločice za uzgoj stanica	19
3.2.	Uređaji.....	19
3.3.	Metode rada	20
3.3.1.	2D stanična kultura.....	20
3.3.1.1.	Utjecaj doze 5-FU na vijabilnost stanica.....	20
3.3.1.2.	Istovremeni tretman tumorskih stanica 5-FU- om i quisinostatom.....	22
3.3.1.3.	Predtretman s quisinostatom i tretman s 5-FU.....	23
3.3.2.	3D stanična kultura.....	24
3.3.2.1.	Utjecaj koncentracije 5-FU na vijabilnost stanica	24
3.3.2.2.	Istovremeni tretman tumorskih stanica s 5-FU i quisinostatom	25
3.3.2.3.	Predtretman s quisinostatom i tretman 5-FU-om.....	26
3.3.3.	Određivanje broja mrtvih/živih stanica u 3D staničnoj kulturi.....	27
3.3.3.1.	CellTox™ Green Cytotoxicity test	27
3.3.3.2.	RealTime-Glo MT Cell Viability test	27
3.3.3.3.	CellTiter-Glo 3D Cell Viability test.....	28
3.4.	Analiza i statistička obrada podataka	28
4.	Rezultati i rasprava	30
4.1.	Utjecaj doze 5-FU na vijabilnost stanica u 2D i 3D staničnoj kulturi	30
4.2.	Vijabilnost tumorskih stanica pri istovremenom izlaganju tumorskih stanica 5-FU i quisinostatu u 2D i 3D kulturi.....	36
4.3.	Vijabilnost tumorskih stanica nakon predtretmana quisinostatom te naknadnog tretmana s 5-FU u 2D i 3D kulturi.....	42
5.	Zaključak	50
6.	Popis literature.....	51

1. Uvod

U današnje vrijeme sve veći naglasak stavlja se na potrebe istraživanja rastućeg broja raznih oboljenja s ciljem njihove prevencije, u čemu veliku ulogu zauzimaju tumori. Upravo ova vrsta bolesti proširuje crnu sliku smrtnosti diljem svijeta te sa svojim mehanizmima rezistencije usmjerava sve veći broj istraživanja ka njezinom razumijevanju i pokušaju prevencije ili smanjenju simptoma uznapredovalog stadija. Zajednička karakteristika tumora predstavlja nekontrolirani rast tumorskih stanica, uništavanje ustroja i funkcioniranja zahvaćenog tkiva. Također, stanice imaju potencijal tvorbe metastaza, tj. formiranja sekundarne neoplazije u okolnim tkivima i organima, nastale širenjem tumorskih stanica putem krvožilnog te limfnog sustava. Budući da postoji više različitih tipova tumora, koji su specifični po mjestu nastanka u organizmu, načinu djelovanja, simptomima, mogućnosti tvorbe metastaza važno je razumijevanje molekularnih mehanizama koji prethode identifikaciji odgovarajućih terapijskih meta. Tumor dojke jedan je od najčešće dijagnosticiranih kod ženske populacije. Smrtnost je posljedica njegova širenja u limfne čvoriće i daljnje organe, kao što su kost, pluća, jetra i mozak (Fantozzi i Christofori, 2006).

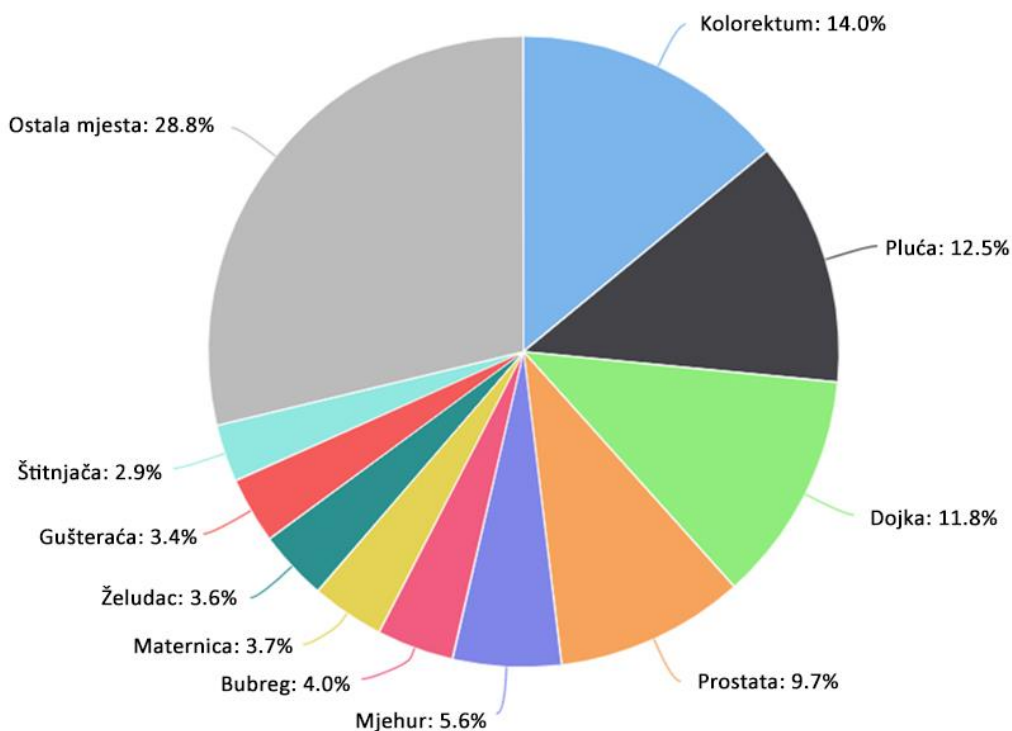
Između ostalog, zbog sve veće njegove zastupljenosti među uzrocima smrti kod žena, cilj ovog eksperimentalnog rada je ispitati osjetljivost tumorskih stanica na primjenu lijeka 5-fluorouracila (5-FU) te mogući sinergistički učinak lijeka i pomoćnog sredstva quisinostata (inhibitor histon deacetilaza). Provedeno istraživanje sastojalo se od sljedećih faza:

- Istraživanje utjecaja doze lijeka 5-FU na citotoksičnost u 2D i 3D staničnim kulturama tumora mliječne žlijezde miša
- Istraživanje utjecaja istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom na citotoksičnost u 2D i 3D staničnim kulturama tumora mliječne žlijezde miša
- Istraživanje utjecaja predtretmana quisinostatom i naknadnog tretmana s 5-FU u 2D i 3D staničnim kulturama tumora mliječne žlijezde miša.

2. Teorijski dio

2.1. Tumori

Tumori ili novotvorine definiraju se kao abnormalna nakupina tkiva nastala kao rezultat nekontrolirane diobe genski promijenjenih stanica. Prema krajnjem utjecaju na organizam tumore je moguće klasificirati na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Osnovna razlika u navedenoj podjeli je mogućnost tvorbe metastaza te uništavanje normalne strukture i funkcije tkiva i organa u kojima se nalaze, što je karakteristika malignih tumora. Maligne stanice nadmašuju usklađen rast normalnih stanica, tvore nakupine te imaju potencijal metastaziranja, tj. širenja u okolna tkiva putem krvožilnog i limfnog sustava, što je karakteristično za lokalno širenje te širenje koje obuhvaća regionalne limfne čvoriće, tkiva i organe u udaljenim dijelovima tijela. Jedni od mogućih uzroka koji dovode do širenja u okolna tkiva su epitel mezenhimski prijelaz koji nije kompletan u tumorskim stanicama, nakupljanje mutacija u matičnim tumorskim stanicama, alternativna diferencijacija makrofaga te njihova transformacija (fuzijska hibridizacija s neoplastičnim stanicama) (Seyfried i Huysentruyt, 2013; Roche, 2018). Proces metastaziranja uključuje niz uzastopnih i međusobno povezanih koraka koji se sastoje od odvajanja stanica od primarnog tumora, invadiranja u krvožilni i limfni sustav, izbjegavanja imunološkog odgovora, širenja u kapilarna korita, invadiranja i proliferacije u tkivima i organima (Seyfried i Huysentruyt, 2013). Najčešća područja tvorbe metastaza su kosti, jetra, pluća, mozak, potrbušnica i nadbubrežna žlijezda (NIH). Histopatološka klasifikacija tumora upućuje na mjesto nastanka tumora te tkiva iz kojeg potječe metastaza. Najveći postotak tumora prisutan kod muškaraca javlja se u prostati, plućima, urinarnom traktu te debelom crijevu. Kod ženske populacije najveći postotak oboljelih je od tumora dojke, pluća, vrata maternice, debelog crijeva te štitnjače (Hassanpour i Dehghani, 2017). Kao prilog navedenom, na Slici 1. je prikaz statističke učestalosti pojave različitih tipova tumora za oba spola u Republici Hrvatskoj za 2018. godinu. Također, najveću smrtnost uzrokuje tumor pluća kod oba spola. Za uspješnu terapiju i smanjen mortalitet uzrokovan tumorima nužno je detaljno razmišljanje mehanizama nastanka, metastaziranja, izbjegavanja imunološkog odgovora kao i otpornosti na postojeće te nove antitumorske lijekove.



Slika 1. Učestalost pojave tumora u Republici Hrvatskoj za 2018. godinu (ECIS,2018).

2.1.1. Tumor dojke

Tumor dojke jedan je od najučestalijih koji se javlja među ženskom populacijom te zahvaljujući pravovremenoj prevenciji, ranom otkrivanju te liječenju, omogućuje preživljenje u čak 80 % slučajeva. Mehanizam nastanka tumora veže se uz genske promjene karakteristične za većinu tumora kao što su uzastopne mutacije koje i) rezultiraju stalnom aktivnošću protoonkogena u stimulaciji rasta, proliferacije i preživljavanja stanica odnosno dovode do njihove nekontrolirane diobe, (ii) uzrokuju gubitak funkcije tumor supresorskih gena te gena ključnih za popravak oštećenja molekule DNA, neobuzdanog rasta stanica ili regulacije staničnog ciklusa (Sun i sur., 2017). Primjer navedenog je pojava mutacija u genima *BRCA1* i *BRCA2*, za što je potrebna mutacija u oba alela za pojedini gen kako bi došlo do fenotipske ekspresije. Produkti ovih gena sudjeluju u različitim staničnim procesima, uključujući popravak oštećenja DNA u S fazi staničnog ciklusa. Mutacijom navedenih gena ne formiraju se potrebni proteinski kompleksi za popravak DNA, zbog čega izostaje mehanizam popravka DNA homolognom rekombinacijom (Jasin, 2002). Osim toga, gen *HER2* kodira za receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta istoimenog naziva, čija je

prekomjerna ekspresija uočena u 20 % primarnih tumora dojke (Sun i sur., 2017). S obzirom na područje razvitka tumora unutar dojke mogu nastati različiti tipovi tumora, od kojih je većina benigna. Primjer navedenog su fibrocistične promjene unutar dojke koje rezultiraju nastankom ciste, područja zadebljanja, fibroze, tj. formiranja viška vlaknastog vezivnog tkiva. Većina neinvazivnih tumora dojke razvija se u tankim cijevima koje povezuju režnjeve i lobule, zvani duktusi. Duktalne stanice ograničene su na to područje te ne invadiraju u okolno masno i vezivno tkivo dojke, osim kod invazivnog dukalnog karcinoma. Osim toga, moguć je nastanak tumorskih stanica u režnjevima ili lobulima što rezultira lobularnim malignim tumorom, koji ima mogućnost širenja u okolno tkivo dojke (Sharma i sur., 2010). Liječenje benignih tumora odnosi se na primjenu operativnog zahvata dok kod malignih ovisi o proširenosti (stadij 0-IV) i tipu nastalog tumora. Najraniji stadij raka dojke je neinvazivna bolest (stadij 0) koji je ograničen na širenje unutar kanalića ili režnjića dojke, bez širenja u zdravo tkivo (karcinom *in situ*). Invazivni tumor dojke karakterističan je zbog širenja u kanaliće ili režnjiće te zdravo tkivo dojke, ili izvan dojke u limfne čvorove i druge organe (stadiji I - IV). Načini liječenja invazivnog oblika sastoje se od operativnog zahvata, radioterapije, kemoterapije, imunoterapije te endokrine (hormonalne) terapije. Osim toga, razvijaju se mehanizmi ciljane dostave lijeka primjenom nanotehnologije, s ciljem smanjenja nuspojava nastalih u liječenju, kao što su gubitak kose, gastrointestinalne smetnje, neutropenija te smanjen imunitet (Nounou i sur., 2015).

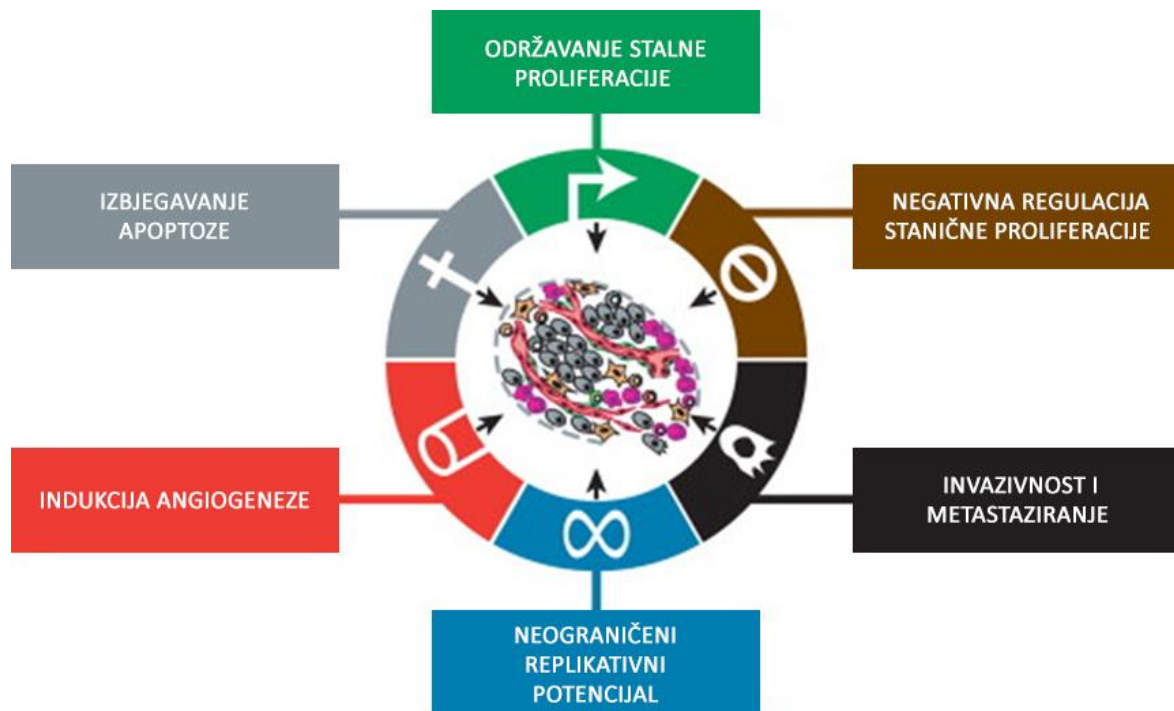
2.2. Kancerogeneza

Tumori su jedan od glavnih uzroka povećanja smrtnosti diljem svijeta pa ne iznenađuje velik interes u istraživanju mehanizma nastanka tumora (kancerogeneze) kako bi se detektirala ciljna mjesta djelovanja za terapijske postupke. Kancerogenezu promiču karcinogeni, tj. supstance koje direktno ili indirektno dovode do disfunkcije staničnih gena te staničnih funkcija koje su rezultat oštećenja molekule DNA (Barnes i sur., 2018). Kemijske supstance prisutne u okolišu, virusi, bakterije te zračenje uzročnici su 7 % različitih tipova tumora (Hassanpour i Dehghani, 2017). Primjer su kronične infekcije bakterijama *Helicobacter pylori* i *Salmonella typhi* koje proizvode karcinogene metabolite odnosno produkti viralnih gena Epstein-Barr virusa, hepatitis B virusa i humanog herpes virusa-8 (Mager, 2006; Liao, 2007). Osim navedenog, moguć je utjecaj endogenih faktora kao što su mutacija ključnih gena, mehanizam popravka DNA te epigenetski mehanizmi. Posljedica izlaganju karcinogenima je akumulacija mutacija u genomu, promjene u ekspresiji gena, staničnom

funkcioniranju te nastanak stanica s metastatskim potencijalom (Schedin i Elias, 2004). Osnovna svojstva tumorskih stanica (Slika 2.) kojima se razlikuju od normalnih stanica su: održavanje stalne proliferacije, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje stanične smrti, omogućavanje stanične besmrtnosti, induciranje angiogeneze te invazivnost i metastaziranje. Osim toga, formiranje tumorskih nakupina uključuje prisutnost različitih tipova stanica koje međusobnim interakcijama doprinose formiranju mikrokoliša te razvitku i ekspresiji tumorskih svojstava (Hanahan i Weinberg, 2011).

Održavanje stalne proliferacije tumorskih stanica odnosi se na njihovu sposobnost deregulacije signala rasta, tj. samostalnu proizvodnju faktora rasta koji vezanjem na receptore podržavaju autokrinu proliferativnu stimulaciju i neograničeni rast. Nasuprot tome, normalne stanice imaju strogo kontroliranu proizvodnju i otpuštanje signala rasta koji omogućuju regulaciju staničnog ciklusa (Feitelson i sur., 2015). Negativna regulacija stanične proliferacije posredovana je genima za cijeli niz staničnih funkcija, uključujući i remodeliranje kromatina te tumor supresorskim genima, kao što su oni koji kodiraju za proteine p53 i Rb, koji sudjeluju u aktivaciji senescencije odnosno apoptoze stanica. Izbjegavanje apoptoze vezano je za mehanizme na razini transkripcije, translacije i posttranslacijske modifikacije, moguću inaktivaciju p53 proteina te povećanu ekspresiju antiapoptičkih regulatora (*Bcl-2* i srodnih gena) ili signala preživljavanja, što se postiže smanjivanjem ekspresije proapoptičkih faktora ili zaobilazanjem ekstrinzičnog i intrinzičnog programa smrti/apoptoze (Hanahan i Weinberg, 2011). Neograničeni replikativni potencijal, tj. stanična besmrtnost vezana je za visoku aktivnost telomerase, čija je uloga produljenje krajeva DNA dodavanjem ponavljajućih slijedova nukleotida. Njezina prisutnost povezuje se s otpornošću stanica na indukciju senescencije i apoptoze (Yaswen i sur., 2015). Također, istraživanja ukazuju da telomeraza može utjecati na kancerogenezu bez osnovne uloge produljenja krajeva molekule DNA, utjecajem na mehanizam popravka oštećenja molekule DNA, regulaciju p53 i RNA ovisnu polimeraznu aktivnost (Tergaonkar, 2015). Sljedeće svojstvo tumorskih stanica, angiogeneza je proces staničnog dijeljenja, migracije i povezivanja endotelnih stanica iz postojećih krvnih žila. Regulacija uključuje aktivnost pro i anti angiogenetskih faktora, čija ravnoteža određuje smjer odvijanja angiogeneze. U slučaju formiranja tumora dolazi do aktivacije pro angiogenetskih faktora (Fouad i Aane, 2017). Sposobnost invadiranja okolnog tkiva i tvorba metastaza vezana je uz promjenu interakcija tumorskih stanica s različitim tipovima stanica te ekstracelularnim matriksom, što nastaje kao posljedica smanjenje ekspresije E-kadherina, transmembranskog glikoproteina odgovornog za ostvarivanje tih interakcija (Hanahan i Weinberg, 2011). Međutim, udaljene metastaze tumora

dojke pokazuju konstantnu ekspresiju E-kadherina, veću nego u primarnim tumorima (Kowalski i sur., 2003).



Slika 2. Osnovna svojstva tumorskih stanica (Hanahan i Weinberg, 2011).

2.2.1. Vanjski faktori nastanka tumora

Niz istraživanja ukazuje na vjerovatnost nastanka tumora uzrokovanih okolišnim faktorima u kombinaciji s genskim promjenama. Većina slučajeva se može prevenirati promjenom individualnog stila života te smanjenom izlaganju karcinogenima. Vanjski faktori koji mogu utjecati na razvoj tumora su izlaganje ultraljubičastom zračenju (Sunčeva svjetlost), infektivnim agensima, organskim i anorganskim kemikalijama, stil života koji uključuje prekomjernu težinu, konzumiranje cigareta, alkohola, hormonska terapija te čimbenici kao što su zagađenje vode i zraka (Parsa, 2012; IARC).

2.2.2. Unutarnji faktori nastanka tumora

Pojava mutacija u ključnim genima vezanim za staničnu diobu, kao što su onkogeni, tumor supresorski geni, geni uključeni u apoptozu te stanični popravak, može značajno doprinjeti nastanku tumora (Parsa, 2012).

2.2.2.1. Protoonkogeni i tumor supresorski geni

Otkrićem skupine gena, protoonkogeni i tumor supresorskih gena, koji sudjeluju u normalnim staničnim procesima uključujući staničnu proliferaciju, smrt, odgovor na stanični stres, diferencijaciju, pokretljivost, prijenos signala među stanicama, utvrđeno je da njihove mutacije dovode do promjene u regulaciji normalnih staničnih procesa, te posljedično nastanku tumora (Kim, 2015). Protoonkogeni su skupina gena čiji produkti utječu na staničnu proliferaciju, diferencijaciju te rast stanice. Njihovom mutacijom dolazi do formiranja onkogeni, čiji produkti uzrokuju nekontroliranu diobu stanice. U slučaju mutacije protoonkogeni dolazi do ekspresije onkoproteina, funkcionalnih analoga normalnih proteina koji su izgubili mogućnost regulacije staničnog ciklusa. Iz tog razloga, dolazi do trajne aktivnosti onkoproteina, neovisno o faktorima rasta te vanjskim signalima. Također postoji skupina onkoproteina aktivnih u jezgri stanice koji utječu na regulaciju transkripcije i ekspresije gena. Onkogeni čiji su produkti locirani u jezgri su npr. myc (c-myc, n-myc, l-myc); c-myb i c-fos (Wang i Li, 2014). Oni posjeduju kinaznu aktivnost čineći proces fosforilacije jednim od nezaobilaznih načina regulacije staničnog ciklusa.

Biokemijski mehanizmi regulacije staničnog rasta putem produkata tumor supresorskih gena odnose se na sintezu niza staničnih proteina koji utječu na represiju staničnog rasta. Primjer jednog od najvažnijeg proteinskog produkta tumor supresorskih gena je p53 čija uloga je vezana uz proliferaciju, staničnu smrt, senescenciju, angiogenezu, diferencijaciju te DNA metabolizam (Hassanpour i Dehghani, 2017). Naime, p53 je transkripcijski faktor koji inducira ekspresiju gena čiji produkti funkcioniraju kao inhibitori staničnog ciklusa koji omogućavaju dobivanje na vremenu za popravak oštećene DNA molekule. Gen *TP53* je mutiran u 42% svih tipova tumora (Kim, 2015).

2.2.2.2. Mehanizmi popravka DNA

Geni uključeni u stanični popravak, na razini DNA, izrazito su bitni za sprječavanje nastanka letalnih mutacija ili onih koje dovode do nastanka tumora. Međutim, prisutni su unutarnji faktori koji mogu dovesti do prekida kontinuiteta (jednolančanog ili dvolančanog loma) molekule DNA, kao što su greške tijekom replikacije DNA, prisutnost reaktivnih kisikovih radikala, skraćivanje telomera te replikacijski stres izazvan aktivacijom onkogeni ili inaktivacijom tumor supresorskih gena (Li i sur., 2013). Također, *cis* elementi unutar strukture DNA mogu utjecati na veću vjerojatnost mutacije gena (Duan i sur., 2018).

Iz tog razloga, u stanici su razvijeni mehanizmi popravka molekule DNA kako bi se smanjila mogućnost nastanka mutacija. U slučaju nastanka jednolančanog loma ili ugradnje krivog nukleotida aktiviraju se bazni te nukleotidni ekscizijski popravak u kojemu dolazi do zamjene oštećene dušikove baze novom te povezivanja oštećenog lanca djelovanjem određenih kompleksa proteina. Pritom komplementarni lanac DNA služi kao kalup za popravak nastalog oštećenja. Također, djelovanjem određenih agenasa moguć je nastanak dvolančanog loma. Ovaj tip novonastalog oštećenja teže je popraviti zbog odsustva komplementarnog dijela lanca molekule DNA, čime se aktiviraju posebni mehanizmi popravka zvani homologna rekombinacija te ilegitimna rekombinacija. Homologna rekombinacija prisutna je u S i G₂ fazi staničnog ciklusa jer zahtjeva prisustvo homologne sestrinske kromatide prema kojoj se vrši popravak, dok je ilegitimna rekombinacija prisutna u postmitotičkim stanicama te onima u G₁ fazi staničnog ciklusa. Mehanizam homologne rekombinacije iniciran je vezanjem MRN kompleksa na novonastali dvolančani lom, pri čemu služi kao nosač sljedećeg proteina u nizu, CtIP nukleaze. Zajedno s egz nukleazom (EXO1) dolazi do procesiranja krajeva DNA. Vezanjem RAD51 nukleo-proteinskog filameta na jednolančanu regiju osigurava se invadiranje lanca DNA u homolognu regiju sestrinske kromatide prema kojoj se vrši popravak (Giglia-Mari i sur., 2011). Ilegitimna rekombinacija započinje prepoznavanjem i vezanjem Ku heterodimera koji se sastoji od vrlo strukturno sličnih Ku70 i Ku80 podjedinica. Budući da je kompleks u stanici prisutan u velikim koncentracijama te ima veliki afinitet za krajeve DNA, vezanje tijekom nastanka dvolančanog loma odvija se vrlo brzo po nastanku oštećenja. Ku kompleks veže se na šećerni dio lanca, štiti krajeve novonastalog loma, formira prsten te klizi po molekuli DNA, služeći kao nosač ostalih proteinskih faktora koji vrše popravak. Također, ako je potrebno provodi se procesiranje DNA kako bi se stvorili ligirajući krajevi koje povezuje enzim ligaza, čime dolazi do raspuštanja čitavog kompleksa proteina i popravka oštećenja (Davis i Chen, 2013). Budući da je u većini slučajeva za nastanak tumora karakteristična genomska nestabilnost, izostanak enzima koji sudjeluju u ovim mehanizmima popravka povećava istu te dovodi do veće vjerovatnosti nastanka tumorskih stanica.

2.2.2.3. *Epigenetski mehanizmi*

Epigenetski mehanizmi, kao što su modifikacija histona i metilacija DNA, predstavljaju dodatan faktor za razumijevanje funkcioniranja stanice s naglaskom potencijalne uloge u nastanku tumorskih stanica. Struktura kromatina, dostupnost pojedinih gena te njihova ekspresija čine dodatnu kontrolnu točku stanice te promjene na toj razini mogu sudjelovati u

nastanku tumora (Dalgliesh i sur., 2010). Genetički materijal eukariota pohranjen je u obliku DNA molekule u jezgri, mitohondrijima i plastidima te formira specifičnu strukturu koja omogućava kompaktno pakiranje izrazito velike molekule. Molekula DNA u jezgri tvori strukturne komplekse s proteinima histonima, što predstavlja prvu razinu organizacije DNA molekule. Nukleosom se sastoji od dvije kopije histona H2A, H2B, H3 i H4 te DNA molekule kondenzirane u oktamerni kompleks. Strukture nukleosoma su međusobno povezane linker DNA, varijabilnih duljina te histonom H1 u kromatinsko vlakno. Internukleosomalne interakcije su osigurane preko linker histona H1. Daljnjom kondenzacijom molekule DNA formira se struktura zvana kromatin (Mariño-Ramírez i sur., 2005). Modifikacijom (metilacija, acetilacija, ubikvitinacija, fosforilacija) amino terminalnog kraja histona, utječe se na replikaciju DNA, transkripciju, tj. ekspresiju pojedinih gena kao i na arhitekturu same jezgre (Li i sur., 2007). Navedene epigenetske promjene kontrolirane su specifičnim proteinima koji uključuju histon metilaze i demetilaze. Primjer navedenog je gen *UTX* koji kodira za histon H3 lizin 27 demetilazu, čijom mutacijom dolazi do formiranja tumora jer se metilacija aminokiselinskog ostatka lizina na H3 histonu povezuje s genomskim utišavanjem i represijom transkripcije. Navedena mutacija primjećena je kod pojave raznih tumora, a čak 10 % kod multiplih mijeloma (van Haafte i sur., 2010). Osim toga, gen *UTX* se ovisno o staničnom kontekstu može ponašati i kao onkogen (Schultz i sur., 2019). Drugi navedeni epigenetski mehanizam uključuje metilaciju DNA, odnosi se na proces enzimski katalizirane reakcije kovalentnog vezanja metilne skupine na peti ugljikov atom dušikove baze citozina. Iako je ovaj biološki proces prisutan u normalnim stanicama, metilacija DNA može se javiti u promotorskim regijama različitih gena, uključujući tumor supresorske gene, čime dovodi do represije transkripcije pojedinih gena, povećanja vjerojatnosti nastanka mutacije, što može rezultirati formiranjem tumorskih stanica. Također, uzorak metiliranja CpG otoka, unutar promotorskih regija primijećen je u tumorskim stanicama (Wajed i sur., 2001). Ovaj uzorak ponašanja tumorskih stanica, kao i prethodno navedeni, mogu igrati veliku ulogu u daljnjim istraživanjima njihova tretiranja.

2.2.2.3.1. Acetilacija/ deacetilacija histona

Modifikacija histona kojom se utječe na ekspresiju gena uključuje procese acetilacije i deacetilacije histona, posredovane enzimima histon acetil transferazama (HAT) i histon deacetilazama (HDAC). Acetilacija lizina na histonima H3 i H4 dovodi do formiranja otvorene strukture kromatina, tj. aktivacije transkripcije gena, dok deacetilacija ima suprotan

(inhibicijski) učinak. Osim toga, procesu acetilacije i deacetilacije podložni su i drugi proteini kao transkripcijski faktori, uključujući p53 protein. U ljudskim stanicama otkriveno je 18 različitih HDAC enzima podijeljenih u četiri grupe s obzirom na karakteristike pojedinih. Aktivnost histon deacetilaza grupe I povezana je sa staničnom proliferacijom te je njezina prisutnost karakteristična za tumorske stanice. Inhibicija aktivnosti HDAC utječe na indukciju apoptoze, modifikaciju staničnog ciklusa, indukciju diferencijacije stanica, promjene u angiogenezi i mikrookolišu tumora te proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala. Quisionstat je inhibitor HDAC širokog spektra koji pokazuje sposobnost inhibicije rasta tumorskih stanica (Venugopal i sur., 2013). Karakterističan je po selektivnom djelovanju prema prvoj i drugoj skupini HDAC izoenzima, ovisno o koncentraciji, čime pokazuje moguću primjenu kao antitumorski lijek (Carol i sur., 2013)

2.3. Stanične kulture

Uspostava stanične kulture uključuje izolaciju stanica iz određenog tkiva ili organa, koji predstavljaju normalne uvjete za njihov rast i proliferaciju (*in vivo*) te njihov uzgoj u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (*in vitro*). Kratkoročne stanične kulture mogu se koristiti za istraživanja te postavljanje dijagnoze kao npr. detekciju patogena, praćenje rasta te individualnog ponašanja stanica, morfologije tkiva, mehanizma bolesti, utjecaja lijeka, produkciju proteina te razvoj tkivnog inženjerstva (Hudu i sur., 2016; Kapałczyńska i sur., 2018). Stanične kulture koje se koriste s ciljem istraživanja utjecaja pojedinog lijeka na tumorske stanice s obzirom na osobitost rasta *in vitro* mogu biti 2D i 3D stanične kulture. Osnovna razlika je u načinu uzgoja stanica, tj. 2D kulture rastu u monosloju, dok 3D kulture stanica u posebno dizajniranim uvjetima tvore višeslojne tvorbe koje omogućuju realnije istraživanje stanične biologije uključujući tumore (Lovitt i sur., 2014).

2.3.1. 2D stanična kultura

Većina eksperimentalnih istraživanja bazira se na korištenju adherentnih 2D staničnih kultura u *in vitro* uvjetima, koja je karakteristična po rastu u monosloju na specifičnim plastičnim nosačima (Lovitt i sur., 2014). Osnovna prednost upotrebe ovih kultura je lakoća održavanja stanica, podjednaka dostupnost nutrijenata i faktora rasta u mediju, što rezultira homogenim rastom i proliferacijom. Međutim, nedostaci njihove upotrebe sve više dolaze do izražaja.

Primjena 2D stanične kulture ne imitira prirodne strukture tkiva i tumora, tj. interakcije odgovorne za diferencijaciju, proliferaciju stanica, odgovor na podražaje, ekspresiju gena i proteina, metabolizam lijeka te one funkcioniraju drugačije u odnosu na tumorske stanice u prirodnom okruženju (*in vivo*). Također, nakon izolacije iz tkiva dolazi do promjene njihove morfologije što u konačnici utječe na funkciju, stanični prijenos signala i raspored mikrostruktura unutar stanice. Osim prethodno navedenog, adherentne stanice rastu u monosloju čime izostaje efekt tumorskog mikrokoliša koji je potreban za potpunije razumijevanje tumora. U 2D kulturi tumorske stanice gube polarnost te imaju neograničen pristup sastojcima medija u kojemu se nalaze, kao što su kisik, nutrijenti, metaboliti i signalne molekule (Kapałczyńska i sur., 2018).

2.3.1.1. Određivanja vijabilnosti stanica u 2D staničnim kulturama

2.3.1.1.1. Resazurin test

Resazurin test je metoda koja služi za određivanje vijabilnosti stanične kulture. Bazira se na primjeni redoks indikatora resazurina, plavo obojenog spoja koji slobodno difundira u stanicu. Stanice s aktivnim metabolizmom reduciraju resazurin u rezorufin, ružičasto obojenu fluorescentnu komponentu čija se fluorescencija mjeri pri valnim duljinama ekscitacije 560 nm te emisije 590 nm. Pritom, vrijednost fluorescencije proporcionalna je broju živih stanica (Borra i sur., 2009).

2.3.2. 3D stanična kultura

3D stanična kultura prevladava nedostatke primjene 2D stanične kulture jer imitira strukturu unutar tkiva i organa te kao takva može biti korištena kao model koji oponaša *in vivo* stanična događanja. Također, zbog strukture koja nalikuje tumorskoj masi difuzija kisika, nutrijenata, signalnih molekula ograničena je zbog lokalnog okoliša u kojem obitavaju stanice. Upravo taj okoliš može se sastojati od različitih staničnih populacija unutar višestanične nakupine, kao što su fibroblasti ili endotelne stanice, što pospješuje razumijevanje samog modela u *in vitro* uvjetima (Melissaridou i sur., 2019). Osim navedenog, dolazi do uspostave pravilnih interakcija stanica te stanica i medija koje omogućavaju tvorbu tkiva, primanja signala iz okoline tumorske mase, zadržavanja morfologije i polarnosti stanica te slične ekspresije gena,

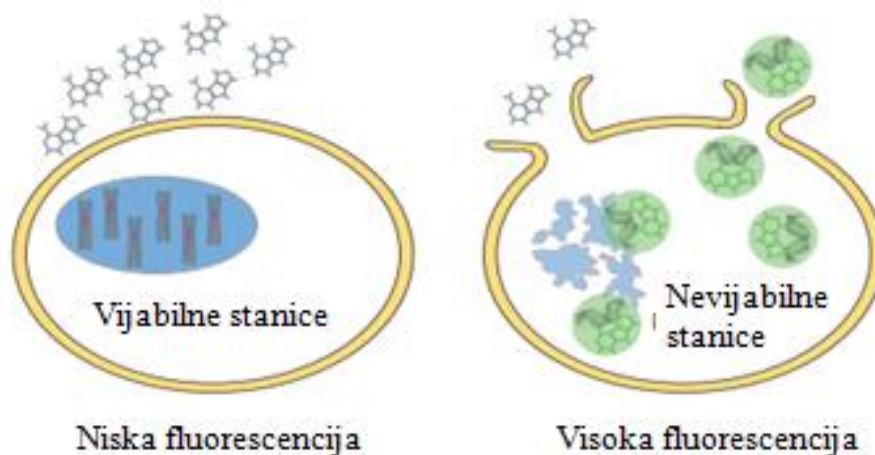
signaliziranja i metabolizma kao u *in vivo* uvjetima (Kapałczyńska i sur., 2018). Nakupine tumorskih stanica u 3D kulturama najčešće formiraju strukture koje su kružnog oblika i nazivaju se sferoidi, tj. mikrotumori. Za formiranje takvih tumorskih struktura potrebno je osigurati odgovarajuće uvjete i danas u primjeni poznate su sljedeće metode: korištenje posebnih 3D nosača koji omogućuju rast suspenzijske kulture bez mogućnosti adherencije u mikrotitarskim pločicama sa zaobljenim dnom za rast stanica odnosno, metoda viseće kapi, korištenje posebnih uređaja baziranih na mikrofluid-čipovima te uzgoj stanica u matriks - gelu. Najčešća primjena sferoida sastoji se u proučavanju metabolizma lijekova, rasta i proliferacije stanica unutar tumorske mase, imunointerakcija, difuzije različitih sastojaka podloge unutar strukture, remodeliranja matriksa te angiogeneze (Yılmaz i Sakarya, 2018).

2.3.2.1. Metode određivanja vijabilnosti stanica u 3D staničnim kulturama

Metode određivanja 3D stanične kulture mogu se podijeliti na one koje imaju cilj odrediti žive stanice te one na kojima je cilj odrediti prisutnost mrtvih stanica. U ovom radu primjenjivana je jedna metoda za određivanje brojnosti mrtvih stanica te dvije metode za određivanje brojnosti živih.

2.3.2.1.1. CellTox Green Cytotoxicity test

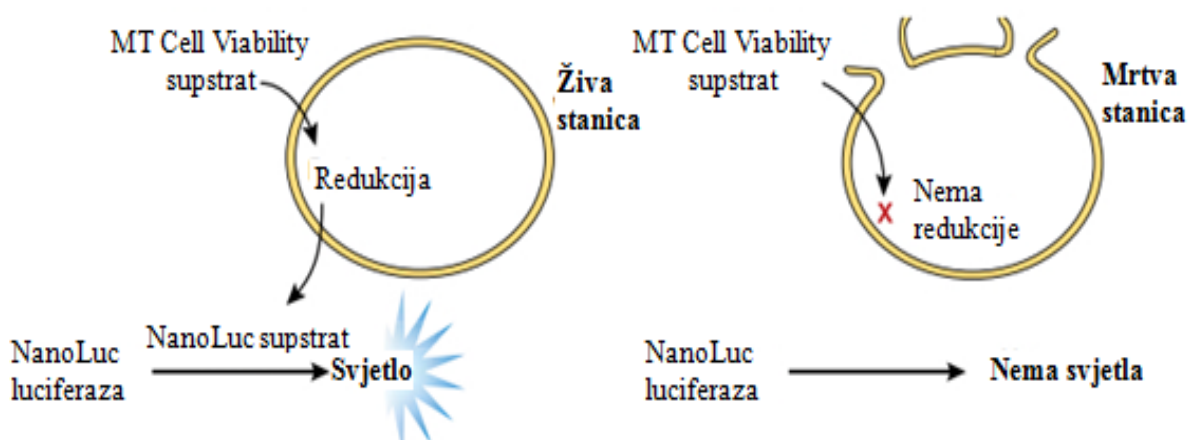
Ova metoda bazira se na primjeni fluorescentne boje za detekciju mrtvih stanica na temelju gubitka selektivne permeabilnosti membrane i ulaska boje isključivo u mrtve stanice. Glavna komponenta testnog kompleta je CellTox™ Green fluorescentna boja koja se veže na DNA mrtvih stanica što vodi do povećanja intenziteta fluorescencije u promatranom uzorku. Fluorescencija se pritom mjeri na valnim duljinama 520 - 530 nm (Promega).



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma CellTox Green Cytotoxicity testa.

2.3.2.1.2. RealTime-Glo MT Cell Viability test

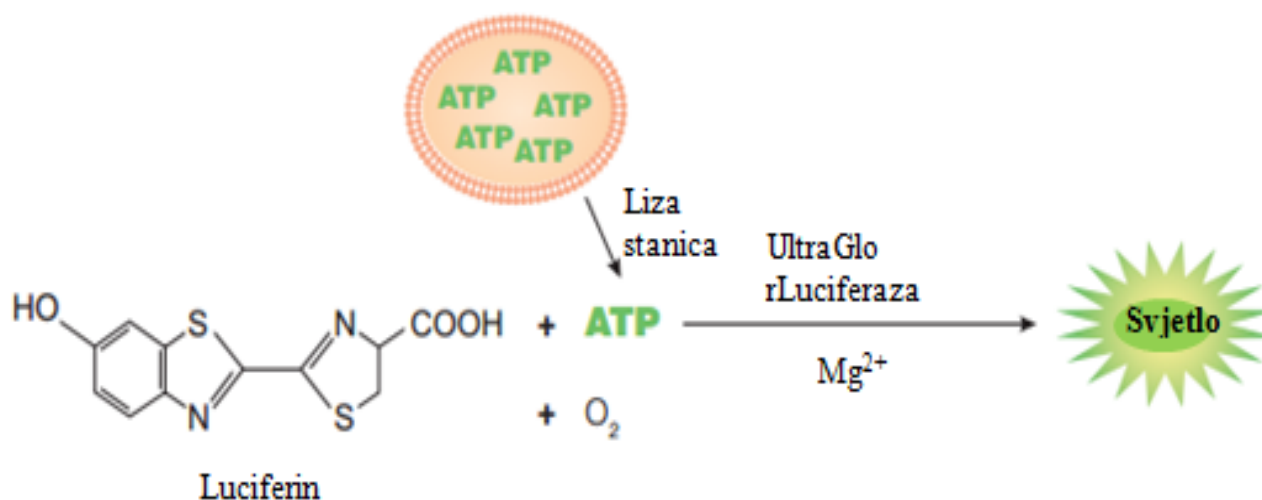
Ovaj test se koristi za određivanje živih stanica i bazira se na primjeni nelitičke, bioluminiscentne metode. Osnovu testa čine NanoLuc luciferaza te prosupstrat koji slobodno difundira kroz staničnu membranu. Stanice reduciraju prosupstrat u supstrat za luciferazu koji difundira u medij, u kojemu se nalazi luciferaza. NanoLuc luciferaza katalizira pregradnju supstrata pri čemu proizvodi bioluminiscentni signal čiji intenzitet ovisi o količini metaboliziranog prosupstrat – supstrat enzimskog produkta koji je proporcionalan broju živih stanica. Prednost ove metode je što ne dolazi do prekida kontinuiteta stanične membrane te se stanice mogu uporabiti za dodatna mjerenja (Promega).



Slika 4. Shematski prikaz mehanizma RealTime-Glo MT Cell Viability testa.

2.3.2.1.3. CellTiter-Glo 3D Cell Viability test

Ovaj test bazira se na primjeni reagenasa koji liziraju staničnu membranu što ima za posljedicu oslobađanje adenozin trifosfat (ATP) molekula. Supstrat luciferin i luciferaza zatim sudjeluju u katalitičkoj reakciji koja rezultira stvaranjem bioluminiscentnog signala. Nastali bioluminiscentni signal dobiven u reakciji proporcionalan je broju živih stanica u kulturi (Promega).



Slika 5. Shematski prikaz mehanizma CellTiter-Glo 3D Cell Viability testa.

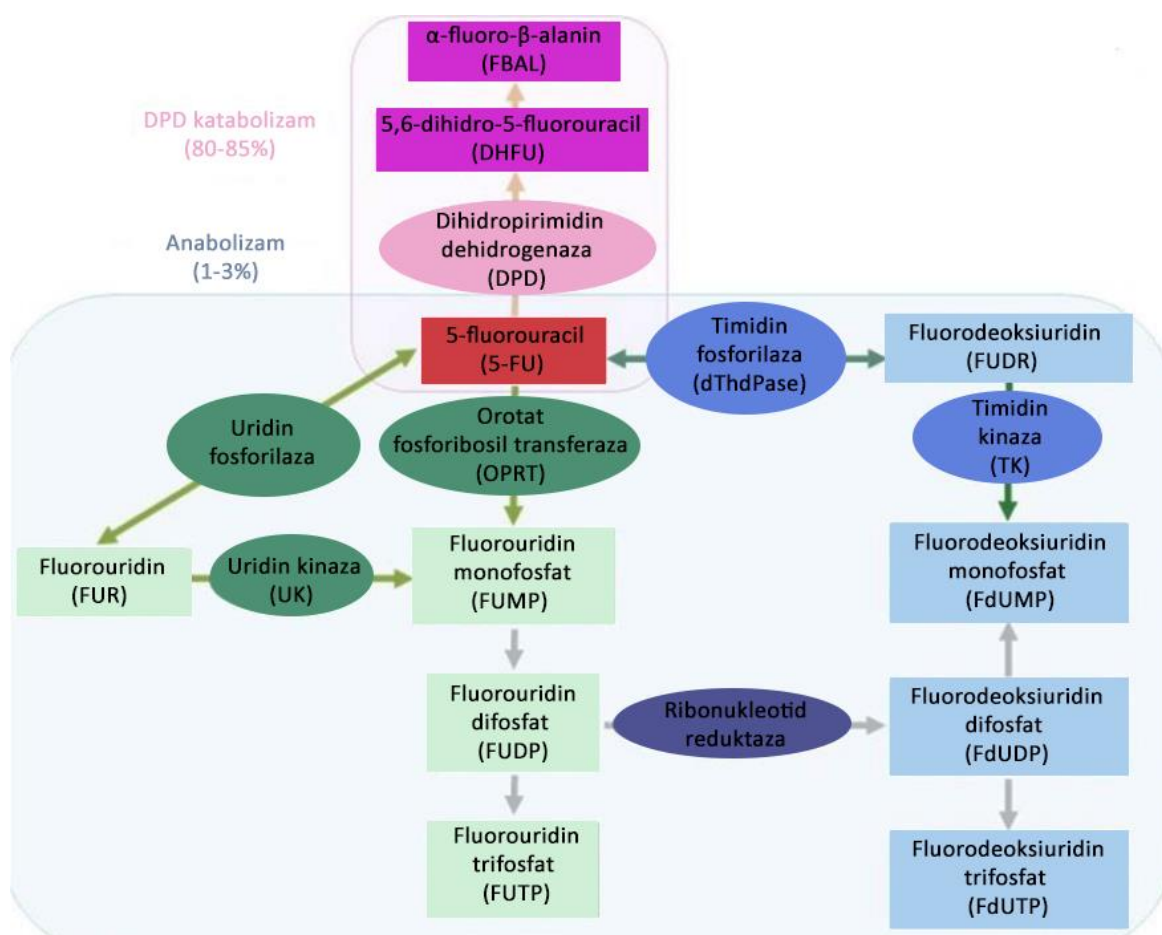
2.4. Istraživanje utjecaja antitumorskog lijeka (citotoksičnost)

Važnost otkrića novih lijekova za tretman različitih tipova tumora neizbježan je zbog sve veće raširenosti ove vrste bolesti. Pritom, naglasak u pronalasku novih lijekova stavlja se na potencijal smanjivanja i stabiliziranja tumorske mase posebno u slučaju neizlječivih tumora, smanjenje simptoma bolesti s ciljem produljenja života, s prihvatljivim utjecajem na kvalitetu života. U ovom eksperimentalnom radu naglasak je na istraživanju lijeka 5-fluorouracila (5-FU) za kojeg je utvrđeno da pokazuje snažan antitumorski učinak, u kombinaciji s quisinostatom na stanicama tumora mliječne žlijezde miša.

2.4.1. Antitumorski lijek 5-fluorouracil

5-FU je lijek koji se najčešće koristi, zajedno s ostalim lijekovima, u tretiranju tumora gastrointestinalnog trakta, ginekoloških organa, tumora glave i vrata te tumora dojke (Focaccetti i sur., 2015). Od 80 do 85 % ovog fluoropirimidina metabolizirano je do inaktivnih komponenti djelovanjem enzima dihidropirimidin dehidrogenaze, prisutnog u jetri, intestinalnoj mukozii i drugim tkivima, a samo 1 – 3 % početne doze lijeka pokazuje mogućnost inhibicije sinteze DNA te inhibicije procesiranja i funkcije RNA molekula. Citotoksično djelovanje na tumorskim stanicama izraženo je preko staničnog anabolizma u kojemu dolazi do formiranja niza aktivnih metabolita (Slika 4.): (1) fluorouridin trifosfata (FUTP) koji utječe na sintezu RNA ugradnjom umjesto uridin trifosfata (UTP); (2) fluorodeoksiuridin trifosfata (FdUTP) koji utječe na sintezu DNA inkorporiranjem u novonastali lanac umjesto deoksitimidin trifosfata (dTTP); (3) fluorodeoksiuridina monofosfata (FdUMP) koji utječe na aktivnost timidilat sintaze unutar tercijarnog kompleksa s reduciranim metal – tetrahidrofolatom (CH_2THF), čime posljedično utječe na sintezu DNA (Miura i sur., 2010). Dodatno, pokazano je da 5-FU potiče staničnu senescenciju koja uključuje povišenu razinu Nanog transkripcijskog faktora odgovornog za blokiranje diferencijacije pluripotentnih stanica (Focaccetti i sur., 2015; Was i sur., 2017).

5-FU se koristi kod tretiranja tumora dojke, kao dio kemoterapije u kombinaciji s ostalim lijekovima, gdje dugi niz godina pokazuje visoku efikasnost. Međutim, prisustvo metaloproteinaza (ADAMs) ključnih za međustanične interakcije te interakcije stanica i ekstracelularnog matriksa, može utjecati na pojavu rezistencije na navedeni lijek (Duffy i sur., 2009). Zbog svega navedenog, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dodatno utvrdio mehanizam djelovanja lijeka te poboljšano djelovanje u trenutno primjenjivanim kemoterapijama za različite tipove tumora, uključujući tumor dojke.



Slika 6. Prikaz anabolizma i katabolizma 5 – FU (Miura i sur., 2010).

2.4.2. Quisinostat

Epigenetske modifikacije mogu biti ključan faktor u kancerogenezi jer utječu na ekspresiju cijelog niza različitih gena. Jedna od spomenutih modifikacija uključuje visoku aktivnost histon deacetilaza koja dovodi do smanjene acetilacije lizina u histonima i drugim proteinima. Quisinostat je potencijalni antitumorski lijek širokog spektra tumora zbog izražene inhibicije histon deacetilaza, čime pokazuje efikasnost u smanjenju rasta tumorske mase (He i sur., 2018). Pripada skupini strukturno različitih spojeva hidroksamske kiseline s aromatskim dijelom koji sjeda u katalitički kanal enzima i inhibira HDAC-e skupine I i II, čime utječe na promjene u ekspresiji gena, indukciji apoptoze, zaustavljanju staničnog ciklusa te diferencijaciji stanica. Antiproliferativni učinak dosada je pokazan na stanicama tumora pluća, crijeva, dojke, prostate, jajnika, i to u nanomoralnim koncentracijama (Venugopal i sur., 2013). Zbog svojih povoljnih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava te sigurnosti, postoji veliki potencijal za razvoj quisinostata kao monoterapije ili u kombinaciji s drugim antitumorskim lijekovima.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Stanična linija

U ovom eksperimentalnom radu korištena je stanična linija tumora mliječne žlijezde miša (mMCA) uspostavljena u Laboratoriju za imunologiju CIPZB Sveučilišta u Zagrebu. Početni materijal bio je primarna tumorska masa femura miša dobivena sa Zavoda za animalnu fiziologiju PMF-a (prof. dr. sc. Nada Oršolić).

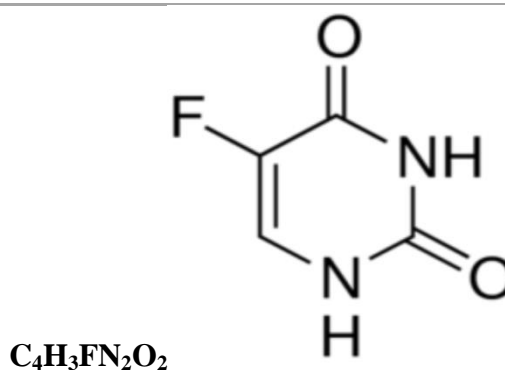
3.1.2. Kemikalije

- 5- fluorouracil (5-FU), *Sigma – Aldrich*, Missouri, SAD
- Quisinostat (QUS), *Selleckchem*, SAD
- Dimetil-sulfoksid (DMSO), *Sigma – Aldrich*, SAD
- Dulbecco modificirani Egelov medij/F-12 (DMEM/F12), *Capricorn Scientific*, Njemačka
- Fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine (calf) serum*; FCS), *Gibco*, Australija
- Pufer PBS (eng. *phosphate-buffered saline*), *Lonza*, Belgija
- Voda za injekcije, *Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu*, Hrvatska
- Tripsin/Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (0,25 %), *Imunološki zavod*, Hrvatska
- Resazurin natrijeva sol, *Sigma-Aldrich*, SAD
- CellTox Green Cytotoxicity Assay Kit, *Promega*, SAD
- CellTiter – Glo 3D Cell Viability Assay Kit, *Promega*, SAD
- RealTime – Glo MT Cell Viability Assay Kit, *Promega*, SAD

3.1.3. Lijekovi

5-fluorouracil (MW 130, 077 g/mol):

Molekulska formula



Molarna masa	130,077 g/mol
Talište	282-283 °C
λ_{max}	265 nm
pKa	8.0
Sinonimi	5-FU, 2,4 - dihidroksi - 5 – fluoropirimidin

Ishodna otopina 5-fluorouracila koja se primjenjuje za istraživanje osjetljivosti 2D kulture, koncentracije 300 mM, priprema se u sterilnim uvjetima otapanjem 39 mg praškastog preparata 5-fluorouracila u 1 mL sterilnog dimetil-sulfoksida (DMSO).

Također, ishodna otopina za ispitivanje 3D kulture, koncentracije 600 mM, priprema se pod istim radnim uvjetima, otapanjem 78 mg praškastog preparata 5-fluorouracila u 1 mL sterilnog dimetil-sulfoksida.

Quisinostat (MW 394, 47 g/mol):

Ishodna otopina quisinostata koncentracije 20 mM priprema se otapanjem 5 mg praškastog quisinostata u 0,634 mL sterilnog DMSO-a. Potom se podijeli u alikvote i pohranjuje na -80 °C.

Quisinostat koncentracije 20 μ M priprema se razrjeđivanjem ishodne otopine koncentracije 20 mM u PBS-u u omjeru 1 : 1000.

Ishodna otopina quisinostata za 2D kulturu (5 μ M) priprema se razrjeđivanjem otopine koncentracije 20 μ M u PBS-u u omjeru 1 : 4.

Ishodna otopina quisinostata za 3D kulturu (2 μ M) priprema se razrjeđivanjem otopine koncentracije 20 μ M u PBS-u u omjeru 1 : 10.

3.1.4. Medij i otopine

Medij za uzgoj stanične linije mMCa priprema se miješanjem gotovog medija DMEM/F12 sa FCS, 10 % od ukupnog volumena koji se želi pripremiti.

PBS se priprema razrjeđivanjem ishodnog PBS-a ($10 \times$) vodom za injekcije u omjeru 1 : 10.

Ishodna otopina resazurina priprema se otapanjem 0,5 g resazurin natrijeve soli u 100 mL PBS-a. Radna otopina se dobiva razrjeđivanjem s PBS u omjeru 1 : 100.

3.1.5. Pločice za uzgoj stanica

96-jažična mikrotitarska pločica s ravnim dnom, *Corning*

96-jažična mikrotitarska bijela pločica s ravnim dnom, *Thermo Scientific*

96-jažična mikrotitarska crna pločica za sferoide s ultra niskom prijanjajućom površinom i zaobljenim dnom, *Corning*

6-jažična mikrotitarska pločica s ravnim dnom, *Corning*

3.2. Uređaji

Laminar

Inkubator Harasafe, *Haereus*

Centrifuga, *Eppendorf*

Tresilica za epruvete

Invertni mikroskop Eclipse, *Nikon*

Vakum uređaj, *Vacutip Integra Biosci.*

UV/VIS Spektrofotometar

Multifunkcionalni uređaj za mikrotitarske pločice EnVision, *Perkin Elmer*

Orbitalna tresilica

Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0,5-10 μ L, *Eppendorf*, Njemačka

Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100 μ L, *Eppendorf*, Njemačka

3.3. Metode rada

Resazurin test je metoda korištena za određivanje vijabilnosti stanica tumora mliječne žlijezde miša (mMCA) u 2D modelu stanične kulture. Za 3D kulturu stanica korištene su (1) metode koje služe za određivanje broja živih stanica *RealTime-Glo MT Cell Viability* test i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* test i (2) metoda za određivanje broja mrtvih stanica *CellTox Green Cytotoxicity* test, opisane u poglavlju 2.3. Navedene metode koristile su se kod istraživanja citotoksičnosti različitih koncentracija lijeka 5-FU na tumorskim stanicama (ovisnost o dozi), modulacije odgovora na 5-FU u kombinaciji s pomoćnim sredstvom quisinostat tijekom istovremenog tretmana s oba lijeka te tijekom tretmana s predtretmanom, u kojem su stanice prvo izložene djelovanju quisinostatu, a zatim 5-FU.

3.3.1. 2D stanična kultura

3.3.1.1. Utjecaj doze 5-FU na vijabilnost stanica

Ovom metodom želi se utvrditi učinkovitost koncentracija 5-FU na vijabilnost tumorskih stanica. Budući da se radi o adherentnoj liniji, stanice su od podloge odvojene slijedećim postupkom: uklonjen je cjelokupni medij u kojemu se nalaze stanice tijekom perioda rasta u inkubatoru (37 °C, 5 % CO₂) primjenom vakuuma sisaljke te su stanice isprane s 5 mL PBS-a. Zatim je dodan 1 mL otopine tripsin/EDTA (0,25 %) pomoću koje su skinute adherirane stanice s ploča u svrhu subkultiviranja (pasaža). Nakon dodatka otopine tripsin/EDTA (0,25 %), plastična boca za uzgoj stanica volumena 25 mL u kojoj se nalaze stanice stavljena je u inkubator kako bi se omogućilo djelovanje enzima te se nakon perioda od 5 minuta inhibiralo njegovo djelovanje dodavanjem istog volumena (1 mL) FCS-a. Cjelokupan volumen iz boce uklonjen je pomoću pipete te stavljen u epruvetu za centrifugiranje, koje se provelo tijekom 5 min na 400 × g. Pažljivo je uklonjen supernatant pomoću sisaljke te je na dobiveni talog stanica dodan 1 mL medija DMEM/F12 + 10 % FCS. Za brojanje stanica, pripremljena je suspenzija od 70 µL PBS-a, 20 µL tripanskog modrila i 10 µL suspenzije stanica dobivene u prethodnom koraku te je mikroskopski određena koncentracija stanica brojanjem u komorici (Naubauer ili Bürker). U novu plastičnu bocu za uzgoj stanica volumena 25 mL nacijepljeno je 200 000 stanica u 5 mL kompletnog medija DMEM/F12 + 10 % FCS medija, dok je jedan dio stanica korišten za nasađivanje 96-jažične mikrotitarske pločice s ravnim dnom za kultivaciju stanica, s 20 000 stanica po jažici, u volumenu od 160 µL.

Nakon 24 h (mikroskopskom provjerom utvrdilo se da su se stanice uhvatile na podlogu) pripravljene su različite koncentracije (60 mM, 30 mM, 15 mM, 7,5 mM i 3,75 mM) lijekova na način opisan u poglavlju 3.1.2. te su dodane u jažice u volumenu od 20 µL po jažici, do konačne koncentracije od 6 ; 3 ; 1,5 ; 0,75 ; 0,375 mM. Citotoksični učinak različitih koncentracija lijekova na tumorske stanice praćen je promjenama morfologije i odumiranja (odvajanja od podloge) stanica. Usporedno, pripremljene su kontrolne jažice sa stanicama u koje je dodavano čisto otapalo DMSO, koncentracije 60 ; 30 ; 15 ; 7,5 ; 3,75 mM, do konačne koncentracije od 6 ; 3 ; 1,5 ; 0,75 ; 0,375 mM, uz jažice koje sadržavaju samo stanice u mediju (kako bi se uzelo u obzir spontano odumiranje stanica) te samo medij. Test je izvođen u triplicatu. Nakon 70 h u jažice je dodano 20 µL resazurina 5 mg/mL i izmjerena apsorbancija pri 570 i 600 nm kako bi se vidjelo kako stanice metaboliziraju dodani pripravak, što se dovodi u vezu s odumiranjem i metabolizmom stanica.

Tablica 1. Postavljanje eksperimenta za utvrđivanje utjecaja koncentracije 5- fluorouracila (5-FU) na vijabilnost stanica u 2D staničnoj kulturi.

20 000 stanica 6 mM 5-FU	20 000 stanica 6 mM 5-FU	20 000 stanica 6 mM 5-FU	20 000 stanica DMSO
20 000 stanica 3 mM 5-FU	20 000 stanica 3 mM 5-FU	20 000 stanica 3 mM 5-FU	20 000 stanica DMSO
20 000 stanica 1.5 mM 5-FU	20 000 stanica 1.5 mM 5-FU	20 000 stanica 1.5 mM 5-FU	20 000 stanica DMSO
20 000 stanica 0.75 mM 5-FU	20 000 stanica 0.75 mM 5-FU	20 000 stanica 0.75 mM 5-FU	20 000 stanica DMSO
20 000 stanica 0.375 mM 5-FU	20 000 stanica 0.375 mM 5-FU	20 000 stanica 0.375 mM 5-FU	20 000 stanica DMSO
20 000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	20 000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	DMEM/F12+10 % FCS	DMEM/F12 +10 % FCS

Podaci su obrađeni kako je opisano u poglavlju 2.3.1.1.1. te je izračunat postotak preživjelih stanica. Iz dobivenih rezultata odabrana je koncentracija lijeka koja ubije približno 50 % stanica i korištena za daljnje postupke.

3.3.1.2. Istovremeni tretman tumorskih stanica 5-FU- om i quisinostatom

Nakon određivanja broja stanica i podešavanja koncentracije, u volumenu od 160 μL , 20 000 stanica po jažici nasadeno je na 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom za kultivaciju stanica. Nakon 24 h, pripremljen je lijek 5-FU koji je dodan u jažice u volumenu od 20 μL te quisinostat u volumenu od 3,6 μL , 1,8 μL te 0,9 μL . U ovom slučaju pripremljena je konstantna koncentracija lijeka 5-FU, 25 mM (konačna koncentracija u jažicama 2,5 mM) iz ishodne otopine na način opisan u poglavlju 3.1.3. Također, quisinostat je dodan u koncentracijama 100, 50 i 25 nM, pripremom iz ishodne otopine koncentracije 5 μM , u jažice u koje je prethodno dodan odgovarajući volumen lijeka. Osim toga, postavljene su jažice s konstantnim koncentracijama lijeka, bez dodatka pomoćnog sredstva kako bi se dobila referentna vrijednost učinka lijeka te je istražen utjecaj samo quisinostata postavljanjem jažica s koncentracijama quisinostata od 100, 50 i 25 nM. Test je izvođen u triplikatu. Nakon perioda od 70 h u sve jažice dodaje se redoks indikator rezasurin u volumenu od 20 μL (5 mg/mL) te mjeri apsorbancija pri 570 i 600 nm kako bi se utvrdio utjecaj kombinacije lijeka 5-FU i quisinostata na tumorske stanice.

Tablica 2. Postavljanje eksperimenta za istovremeni tretman 5-FU-om i quisinostatom u 2D staničnoj kulturi.

20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 100 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 100 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS
20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 50 nM QUS	20 000 stanica 25 mM 5-FU 50 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 50 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 50 nM QUS
20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 25 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 25 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 25 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 25 nM QUS
20 000 stanica DMEM/F12+ 10 % FCS	20 000 stanica DMEM/F12+ 10 % FCS	20 000 stanica 25 mM 5-FU	20 000 stanica 25 mM 5-FU	DMEM/F12+ 10 % FCS	DMEM/F12+ 10 % FCS

3.3.1.3. Predtretman s quisinostatom i tretman s 5-FU

Prije nasađivanja odgovarajućeg broja stanica na 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom za kultivaciju stanica, potrebno je podići adherirane stanice s podloge na kojoj se, uz izmjenu medija, omogućavao njihov rast uz odgovarajuće uvjete, postupcima opisanim u poglavlju 3.3.1.1. Uz pretpostavku da stanice usporeno rastu u prisutnosti quisinostata, nacjepljeno je 2000 stanica po jažici u volumenu od 180 μ L, kako bi se do trenutka dodavanja lijeka postigao približno odgovarajući broj od 20 000 stanica po jažici. Nakon 24 h, potrebnih za adheriranje na podlogu, u jažice u kojima se nalaze stanice dodan je quisinostat za konačne koncentracije od 100, 50 i 25 nM, u volumenu od 3,6 ; 1,8 ; 0,9 μ L iz ishodne otopine koncentracije 5 μ M. Također, provjeravalo se djelovanje i samog quisinostata u koncentracijama od 100, 50 i 25 nM. Nakon inkubacije tijekom 72 h pri 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj s 5 % CO₂ dodana je konstantna koncentracija lijeka 5-FU, 25 mM, u volumenu od 20 μ L. Zatim je nakon perioda od 70 h dodano 20 μ L redoks indikatora resazurina te izmjerena apsorbancija pri 570 i 600 nm kako bi se utvrdio utjecaj predtretmana quisinostatom, tj. pospješuje li odumiranje tumorskih stanica.

Tablica 3. Postavljanje eksperimenta za predtretman quisinostatom uz tretman 5-FU-om u 2D staničnoj kulturi.

20 000 stanica 2,5 mM 5- FU 100 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5- FU 100 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS
20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 50 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5- FU 50 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 50 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 50 nM QUS
20 000 stanica 2,5 mM 5-FU 25 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5- FU 25 nM QUS	20 000 stanica 2,5 mM 5- FU 25 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 100 nM QUS	20 000 stanica 25 nM QUS
20 000 stanica DMEM/F12+ 10 % FCS	20 000 stanica DMEM/F12+ 10 % FCS	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU	20 000 stanica 2,5 mM 5-FU	DMEM/F12+ 10 % FCS	DMEM/F12+ 10 % FCS

3.3.2. 3D stanična kultura

3.3.2.1. Utjecaj koncentracije 5-FU na vijabilnost stanica

Postupak pripreme stanica za uspostavljanje 3D stanične kulture opisan je u poglavlju 3.3.1.1. U svrhu utvrđivanja citotoksične koncentracije 5-FU koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %, nasadeno je 2500 stanica po jažici u volumenu od 90 μ L, u 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu sa zaobljenim dnom i ultra niskom prijanjajućom površinom. Nakon razdoblja inkubacije od 24 h, potrebnog za formiranje sferoida, pripremljene su koncentracije lijeka 120 mM, 60 mM, 30 mM i 15 mM iz ishodne otopine opisane u poglavlju 3.1.3. te su dodane na prethodno formirane sferoide u volumenu od 10 μ L, do konačne koncentracije od 12, 6, 3, i 1,5 mM. U kontrolne jažice dodano je 90 μ L medija. Ukupni volumen u jažicama iznosi 100 μ L. Za kalibraciju je nasadeno: 2500 st./jažici, 2000 st./jažici, 1500 st./jažici i 1000 st./jažici tako da je pipetirano po 90 μ L, 72 μ L, 54 μ L i 36 μ L suspenzije koncentracije 28 000 st./mL i do 90 μ L dodan odgovarajući volumen kompletnog medija. Za kalibraciju u sva tri eksperimenta korištene su netretirane stanice. Inkubacija pločice tijekom cijelog eksperimenta (izuzev vremena potrebnog za manipulacije) provodi se pri 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj sa 5 % CO₂.

Nakon 72 h određen je citotoksični učinak lijeka 5-fluorouracila na stanice u 3D kulturi, određivanjem broja mrtvih odnosno živih stanica korištenjem tri metode: *CellTox™Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testa.

Tablica 4. Postavljanje eksperimenta za određivanje utjecaja doze 5-FU na vijabilnost stanica 3D staničnoj kulturi.

2500 stanica 12 mM 5-FU	2500 stanica 12 mM 5-FU	2500 stanica 12 mM 5-FU	2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica 6 mM 5-FU	2500 stanica 6 mM 5-FU	2500 stanica 6 mM 5-FU	2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica 3 mM 5-FU	2500 stanica 3 mM 5-FU	2500 stanica 3 mM 5-FU	2500 stanica DMSO
2500 stanica 1,5 mM 5-FU	2500 stanica 1,5 mM 5-FU	2500 stanica 1,5 mM 5-FU	DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	2000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS

Za svaki test pločice su pripremljene na isti način, kako je prikazano u Tablici 4.

3.3.2.2. Istovremeni tretman tumorskih stanica s 5-FU i quisinostatom

Nakon pripreme stanične suspenzije u mediju DMEM/F12 + 10 FCS, 28 000 st/mL, nasadeno je 2500 stanica po jažici u volumenu od 90 μ L u 96-jažične mikrotitarske pločice sa zaobljenim dnom. Nakon 24 h pripremljen je lijek 5-FU u koncentracijama od 1 mM (za *CellTiter-Glo 3D Cell Viability test*) te 2 mM (za *CellTox™ Green Cytotoxicity* i *RealTime-Glo MT Cell Viability test*), iz ishodne otopine čiji je način pripreme opisan u poglavlju 3.1.3. Također, pripremljena je otopina quisinostata u koncentracijama od 100, 50 i 25 nM te dodana, zajedno s prethodno pripremljenim 5-FU, u volumenu od 5 ; 2,5 ; 1,25 μ L po jažici, iz ishodne otopine koncentracije 2 μ M. U kontrolne jažice dodano je isključivo primijenjeno otapalo DMSO te quisinostat u istraživanim koncentracijama, kako bi se uzeo u obzir njihov utjecaj na tumorske stanice. Nakon 72 h vršilo se određivanje staničnog preživljenja odabranim metodama, na način opisan u nastavku.

Tablica 5. Postavljanje eksperimenta za kombinirani tretman s 5-FU i quisinostatom.

2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica DMSO
2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica DMSO
2500 stanica 100 nM QUS	2500 stanica 50 nM QUS	2500 stanica 25 nM QUS	DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	2000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS

3.3.2.3. Predtretman s quisinostatom i tretman 5-FU-om

U 6-jažične mikrotitarske pločice s ravnim dnom nasadeno je 200 000 stanica u ukupnom volumenu 2 mL te inkubirano 24 h kako bi se uhvatile za podlogu. Nakon tog perioda, u jažice je dodano po 10 μ L, 5 μ L i 2,5 μ L ishodne otopine quisinostata koncentracije 20 μ M kako bi se postigle radne koncentracije od 100 nM, 50 nM i 25 nM. Stanice su izložene djelovanju quisinostata u obliku predtretmana, koji traje tijekom četiri dana uz izmjenu medija i održavanje koncentracije quisinostata, nakon čega se iste podižu s podloge te se nasađuje 2500 stanica po jažici u 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu sa zaobljenim dnom i ultra niskom prijanjajućom površinom u volumenu od 90 μ L. Formiranje sferoida odvija se uz inkubaciju tijekom 24 h, nakon čega je dodan 5-FU u koncentracijama od 1 mM (za *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* test) te 2 mM (za *CellTox™ Green Cytotoxicity* i *RealTime-Glo MT Cell Viability* test). 5-FU dodan je u volumenu od 5 μ L. Također, pripremljene su jažice s otapalom DMSO te samo stanicama u mediju za uzgoj, u volumenu od 90 μ L, te jažice s koncentracijama quisinostata od 100, 50 i 25 nM, u volumenu od 100 μ L. Nakon 72 h pažljivo je uklonjeno 50 μ L medija te određen broj živih i mrtvih stanica pomoću tri ranije navedene metode.

Tablica 6. Postavljanje eksperimenta za predtretman s quisinostatom i tretman 5-FU-om.

2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 100 nM QUS	2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 50 nM QUS	2500 stanica DMSO
2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica mM 5-FU 25 nM QUS	2500 stanica DMSO
2500 stanica 100 nM QUS	2500 stanica 50 nM QUS	2500 stanica 25 nM QUS	DMEM/F12 + 10 % FCS
2500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	2000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1500 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS	1000 stanica DMEM/F12 + 10 % FCS

3.3.3. Određivanje broja mrtvih/živih stanica u 3D staničnoj kulturi

Prije dodavanja reagenasa uklanja se 50 μL iz svake jažice, pažljivo kako se ne bi povukao formirani sferoid. Na preostali volumen u jažicama koji iznosi 50 μL dodan je isti volumen pripremljenih otopina za određivanje broja stanica.

3.3.3.1. *CellTox™ Green Cytotoxicity test*

Prije istraživanja navedenom metodom inkubiraju se sastavni dijelovi CellTox™ Green Cytotoxicity testnog kompleta na sobnoj temperaturi, a komplet se sastoji od CellTox Green boje, 1000x; pufera i lizirajuće otopine. U sterilnoj plastičnoj tubici pripremljena je otopina pufera i boje, u volumenu koji omogućava provedbu sva tri eksperimenta. Zatim je pripremljena koncentracija boje 2 \times kako bi se dodatkom u jažicu postigla radna koncentracija od 1 \times . Dakle, omjer volumena pufera i boje mora biti 500 : 1, a volumen ovisi o broju uzoraka. Otopina je dodana u svaku jažicu u volumenu 50 μL , u kojoj se prethodno nalazi 50 μL medija u kojem se održavaju stanice. Osim navedenog, u jažice koje će se koristiti za kalibraciju dodano je 4 μL lizirajuće otopine. 96-jažična mikrotitarska ploča sa zaobljenim dnom miješana je na orbitalnoj tresilici pri 700 – 900 o/min tijekom 60 sekundi te je potom inkubirana na 37 °C tijekom 15 min. Postupak miješanja pločice ponovljen je u istim uvjetima te je izmjerena fluorescencija pri 520 – 530 nm. Također, dodatne postavke na uređaju su vrijeme integracije 0,25 - 1 sekunda/jažici.

3.3.3.2. *RealTime-Glo MT Cell Viability test*

RealTime-Glo MT Cell Viability testni komplet sastoji se od MT Cell Viability supstrata, 1000 \times i NanoLuc enzima, 1000 \times . Postupak određivanja vijabilnosti stanica sastoji se od pripreme otopine u sterilnoj tubici u omjerima 500 : 1 : 1, dobivene miješanjem navedenih komponenti kompleta. Također, kao i u prethodnoj metodi dodana je pripremljena otopina u volumenu od 50 μL u svaku jažicu. 96-jažična ploča sa zaobljenim dnom inkubirana je na 37 °C tijekom 15 min te se njezin sadržaj prenosi u bijelu 96- jažičnu ploču s ravnim dnom u kojoj se mjeri luminiscentni signal. Vrijeme integracije podešeno je na 1 sekundu/jažici.

3.3.3.3. CellTiter-Glo 3D Cell Viability test

Testni komplet, koji se sastoji od CellTiter-Glo 3D reagensa, odmrznut je tijekom noći na 4 °C te pola sata prije korištenja zagrijan u vodenoj kupelji na 22 °C. U svaku jažicu na 96-jažičnoj mikrotitarskoj pločici sa zaobljenim dnom dodano je 50 µL pripremljenog reagensa. Nakon dodavanja pločica je snažno promiješana 5 min na orbitalnoj tresilici kako bi se pospješila liza stanica te je njezin sadržaj prebačen u bijelu 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom. Nakon 30 minuta inkubacije izmjeren je luminiscentni signal, s vremenom integracije od 0,1 sekundu/jažici.

3.4. Analiza i statistička obrada podataka

U ovom eksperimentalnom radu rezultati su prikazani kao postotak preživjelih/mrtvih stanica u tretiranom uzorku u odnosu na preživjele/mrtve stanice u netretiranom uzorku. Netretirani uzorak sastoji se od stanica u kompletnom mediju te je korišten kao kontrola, a kao negativna kontrola je korišten uzorak u kojem je osim navedenog dodano istraživano otapalo DMSO.

Za određivanje vijabilnosti tumorskih stanica u 2D staničnoj kulturi nakon izlaganja 5-FU i quisinostatu korišten je resazurin test koji se bazira na određivanju apsorbancije plavog spoja resazurina i njegovog reduciranog oblika, ružičastog rezorufina, pri valnim duljinama 560 nm i 590 nm. Rezultati za 2D kulturu izračunati su prema formuli:

$$\text{Postotak redukcije} = \frac{\epsilon_{OX_600nm} \times A_{570nm_tx} - \epsilon_{OX_570nm} \times A_{600nm_tx}}{\epsilon_{RED_570nm} \times A_{600nm_t0} - \epsilon_{RED_600nm} \times A_{570nm_t0}}$$

gdje je: ϵ - molarni ekstinkcijski koeficijent za resazurin (eng. *molar extinction coefficient*)

$$\epsilon_{OX_600nm} = 117,216$$

$$\epsilon_{OX_570nm} = 80,586$$

$$\epsilon_{RED_570nm} = 155,677$$

$$\epsilon_{RED_600nm} = 14,652$$

A - izmjerena apsorbancija pri odgovarajućoj valnoj duljini

t₀ - samo medij

t_x - određeni uzorak

Detaljnije objašnjenje dostupno je u radu Lee, 2017 .

Za određivanje vijabilnosti odnosno smrtnosti tumorskih stanica u 3D staničnoj kulturi provedena je statistička obrada rezultata u programu Microsoft Excel. Dobivena vrijednost apsorpcije proporcionalna je broju živih/mrtvih stanica te je iz izmjerenih vrijednosti direktno izračunat postotak preživljenja/umiranja.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

s pripadajućim standardnim pogreškama ($S_{\bar{x}}$):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

gdje je: N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom pri čemu je t vrijednost izračunata prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnima smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$.

4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi osjetljivost tumorskih stanica mliječne žlijezde miša na primjenu antitumorskog lijeka 5-fluorouracila (5-FU) te moguće sinergističko djelovanje quisinostata, inhibitora histon deacetilaza, prilikom istovremene inkubacije stanica ili u predtretmanu stanica s quisinostatom. Istraživanje citotoksičnosti provedeno je na 2D i 3D staničnim kulturama u nekoliko faza.

Radi utvrđivanja citotoksične koncentracije 5-FU pri kojoj je vijabilnost stanica približno 50 %, provedena je inkubacija stanica u 2D i 3D staničnoj kulturi s različitim koncentracijama 5-FU (djelovanje u ovisnosti o koncentraciji). Istražen je adjuvantni utjecaj quisinostata na djelovanje 5-FU tijekom istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom te predtretmana quisinostatom, uz dodatak lijeka nakon određenog vremena.

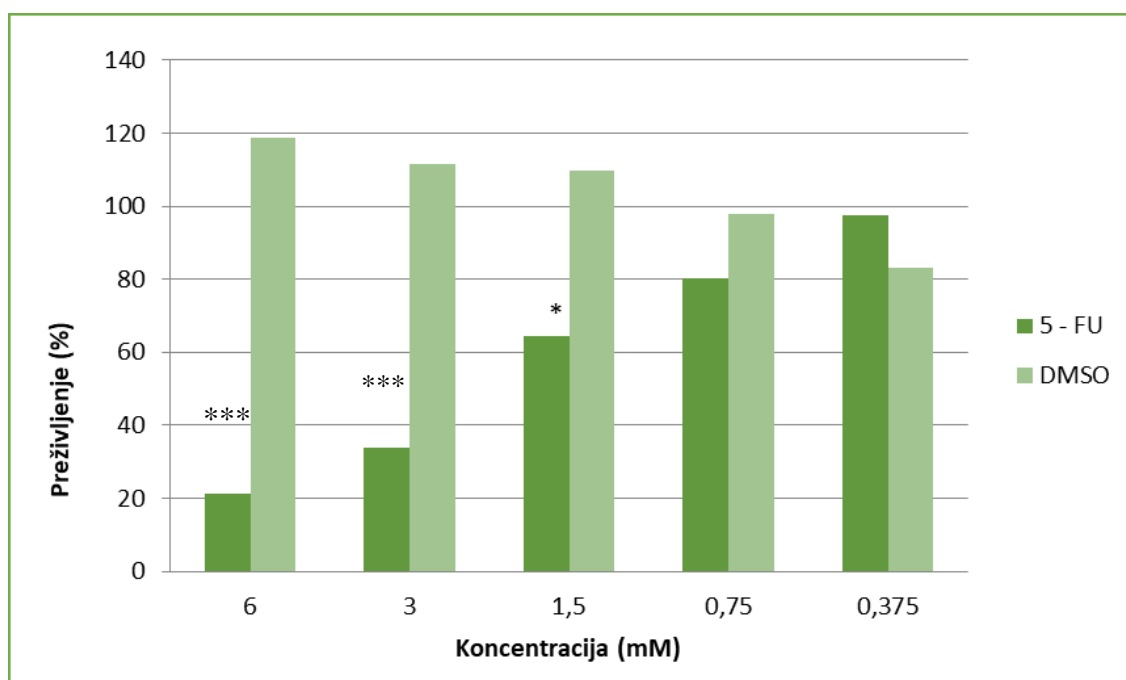
Dobiveni rezultati omogućuju usporedbu osjetljivosti 2D i 3D stanične kulture na 5-FU, na quisinostat te njihove kombinacije tijekom različitog načina izlaganja stanica. Također, rezultati su dani kao srednja vrijednost mjerenja u triplikatu te prikazani kao postotak preživljenja odnosno postotak umiranja stanica u odnosu na netretirani uzorak (netretirane stanice + medij).

4.1. Utjecaj doze 5-FU na vijabilnost stanica u 2D i 3D staničnoj kulturi

Za određivanje koncentracije 5-FU pri kojoj je vijabilnost stanica 50 % u 2D staničnoj kulturi tumorskih stanica mliječne žlijezde miša korištene su koncentracije 6, 3, 1,5, 0,75 i 0,375 mM. Preživljenje stanica određeno je resazurin testom.

Tablica 7. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D staničnoj kulturi pri različitim koncentracijama 5-fluorouracila (5-FU). Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Koncentracija (mM)	Preživljenje (%)	
	5-FU \pm SD	DMSO \pm SD
6	21,1153 \pm 2,1743 ***	101,1183 \pm 0,7149
3	33,6703 \pm 5,0804 ***	111,3635 \pm 28,3623
1,5	64,3614 \pm 19,3309 *	109,5786 \pm 16,7812
0,75	80,3792 \pm 24,0855	98,0262 \pm 9,0925
0,375	97,4112 \pm 26,0805	83,1509 \pm 1,3503



Slika 7. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D staničnoj kulturi pri različitim koncentracijama 5-FU. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

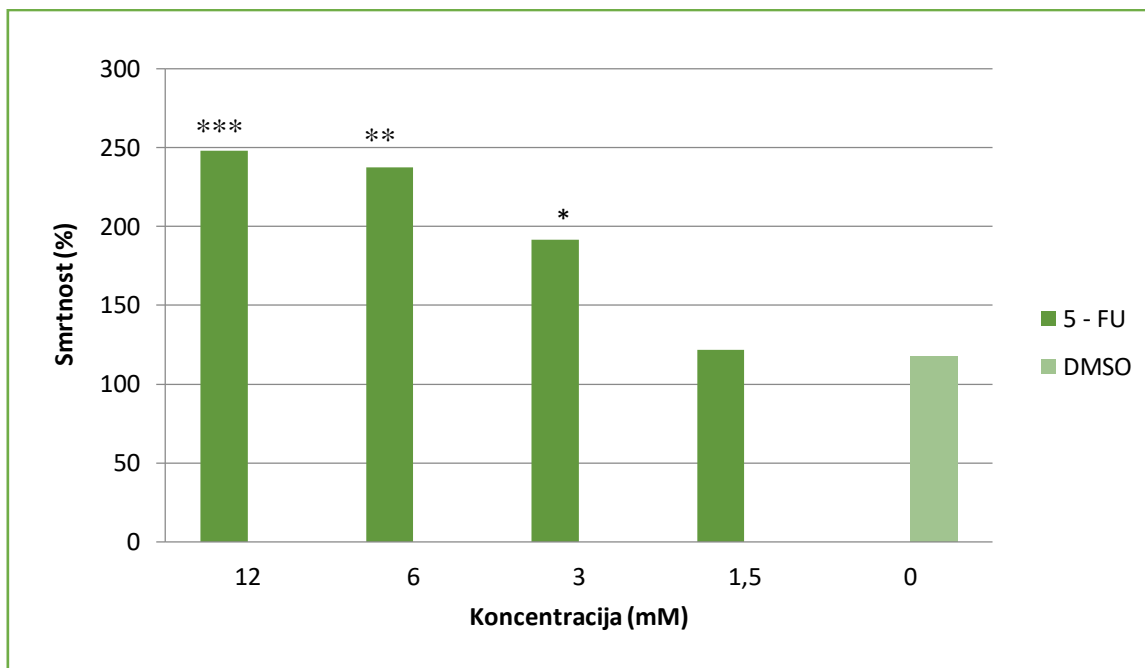
Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da odnos koncentracije lijeka 5-FU i udjela preživjelih stanica je obrnuto proporcionalan, tj. povećanjem koncentracije lijeka smanjuje se postotak preživjelih stanica u 2D kulturi (Tablica 7 i Slika 7). Na taj način potvrđena je antitumorska aktivnost testiranog lijeka na stanicama tumora mliječne žlijezde miša.

DMSO pripremljen u istim koncentracijama kao i istraživani lijek, ne pokazuje značajan citotoksični učinak niti inhibira rast tumorskih stanica. Preživljenje stanica tretiranih samo DMSO-om u ovom pokusu iznosilo je od 83,1509 do 111,3635 %, što ne predstavlja statistički značajno odstupanje od stanica u čistom mediju za kulturu te se njegov utjecaj može zanemariti u daljnjim eksperimentima. Na temelju dobivenog baždarnog dijagrama (Slika 7) određena je koncentracija lijeka koja ubija približno 50 % tumorskih stanica i iznosi 2,5 mM te je korištena u nastavku istraživanja.

Preživljavanje tumorskih stanica u 3D kulturi nakon tretmana 5-FU-om i quisinostatom istraženo je primjenom tri metode (*CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testa) koje služe određivanju mrtvih odnosno živih stanica. Uporabom različitih koncentracija lijeka 5-FU (12 ; 6 ; 3 ; 1,5 mM) istražen je utjecaj na 3D staničnu kulturu te je određena koncentraciju lijeka koja ubija približno 50% stanica.

Tablica 8. Smrtnost stanica ovisno o koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

	Smrtnost (%)
Koncentracija (mM)	5-FU ± SD
12	247,9220 ±1,2777 ***
6	237,54 ±19,2737 **
3	191,719 ±11,8432 *
1,5	121,678 ± 0,01605
DMSO (12 mM)	117,5237 ± 7,8824
Netretirane stanice	-

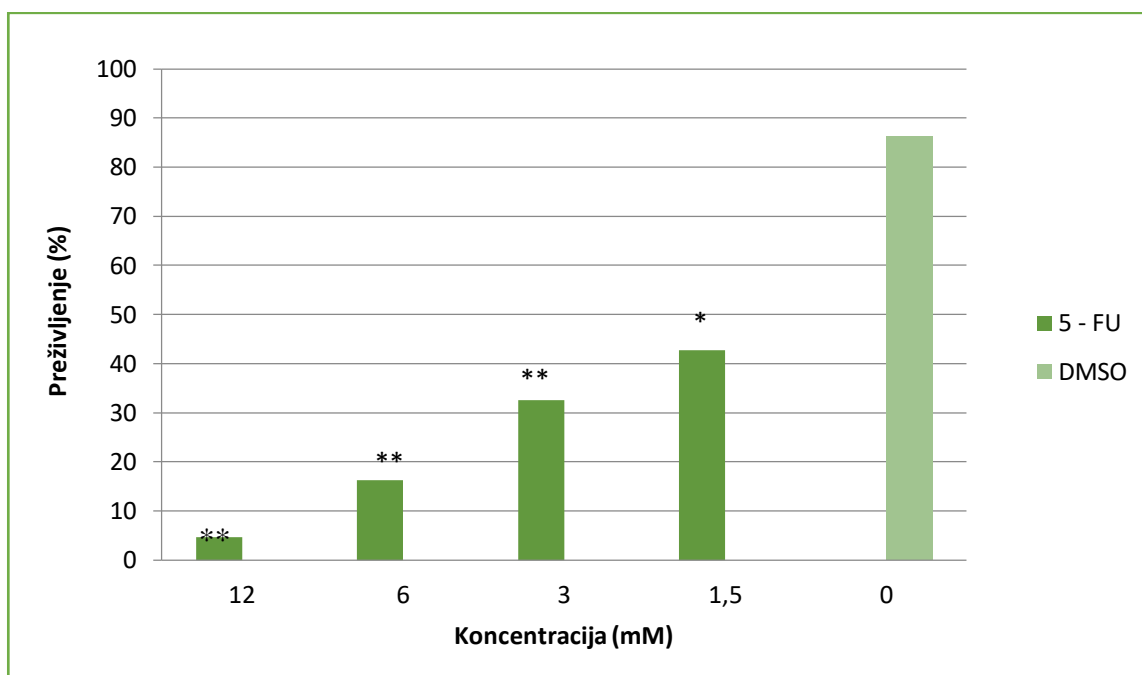


Slika 8. Smrtnost stanica ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Na osnovu dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 8. i Slici 8. može se zaključiti da se porastom koncentracije lijeka 5-FU proporcionalno smanjuje preživljenje tumorskih stanica. Pritom, najdjelotvornija koncentracija je 12 mM. DMSO najviše koncentracije (pripremljen na isti način kao 5-FU koncentracije 12 mM) nema utjecaj na stanice pa se može zanemariti u daljnjim eksperimentima. Koncentracija lijeka koja ubije približno 50 % stanica za ovu metodu iznosi 2 mM i korištena je u daljnjim eksperimentima (istovremeni tretman tumorskih stanica 5-FU-om i quisinostatom te predtretman quisinostatom uz dodatak lijeka) koji primjenjuju ovu metodu.

Tablica 9. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	Preživljenje (%)
Koncentracija (mM)	5-FU \pm SD
12	4,6032 \pm 0,6991 **
6	16,2108 \pm 0,4449 **
3	32,5179 \pm 1,0805 **
1,5	42,7003 \pm 2,6421*
DMSO (12 mM)	86,2189 \pm 4,3562
Netretirane stanice	100

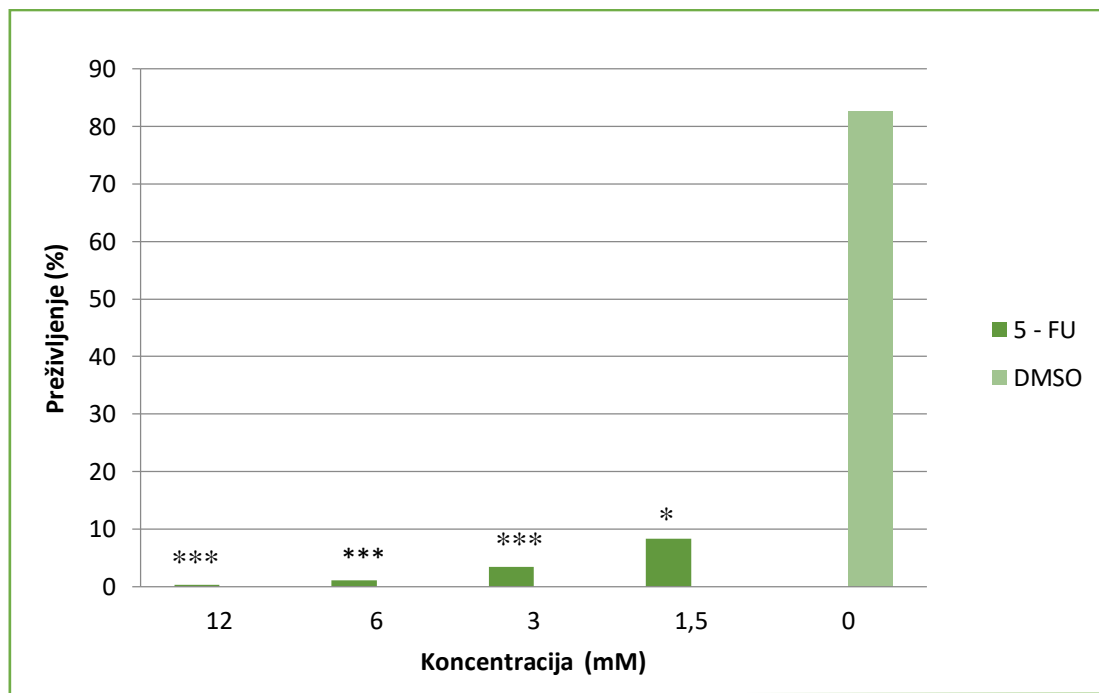


Slika 9. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 9. i Slici 9. može se zaključiti da je najdjelotvornija ujedno i najviša koncentracija 5-FU 12 mM jer pokazuje najveći citotoksični učinak i inhibiciju rasta tumorskih stanica u 3D kulturi. Također, pokazan je obrnuto proporcionalan odnos koncentracije lijeka i preživjelih stanica, tj. povećanjem koncentracije lijeka smanjuje se postotak preživljenja. Osim toga, pokazano je da primijenjeno otapalo DMSO nema antitumorski učinak. Koncentracija lijeka s kojom se nastavlja dalje u primjeni ove metode iznosi 2 mM.

Tablica 10. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

	Preživljenje (%)
Koncentracija (mM)	5-FU \pm SD
12	0,2965 \pm 0,0211 ***
6	1,0201 \pm 0,1297 ***
3	3,3977 \pm 0,1632 ***
1,5	8,3036 \pm 0,4109 *
DMSO (12 mM)	82,7318 \pm 4,9992
Netretirane stanice	100



Slika 10. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Iz podataka u Tablici 10. i Slici 10. vidljivo je da najveća istraživana koncentracija 5-FU od 12 mM najdjelotvornije smanjuje broj živih stanica kao posljedice citotoksičnosti i inhibicije rasta tumorskih stanica. Također, i preostale istraživane koncentracije lijeka pokazuju značajan citotoksični učinak. Pritom, DMSO ne pokazuje značajan utjecaj na preživljenje stanica te se njegov utjecaj može zanemariti u daljnjim eksperimentima. Koncentracija 5-FU od 1 mM koristi se u daljnjim određivanjima ovom metodom.

Usporedbom sve tri primijenjene metode (*CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability testa*) može se uočiti povećanje inhibicije rasta tumorskih stanica porastom koncentracije 5-FU, čime se ona od 12 mM pokazala kao najdjelotvornija, a koncentracija od 1,5 mM najmanje efikasnom.

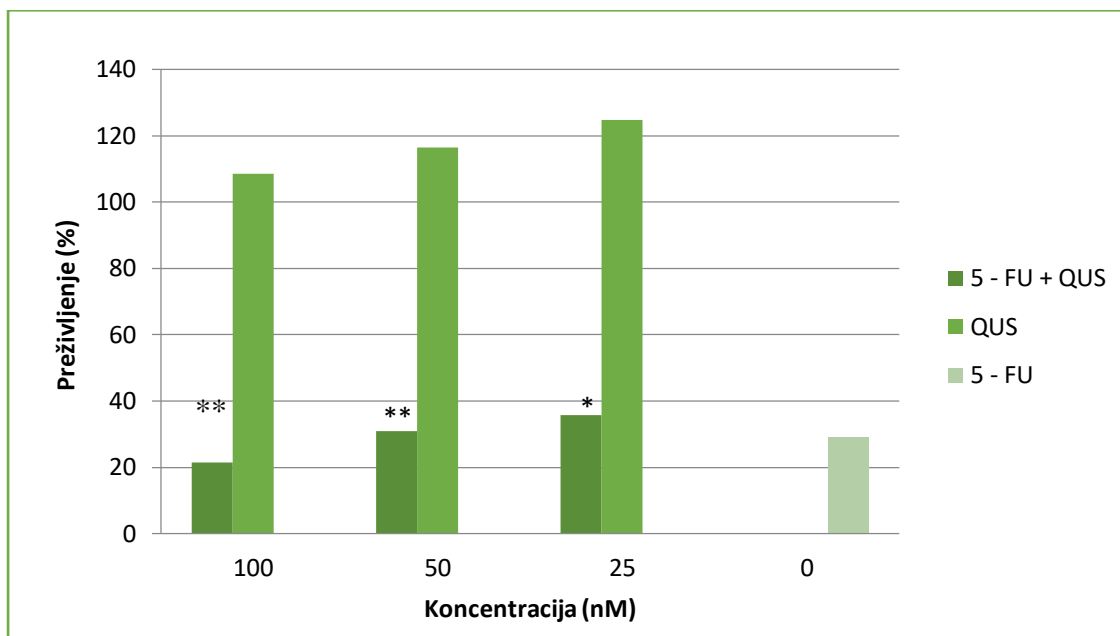
4.2. Vijabilnost tumorskih stanica pri istovremenom izlaganju tumorskih stanica 5-FU i quisinostatu u 2D i 3D kulturi

Da bismo provjerili ima li quisinostat sinergistički učinak na citotoksičnu aktivnost 5-FU te da bismo provjerili citotoksični učinak samog quisinostata, provedena je inkubaciju tumorskih

stanica u 2D i 3D kulturi uz izlaganje quisinostatu te istovremeno izlaganje na obadva lijeka. Vijabilnost stanica u 2D kulturi određena je resazurin testom, a u 3D kulturi *CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testovima.

Tablica 11. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D kulturi tijekom istovremene inkubacije s 2,5 mM 5-FU i različitim koncentracijama quisinostata (QUS). Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Koncentracija QUS (nM)	Preživljenje (%)	
	(5-FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	21,4602 ± 0,2434 **	108,5495 ± 6,0637
50	30,9033 ± 0,5968 **	116,3355 ± 17,8875
25	35,8334 ± 10,7039 *	124,7079 ± 16,4038
0	29,2353 ± 0,8244	

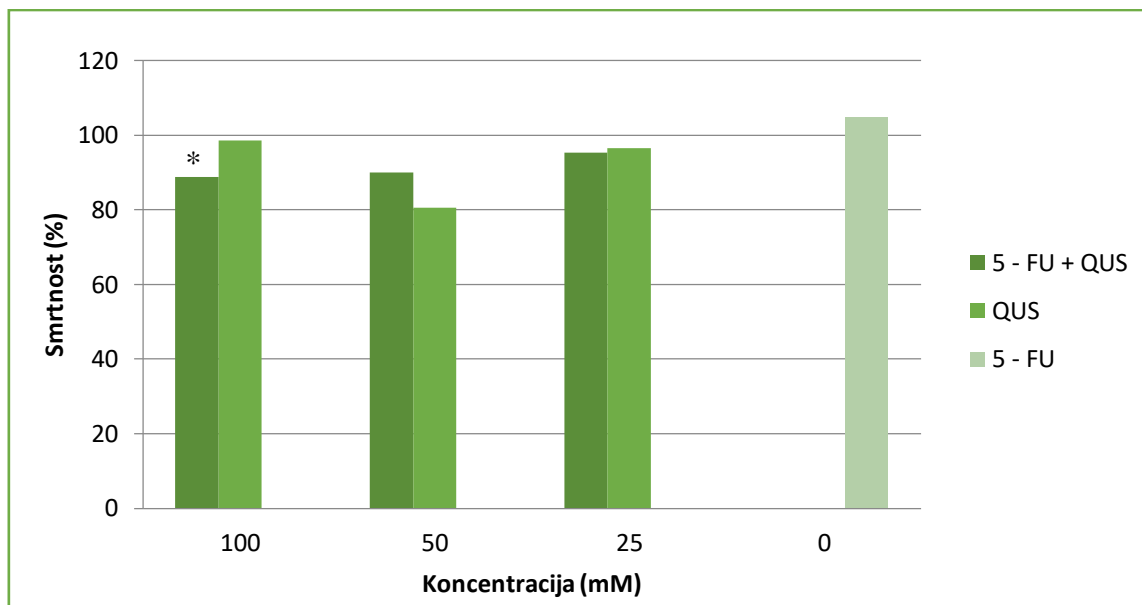


Slika 11. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D kulturi tijekom istovremene inkubacije s 2,5 mM 5-FU i različitim koncentracijama quisinostata (QUS). Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Na osnovu prikazanih vrijednosti u Tablici 11. i Slici 11. može se zaključiti da najveća istraživana koncentracija quisinostata (100nM) u obliku istovremenog tretmana s 5-FU u koncentraciji 2,5 mM, rezultira smanjenjem preživljenja tumorskih stanica, tj. poboljšanim citotoksičnim učinkom. U istraživanim koncentracijama sam quisinostat ne utječe značajno na preživljenje tumorskih stanica.

Tablica 12. Smrtnost stanica ovisno o koncentraciji quisinostata (QUS) pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Koncentracija QUS (nM)	Smrtnost (%)	
	(5 – FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	88,8404± 0,4918 *	98,7007 ± 4,8642
50	90,01278 ± 2,0008	80,6363 ± 3,9739
25	95,4103± 1,6192	96,5669 ±4,7591
0	104,7727 ± 5,1635	
Netretirane stanice	-	

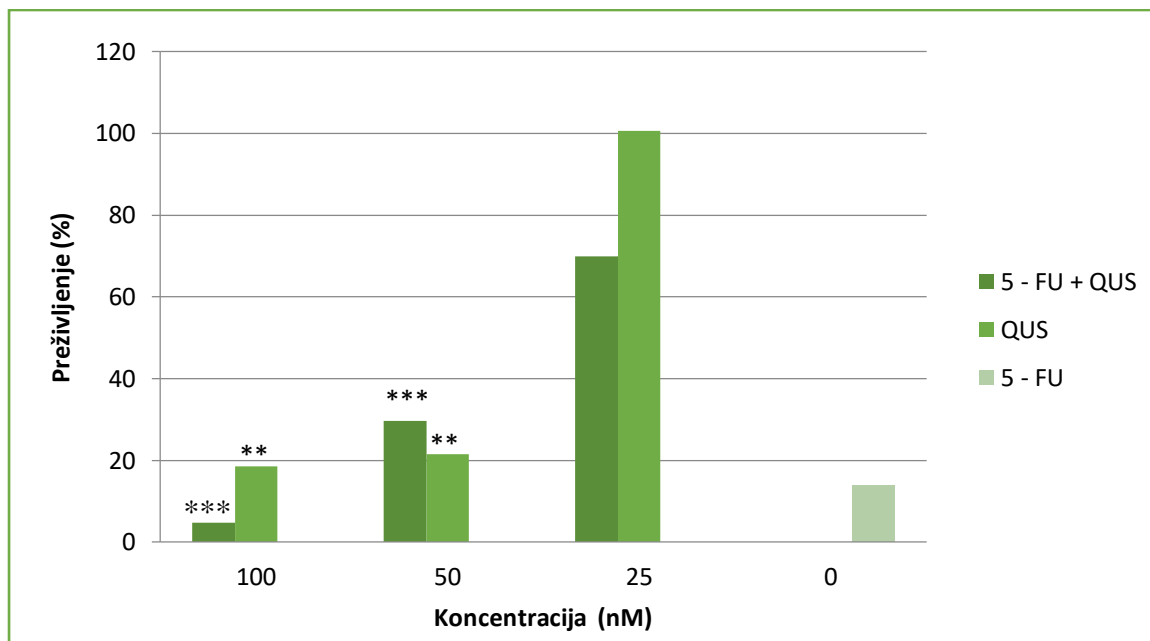


Slika 12. Smrtnost stanica ovisno o koncentraciji quisinostata (QUS) pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 12. te Slici 12. može se zaključiti da istovremeni tretman s 2 mM 5-FU-om te 100 nM quisinostatom nema veću efikasnost od primjene samog 5-FU.

Tablica 13. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji quisinostata (QUS) pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Koncentracija QUS (nM)	Preživljenje (%)	
	(5 – FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	4,7349 ± 3,2141 ***	18,5606 ± 0,9054 **
50	29,6402 ± 7,6335 ***	21,4962 ± 1,0486 **
25	69,8390 ± 20,1552	100,5682 ± 4,9059
0	13,9205 ± 0,6791	
Netretirane stanice	100	

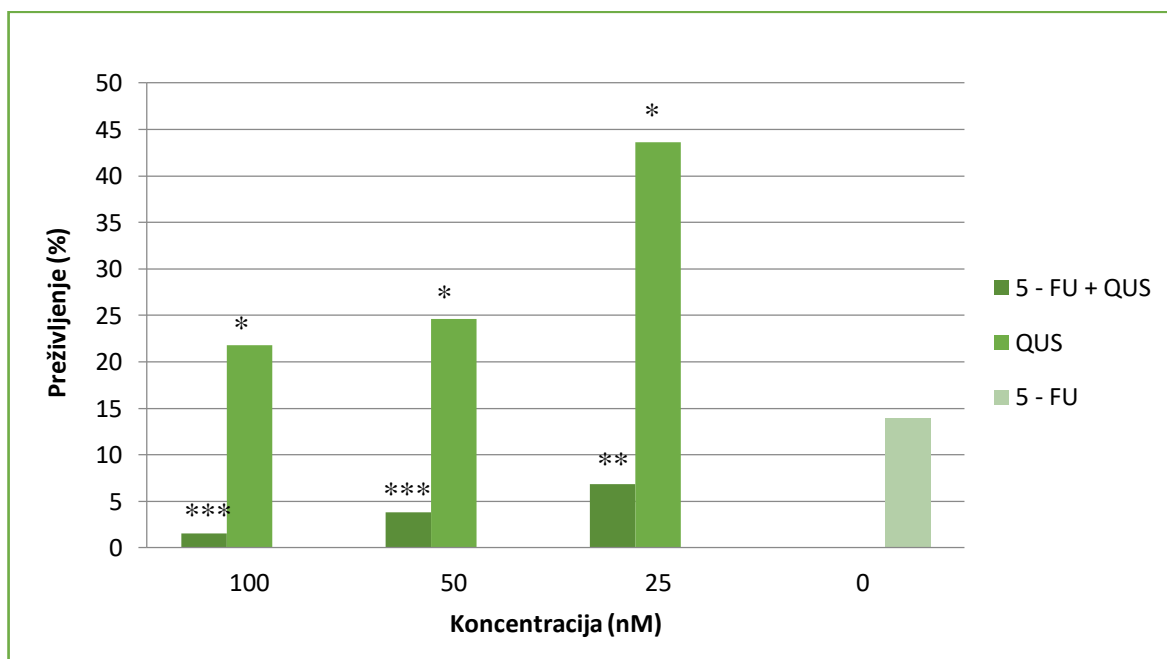


Slika 13. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji quisinostata pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 13. i Slici 13. može se zaključiti da istovremeni tretman pospješuje citotoksičnost te utječe na inhibiciju rasta tumorskih stanica. Pritom, može se uočiti da je najdjelotvornija koncentracija quisinostata 100 nM. Također, može se primijetiti da se porastom koncentracije quisinostata, uz konstantnu koncentraciju 5-FU koja iznosi 2 mM, smanjuje postotak preživljenja. Sam quisinostat u koncentraciji 100 i 50 nM također pokazuje citotoksični učinak.

Tablica 14. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji quisinostata (QUS) pri 1 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Koncentracija QUS (nM)	Preživljenje (%)	
	(5 - FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	1,5627 ± 0,1710 ***	21,7707 ± 1,3743 *
50	3,8462 ± 0,3626 ***	24,5960 ± 1,5526 *
25	6,8215 ± 1,1494 **	43,6478 ± 2,7552 *
0	13,9719 ± 1,2863	
Netretirane stanice	100	



Slika 14. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji quisinostata pri 1 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 14. i Slici 14. može se zaključiti da istovremeni tretman s 5-FU-om i quisinostatom ima značajan utjecaj na smanjenje preživljenja tumorskih stanica, što se najbolje očituje pri koncentraciji quisinostata od 100 nM, koja se pokazala kao najdjelotvornija. Također, usporedbom postotka preživjelih stanica uz djelovanje quisinostata i lijeka može se uočiti da i pomoćno sredstvo pokazuje o koncentraciji ovisnu inhibiciju rasta pri istraživanim koncentracijama, uz manji citotoksični učinak od 5-FU..

Nakon provedenog određivanja utjecaja istovremenog tretmana 5-FU-om i quisinostatom na postotak mrtvih odnosno živih stanica može se uočiti da tri primijenjene metode ne daju isti zaključak. *CellTox™ Green Cytotoxicity test* ukazuje na neefikasnost primjene quisinostata u obliku kombiniranog tretmana, dok preostale dvije metode (*RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability test*) ukazuju na suprotno, tj. istovremeni tretman smanjuje broj živih stanica kao posljedica citotoksičnosti i inhibicije rasta tumorskih stanica. Pritom, najdjelotvornija koncentracija quisinostata uz konstantnu koncentraciju lijeka jest i najviša primijenjena, 100 nM.

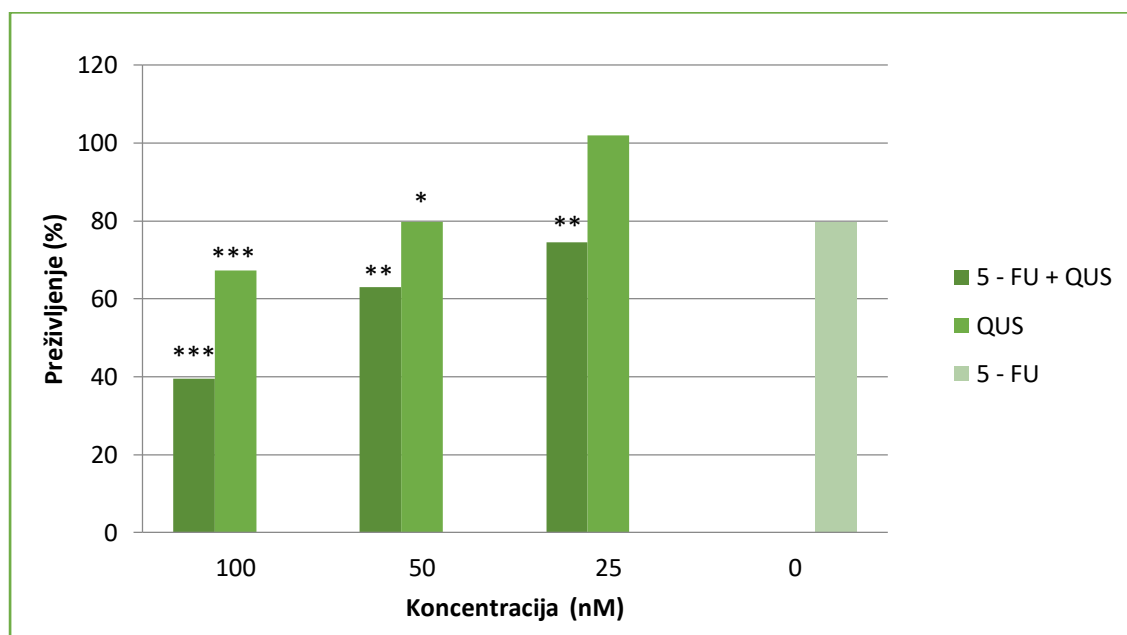
Također, može se uočiti da kod dvije primijenjene metode (*RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability test*) utjecaj quisinostata na postotak mrtvih odnosno živih stanica daje isti zaključak. Najdjelotvornija koncentracija quisinostata iznosi 100 nM.

4.3. Vijabilnost tumorskih stanica nakon predtretmana quisinostatom te naknadnog tretmana s 5-FU u 2D i 3D kulturi

Da bismo provjerili utjecaj predtretmana quisinostatom na citotoksičnu aktivnost 5-FU provedena je inkubacija tumorskih stanica u 2D i 3D kulturi u obliku predtretmana quisinostatom tijekom četiri dana, nakon čega slijedi izlaganje 5-FU tijekom 3 dana. Također, provjeren je i citotoksični učinak samog quisinostata u uvjetima pokusa. Vijabilnost stanica u 2D kulturi određena je resazurin testom, a u 3D kulturi *CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testovima.

Tablica 15. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D kulturi tretiranih s različitim koncentracijama quisinostata (QUS) tijekom 4 dana (predtretman) te tretmana s 2,5 mM 5-FU tijekom dodatna 72 sata. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Koncentracija QUS (nM)	Preživljenje (%)	
	(5-FU + QUS) \pm SD	QUS \pm SD
100	39,4502 \pm 4,5451 ***	67,2485 \pm 0,5840 ***
50	62,9996 \pm 3,7517 **	79,7785 \pm 14,2761*
25	74,6171 \pm 14,4246 **	101,9582 \pm 13,6402
0	78,1005 \pm 38,2494	

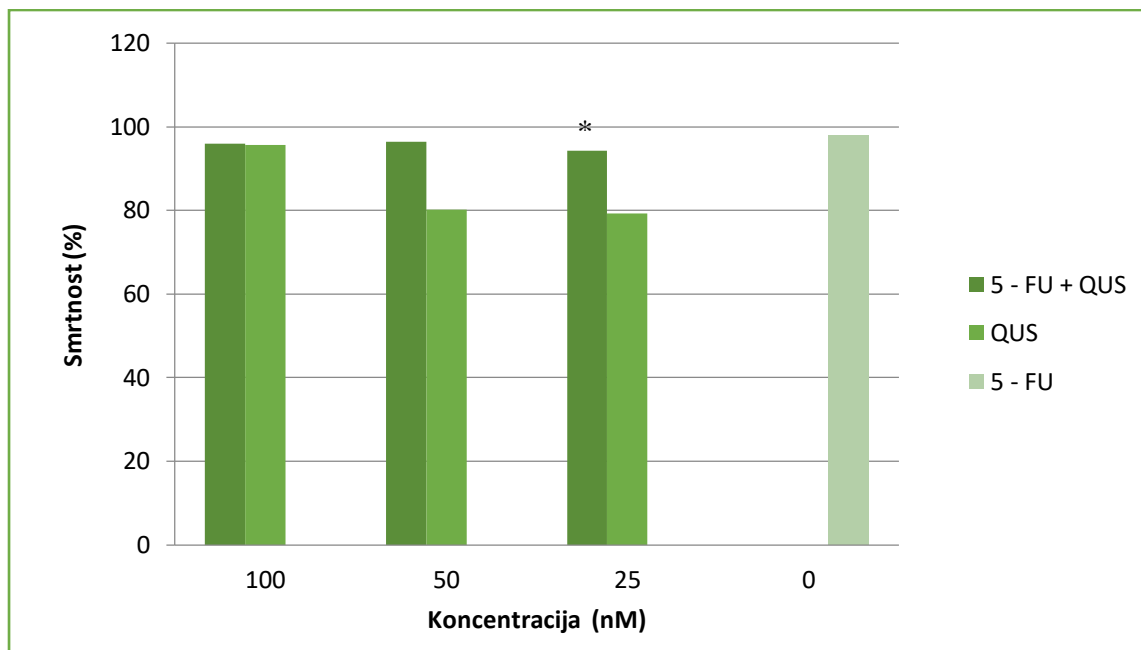


Slika 15. Preživljenje stanica tumora mliječne žlijezde miša (%) u 2D kulturi tretiranih s različitim koncentracijama quisinostata (QUS) tijekom 4 dana (predtretman) te tretmana s 2,5 mM 5-FU tijekom dodatna 72 sata. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dobiveni rezultati u Tablici 15. i Slici 15. ukazuju na moguću primjenu quisinostata kao antitumorskog agensa u obliku predtretmana. Naime, sam quisinostat u koncentracijama 50 i 100 nM, pokazuje značajan utjecaj na smanjenje postotka preživjelih stanica. Štoviše, istovremeni tretman s 5-FU dodatno smanjuje preživljenje tumorskih stanica kod navedenih koncentracija quisinostata. Utjecaj inhibitora histon deacetilaza na citotoksični efekt 5-FU u obliku predtretmana ukazuje da suberoilanilid-hidroksamična kiselina, poznatija kao vorinostat te valproinska kiselina tijekom izlaganja od 24 h te dodatka lijeka značajno utječu na povećanje osjetljivosti stanične linije MDA468, tj. stanica tumora dojke (Minegaki i sur., 2018). Također, predtretman panobionostatom tijekom 24 h pokazuje adjuvantni učinak na 5-FU na staničnoj liniji tumora debelog crijeva (Fazzone i sur., 2009).

Tablica 16. Smrtnost stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Koncentracija QUS (nM)	Smrtnost (%)	
	(5-FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	95,9419 ± 3,2302	95,6347± 4,7131
50	96,4284 ± 3,5808	80,1021 ± 3,9476
25	94,2057± 1,6024 *	79,2163±3,9039
0	98,008 ± 4,8301	
Netretirane stanice	-	



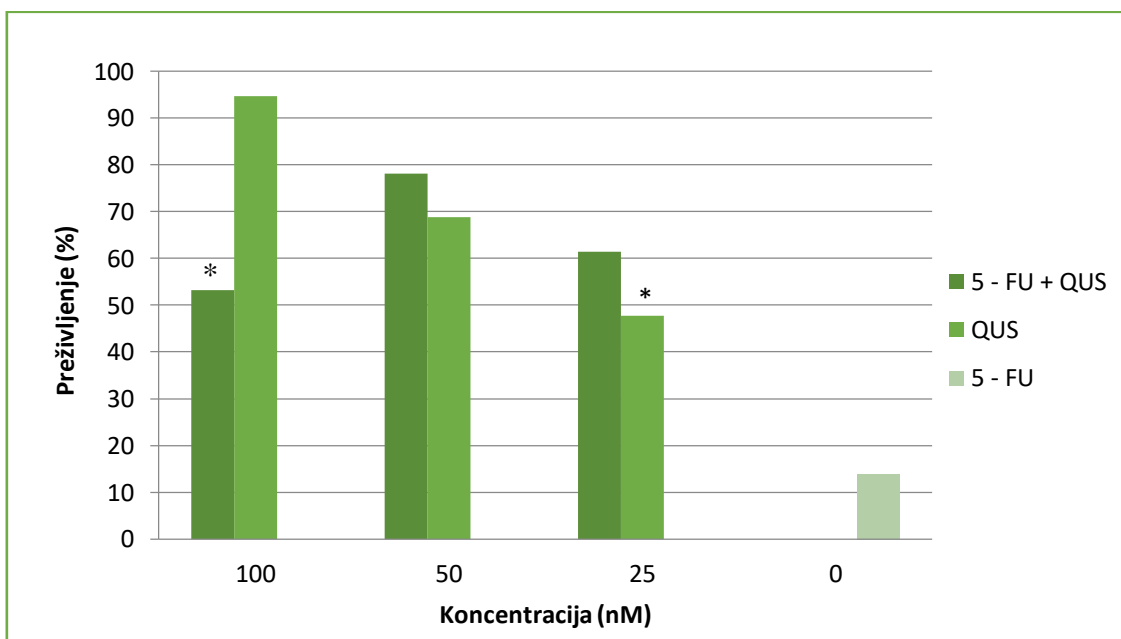
Slika 16. Smrtnost stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTox Green Cytotoxicity* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 16. te na Slici 16. može se zaključiti da je efikasnost predtretmana s quisinostatom podjednaka efikasnosti primjene 5-FU. Budući da se radi o izrazito bliskim vrijednostima smrtnosti stanica, za 100, 50 i 25 nM quisinostat u kombinaciji s 5-FU-om, može se reći da pokazuju istu razinu citotoksičnosti i inhibicije rasta tumorskih stanica. Osim toga, 50 i 25 nM quisinostat nema značajan utjecaj na smanjenje preživljenja tumorskih stanica, u odnosu na 100 nM quisinostat te 5-FU.

Usporedbom istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom te predtretmana s quisinostatom uz dodatak lijeka, za *CellTox™ Green Cytotoxicity test*, može se zaključiti da quisinostat nema značajan utjecaj na poboljšano djelovanje lijeka, tj. ne pokazuje se bolja inhibicija rasta tumorskih stanica primjenom istovremenog tretmana i predtretmana u odnosu na primjenu isključivo 5-FU. Također, u oba navedena slučaja quisinostat ne povećava djelovanje 5-FU, ali primjenom predtretmana približava se vrijednosti koju daje sam lijek.

Tablica 17. Preživljenje stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Koncentracija QUS (nM)	Postotak preživljenja (%)	
	(5-FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	53,2197 ± 7,3657 *	94,6969 ± 4,6195
50	78,0777 ± 9,0397	68,7500 ± 3,3538
25	61,4583 ± 37,7659	47,7273 ± 2,3282 *
0	13,9204 ± 0,6791	
Netretirane stanice	100	



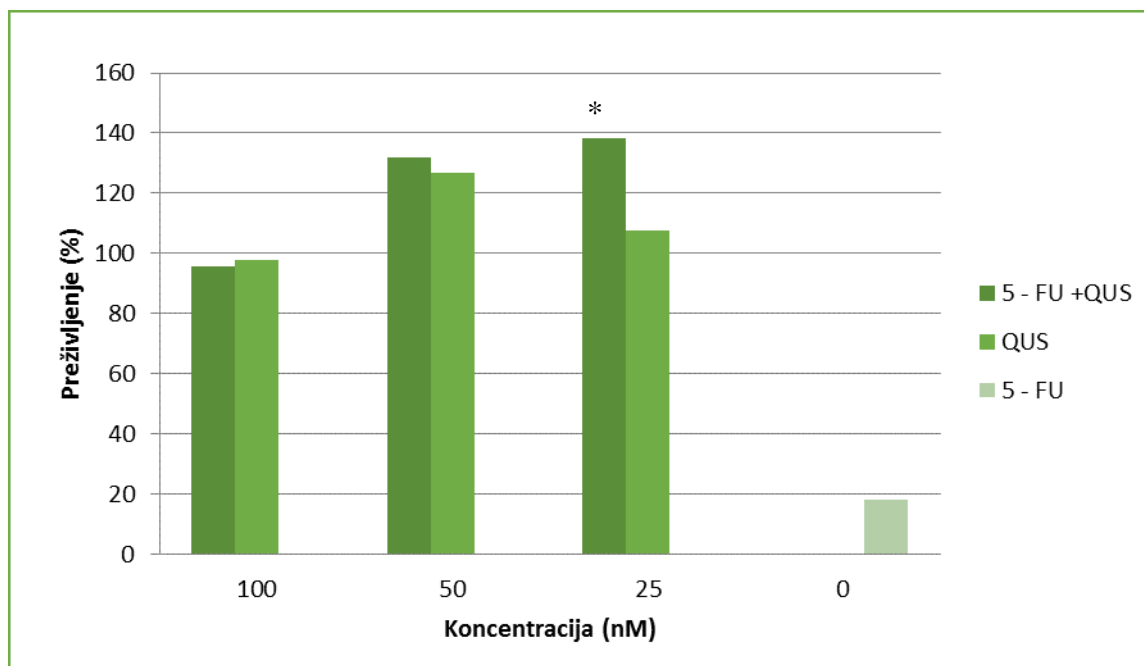
Slika 17. Preživljenje stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *RealTime-Glo MT Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tablici 17. i Slici 17. može se zaključiti da predtretman quisinostatom ne pospješuje inhibiciju rasta tumorskih stanica. Od istraživanih koncentracija, 100 nM pokazala se kao najdjelotvornija. Pritom, izlaganje quisinostatu ukazuje da najmanja koncentracija od 25 nM daje najmanji postotak preživljenja, što je suprotno pretpostavljenoj hipotezi.

Usporedbom istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom te predtretmana quisinostatom s naknadnim tretmanom s 5-FU može se zaključiti da istovremeni tretman pokazuje bolji utjecaj na smanjenje vijabilnosti stanica u 3D kulturi.

Tablica 18. Preživljenje stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 1 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Koncentracija QUS (nM)	Preživljenje (%)	
	(5-FU + QUS) ± SD	QUS ± SD
100	95,5734 ± 4,2928	97,8183 ± 5,6686
50	131,7506 ± 4,9858	126,8971 ± 7,3538
25	138,2799 ± 25,2346 *	107,5569 ± 6,2329
0	17,9753 ± 2,1687	
Netretirane stanice	100	



Slika 18. Preživljenje stanica nakon predtretmana quisinostatom (QUS) ovisno o njegovoj koncentraciji pri 1 mM koncentraciji 5-FU u 3D kulturi određeno *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

Iz podataka prikazanih u Tablici 18. i na Slici 18. može se zaključiti da predtretman quisinostatom ne pokazuje značajan citotoksičan efekt i inhibiciju rasta tumorskih stanica. U odnosu na primjenu samog 5-FU, može se reći da primjena predtretmana u zadanim uvjetima nema sinergistički učinak na smanjenje njihova preživljenja. Od istraživanih koncentracija za predtretman s quisinostatom najdjelotvornijom se pokazala 100 nM. U slučaju nižih koncentracija, quisinostat pokazuje bolje smanjenje preživljenja u odnosu na predtretman.

Usporedbom *CellTiter-Glo 3D Cell Viability* testa za istovremeni tretman te predtretman quisinostatom i 5-FU, može se zaključiti da istovremeni tretman s 5-FU i quisinostatom pokazuje bolju efikasnost primjene u odnosu na predtretman. Quisinostat u obliku istovremenog tretmana tumorskih stanica pokazuje značajan citotoksični efekt te inhibiciju rasta tumorskih stanica te je kao takav bolja opcija za primjenu u odnosu na predtretman quisinostatom i 5-FU.

Osim navedenog, rezultati ispitivanja predtretmana s quisinostatom uz dodatak lijeka 5-FU kod sve tri metode (*CellTox™ Green Cytotoxicity*, *RealTime-Glo MT Cell Viability* i *CellTiter-Glo 3D Cell Viability testa*) ukazuje na isto, tj. da quisinostat ne povećava djelovanje 5-FU.

Usporedbom rezultata istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom kod 2D i 3D stanične kulture može se uočiti da je 3D kultura osjetljivija na primijenjeni tretman, tj. sinergistički učinak 5-FU i quisinostata omogućava bolju inhibiciju rasta tumorskih stanica. Predtretman quisinostatom uz naknadni tretman s 5-FU ukazuje na suprotno, tj. 2D kultura pokazuje manje preživljenje tumorskih stanica u odnosu na 3D kulturu.

5. Zaključak

Na temelju podataka dobivenih istraživanjem osjetljivosti stanica tumora mliječne žlijezde miša u 2D i 3D kulturama, u obliku istovremenog tretmana odnosno predtretmana s quisinostatom i tretmana 5-FU-om može se zaključiti sljedeće:

- 3D stanične kulture pokazuju veću osjetljivost na primijenjene doze 5-FU i quisinostata kod istovremenog tretmana s 5-FU i quisinostatom, u odnosu na 2D stanične kulture, što se može vidjeti po većoj inhibiciji rasta tumorskih stanica. Međutim, predtretman quisinostatom uz naknadni tretman s 5-FU ukazuje na suprotno, tj. 2D kultura pokazala se kao osjetljivija;
- 2D stanična kultura pokazuje osjetljivost u oba slučaja njihova tretiranja u obliku istovremenog tretmana odnosno predtretmana quisinostatom i tretmana 5-FU-om. Međutim, istovremeni tretman 5-FU-om i quisinostatom pokazuje manje preživljenje tumorskih stanica u odnosu na predtretman, kod iste primijenjene koncentracije lijeka koja iznosi 2,5 mM. Na taj način može se zaključiti da istovremeni tretman s 5-FU i quisinostatom ima prednost primjene kod 2D kulture;
- Kod istraživanja 3D stanične kulture uočena je izrazito slaba osjetljivost stanica na primjenu quisinostata u obliku predtretmana. Međutim, istovremeni tretman tumorskih stanica pokazuje izrazito visok stupanj inhibicije rasta tumorskih stanica te se pokazao kao najbolja opcija primjene kod 3D kulture;
- Također, može se primijetiti razlika u djelovanju quisinostata kod primjene u obliku istovremenog tretmana te predtretmana. Naime, istovremeni tretman pokazuje obrnuto proporcionalan odnos utjecaja povećanja koncentracije quisinostata na postotak preživljenja tumorskih stanica, dok predtretman pokazuje varijacije u njegovoj efikasnosti.

Zaključno, istovremeni tretman tumorskih stanica s 5-FU i quisinostatom se kod obje ispitivane kulture pokazao kao najbolja opcija primjene, zbog izražene citotoksičnosti na tumorske stanice, u odnosu na primjenu u obliku predtretmana te samog lijeka.

6. Popis literature

1. Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., Martin, F. L. (2018) Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans.* **46**: 1213–1224.
2. Borra, R.C., Lotugol, M.A., Gagiutil, S.A., de Mesquita Barros, F., Andrade, P.M. (2009) A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. oral res.* **23**: 255 - 62.
3. Carol, H., Gorlick, R., Kolb, E. A., Morton, C. L., Manesh, D. M., Keir, S. T., Lock, R. (2014) Initial testing (stage 1) of the histone deacetylase inhibitor, quisinostat (JNJ-26481585), by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatric blood & cancer* **61**: 245–252.
4. Dalgliesh, G.L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., Teague, J., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P.J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., Knott, H., Kok, C.Y., Lau, K.W., Leroy, C., Lin, M.L., McBride, D.J., Maddison, M., Maguire, S., McLay, K., Menzies, A., Mironenko, T., Mulderrig, L., Mudie, L., O'Meara, S., Pleasance, E., Rajasingham, A., Shepherd, R., Smith, R., Stebbings, L., Stephens, P., Tang, G., Tarpey, P.S., Turrell, K., Dykema, K.J., Khoo, S.K., Petillo, D., Wonderegem, B., Anema, J., Kahnoski, R.J., Teh, B.T., Stratton, M.R., Futreal, P.A. (2010) Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* **463**: 360-363.
5. Davis, A.J., Chen, D.J. (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res.* **2**: 130–143.
Duan, C., Huan, Q., Chen, X., Wu, S., Carey, L.B., He, X., Qian, W. (2018) Reduced intrinsic DNA curvature leads to increased mutation rate. *Genome Biology* **19**:132.
6. Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N., McGowan, P.M. (2009) Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin Cancer Res.* **15**: 1140 – 1144.
7. ECIS (2019) Estimates oof cancer incidence and mortality in 2018. ECIS – European Cancer Information System, < [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-0\\$1-HR\\$2-All\\$4-1,2\\$3-All\\$6-0,14\\$5-2008,2008\\$7-7\\$CEstByCancer\\$X0_8-3\\$CEstRelativeCanc\\$X1_8-3\\$X1_9-AE28](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-0$1-HR$2-All$4-1,2$3-All$6-0,14$5-2008,2008$7-7$CEstByCancer$X0_8-3$CEstRelativeCanc$X1_8-3$X1_9-AE28)>, Pristupljeno 10. kolovoza 2019.
8. Fantozzi, A., Christofori, G. (2006) Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* **8**: 212.

9. Fazzone, W., Wilson, P.M., LaBonte, M.J., Lenz, H.J., Ladner, R.D. (2009) Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. *IJC* **125**: 463 – 473.
10. Feitelson, M.A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R.J., Blain, S.W., Holcombe, R.F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N.K., Singh, N., Vlachostergios, P.J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Bilsland, A., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., SalmanAshraf, S., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Bhakta, D., Halicka, D., Keith, W.N., Newsheen, S. (2015) Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* **35**: S25-S54.
11. Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Albini, A. (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS one* **10**: e0115686.
12. Fouad, Y.A., Aane, C., (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* **7**: 1016-1036.
13. Giglia – Mari, G., Zotter, A., Vermeulen, W. (2011) DNA Damage Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**: a000745.
14. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell* **144**: P646-674.
15. Hassanpour, S.H., Dehghani M. (2017) Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract* **4**: 127-129.
16. He, B., Dai, L., Zhang, X., Chen, D., Wu, J., Feng, X., Zheng, S. (2018). The HDAC Inhibitor Quisinostat (JNJ-26481585) Suppresses Hepatocellular Carcinoma alone and Synergistically in Combination with Sorafenib by G0/G1 phase arrest and Apoptosis induction. *Int J Biol Sci.* **14**: 1845–1858.
17. Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., Sekawi, Z. (2016). Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res.* **10**: DE01–DE05.
18. IARC (2019) IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. IARC – International Agency for Research on Cancer, <<https://monographs.iarc.fr/>> , Pristupljeno 12. kolovoza 2019.

19. Jasin, M. (2002) Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21**: 8981–8993.
20. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* **14**: 910–919.
21. Kim, S. (2015) New and emerging factors in tumorigenesis: an overview. *Cancer Manag Res.* **7**: 225–239.
22. Kowalski, P. J., Rubin, M. A., Kleer, C. G. (2003) E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast cancer research* **5**: R217–R222.
23. Li, B., Carey, M., Workman, J.L.. (2007) The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**: 707–719.
24. Li, X., Xu, H., Xu, C., Lin, M., Song, X., Yi, F., Feng, Y., Coughlan, K.A., Chi –shing Cho, W., Kim, S.S., Cao, L. (2013) The Yin-Yang of DNA Damage Response: Roles in Tumorigenesis and Cellular Senescence. *Int J Mol Sci.* **14**: 2431–2448.
25. Liao J. B. (2006) Viruses and human cancer. *Yale J Biol Med.* **79**: 115–122.
26. Lovitt, C. J., Shelper, T. B., Avery, V. M. (2014). Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology* **3**: 345–367.
27. Mager D. L. (2006) Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med.* **4**: 14.
28. Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* **2**: 719–729.
29. Melissaridou, S., Wiechec, E., Magan, M., Jain, M. V., Chung, M. K., Farnebo, L., Roberg, K. (2019). The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.* **19**: 16.
30. Minegaki, T., Suzuki, A., Mori, M., Tsuji, S., Yamamoto, S., Watanabe, A., Nishiguchi, K. (2018) Histone deacetylase inhibitors sensitize 5-fluorouracil-resistant MDA-MB-468 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncology Letters* **16**: 6202–6208.
31. Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Sasaki, I. (2010). 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers* **2**: 1717–1730.
32. NIH (2019) Metastatic cancer. NIH – National Cancer Institute, <<https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>>, Pristupljeno 10. kolovoza 2019.

33. Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., Syed-Sha-Qhattal, H. (2015) Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl)*. **9**:17–34.
34. Parsa, N. (2012) Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iran J Public Health* **41**: 1–9.
35. Roche J. (2018) The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers* **10**: 52.
36. Schedin, P., Elias, A. (2004) Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Research* **6**: 93.
37. Schultz, W., Lang, A., Koch, J., Greife, A. (2019) The histone demethylase UTX/KDM6A in cancer: Progress and puzzles. *Int J Cancer* **145**: 614-620.
38. Seyfried, T. N., Huysentruyt, L. C. (2013) On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*. **18**: 43–73.
39. Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, K. K. (2010) Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*. **1**: 109–126.
40. Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.P., Zhu, H.P. (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci*. **13**: 1387–1397.
41. Tergaonkar V. (2015) Catalytically inactive telomerase in oncogenesis. *Oncotarget*, **6**: 14725–14726.
42. van Haaften, G., Dalgliesh, G.L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Teague, J., Butler, A., Hinton, J., Latimer, C., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P.J., Cole, J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., Kok, C.Y., Leroy, C., Lin, M.L., McBride, D.J., Maddison, M., Maquire, S., McLay, K., Menzies, A., Mironenko, T., Mulderrig, L., Mudie, L., Pleasance, E., Shepherd, R., Smith, R., Stebbings, L., Stephens, P., Tang, G., Tarpey, P.S., Turner, R., Turrell, K., Varian, J., West, S., Widaa, S., Wray, P., Collins, V.P., Ichimura, K., Law, S., Wong, J., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Tonon, G., DePinho, R.A., Tai, Y.T., Anderson, K.C., Kahnoski, R.J., Massie, A., Khoo, S.K., Teh, B.T., Stratton, M.R., Futreal, P.A. (2009) Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*. **41**:521-523.
43. Venugopal, B., Baird, R, Kristeleit, R.S., Plummer, R., Cowan, R., Stewart, A., Fourneau, N., Hellemans, P., Elsayed, Y., McClue, S., Smit, J.W., Forslund, A.,

- Phelps, C., Camm, J., Evans, T.R., de Bono, J.S., Banerji, U. (2013) A phase I study of quisinostat (JNJ-26481585), an oral hydroxamate histone deacetylase inhibitor with evidence of target modulation and antitumor activity, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* **19**:4262-72.
44. Wajed, S.A., Laird, P.W., DeMeester, T.R. (2001) DNA Methylation: An Alternative Pathway to Cancer. *Ann Surg.* **234**: 10–20.
45. Wang, X., Li, S. (2014) Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1846**: 13 - 25.
46. Was, H., Czarnecka, J., Kominek, A., Barszcz, K., Bernas, T., Piwocka, K., Kaminska, B. (2018) Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features. *Cancer biology & therapy* **19**: 63–75.
47. Yaswen, P., MacKenzie, K. L., Keith, W. N., Hentosh, P., Rodier, F., Zhu, J., Yang, X. (2015) Therapeutic targeting of replicative immortality. *Seminars in cancer biology* **35**: S104–S128.
48. Yılmaz, Ö., Sakarya, S. (2018) Is ‘Hanging Drop’ a Useful Method to Form Spheroids of Jimt, Mcf-7, T-47d, Bt-474 That are Breast Cancer Cell Lines. *Single Cell Biol.* **7**: 170.

Izjava o izvornosti

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

Leonina Moslavac

ime i prezime studenta