

In vitro istraživanje adjuvantnog učinka quisinostata na citotoksičnost kapecitabina na tumorske stanice mliječne žlijezde miša

Marjanović, Ivona

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:159:818387>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Ivona Marjanović

1011/MB

***IN VITRO* ISTRAŽIVANJE
ADJUVANTNOG UČINKA
QUISINOSTATA NA
CITOTOKSIČNOST
KAPECITABINA 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, višeg znanstvenog suradnika, te pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Šver iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog 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 KAPECITABINA NA TUMORSKE STANICE MLIJEČNE ŽLIJEZDE MIŠA

Ivona Marjanović, 1011/MB

Sažetak: Zbog veće sličnosti uvjeta 3D staničnih kultura *in vivo* uvjetima, raste interes za njihovu primjenu u raznim područjima. Pokazano je da učinak antitumorskih lijekova u 2D staničnim kulturama nije isti učinku *in vivo* ili u 3D staničnim kulturama. Razlika učinkovitosti je vjerojatno posljedica fizičkih i fizioloških osobitosti tumorskih stanica, uslijed razlika u ekspresiji gena (koje su direktna posljedica djelovanja epigenetskih mehanizama) ili zastupljenosti stanica u pojedinim fazama životnog ciklusa. U ovom radu istražen je utjecaj antitumorskog lijeka kapecitabina i pomoćne tvari quisinostata na stanice raka dojke miša u 2D i 3D staničnim kulturama. Rezultati su pokazali da kapecitabin ima o koncentraciji ovisan citotoksični učinak na stanice raka mliječne žlijezde miša, izraženiji u 2D kulturi. Dodatak quisinostata u obliku istovremenog tretmana s kapecitabinom ne utječe značajno na povećanje citotoksičnosti kapecitabina u 2D kulturi. Međutim, u 3D staničnoj kulturi dodatak quisinostata značajno je povećao citotoksičnost kapecitabina. Primjena quisinostata kao predtretmana, za razliku od 3D kulture, znatno je povećala citotoksičnost kapecitabina u 2D kulturi.

Ključne riječi: *kapecitabin, quisinostat, inhibitor histon deacetilaza, 2D stanične kulture, 3D stanične kulture*

Rad sadrži: 51 stranica, 20 slika, 17 tablica, 50 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
Scientificarea: Biotechnical Sciences
Scientificfield: Biotechnology

IN VIRO STUDY OF THE ADJUVANT EFFECT OF QUISINOSTAT ON THE CYTOTOXICITY OF CAPECITABINE ON MOUSE MAMMARY GLAND TUMOR CELLS

Ivona Marjanović, 1011/MB

Abstract: Due to the greater similarity of 3D cell culture model to in vivo conditions, there is increasing interest in its application in various fields. The effect of antitumor drugs in 2D cell cultures has been shown to differ in comparison to in vivo or in 3D cell culture settings. The difference in efficacy is probably due to the physical and physiological characteristics of the tumor cells, due to differences in gene expression (which are a direct consequence of the action of epigenetic mechanisms) or the presence of cells at certain stages of the life cycle. The effect of the anticancer drug capecitabine and the adjuvant quisinostat on mouse breast cancer cells in 2D and 3D cell cultures was examined. The results showed that capecitabine had a concentration-dependent cytotoxic effect on mouse breast cancer cells, more expressed in 2D culture. The addition of quisinostat in the combination with capecitabine did not significantly increase the cytotoxicity in 2D culture. However, in 3D cell culture, the addition of quisinostat significantly increased the cytotoxicity of capecitabine. The use of quisinostat as pretreatment significantly increased the cytotoxicity of capecitabine in 2D culture only.

Keywords: *capecitabine, quisinostat, histone deacetylase inhibitor, 2D cell cultures, 3D cell cultures*

Thesis contains: 51 pages, 20 figures, 17 tables, 50 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, Associate 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: 25 September 2019

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. TUMORI | 3 |
| 2.1.1. Tumorigeneza..... | 3 |
| 2.1.1.1. Onkogeni | 3 |
| 2.1.1.2. Tumor supresorski geni | 4 |
| 2.1.1.3. Acetilacija i deacetilacija..... | 5 |
| 2.1.2. Svojstva tumorskih stanica..... | 5 |
| 2.1.3. Vrste tumora | 6 |
| 2.1.3.1. Zloćudni (maligni) tumori | 6 |
| 2.1.3.2. Dobroćudni (benigni) tumori | 7 |
| 2.1.3.3. Prekancerogeni | 7 |
| 2.1.3.4. Tumor dojke | 8 |
| 2.2. STANIČNE KULTURE | 9 |
| 2.2.1. Tumorske stanične kulture | 9 |
| 2.2.2. 2D kulture..... | 10 |
| 2.2.2.1. Određivanje broja živih stanica bojanjem resazurinom | 11 |
| 2.2.3. 3D kulture..... | 11 |
| 2.2.4. Usporedba djelovanja lijeka na stanice u 2D i 3D kulturama | 13 |
| 2.2.5. Određivanje učinkovitosti lijeka u 3D kulturi..... | 14 |
| 2.2.5.1. Određivanje broja mrtvih stanica CellTox Green Cytotoxicity testom..... | 14 |
| 2.2.5.2. Određivanje broja živih stanica RealTime-Glo MT Cell Viability testom | 15 |
| 2.2.5.3. Određivanje broja živih stanica CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom..... | 15 |
| 2.3. ANTITUMORSKI LIJEKOVI..... | 16 |
| 2.3.1. Kapecitabin..... | 16 |
| 2.3.2. Quisinostat..... | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. MATERIJALI | 18 |
| 3.1.1. Stanična linija | 18 |
| 3.1.2. Kemikalije | 18 |
| 3.1.3. Lijekovi | 18 |
| 3.1.4. Medij i otopine | 19 |
| 3.1.5. Pločice i boce za uzgoj stanica | 19 |
| 3.2. UREĐAJI | 19 |
| 3.3. METODE | 20 |
| 3.3.1. Subkultiviranje kulture (pasažiranje) | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.2. Postavljanje 2D kulture na 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu za uzgoj stanica..... | 21 |
| 3.3.2.1. Utjecaj koncentracije kapecitabina na vijabilnost stanica..... | 21 |
| 3.3.2.2. Istovremeni tretman tumorskih stanica kapecitabinom i quisinostatom | 22 |
| 3.3.2.3. Predtretman quisinostatom i tretman kapecitabinom | 23 |
| 3.3.3. Postavljanje 3D kulture na 96-jažičnoj mikrotitarskoj pločici s U dnom | 24 |
| 3.3.3.1. Utjecaj koncentracije kapecitabina na vijabilnost stanica..... | 25 |
| 3.3.3.2. Istovremeni tretman kapecitabinom i quisinostatom..... | 26 |
| 3.3.3.3. Predtretman quisinostatom i tretman kapecitabinom | 27 |
| 3.3.4. Određivanje broja mrtvih/živih stanica u 3D kulturi | 27 |
| 3.3.4.1. CellTox Green Cytotoxicity test | 27 |
| 3.3.4.2. RealTime-Glo MT Cell Viability test | 28 |
| 3.3.4.3. CellTiter-Glo 3D Cell Viability test..... | 28 |
| 3.4. ANALIZA I STATISTIČKA OBRADA REZULTATA..... | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 30 |
| 4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE KAPECITABINA NA VIJABILNOST STANICA... .. | 30 |
| 4.2. ISTOVREMENI TRETMAN KAPECITABINOM I QUISINOSTATOM | 36 |
| 4.3. PREDTRETMAN QUISINOSTATOM I TRETMAN KAPECITABINOM..... | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI | 46 |
| 6. LITERATURA | 47 |

1. UVOD

Ubrzano raste interes za primjenu trodimenzionalnih (3D) staničnih kultura u raznim područjima, npr. praćenju djelovanja lijeka na stanice u kulturi, tkivnom inženjerstvu itd. Razlog tomu je njihova sličnost stvarnim *in vivo* uvjetima u odnosu na dugo primjenjivane 2D kulture (Edmondson i sur., 2014). To se pokazalo važnim u ispitivanju djelovanja antitumorskih lijekova na tumore različitog porijekla. Naime, jedan lijek (npr. 5-fluorouracil, kaptopotecin i dr.) pokazao je različitu djelotvornost prema stanicama u 2D i 3D kulturama, gdje su neki lijekovi (npr. kaptopotecin) imali jači učinak u 2D, a drugi (npr. 5-fluorouracil) u 3D kulturama (Gurski i sur., 2009; Loessner i sur., 2010; Karlsson i sur., 2012; Hongisto i sur., 2013). Različiti stanični odgovor na lijek može biti posljedica različitih fizičkih i fizioloških osobitosti tumorskih stanica uslijed razlika u kvalitativnoj i kvantitativnoj ekspresiji gena ili zastupljenosti stanica u pojedinim fazama životnog ciklusa što utječe na osjetljivost stanica na djelovanje lijeka (Edmondson i sur., 2014). Razlike u ekspresiji gena direktna su posljedica djelovanja epigenetskih mehanizama između kojih acetilacija histona ima važnu ulogu u biologiji tumora. Promjene u acetilaciji histona u kromatinu reguliraju kondenzacijsko stanje DNA što pospješuje ili blokira ekspresiju gena, uključujući gene koji sudjeluju u rezistenciji stanica na antitumorske lijekove (Mottamal i sur., 2015). Kondenzacijsko stanje DNA regulira i prolazak kroz stanični ciklus te osjetljivost same DNA na genotoksične agense, što je bitno u terapiji (Takata i sur., 2013).

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj antitumorskog lijeka kapecitabina i pomoćne tvari quisinostata na stanice tumora mliječne žlijezde miša u 2D i 3D kulturi. Primijenjeni 3D sustav činili su sferoidi formirani na pločici za stanične kulture s ultra niskom prijanjajućom površinom. U ovom radu, istraživani su utjecaji različitih koncentracija kapecitabina, utjecaj quisinostata na citotoksičnost kapecitabina u dva modaliteta: (i) istovremeno izlaganje stanica te (ii) prethodni tretman stanica quisinostatom i naknadni tretman s kapecitabinom. U 2D kulturama korišten je resazurin test za određivanje vijabilnosti stanica, te posljedično utjecaja primijenjenog tretmana na stanice, a u 3D kulturama se utjecaj tretmana određivao pomoću 3 testa: CellTox Green Cytotoxicity, RealTime-Glo MT Cell Viability i CellTiter-Glo 3D Cell Viability.

Rezultati ovog rada omogućavaju usporedbu citotoksičnosti kapecitabina u 2D i 3D kulturama stanica tumora mliječne žlijezde miša te su osnova za određivanje mehanizma djelovanja kapecitabina ovisno o uvjetima uzgoja. Dodatno, primjena modulatora acetilacije histona,

kroz inhibiciju histon deacetilaza korištenjem quisinostata, pokazala je sinergijski učinak u kombinaciji s kapecitabinom u 3D kulturama što upućuje na mogućnost korištenja sličnih lijekova sa svrhom povećavanja citotoksičnosti antitumorskih lijekova *in vivo*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TUMORI

2.1.1. Tumorigeneza

Živi organizam građen je od stanica koje su povezane u tkiva i organe. Geni u jezgri stanice sadrže upute kada stanica treba rasti, dijeliti se, vršiti svoju funkciju i naposljetku umrijeti, pri čemu su pod kontrolom regulacijskih mehanizmima koji djeluju kako na genskoj, tako i na epigenetskoj razini. Tumorske stanice ne reagiraju na normalne mehanizme regulacije rasta, nego se nastavljaju nekontrolirano dijeliti te se tako umnože u klon, koji se naziva neoplazma. Ona ne mora nužno biti čvrsta (npr. leukemija), ali kada je, naziva se tumor. Uzrok pretvorbe normalne stanice u tumorsku su nagomilane mutacije u genima koji su odgovorni za umnažanje ili rast stanice. Zbog mutacija u genima za regulaciju rasta mijenjaju se količina proizvedenog proteina ili njegova svojstva zbog čega dolazi do deregulacije staničnog dijeljenja. Geni koji reguliraju stanični rast mogu se podijeliti u tri skupine: protoonkogeni, tumor supresorski geni i geni za popravak DNA (Andreis i sur., 2004). Osim genskog utjecaja, na razvoj tumora utječu i epigenetski mehanizmi (Mottamal i sur., 2015).

2.1.1.1. Onkogeni

Protoonkogen je normalan gen koji povećanom ekspresijom ili mutacijom prelazi u onkogen, koji promovira tumorigenezu. Funkcija protoonkogena je kodiranje proteina koji imaju ulogu u metabolizmu, regulaciji staničnog ciklusa, diferencijaciji stanice i drugim staničnim procesima (Lodish i sur., 2000). Najčešće su uključeni u proces prijenosa signala rasta od površine do jezgre stanice. Ekspresija onkogena, osim što dovodi do nastanka tumora, regulira genske i epigenetske promjene (Pranavathiyani i sur, 2018). Aktivacija onkogena može biti posljedica amplifikacije gena pa je veća količina proteina kodiranog tim genom. Primjer ovakve aktivacije onkogena je aktivacija gena *HER-2* prisutna u oko 20% primarnih tumora dojke. Drugi mehanizam aktivacije je točkasta mutacija koja za posljedicu ima povećanje aktivnosti proteina mutiranog gena. Primjer je aktivacija *ras* onkogena u raku pluća i gušterače. Kromosomska translokacija je još jedan mehanizam aktivacije onkogena, u kojem nastaje fuzionirani gen čiji proteinski produkt ima povećanu funkciju (Osborne i sur., 2004).

2.1.1.2. Tumor supresorski geni

Tumor supresorski geni kodiraju regulacijske proteine koji su uključeni u proces potiskivanja staničnog rasta i smanjenja stanične adhezije i aktivnosti proteina (Osborne i sur., 2004), ali ponekad i pojačavaju aktivnost regulacijskih proteina (npr. p53 pojačava aktivnost p21). Zahvaljujući tim aktivnostima, mogu utjecati na metastatički potencijal i invazivnost tumora (Pranavathiyani i sur, 2018). Za razliku od onkogeni, koji su u tumoru pojačano eksprimirani, tumor supresorski geni su najčešće potisnuti ili inaktivirani. Međutim, poznati su primjeri tumor supresorskih gena koji nakon mutacije mogu djelovati kao aktivni onkogeni i sudjelovati u razvoju tumora. Najpoznatiji primjer takvog gena je *TP53* (Oren i Rotter, 2010). Mutacije koje uzrokuju promjenu gena mogu biti nasljedne ili stečene. U oba slučaja, tumor je najčešće karakteriziran mutacijom u jednom alelu i delecijom drugog alela. Međutim, ne mora nužno biti prisutna mutacija tumor supresorskog gena kako bi došlo do inaktivacije. Drugi mehanizmi koji utječu na njegovu ekspresiju ili funkciju mogu biti metilacija promotora što suprimira transkripciju; povećana degradacija proteina; modifikacije drugih proteina koji stupaju u interakcije s proteinskim produktom tumor supresorskog gena (Osborne i sur., 2004). Najvažniji tumor supresorski geni su: *TP53*, koji regulira odgovor stanice na stres; *BRCA* koji regulira gene za popravak DNA; *Rb* koji regulira diobu stanice; te *APC* koji kontrolira signalne puteve.

U normalnim stanicama, razina proteina p53 održava se niskom pomoću proteina Mdm2 koji promovira ubikvitinaciju i proteasomalnu degradaciju p53 (Lee i Muller, 2010). Aktivacija p53 započinje stabilizacijom p53 ometanjem njegovih interakcija s Mdm2, što se postiže posttranslacijskom modifikacijom p53 na amino-terminalnom kraju, uključujući fosforilaciju specifičnih aminokiselinskih ostataka kataliziranu brojnim kinazama. Rezultat stabilizacije je mogućnost vezanja p53 na specifične regije DNA te njegova interakcija s općim transkripcijskim faktorima, čime on utječe na aktivaciju ili represiju ciljnih gena (Zilfou i Lowe, 2009). Ukoliko dođe do oštećenja DNA ili drugih vrsta staničnog stresa (npr. hipoksija, nedostatak hranjivih tvari i dr.) poraste stanična koncentracija p53 koji aktivira transkripciju brojnih gena i privremeno zaustavlja stanični ciklus u G_1 ili G_2/M fazi kako bi se DNA mogla popraviti te, u slučaju prevelikih oštećenja, stupa u interakcije s drugim staničnim putevima kako bi se aktivirala apoptoza (Osborne i sur., 2004).

2.1.1.3. Acetilacija i deacetilacija

Razlike u ekspresiji gena direktna su posljedica djelovanja epigenetskih mehanizama među kojima acetilacija/deacetilacija histona ima važnu ulogu u biologiji tumora. Promjene u acetilaciji histona u kromatinu reguliraju kondenzacijsko stanje DNA što pospješuje ili blokira ekspresiju gena, uključujući gene koji sudjeluju u rezistenciji stanica na antitumorske lijekove. Kondenzacijsko stanje DNA regulira i prolazak kroz stanični ciklus, te osjetljivost same DNA na genotoksične agense, što je bitno u terapiji (Takata i sur., 2013). Histon acetilaze acetiliraju lizinske ostatke na histonima, omogućuju razmatanje kromatina i ekspresiju gena, dok histon deacetilaze uklanjaju acetilne skupine, zbog čega se kromatin jače kondenzira i dolazi do represije i utišavanja ekspresije gena (Mottamal i sur., 2015). Acetilacija histona je povezana i s drugim staničnim procesima, npr. popravkom DNA i rekombinacijom. Histon deacetilaze uključene su i u deacetilaciju nehistskih proteina koji reguliraju diferencijaciju, apoptozu, tijekom staničnog ciklusa (Ropero i Esteller, 2007).

2.1.2. Svojstva tumorskih stanica

Svojstva po kojima se tumorske razlikuju od normalnih stanica su: zadržavanje proliferacije, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje stanične smrti, omogućavanje stanične besmrtnosti, induciranje angiogeneze, invazivnost i metastaziranje, mijenjanje metabolizma za iskorištavanje drugih izvora energije, izbjegavanje imunskog odgovora i dr. (Hanahan i Weinberg, 2011).

Osnovna karakteristika tumorskih stanica je sposobnost zadržavanja signalizacije proliferacije. Normalne stanice imaju strogo reguliranu proizvodnju i otpuštanje signala rasta koji usmjeravaju stanicu kroz ciklus rasta i dijeljenja te tako održavaju normalnu funkciju i građu tkiva. U tumorskim stanicama uočena je deregulacija signala rasta što im omogućava zadržavanje proliferacije i u situacijama kad se ti signali ne otpuštaju u normalnim stanicama. Način na koji to postižu je da samostalno proizvode faktora rasta i vežu ih na receptore što rezultira autokrino-induciranom proliferacijom. Također, tumorske stanice mogu stimulirati normalne stromalne stanice na proizvodnju njima potrebnih faktora rasta (Cheng i sur., 2008). Osim što moraju osigurati stalnu proliferaciju, tumorske stanice ujedno izbjegavaju negativne regulacijske mehanizme proliferacije u kojima važnu ulogu imaju tumor supresorski geni. Već su spomenuta dva najvažnija tumor supresorska gena koji kodiraju Rb i p53 koji odlučuju hoće li stanica proliferirati ili će se aktivirati senescencija i apoptoza. Rb prenosi signale koji uglavnom potječu izvan stanice, dok p53 preuzima informacije od intrinzičkih staničnih senzora (Hanahan i Weinberg, 2011).

Apoptoza ili programirana stanična smrt služi kao prirodna barijera razvoju tumora jer eliminira stanice koje imaju narušenu regulaciju staničnog ciklusa. Intrinzička stanja koja dovode do apoptoze mogu biti povišena razina onkogene signalizacije i oštećenje DNA povezano s hiperproliferacijom. Tumorske stanice razvile su nekoliko strategija izbjegavanja apoptoze, od kojih je najčešća gubitak funkcije p53 koji je važan faktor induciranja apoptoze. Druga strategija je povećanje ekspresije antiapoptotičkih regulatora (*Bcl-2* i srodnih gena) ili signala preživljavanja, što postižu smanjivanjem ekspresije proapoptotičkih faktora ili zaobilazanjem ekstrinzičkog programa smrti/apoptoze (Hanahan i Weinberg, 2011).

Kako bi iz tumorske stanice nastao zloćudni tumor, one moraju biti besmrtno odnosno imati neograničeni diobeni potencijal. Normalne stanice imaju određeni, ograničeni broj ciklusa kroz koji mogu proći prije nego što dođe do senescencije (stanje u kojem stanice ne mogu proliferirati, ali su i dalje vijabilne) i odumiranja stanice. Telomere, koje štite krajeve kromosoma, uključene su razvoj sposobnosti neograničene proliferacije (Shay i Wright, 2000). Telomere su tandemska heksanukleotidna ponavljanja koja se u normalnim stanicama progresivno skraćuju. DNA polimeraza koja dodaje ponavljajuće slijedove nukleotida na krajeve telomerne DNA naziva se telomeraza. Njezina razina u normalnim stanicama je vrlo niska, za razliku od spontano nastalih besmrtnih stanica, gdje joj je razina visoka. Svojim djelovanjem telomeraze produljuju telomernu DNA i suzbijaju progresivno skraćivanje telomere. Osim povezanosti s otpornosti na ulazak stanica u senescenciju, telomeraze sudjeluju u regulaciji apoptoze (Hanahan i Weinberg, 2011).

2.1.3. Vrste tumora

Tumor je građen od stanica koje čine kvržice ili nakupine i može se razviti iz bilo koje stanice organizma. Podjela tumora po krajnjem efektu na organizam je na kancerogene ili maligne, nekancerogene ili benigne te prekancerogene.

2.1.3.1. Zloćudni (*maligni*) tumori

Maligni ili kancerogeni tumor odlikuju jedna ili više sljedećih osobina: brz rast, sposobnost metastaziranja stanica, tj. da putem krvi ili limfe dođu do udaljenijih mjesta u organizmu i tamo formiraju tumor, stanice imaju abnormalne kromosome i DNA te mogu biti abnormalnog oblika. Tumor koji je prvi nastao naziva se primarni tumor, a tumor koji je nastao iz primarnog naziva se metastaza. Stanice u nastaloj metastazi su u većini slučajeva i dalje stanice tkiva u kojem se razvio primarni tumor, ali su stekle sposobnost ulaska u druga tkiva (Baba i Câtoi, 2007).

2.1.3.2. Dobročudni (benigni) tumori

Nekancerogeni ili benigni tumori se od kancerogenih razlikuju u nekoliko svojstava: ostaju na primarnom mjestu nastanka i ne šire se po organizmu; obično su pravilnog oblika, glatke površine i imaju pokrov koji nazivamo kapsula; uglavnom sporo rastu; oblik, kromosomi i DNA pod mikroskopom izgledaju normalno.

Sami po sebi ne predstavljaju izravnu opasnost za zdravlje i najčešće ih nema potrebe kirurški uklanjati, ali mogu uzrokovati komplikacije ukoliko pritišću okolna tkiva, živce ili krvne žile (Baba i Câtoi, 2007).

2.1.3.3. Prekancerogeni

Kada koristimo riječ prekancerogeno, ne govorimo o tumorima, nego o stanicama. To su abnormalne stanice koje, ukoliko se ne tretiraju, mogu prijeći u tumor. Promjene na takvim stanicama su ponekad toliko blage da se mogu samostalno povući, ali vrlo često se promjene prenose na novonastale stanice i tako postupno postaju abnormalnije sve dok se ne razviju u tumor. Postoje različiti načini opisivanja prekancerogenih promjena nastalih na stanicama, ovisno o stupnju promjena. Tako razlikujemo:

- hiperplaziju koju karakterizira porast broja normalnih stanica (i volumena) uslijed uzastopnih i ubrzanih dioba
- atipiju, kod koje se stanice malo razlikuju od normalnih, kažemo da su atipične ili abnormalne
- metaplaziju, kod koje se u tkivu pojavljuju vrste stanica koje izgledaju normalno, ali inače nisu karakteristične za to tkivo.

Ove tri pojave mogu biti prekancerogene, iako najčešće nisu. Za razliku od njih, sljedeće pojave su prekancerogena stanja:

- displazija koja je karakterizirana prisutnošću abnormalnih stanica koje su brojnije nego što je uobičajeno, rastu brže i nisu organizirane kao normalne stanice
- *carcinoma in situ*, što predstavlja najgori oblik prekancerogenog stanja u kojem su stanice izrazito abnormalne i, iako nisu urasle u okolno tkivo, ovakav oblik zahtijeva tretman jer predstavlja veliki rizik za razvoj tumora (Canadian Cancer Society).

2.1.3.4. Tumor dojke

Tumor dojke najčešći je tumor od kojeg obolijevaju žene. Njegovo rano otkrivanje omogućuje liječenje i preživljenje u čak 90% slučajeva (Pranavathiyani i sur., 2018). Epidemiološke analize tumora dojke u različitim stadijima upućuju na povećanje agresivnosti tumora tijekom postupne akumulacije genskih promjena. Genske promjene karakteristične za sve tumore pronađene su i u tumoru dojke te uključuju: mutacije koje (i) rezultiraju stalnom aktivnošću protoonkogeni u stimulaciji rasta, dijeljenja i preživljavanju stanica, (ii) uzrokuju gubitak funkcije tumor supresorskih gena te sposobnosti popravka DNA, regulacije staničnog ciklusa ili neobuzdani rasta stanica. U velikom broju slučajeva, analiza genoma tumora dojke otkrila je česte mutacije samo nekoliko specifičnih gena. Međutim, s manjom učestalošću mutacije mogu biti prisutne i u drugim genima što rezultira velikom heterogenošću tumora dojke (Lee i Muller, 2010). Najčešći onkogeni uključeni u razvoj tumora dojke su *HER-2* (eng. *human epithelial growth factor receptor 2*) i drugi geni HER porodice (Osborne i sur., 2004), *CDK1*, *FOS*, *CCNA2*, *CCNB1* i dr. (Pranavathiyani i sur., 2018).

HER-2 kodira za transmembranski receptor faktora rasta, koji ima tirozin kinaznu aktivnost i sudjeluje u kaskadnom prijenosu signala u stanici, u različitim signalnim putevima od kojih su neki uključeni u proliferaciju, angiogenezu, promjene međustanične interakcije, povećanu pokretljivost stanica, metastaziranje i otpornost na apoptozu (Osborne i sur., 2004).

Najčešći tumor supresorski geni uključeni u razvoj tumora dojke su *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* i *PTEN* (Osborne i sur., 2004).

BRCA1 kodira za protein koji na N-terminalnom kraju sadrži RING domenu preko koje ostvaruje interakciju s drugom RING domenom u proteinu BARD1. Tako nastali heterodimer ima ubikvitin-ligaznu aktivnost (Chen i sur., 2002). *BRCA1* također stupa u interakcije s proteinskim kompleksom Mre11-Rad50-NBS1, koji popravljiva dvolančane lomove DNA, i transkripcijskim represorom ZBRK1 (Lee i Muller, 2010). Poznato je više od 200 *BRCA1* mutacija i, iako se one mogu pronaći cijelom duljinom gena, njihov položaj utječe na ozbiljnost tumora. Tako npr. tumori koji uključuju mutacije amino ili karboksilnog kraja imaju veću proliferacijsku aktivnost (Osborne i sur., 2004).

2.2. STANIČNE KULTURE

Većina biljnih i životinjskih stanica može rasti, dijeliti se pa čak i diferencirati uzgajana u kulturi. Uzgoj stanica u laboratoriju, izvan živog bića, naziva se *in vitro*. Da bi se uspostavila 2D kultura stanica potrebno je izolirati tkivo iz organizma, a potom i stanice iz tkiva kako bi se dobile stanice jedne vrste (Alberts i sur., 2002), dok se u 3D kulturama sve češće koristi više vrsta stanica (Domansky i sur., 2009). Tkivo se tretira proteolitičkim enzimima (tripsin, kolagenaza i dr.) kako bi se razgradili proteini ekstracelularnog matriksa i stanice otpustile u suspenziju (Voigt i sur., 2015). Komadići tkiva, koji se nazivaju eksplantat, mogu se staviti na medij za rast te se onda koriste stanice koje narastu. Ovaj postupak poznat je kao kultura eksplantata. Da bi stanice u 2D kulturi mogle započeti s rastom, potrebna je čvrsta podloga na koju će se vezati. Kritičan korak je uspostava veza između membrane stanice i podloge za rast. Prihvaćanje stanica odvija se u prisutnosti Ca^{2+} (Alberts i sur., 2002). Pri uzgoju nekih animalnih stanica (npr. stanice korištene u eksperimentalnom dijelu ovog rada), ovaj korak nije nužan jer se one mogu uzgajati i u suspenziji. Stanice za rast zahtijevaju medij bogat hranjivim sastojcima, vitaminima i mineralima, hormonima i faktorima rasta. Osim toga, potrebno je osigurati odgovarajuću temperaturu i atmosferu za optimalan rast.

Razlikujemo dvije vrste staničnih kultura:

- Primarna kultura pripravljena je iz stanica dobivenih direktno iz tkiva organizma, bez proliferacije *in vitro*. Stanice u ovoj kulturi zadržavaju svoj diploidni karakter, imaju ograničeni potencijal rasta i životni vijek.
- Sekundarna kultura dobiva se proliferacijom stanica primarne kulture (Alberts i sur., 2002).

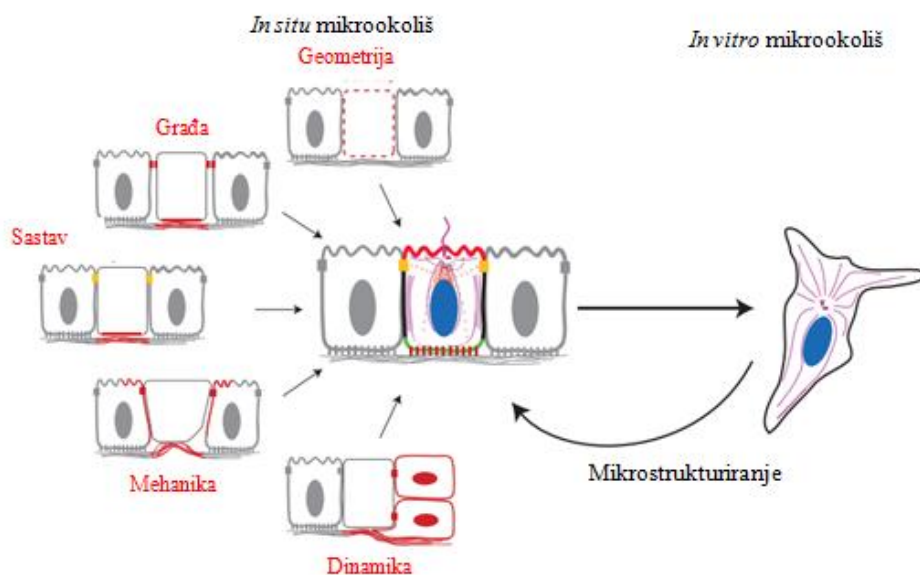
Daljnijim precjepljivanjem stanica u sekundarnoj kulturi dobiju se stanične linije koje mogu biti konačne ili normalne i kontinuirane ili besmrtno.

2.2.1. Tumorske stanične kulture

Tumorske stanične kulture tipičan su primjer besmrtnih staničnih linija. Osim što imaju neograničen životni vijek, kod njih nije prisutna kontaktna inhibicija koja se pojavljuje kod normalnih stanica. Naime, normalne stanice će se dijeliti dok ne dođu u kontakt sa susjednim stanicama, kada prestaju s rastom i zajedno formiraju monosloj. Tumorske stanice u kulturi nastavit će rasti te će u konačnici formirati višeslojnu strukturu, tj. tumor (Cooper, 2000).

2.2.2. 2D kulture

Stanice u 2D kulturi vežu se na ravnu površinu laboratorijskog posuđa, izrađenog od stakla ili plastike. Rast u 2D monoslojevima omogućuje pristup otprilike jednake količine nutrijenata svim stanicama u sloju, što rezultira homogenim rastom i proliferacijom (Huang i sur., 2013). Većina 2D metoda ne daje mogućnost kontrole oblika stanica, koji utječe na bioaktivnost stanice *in vivo*. Stanice monosloja su spljoštenije i rastegnutije nego stanice *in vivo* uvjeta, što utječe na brojne procese u stanicama, kao npr. proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu te ekspresiju gena (Tibbitt i Anseth, 2009). S obzirom na to da ovaj model ne oponaša u potpunosti mikrookoliš u *in vivo* uvjetima, stanice u 2D kulturi se neće ponašati istovjetno onima u organizmu (Huh i sur., 2011). U tipičnim 2D kulturama, stanice se prihvaćaju za homogenu površinu i nisu pod negativnim utjecajem koji može kontrolirati njihov razvoj (Théry, 2010). Kako bi se kontrolirao oblik stanica u 2D kulturi, razvijene su nove metode 2D uzgoja: mikrostrukturirani supstrati, kao što su otoci za adheziju stanica, mikrojažice, mikroizbočine, te metoda sendviča. Mikrostrukturiranje je metoda kod koje se 2D površina oblikuje i modificira kako bi se stanicama omogućio okoliš specifičnih biokemijskih svojstava, krutosti i mehaničkog opterećenja (Duval i sur., 2017). Slika 1. prikazuje razliku između stanica uzgajanih u klasičnoj 2D kulturi i metodom mikrostrukturiranja.

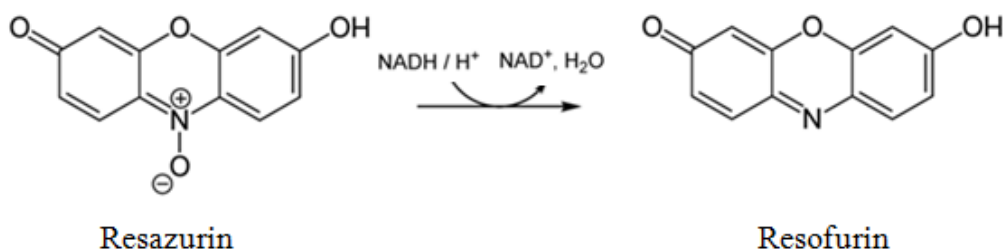


Slika 1. Stanični mikrookoliš *in situ* i *in vitro*. Metodom mikrostrukturiranja (lijevo) oponašaju se uvjeti u organizmu gdje stanica prima različite informacije od okolnih stanica i ekstracelularnog matriksa bitne za morfogenezu, mehaničku otpornost, signaliziranje itd., dok u 2D kulturi (desno) stanica ne prima te informacije jer raste na ravnoj površini. (Théry, 2010)

Još jedna metoda kojom se bolje oponašaju uvjeti *in vivo*, u odnosu na klasični 2D monosloj, je *sendvič metoda* gdje se stanice smještaju između dva sloja koji se mogu sastojati od ekstracelularnog matriksa, kolagena ili poliakrilamida (Duval i sur., 2017).

2.2.2.1. Određivanje broja živih stanica bojanjem resazurinom

Resazurin je boja kojom se određuje broj vijabilnih stanica u 2D kulturi. Žive stanice reduciraju dodanu boju u resofurin (Slika 2.) zbog čega dolazi do prijelaza boje iz tamno plave u ružičastu i može se odrediti relativna metabolička aktivnost stanica (Lee, 2017).



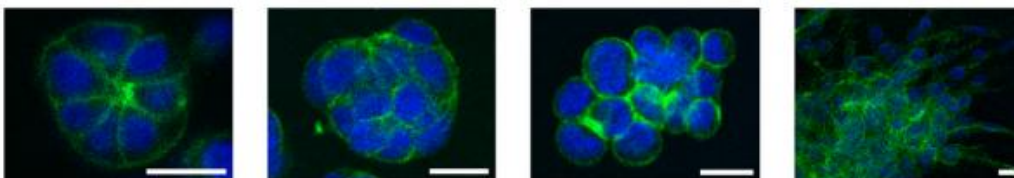
Slika 2. Kemijska reakcija redukcije resazurina u resofurin (Paul i sur., 2018)

2.2.3. 3D kulture

Stanice koje rastu u 3D sustavu formiraju agregate ili sferoide, u ili na matriksu, ili u suspenziji. U takvim strukturama puno je bolje oponašanje interakcija stanica s drugim stanicama i ekstracelularnim matriksom, koje se inače događaju *in vivo*. Posljedica toga je morfologija koja je vrlo slična stvarnom obliku stanice u tijelu. Dodatna prednost u odnosu na 2D kulture je što je sferoid građen od stanica u različitim fazama, pa tako možemo pronaći stanice koje proliferiraju, miruju, hipoksične, stanice u apoptozi ili nekrozi (Edmondson i sur., 2014). Primijećena heterogenost odgovara uvjetima *in vivo*, posebice u tumorima. Naime, stanice koje se nalaze na površini sferoida, izložene su mediju i svim potrebnim hranjivim sastojcima koje on sadrži te su to uglavnom vijabilne stanice koje proliferiraju (Khaitan i sur., 2006). S druge strane, stanicama koje se nalaze u središtu sferoida, smanjena je dostupnost kisika, nutrijenata i faktora rasta te su u fazi mirovanja ili mrtve (Mehta i sur., 2012). Stanični procesi u stanicama uzgajanim u 3D kulturama puno su sličniji stvarnim procesima u organizmu te se može reći da brzina proliferacije bolje opisuje razvoj tumora *in vivo*, nego što je to slučaj u 2D kulturama (Gurski i sur., 2010). U prilog tome idu rezultati brojnih istraživanja koja su pokazala da brzina proliferacije ovisi o staničnoj liniji i matriksu koji se koristi. Tako primjerice stanice linije JIMT1 raka dojke rastu gotovo 2 puta brže u Matrigelu, nego u 2D kulturi, dok ista linija raste 7 puta sporije na sintetičkom 3D nosaču nego u 2D

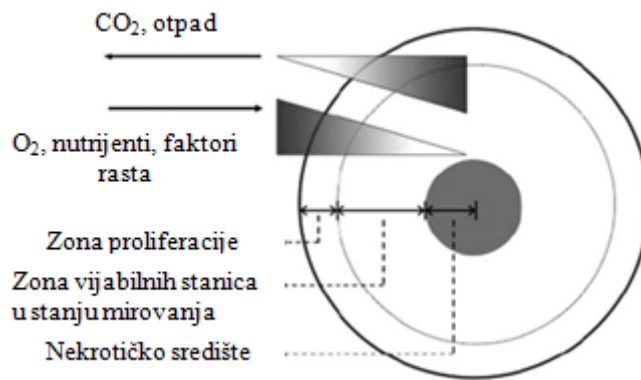
kulturi (Hongisto i sur., 2013). Vijabilnost u prvih nekoliko dana nije značajnije drugačija nego u 2D kulturi te je čak u nekoliko slučajeva u kasnijim danima uzgoja bila manja u odnosu na 2D kulturu, što je posljedica manje dostupnosti kisika i nutrijenata te nakupljanja otpadnih produkata u središtu sferoida (Khaitan i sur., 2006).

Kada uspoređujemo strukturu kolonija različitih staničnih linija, u 2D kulturi ne uočavamo značajne razlike između nastalih monoslojeva. Međutim, kada se te iste linije uzgajaju u 3D kulturi, do izražaja dolaze različitosti u strukturi formiranog sferoida (Edmondson i sur., 2014). Tako su strukture 3D sferoida koje formiraju stanične linije raka dojke klasificirane u 4 grupe: okrugli, nagomilan, sličan grozdu i zvjezdast. Stanice u okruglim sferoidima pokazuju čvrste međustanične adhezijske sile i njihove jezgre su smještene oko središta kolonije. Karakteristike nagomilanih sferoida su obli obrubi kolonije, neorganizirano smještene jezgre u odnosu na središte kolonije, popunjeno središte kolonije i dobra komunikacija među stanicama. Njihov promjer je obično veći od promjera okruglih sferoida. Glavna obilježja sferoida sličnih grozdu su slabe interakcije između stanica i neorganizirano smještene jezgre. Zvjezdasti sferoidi imaju produžena stanična tijela koja ih mogu povezivati s drugim kolonijama i ulaziti u matrikse. Na Slici 3. vide se navedene vrste sferoida snimljene fluorescentnim mikroskopom (Kenny i sur., 2007).



Slika 3. Fluorescencija F-aktina i jezgre. S lijeva: okrugli, nagomilani, sličan grozdu i zvjezdasti sferoid (Kenny i sur., 2007).

U 3D kulturama bolje se oponašaju međustanične interakcije i interakcije stanica s komponentama ekstracelularnog matriksa, nego u 2D kulturama. Međutim, postojeći 3D modeli nemaju adekvatni vaskularni sustav koji bi *in vivo* opskrbljivao tkiva kisikom i nutrijentima, a odvodio razgradne produkte. Navedeni procesi se u 3D kulturama provode difuzijom, što je dostatno za male, ali ne i za veće sferoide (Edmondson i sur., 2014). Na Slici 4 shematski je prikazan smještaj vijabilnih stanica u sferoidu s obzirom na difuziju plinova i hranjivih tvari (Lin i Chang, 2008).



Slika 4. Smještaj vijabilnih stanica u sferoidu s obzirom na difuziju plinova i hranjivih tvari (Lin i Chang, 2008).

2.2.4. Usporedba djelovanja lijeka na stanice u 2D i 3D kulturama

Spomenuti prikaz difuzije plinova i hranjivih tvari može imati utjecaj na djelovanje lijeka na stanice u 3D sustavu. Naime, lijek difundira jednako kao i hranjive tvari te su, zbog limitirane difuzije, vanjske stanice najviše izložene njegovu djelovanju. Prisutnost hipoksičnih stanica, koje se također javljaju kao posljedica ograničene difuzije, pridonosi većoj otpornosti sferoida na lijek jer u njima dolazi do aktivacije gena uključenih u preživljavanje stanice i osjetljivost na lijekove (Edmondson i sur., 2014). Međutim, najveći utjecaj na veću otpornost tumorskih stanica na lijekove u 3D kulturi u odnosu na 2D imaju signali koji nastaju zbog interakcija sa susjednim stanicama i ekstracelularnim matriksom (Walker i sur., 2003). Tvrdnju da su stanice u 3D kulturi otpornije na lijekove u odnosu na stanice iz 2D kulture podupiru brojna istraživanja. Primjerice, stanice raka debelog crijeva HCT-116 tretirane su s četiri standardna antitumorska lijeka (melfalan, 5-fluorouracil, oksaliplatin i irinotecan) i 2 lijeka koji su u fazi istraživanja (akriflavin i VLX50). U 2D kulturi svi lijekovi pokazali su visoku učinkovitost, za razliku od 3D kulture u kojoj su, osim niže citotoksičnosti, postupno gubili antitumorsku aktivnost (Karlsson i sur., 2012). Vrlo slični rezultati dobiveni su u istraživanju preživljenja stanica raka jajnika nakon tretmana paklitakselom, gdje je preživljenje u 3D kulturi iznosilo 40 do 60%, dok je isti lijek u 2D kulturi rezultirao tek s 20%-tnim preživljenjem stanica (Loessner i sur., 2010).

Međutim, postoje i oprečna istraživanja koja pokazuju da stanice u 3D kulturi mogu biti osjetljivije na lijek u odnosu na stanice u 2D kulturi. Tako je, primjerice, metatreksat inhibirao rast JIMT1 stanica raka dojke u Matrigel 3D modelu, a u 2D kulturi i polyHEMA 3D modelu je pokazao slabiju inhibiciju. S druge strane, API-2 (inhibitor Akt puta) pokazao se najefikasnijim u polyHEMA modelima, slabi učinak je imao u Matrigelu, dok je u 2D sustavu

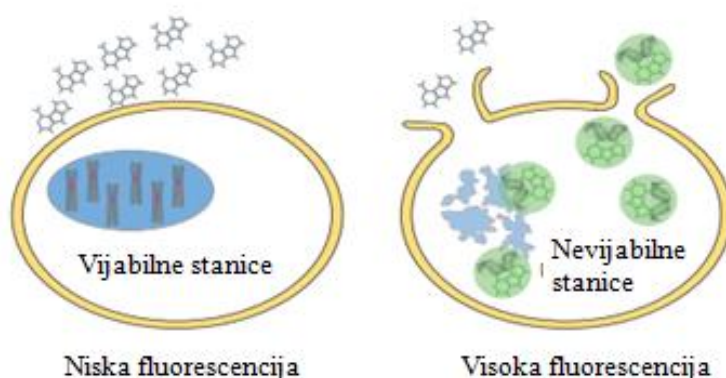
bio neučinkovit (Hongisto i sur., 2013). Isto tako, stanice raka prostate uzgajane u 2D kulturi pokazale su veću otpornost na kampotecin, u odnosu na stanice u 3D sustavu izrađenom od hidrogela na bazi hijaluronske kiseline, dok se kampotecin u kombinaciji s doksorubicinom pokazao jednako učinkovit u 2D i 3D kulturi (Gurski i sur., 2009). Iz toga vidimo da nije moguće donijeti generalni zaključak o osjetljivosti staničnih kultura u nekom *in vitro* modelu na osnovu rezultata dobivenih istraživanjem jednog lijeka ili jedne stanične linije.

2.2.5. Određivanje učinkovitosti lijeka u 3D kulturi

Učinkovitost lijeka određuje se iz preživljenja stanica nakon tretmana. Postoje razni testovi za određivanje preživljenja stanica u 3D kulturi, a u eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su sljedeći: CellTox Green Cytotoxicity, RealTime-Glo MT Cell Viability i CellTiter-Glo 3D Cell Viability test.

2.2.5.1. Određivanje broja mrtvih stanica CellTox Green Cytotoxicity testom

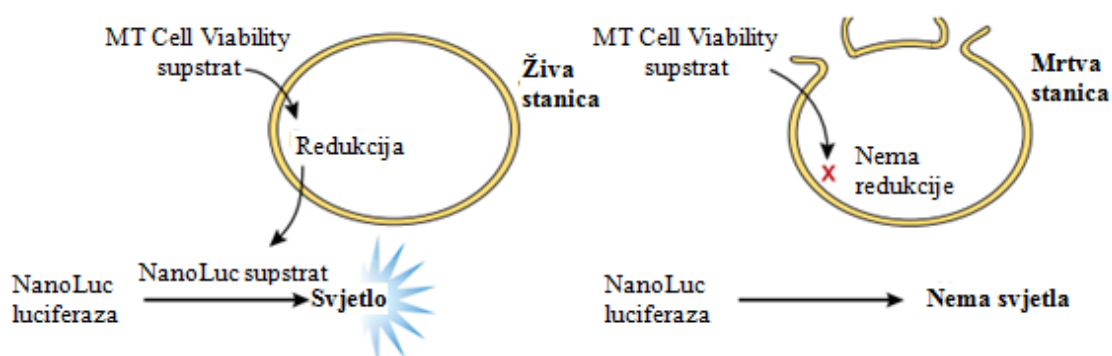
CellTox Green Cytotoxicity je test koji koristi cijaninsku boju koja nije toksična i ulazi u mrtve stanice gdje se veže na DNA (Slika 5.). Korištenje CellTox Green boje omogućuje određivanje brojnosti mrtvih stanica uslijed gubitka selektivne permeabilnosti stanične membrane. Ulaz/vezanje boje na DNA u mrtvim stanicama povećava intenzitet fluorescencije boje, dok žive stanice ne utječu bitno na fluorescenciju. Ovaj test pogodan je za određivanje citotoksičnosti lijeka jer je fluorescentni signal koji nastaje vezanjem boje na DNA u mrtvim stanicama proporcionalan stupnju citotoksičnosti (Promega).



Slika 5. CellTox Green boja veže se na DNA stanica s oštećenom membranom (Promega)

2.2.5.2. Određivanje broja živih stanica RealTime-Glo MT Cell Viability testom

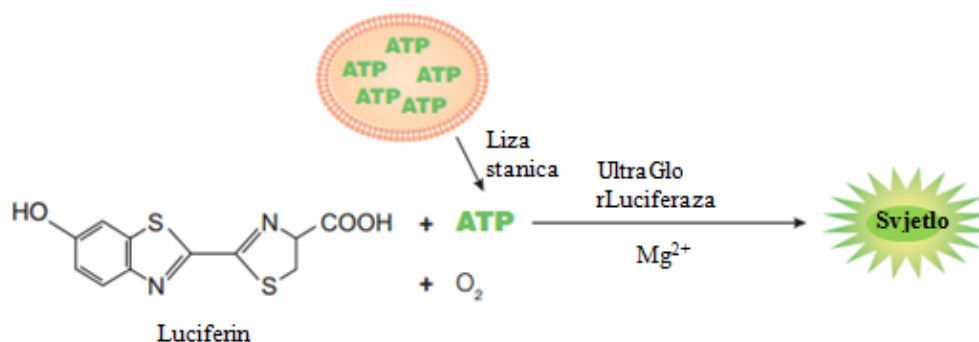
RealTime-Glo MT Cell Viability testom određuje se broj živih stanica mjerenjem njihovog reducirajućeg potencijala, ovisno o staničnoj metaboličkoj aktivnosti. Kulturi stanica dodaje se prosupstrat, MT Cell Viability supstrat, koji slobodno prolazi kroz membranu. Vijabilne stanice reduciraju prosupstrat u supstrat za NanoLuc luciferazu, koja se dodaje zajedno s prosupstratom. Nastali reducirani supstrat difundira iz stanice u medij gdje ga luciferaza koristi za proizvodnju luminiscentnog signala (Slika 6.). Ovaj test pogodan je za određivanje učinka lijeka na smanjenje vijabilnosti jer je nastali signal proporcionalan broju živih stanica (Promega).



Slika 6. Nastajanje luminiscentnog signala (Promega)

2.2.5.3. Određivanje broja živih stanica CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom

CellTiter-Glo 3D Cell Viability je test kojim se određuje broj vijabilnih stanica. Reagens sadrži luciferin, Ultra-Glo rekombinantnu termostabilnu luciferazu i litički reagens. Dodatak reagensa uzrokuje lizu stanica, otpušta se ATP te nastaje luminiscentni signal (Slika 7.). Količina otpuštenog ATP-a direktno je proporcionalna broju vijabilnih stanica (Promega).



Slika 7. Princip CellTiter-Glo 3D Cell Viability testa (Promega)

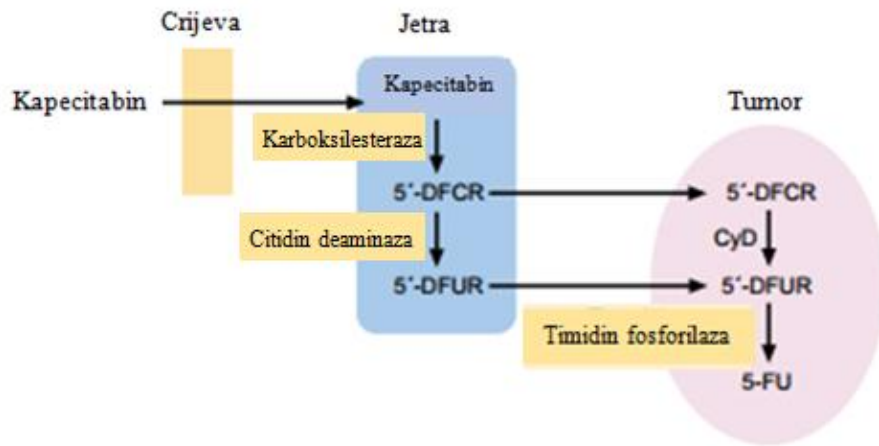
2.3. ANTITUMORSKI LIJEKOVI

2.3.1. Kapecitabin

Kapecitabin je generički naziv za lijek trgovačkog imena Xeloda, koji se koristi kao antitumorski lijek. Koristi se primarno za liječenje raka debelog crijeva i dojke, a može se koristiti i za liječenje nekih drugih tumora kao npr. raka gušterače. U liječenju raka dojke, pokazao je sinergijsku aktivnost s mnogim drugim lijekovima i biološkim agensima, npr. taksanima, mitomicinom C, antraciklinima, radioterapijom itd. (Gelmon i sur., 2006). Kapecitabin pripada skupini lijekova koji se nazivaju antimetaboliti, to su tvari strukturno slične metabolitima koje mogu inhibirati cijeli niz staničnih reakcija. U slučaju kapecitabina dolazi do nemogućnosti dijeljenja stanice. Općenito, antimetaboliti nisu specifični za stanični ciklus, ali kapecitabin je jer u konačnici djeluje kao inhibitor timidilat sintaze tijekom sinteze nukleinskih kiselina te se ugrađuje u nukleinske kiseline. Kapecitabin je prolijek, fluoropirimidin povećane selektivnosti na tumorske stanice koji se nizom reakcija prevodi u lijek (aktivni spoj), 5-fluorouracil (5-FU), koji se dalje prevodi u citotoksične komponente: (i) fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) koji se veže umjesto prekursora nukletioda na timidilat sintazu i tako inhibira sintezu DNA (Chen i sur., 2017), (ii) fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) koji utječe na sintezu DNA inkorporiranjem u novonastali lanac umjesto deoksitimidin trifosfata (dTTP), (iii) fluorouridin trifosfat (FUTP) koji utječe na sintezu RNA ugradnjom umjesto uridin trifosfata (UTP) (Miura i sur., 2010).

Međutim, 5-FU se istovremeno i inaktivira djelovanjem dihidropirimidin dehidrogenaze, enzima odgovornog za prvi korak razgradnje 5-FU (Endo i sur., 2003). Kapecitabin je razvijen kako bi se povećala efikasnost i sigurnost primjene 5-FU, što se ostvaruje povećanjem koncentracije lijeka u samom tumoru (lokalno) čime se posljedično smanjuje sistemska izloženost lijeku (Blum, 2001). Kako bi se postigla željena selektivnost, kapecitabin je dizajniran da predstavlja supstrat za tkivno-specifičnu timidin fosforilazu, jednog od enzima u metaboličkom putu pretvorbe kapecitabina u 5-FU (Miwa i sur., 1998). Kapecitabin se prevodi u 5-FU kroz tri enzimске reakcije (Slika 8.): u jetri karboksilesteraza prevodi kapecitabin u 5'-deoksi-5-fluorocitidin (5'-DFCR) koji se potom, djelovanjem citidin deaminaze, prevodi u 5'-deoksi-5-fluorouridin (5'-DFUR). Posljednja reakcija je pretvorba 5'-deoksi-5-fluorouridina u 5-fluorouracil (5-FU), što katalizira timidin fosforilaza (Blum, 2001). Značajno više koncentracije enzima timidin fosforilaze uočene su u mnogim tumorskim tkivima u odnosu na zdrava tkiva (Miwa i sur., 1998), zbog čega su ove reakcije specifičnije za maligne stanice (Blum, 2001) i rezultiraju većim „otpuštanjem“ lijeka upravo u

tumoru (Gelmon i sur., 2006). Prema tome, antitumorski učinak kapecitabina ovisi o aktivnosti timidin fosforilaze i enzima odgovornog za razgradnju 5-FU, dihidropirimidin dehidrogenaze. U prilog tome, povišenje ekspresije dihidropirimidin dehidrogenaze predstavlja jedan od mehanizama otpornosti stanica na kapecitabin (Endo i sur., 2003).



Slika 8. Enzimska pretvorba kapecitabina u 5-fluorouracil (Blum, 2001).

2.3.2. Quisinostat

Inhibitori histon deacetilaza skupina su antitumorskih agenasa koji utječu na acetilacijsko stanje histona i drugih proteina te posljedično uzrokuju promjenu u ekspresiji gena, induciraju apoptozu, zastoj staničnog ciklusa i diferencijaciju (Venugopal i sur., 2013). Oni povećavaju količinu acetiliranih histona, što promovira ponovnu ekspresiju utišanih regulacijskih gena u tumorskim stanicama i mijenja maligni fenotip (Mottamal i sur., 2015). Quisinostat, poznat i kao JNJ-26481585, je hidroksamat koji djeluje kao nespecifični inhibitor histon deacetilaza klase I i II, ima širok spektar antiproliferativne aktivnosti prema staničnim linijama raka pluća, dojke, debelog crijeva i jajnika (Venugopal i sur., 2013). Aktivira kaspaze i može pospješiti acetilaciju p53 sprječavanjem njegove interakcije s histon deacetilazom 6, što dovodi do aktivacije p53 i zaustavljanja staničnog ciklusa u G₁ fazi, te u konačnici, apoptoze (Li i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanična linija

Korištena stanična linija tumora mliječne žlijezde miša (eng. *mouse mammary adenocarcinoma*; mMCa) uspostavljena je 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

Kapecitabin, CAP, *Sigma-Aldrich*, SAD

Quisinostat, QUS, *Selleckchem*, SAD

Metanol (čistoća: HPLC), *Kemika*, Hrvatska

Dimetil-sulfoksid, DMSO, *Sigma-Aldrich*, SAD

Dulbecco modificirani Eagelov medij/F-12 (DMEM/F12), *Capricorn Scientific*, Njemačka

Fetalni serum teleta (eng. *fetal calf serum*; FCS), *Gibco*, Australija

Fosfatni pufer (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS), *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

RealTime-Glo MT Cell Viability Assay kit, *Promega*, SAD

CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay kit, *Promega*, SAD

3.1.3. Lijekovi

Kapecitabin (359,35 g/mol):

Ishodna otopina kapecitabina za 2D kulturu, koncentracije 300 mM, priprema se otapanjem 53,9 mg praškastog kapecitabina u 0,5 mL sterilnog metanola.

Ishodna otopina kapecitabina za 3D kulturu, koncentracije 1,2 M, priprema se otapanjem 216 mg praškastog kapecitabina u 0,5 mL sterilnog metanola.

Quisinostat (394,47 g/mol):

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

Otopina quisinostata koncentracije 20 µM priprema se razrjeđivanjem ishodne otopine koncentracije 20 mM u PBS-u u omjeru 1 : 1000.

Otopina quisinostata za 2D kulturu, koncentracije 5 µM, priprema se razrjeđivanjem shodne otopine koncentracije 20 µM u PBS-u u omjeru 1 : 4.

Otopina quisinostata za 3D kulturu, koncentracije 2 µM, priprema se razrjeđivanjem ishodne otopine koncentracije 20 µM u PBS-u u omjeru 1 : 10.

3.1.4. Medij i otopine

Medij za uzgoj stanica priprema se miješanjem kupljenog medija DMEM/F12 i 10 % od ukupnog volumena FCS-a.

PBS se priprema razrjeđivanjem kupljenog PBS-a (10×) s vodom za injekcije u omjeru 1 : 10.

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

3.1.5. Pločice i boce za uzgoj stanica

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

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

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

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

T-25 boca za uzgoj stanica, *Corning*, SAD

3.2. UREĐAJI

Laminar

Inkubator Herasafe, *Heraeus*

Centrifuga, *Eppendorf*

Tresilica za epruvete

Invertni mikroskop Eclipse, *Nikon*

Vakuurni 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*

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

3.3. METODE

Za određivanje vijabilnosti stanica primjenjivane tumorske stanične linije mMCa korištene su tri metode: resazurin test za 2D kulture te RealTime-Glo MT Cell Viability test i CellTiter-Glo 3D Cell Viability test za 3D kulture. Kod 3D kultura određivao se i broj mrtvih stanica, primjenom CellTox Green Cytotoxicity testa.

Eksperimenti na 2D i 3D staničnim kulturama tumora mliječne žlijezde miša imali su za svrhu (i) istražiti utjecaj koncentracije (doze) kapecitabina na vijabilnost stanica (*dose response*), istražiti adjuvantni utjecaja pomoćne tvari (quisinostata) na djelovanje kapecitabina i to u slučaju kada se ona koristi kao (ii) predtretman (prije izlaganja kapecitabinu) odnosno (iii) u istovremenom tretmanu zajedno s kapecitabinom.

3.3.1. Subkultiviranje kulture (pasažiranje)

Sve otopine prije početka rada sa stanicama ugrijane su na sobnu temperaturu.

Iz plastične boce za uzgoj stanica volumena 25 mL u kojoj su uzgojene stanice tumora mliječne žlijezde miša, pomoću vakuum pumpe izvučen je medij i dodano je 5 mL sterilnog PBS-a kako bi se isprala kultura i uklonile mrtve stanice koje se ne drže za podlogu. Na isti način uklonjen je i PBS, dodan je 1 mL otopine tripsin/EDTA (0,25 %) te je inkubirano 3 minute na 37 °C, kako bi se adherirane stanice odvojile od podloge. Kada su stanice odvojene od podloge, dodan je isti volumen (1 mL) FCS-a kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Dobivena suspenzija prenesena je u sterilnu epruvetu za centrifugiranje i centrifugirana je 5 minuta na 400 \times g. Nakon što je uklonjen supernatant, stanični talog je resuspendiran u 1 mL kompletnog medija (DMEM/F12 + 10 % FCS-a) korištenjem tresilice za epruvete. Za brojanje stanica, pripremljena je suspenzija od 70 μ L PBS-a, 20 μ L tripanskog modrila i 10 μ L suspenzije stanica te je mikroskopski određena koncentracija stanica brojanjem u komorici. U novu plastičnu bocu za uzgoj stanica volumena 25 mL nacijepljeno je 200 000 stanica u 5 mL kompletnog medija.

3.3.2. Postavljanje 2D kulture na 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu za uzgoj stanica

Za utvrđivanje utjecaja koncentracije kapecitabina (CAP) na vijabilnost tumorskih stanica i istovremeni tretman s quisinostatom, korištena je suspenzija stanica koncentracije 125 000 st./mL u DMEM/F12 + 10 % FCS-a. U svaku jažicu 96-jažične mikrotitarske pločice dodano je 160 μ L suspenzije (20 000 st./jažici). Kao kontrola korištene su jažice u koje je, umjesto stanica, dodano samo 160 μ L medija. Test je izvođen u triplikatu.

Za predtretman quisinostatom i naknadni tretman kapecitabinom koncentracija suspenzije stanica prilagođena je na 11 111 st./mL u kompletnom mediju. Na ploču je nasadeno 180 μ L suspenzije (2 000 stanica) po jažici u triplikatu. Razlog nacjeppljivanja manjeg broja stanica je to što se stanice repliciraju tijekom predtretmana s quisinostatom i do trenutka dodavanja kapecitabina trebale bi otprilike doseći 20 000 st./jažici.

Inkubacija pločice tijekom cijelog eksperimenta (izuzev vremena potrebnog za manipulacije) provodi se pri 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj sa 5 % CO₂.

3.3.2.1. Utjecaj koncentracije kapecitabina na vijabilnost stanica

Dan nakon uspostavljanja adherentne kulture, odnosno prihvaćanja stanica za podlogu, u jažice triplikata dodani su određeni volumeni serijski razrijeđenih otopina kapecitabina (60 mM, 30 mM, 15 mM, 7,5 mM i 3,75 mM) koje su pripremljene iz ishodne otopine koncentracije 300 mM (način pripreme ishodne otopine opisan je u poglavlju 3.1.2.). Na isti način pripremljena su razrjeđenja metanola koja predstavljaju negativne kontrolne uzorke. U jažice je dodano po 20 μ L pripremljenih otopina. U neke jažice s 2D kulturom dodan je samo medij DMEM/F12 + 10 % FCS-a, koji je također dodan i u jažicu bez stanica (Tablica 1.). Nakon ukupno 70 sati djelovanja lijeka, dodano je po 20 μ L otopine rasazurina u sve jažice (ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 200 μ L). Nakon 2 sata inkubacije na 37 °C i 5 % CO₂ izmjerena je apsorbancija na 570 nm i 600 nm.

Tablica 1. Postavljanje eksperimenta za utvrđivanje utjecaja koncentracije kapecitabina (CAP) na vijabilnost stanica

| | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 20 000 stanica + 6 mM CAP | 20 000 stanica + 6 mM CAP | 20 000 stanica + 6 mM CAP | 20 000 stanica + metanol |
| 20 000 stanica + 3 mM CAP | 20 000 stanica + 3 mM CAP | 20 000 stanica + 3 mM CAP | 20 000 stanica + metanol |
| 20 000 stanica + 1,5 mM CAP | 20 000 stanica + 1,5 mM CAP | 20 000 stanica + 1,5 mM CAP | 20 000 stanica + metanol |
| 20 000 stanica + 0,75 mM CAP | 20 000 stanica + 0,75 mM CAP | 20 000 stanica + 0,75 mM CAP | 20 000 stanica + metanol |
| 20 000 stanica + 0,375 mM CAP | 20 000 stanica + 0,375 mM CAP | 20 000 stanica + 0,375 mM CAP | 20 000 stanica + metanol |
| 20 000 stanica + medij | 20 000 stanica + medij | medij | medij |

Podaci su obrađeni kako je opisano u poglavlju 2.2.2.1. te je izračunat postotak preživjelih stanica. Iz dobivenih rezultata odabrana je koncentracija lijeka koja ubije približno 50 % stanica i korištena za daljnje postupke.

3.3.2.2. Istovremeni tretman tumorskih stanica kapecitabinom i quisinostatom

Dan nakon uspostavljanja kulture, u sve jažice u kojima je istraživano djelovanje lijeka dodano je po 20 μ L otopine kapecitabina u koncentraciji pri kojoj je preživljenje tumorskih stanica bilo oko 50 %, a što je određeno prethodnim (3.3.2.1.) eksperimentom (u ovom radu je to 50 mM kako bi konačna koncentracija kapecitabina bila 5 mM). Koncentracija korištene otopine quisinostata je 5 μ M (pripremljena na način opisan u poglavlju 3.1.2.). Da bi se postigle radne koncentracije od 100 nM, 50 nM i 25 nM, u jažice je dodano po 3,6 μ L, 1,8 μ L i 0,9 μ L otopine u triplikatu. Medij DMEM/F12 + 10 % FCS-a je dodan u jažice koje sadrže ili samo stanice ili samo medij. U dvije jažice sa stanicama, dodan je samo lijek kako bi se dobila referenta vrijednost učinka lijeka. Nakon ukupno 70 sati djelovanja lijeka, dodano je po 20 μ L otopine resazurina u sve jažice (ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 200 μ L). Nakon 2 sata inkubacije pri 37 °C i 5 % CO₂ izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru i to dvije valne duljine od 570 nm i 600 nm.

Prikaz postavljenog eksperimenta je u Tablici 2.

Tablica 2. Postavljanje eksperimenta za istovremeni tretman kapecitabinom (CAP) i quisinostatom (QUS) u 2D kulturi

| | | | | | |
|--|--|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 20 000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 20 000 stanica + 100 nM QUS | 20 000 stanica + 100 nM QUS | 20 000 stanica + 100 nM QUS |
| 20 000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 20 000 stanica + 50 nM QUS | 20 000 stanica + 50 nM QUS | 20 000 stanica + 50 nM QUS |
| 20 000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 20 000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 20 000 stanica + 25 nM QUS | 20 000 stanica + 25 nM QUS | 20 000 stanica + 25 nM QUS |
| 20 000 stanica + medij | 20 000 stanica + medij | 20 000 stanica + 5 mM CAP | 20 000 stanica + 5 mM CAP | medij | medij |

Rezultati su obrađeni kao i u prethodnom postupku.

3.3.2.3. Predtretman quisinostatom i tretman kapecitabinom

Dan nakon uspostavljanja kulture, u većinu jažica dodan je quisinostat i to u volumenima od 3,6 μL , 1,8 μL i 0,9 μL otopine koncentracije 5 μM , kako bi se postigle radne koncentracije od 100 nM, 50 nM i 25 nM. Nakon 72 sata inkubacije pri 37 °C i 5 % CO_2 , zamijenjen je medij u svim jažicama (umjesto 180 μL , dodano je 160 μL) i u triplikatima je dodano po 20 μL otopine kapecitabina koncentracije 50 mM (kako bi konačna koncentracija kapecitabina bila 5 mM), koja je dodana i u 2 jažice u kojima su bile samo stanice. U preostale jažice gdje se ne dodaje kapecitabin, dodano je po 20 μL kompletnog medija. Eksperiment je postavljen na način prikazan u Tablici 3. Nakon 70 sati inkubacije u sve jažice je dodano po 20 μL resazurina (ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 200 μL) i dodatno inkubirano 2 sata pri 37 °C i 5 % CO_2 . Apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru i to dvije valne duljine od 570 nm i 600 nm.

Rezultati su obrađeni kao i u prethodna 2 postupka.

Tablica 3. Postavljanje eksperimenta za predtretman quisinostatom (QUS) i tretman kapecitabinom (CAP) u 2D kulturi

| | | | | | |
|--|--|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 2000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 100 nM QUS | 2000 stanica + 100 nM QUS | 2000 stanica + 100 nM QUS | 2000 stanica + 100 nM QUS |
| 2000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 50 nM QUS | 2000 stanica + 50 nM QUS | 2000 stanica + 50 nM QUS | 2000 stanica + 50 nM QUS |
| 2000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 2000 stanica + 5 mM CAP + 25 nM QUS | 2000 stanica + 25 nM QUS | 2000 stanica + 25 nM QUS | 2000 stanica + 25 nM QUS |
| 2000 stanica + medij | 2000 stanica + medij | 2000 stanica + 5 mM CAP | 2000 stanica + 5 mM CAP | medij | medij |

3.3.3. Postavljanje 3D kulture na 96-jažičnoj mikrotitarskoj pločici s U dnom

Za predtretman quisinostatom, na 6-jažičnu ploču s ravnim dnom nasadeno je po 200 000 stanica u 3 jažice i dodano medija do 2 mL. Sljedeći dan je u jažice 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. Nakon još jednog dana, zamijenjen je medij i dodani isti volumeni ishodne otopine quisinostata. Četvrti dan proveden je postupak pasažiranja opisan pod 3.3.1., nakon čega slijedi postupak opisan u nastavku.

Koncentracija suspenzije stanica (za predtretman stanice tretirane quisinostatom na 6-jažičnoj ploči, a za istovremeni tretman i istraživanje utjecaja koncentracije lijeka na vijabilnost stanica korištene su netretirane stanice iz plastične boce za uzgoj stanica) prilagođena je na 28 000 st./mL u DMEM/F12 + 10 % FCS-a. Na 96-jažičnu pločicu s U dnom i ultra niskom prijanjajućom površinom nasadeno je po 90 μ L suspenzije (2 500 st./jažici) u jažice. U kontrolne jažice dodano je samo po 90 μ L medija.

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. Takve stanice koriste se i za 4. stupac u Tablici 5. kod predtretmana.

Inkubacija pločice tijekom cijelog eksperimenta (izuzev vremena potrebnog za manipulacije) provodi se pri 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj sa 5 % CO₂.

3.3.3.1. Utjecaj koncentracije kapecitabina na vijabilnost stanica

Sljedeći dan, kada se formirao sferoid, dodana su serijska razrjeđenja kapecitabina (120 mM, 60 mM, 30 mM, 15 mM i 7,5 mM) koja su pripremljena iz ishodne otopine koncentracije 1,2 M, čija priprema je opisana u poglavlju 3.1.2. U jažice je dodano po 10 µL pripremljenih otopina u triplikatu. Na isti način je pripremljen metanol u najvišoj koncentraciji (kao i lijek koncentracije 120 mM) i dodan u jednu jažicu sa stanicama. U određene jažice sa stanicama dodan je samo medij, koji je također dodan i u jažicu bez stanica (Tablica 4.). Ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 100 µL. Peti dan, nakon ukupno 72 sata inkubacije s lijekom, provedeno se određivanje broja stanica, na način opisan u poglavlju 3.3.4.

Iz dobivenih rezultata odabrana je koncentracija koja ubije približno 50 % stanica i korištena je za daljnje postupke.

Tablica 4. Postavljanje eksperimenta za utvrđivanje utjecaja koncentracije kapecitabina (CAP) na vijabilnost stanica u 3D kulturi

| | | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 2500 stanica + 12 mM CAP | 2500 stanica + 12 mM CAP | 2500 stanica + 12 mM CAP | 2500 stanica + medij |
| 2500 stanica + 6 mM CAP | 2500 stanica + 6 mM CAP | 2500 stanica + 6 mM CAP | 2500 stanica + medij |
| 2500 stanica + 3 mM CAP | 2500 stanica + 3 mM CAP | 2500 stanica + 3 mM CAP | 2500 stanica + metanol |
| 2500 stanica + 1,5 mM CAP | 2500 stanica + 1,5 mM CAP | 2500 stanica + 1,5 mM CAP | medij |
| 2500 stanica + medij | 2000 stanica + medij | 1500 stanica + medij | 1000 stanica + medij |

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

3.3.3.2. Istovremeni tretman kapecitabinom i quisinostatom

Dan nakon uspostavljanja 3D kulture tumorskih stanica, u sve jažice u kojima je istraživano djelovanje lijeka dodano je po 10 μ L otopine kapecitabina u koncentraciji pri kojoj je preživljenje tumorskih stanica bilo oko 50 %, a što je određeno prethodnim (3.3.3.1.) eksperimentom:

20 mM za CellTiter-Glo 3D Cell Viability test

40 mM za RealTime-Glo MT Cell Viability test i CellTox Green Cytotoxicity test.

Koncentracija korištene otopine quisinostata je 2 μ M. Da bi se postigle radne koncentracije od 100 nM, 50 nM i 25 nM, u jažice s kapecitabinom je dodano po 5 μ L, 2,5 μ L i 1,25 μ L otopine quisinostata u triplikatu za svaku koncentraciju. Medij DMEM/F12 + 10 % FCS-a je dodan u jažice koje sadrže ili samo stanice ili samo medij. U jednu jažicu sa stanicama dodan se samo lijek, a u jednu metanol. Ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 100 μ L. Peti dan eksperimenta, nakon ukupno 72 sata djelovanja lijeka, provedeno je određivanje broja stanica. Prikaz postavljenog eksperimenta je u Tablici 5.

Tablica 5. Postavljanje eksperimenta za (i) istovremeni tretman i (ii) predtretman quisinostatom (QUS) i kapecitabinom (CAP) u 3D kulturi

| | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| 2500 stanica + mM CAP + 100 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 100 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 100 nM QUS | 2500 stanica + medij |
| 2500 stanica + mM CAP + 50 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 50 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 50 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP |
| 2500 stanica + mM CAP + 25 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 25 nM QUS | 2500 stanica + mM CAP + 25 nM QUS | 2500 stanica + metanol |
| 2500 stanica + 100 nM QUS | 2500 stanica + 50 nM QUS | 2500 stanica + 25 nM QUS | medij |
| 2500 stanica + medij | 2000 stanica + medij | 1500 stanica + medij | 1000 stanica + medij |

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

3.3.3.3. *Predtretman quisinostatom i tretman kapecitabinom*

Dan nakon uspostavljanja 3D kulture tumorskih stanica, u većinu jažica dodano je po 10 μ L otopine kapecitabina koncentracije:

20 mM za CellTiter-Glo 3D Cell Viability test

40 mM za RealTime-Glo MT Cell Viability test i CellTox Green Cytotoxicity test.

U jednu jažicu sa stanicama dodan je samo lijek, a u jednu najviša koncentracija metanola. U jažicu s medijem dodan je medij. Ukupni volumen u svakoj jažici iznosi 100 μ L. Eksperiment je postavljen na način prikazan u Tablici 5. Nakon inkubacije 72 sata, provedeno je određivanje broja stanica.

3.3.4. Određivanje broja mrtvih/živih stanica u 3D kulturi

Iz svake jažice uklonjeno je 50 μ L medija, pažljivo kako se ne bi povukao sferoid. Nakon uklanjanja medija, ostane još 50 μ L na koje će se dodavati isti volumen pripremljenih otopina za određivanje broja stanica kako bi se postigla radna koncentracija boje (detaljnije objašnjeno u nastavku).

3.3.4.1. *CellTox Green Cytotoxicity test*

Kit, koji se sastoji od: CellTox Green boje, 1000 \times ; pufera i lizirajuće otopine, inkubiran je na sobnoj temperaturi prije uporabe. Pripremljena je otopina boje dostatna za sva 3 eksperimenta, tako da su pufer i boja pomiješani u sterilnoj plastičnoj tubici. Potrebno je pripremiti koncentraciju 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 ukupni volumen pripremljene boje ovisi o broju uzoraka. U svaku jažicu, koja sadrži 50 μ L stanične suspenzije, dodano je 50 μ L pripremljene otopine boje koncentracije 2 \times te je tako postignuta radna koncentracija boje. U jažice koje će se koristiti za kalibraciju, dodano je još i 4 μ L lizirajuće otopine. 96-jažična mikrotitarska pločica s U dnom je miješana na orbitalnoj tresilici 60 sekundi na 700-900 rpm, nakon čega je inkubirana 15 minuta. Ponovno je miješana na orbitalnoj tresilici, nakon čega je izmjerena fluorescencija. Postavke na uređaju:

ekscitacija 485-500 nm

emisija 520-530 nm

vrijeme integracije 0,25-1 sekundi/jažici

96-jažična pločica sa U dnom.

3.3.4.2. RealTime-Glo MT Cell Viability test

Kit se sastoji od MT Cell Viability supstrata, 1000× i NanoLuc enzima, 1000×. Ukupni volumen pripremljene otopine također mora biti dostatan za sva 3 eksperimenta, a koncentracija obje komponentne mora biti 2×. Otopina je pripremljena miješanjem kompletnog medija, MT Cell Viability supstrata i NanoLuc enzima, zagrijanih na sobnu temperaturu, u omjerima 500 : 1 : 1. U svaku jažicu dodano je 50 μL pripremljene otopine te je ploča inkubirana 15 minuta na 37 °C. Iz svake jažice je preneseno 70 μL medija (paziti da se ne povuku sferoidi) na bijelu 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom te je mjerena luminiscencija. Vrijeme integracije podešeno je na 1 sekundu/jažici.

3.3.4.3. CellTiter-Glo 3D Cell Viability test

Kit je preko noći odmrznut na 4 °C te pola sata prije korištenja zagrijan u vodenoj kupelji na 22 °C. Kit se sastoji od CellTiter-Glo 3D reagensa, 2×, koji je prije uporabe promiješan laganim izokretanjem. U svaku jažicu je preneseno 50 μL i pločica je snažno promiješana na orbitalnoj tresilici kako bi se lizirale stanice. Sadržaj jažice je potom prenesen na bijelu 96-jažičnu mikrotitarsku pločicu i inkubirano je na sobnoj temperaturi 30 minuta, nakon čega je mjerena luminiscencija. Vrijeme integracije podešeno je na 0,1 sekundu/jažici.

3.4. ANALIZA I STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao postotak preživjelih/umrlih stanica u tretiranom uzorku u odnosu preživjele/umrle stanice u netretiranom uzorku. Dakle, netretirani uzorak (stanice + kompletni medij) korišten je kao kontrola, a kao negativna kontrola je korišten uzorak u kojem je stanicama, osim medija, dodan i metanol.

Za određivanje vijabilnosti stanica u 2D kulturi korišten je resazurin test. Kako pri mjerenim valnim duljinama (570 nm i 600 nm) apsorbiraju i oksidirani i reducirani oblik, prvo je izračunat postotak redukcije 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
tx - određeni uzorak

Detaljnije objašnjenje dostupno je u radu Lee, 2017.

Kod testova korištenih za određivanje vijabilnosti/umiranja stanica u 3D kulturi, izmjerena vrijednost apsorbancije proporcionalna je broju živih/mrtvih stanica te je iz izmjerenih vrijednosti direktno izračunat postotak preživljenja/umiranja.

Statistička obrada rezultata provedena je u programu Microsoft Excel.

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

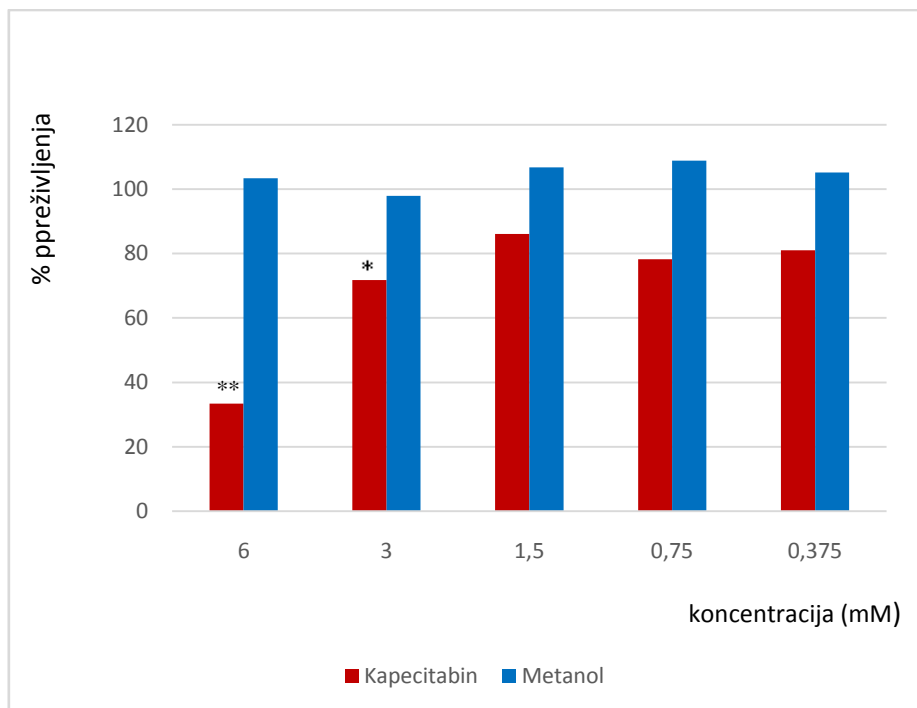
Cilj rada bio je istražiti utjecaj pomoćne tvari quisinostata na citotoksičnost lijeka kapecitabina u 2D i 3D kulturi stanica tumora mliječne žlijezde miša. Eksperiment je koncipiran tako da se nakon ispitivanja utjecaja doze kapecitabina na vijabilnost stanica (*dose response*) odredila koncentracija kapecitabina gdje preživljenje stanica iznosi oko 50 % te se ona koristila u daljnjem radu (Poglavlje 4.1.). Istraživanje adjuvantnog utjecaja quisinostata na djelovanje kapecitabina provedeno je na dva načina: u istovremenom tretmanu stanica s kapecitabinom i quisinostatom (Poglavlje 4.2.), odnosno prethodnim izlaganjem stanica djelovanju quisinostata i naknadnom tretmanu kapecitabinom (Poglavlje 4.3.). Tako dobiveni rezultati omogućavaju usporedbu osjetljivosti 2D i 3D kulture primijenjene stanične linije na kapecitabin te usporedbu utjecaja quisinostata na citotoksičnost kapecitabina u spomenutim kulturama.

Rezultati za preživljavanje i smrtnost stanica u 2D i 3D kulturama za tretmane kapecitabinom/quisinostatom dani su kao srednja vrijednost mjerenja u triplikatu i prikazani kao postotak preživljenja odnosno postotak smrtnosti stanica u odnosu na netretirani uzorak (netretirane stanice).

4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE KAPECITABINA NA VIJABILNOST STANICA

Tablica 6. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

| Koncentracija kapecitabina [mM] | % preživljenja | |
|------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Kapecitabin \pm SD | Metanol \pm SD |
| 6 | 33,392 \pm 5,366 ** | 103,366 \pm 0,150 |
| 3 | 71,827 \pm 2,240 * | 97,882 \pm 6,350 |
| 1,5 | 86,115 \pm 21,203 | 106,792 \pm 5,134 |
| 0,75 | 78,233 \pm 2,787 | 108,882 \pm 2,708 |
| 0,375 | 81,032 \pm 0,221 | 105,218 \pm 0,034 |



Slika 9. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Slika 9. i Tablica 6. pokazuju da smanjenjem koncentracije kapecitabina raste postotak preživjelih stanica, što je u skladu s očekivanjem. Rast je postupan, uz iznimku kapecitabina u koncentraciji 1,5 mM, ali s obzirom da ta vrijednost nije statistički značajna, odstupanje se može zanemariti.

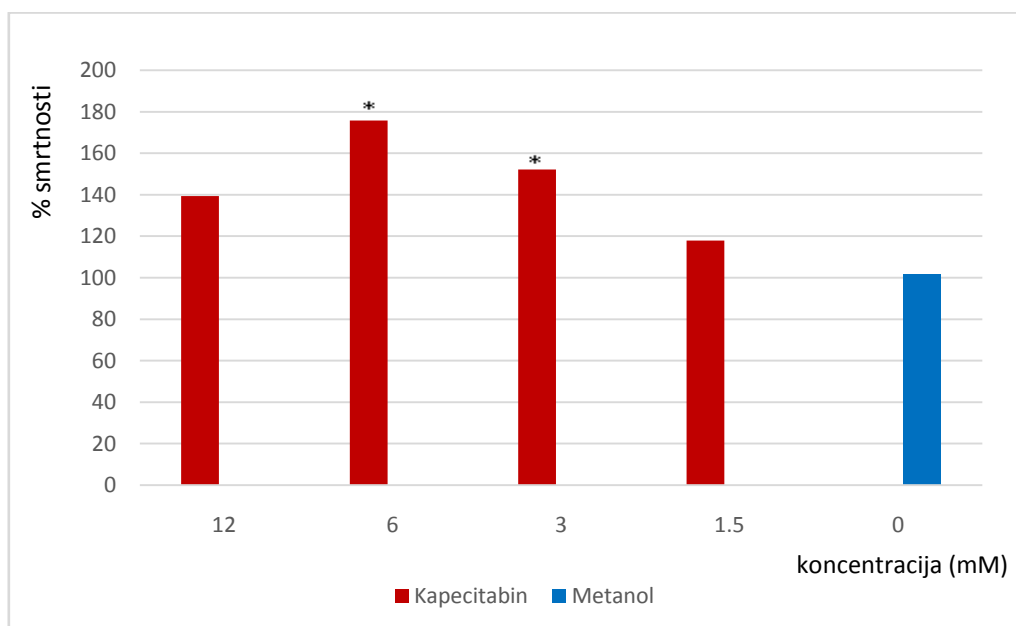
U skladu s očekivanjem, najdjelotvornija koncentracija kapecitabina je 6 mM kod koje je preživjelo samo 33,39 % stanica, dok koncentracije kapecitabina 1,5, 0,75 i 0,375 mM ne pokazuju značajnu razliku u djelovanju na stanice (preživljenje oko 80 % pri sve tri koncentracije). Pri najvećoj koncentraciji metanola nije utvrđen značajan učinak na preživljenje stanica pa se njegov utjecaj može zanemariti u daljnjim eksperimentima.

Iz dobivenih rezultata određeno je da koncentracija kapecitabina od 5 mM smanji preživljenje stanica u 2D kulturi na oko 50 % te je ta koncentracija korištena za daljnje eksperimente u 2D kulturi. Istraživanje utjecaja 5'-deoksi-5-fluorouridina (5'-DFUR), metabolita kapecitabina, na pet staničnih linija tumora debelog crijeva pokazalo je da su dvije stanične linije (HT29 i LoVo) osjetljive, dok su preostale tri (SW620, LS174T i HT29-FU) rezistentne na djelovanje lijeka. Koncentracija lijeka koja ubije 50 % stanica u staničnoj liniji HT29 je 8 μM , a u staničnoj liniji LoVo je 16 μM (Di Gennaro i sur., 2010). Isti metabolit kapecitabina primijenjen je i na četiri stanične linije tumora dojke pri čemu su dvije (MCF-7 i SKBR3) pokazale visoku osjetljivost s vrijednostima IC_{50} 2,03 μM i 1,99 μM , dok su

vrijednosti IC_{50} drugih dviju staničnih linija (MDA-MB231 i MDA-MB468) $10,4 \mu\text{M}$ i $12,14 \mu\text{M}$ (Terranova-Barberio i sur., 2015). Stanična linija korištena u ovom radu osjetljivija je na kapecitabin u uvjetima 2D kulture u odnosu na navedene stanične linije tumora debelog crijeva te neke stanične linije tumora dojke.

Tablica 7. Smrtnost stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

| Koncentracija kapecitabina [mM] | % smrtnosti |
|------------------------------------|-----------------------|
| | Kapecitabin \pm SD |
| 12 | $139,380 \pm 6,663$ |
| 6 | $175,724 \pm 4,243$ * |
| 3 | $152,209 \pm 3,090$ * |
| 1,5 | $117,942 \pm 6,911$ |
| Metanol \pm SD | $101,688 \pm 7,160$ |



Slika 10. Smrtnost stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$.

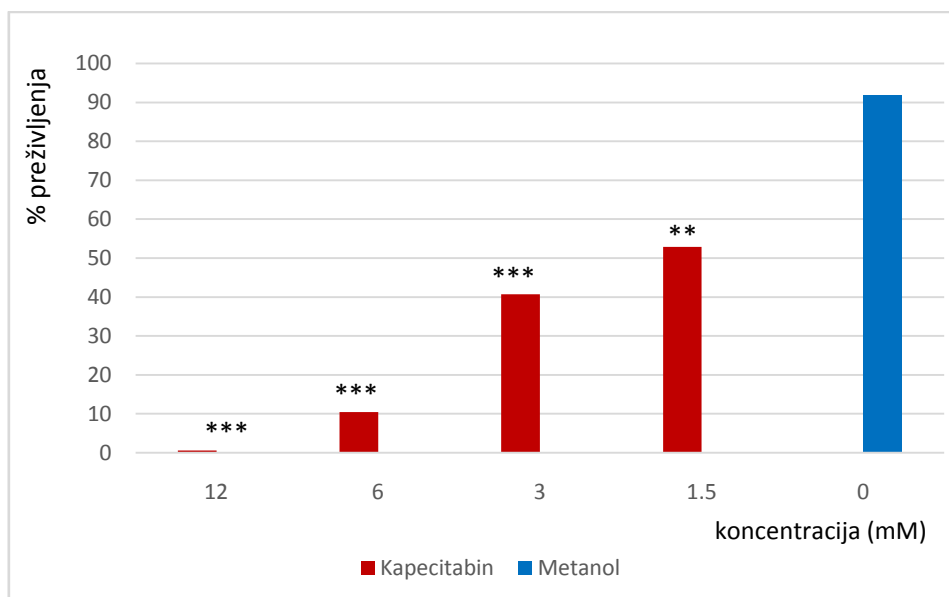
CellTox Green Cytotoxicity testom određen je udio mrtvih stanica u tretiranom uzorku u odnosu na netretirani uzorak. Iz Tablice 7. i Slike 10. vidljivo je da je kapecitabin koncentracije 6 mM imao najjači citotoksični učinak na stanice. Kako je koncentracija 12 mM očekivano najdjelotvornija, može se pretpostaviti da došlo je do neočekivanog odstupanja u

mjerenju. Preživljenje stanica tretiranih samo metanolom (pripremljen na isti način kao kapecitabin koncentracije 12 mM) u ovom eksperimentu iznosilo je 101,68 % što ne predstavlja statistički značajno odstupanje od stanica u čistom mediju za kulturu te se može zanemariti u daljnjim eksperimentima.

Iz rezultata je određeno da koncentracija kapecitabina od 4 mM smanji preživljenje na oko 50 % te je ta koncentracija korištena u daljnjim postupcima za CellTox Green Cytotoxicity metodu.

Tablica 8. Preživljenje stanica ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

| Koncentracija kapecitabina [mM] | % preživljenja |
|---------------------------------|------------------------|
| | Kapecitabin \pm SD |
| 12 | 0,540 \pm 0,127 *** |
| 6 | 10,476 \pm 1,437 *** |
| 3 | 40,677 \pm 1,189 *** |
| 1,5 | 52,841 \pm 1,831 ** |
| Metanol \pm SD | 91,921 \pm 9,172 |



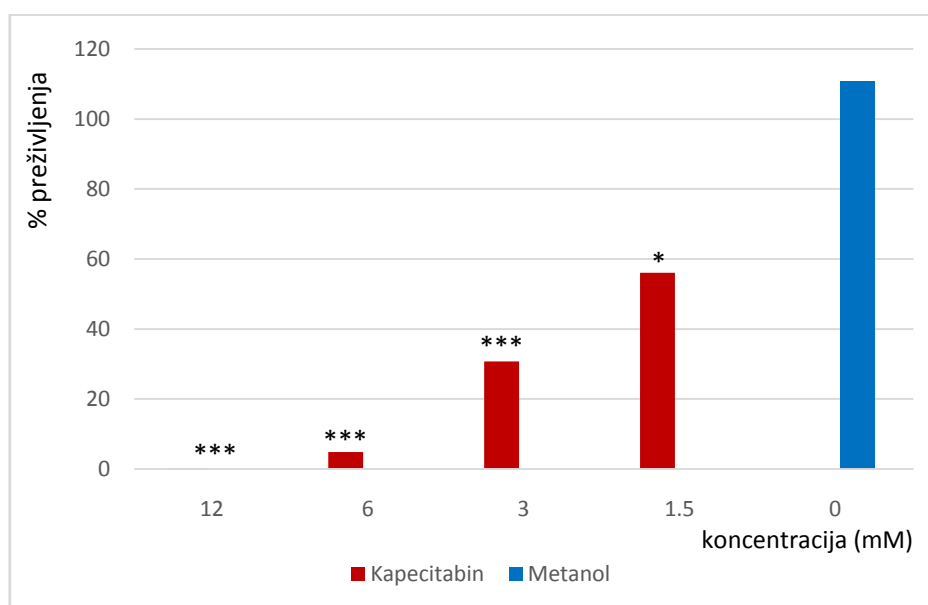
Slika 11. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rezultati dobiveni RealTime-Glo MT Cell Viability testom (Tablica 8. i Slika 11.) pokazuju smanjenje postotka preživjelih stanica s porastom koncentracije kapecitabina. Kapecitabin koncentracije 12 mM imao je gotovo 100 %-tno citotoksično djelovanje na tumorske stanice. Preživljenje stanica tretiranih samo metanolom (pripremljen na isti način kao kapecitabin koncentracije 12 mM) niti u ovom eksperimentu ne predstavlja statistički značajno odstupanje od stanica u čistom mediju za kulturu te se može zanemariti u daljnjim eksperimentima.

Iz rezultata je određena 4 mM koncentracija kapecitabina koja je korištena u daljnjim eksperimentima za RealTime-Glo MT Cell Viability test.

Tablica 9. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

| Koncentracija kapecitabina [mM] | % preživljenja |
|------------------------------------|------------------------|
| | Kapecitabin \pm SD |
| 12 | 0,107 \pm 0,050 *** |
| 6 | 4,888 \pm 2,225 *** |
| 3 | 30,737 \pm 2,316 *** |
| 1,5 | 56,044 \pm 6,365 * |
| Metanol \pm SD | 110,613 \pm 1,794 |



Slika 12. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Drugi test za određivanje vijabilnosti stanica u 3D kulturi, CellTiter-Glo 3D Cell Viability test, pokazuje vrlo slične rezultate prethodnima, što se vidi iz Tablice 9. i Slike 12. Kapecitabin koncentracije 12 mM je i u ovom slučaju pokazao gotovo 100 %-tno citotoksično djelovanje na tumorske stanice.

U svim eksperimentima uočeno je kako preživljenje stanica tretiranih samo metanolom ne odstupa statistički značajno od preživljenja stanica u čistom mediju za kulturu. Stoga je učinak metanola na stanice u ovom radu nadalje zanemaren, te se prema stanicama tretiranim metanolom odnosi kao prema negativnoj kontroli koja prikazuje preživljenje od 100%.

Koncentracija za CellTiter-Glo 3D Cell Viability test koja ubije oko 50 % stanica i koja je korištena u daljnjim eksperimentima iznosi 2 mM.

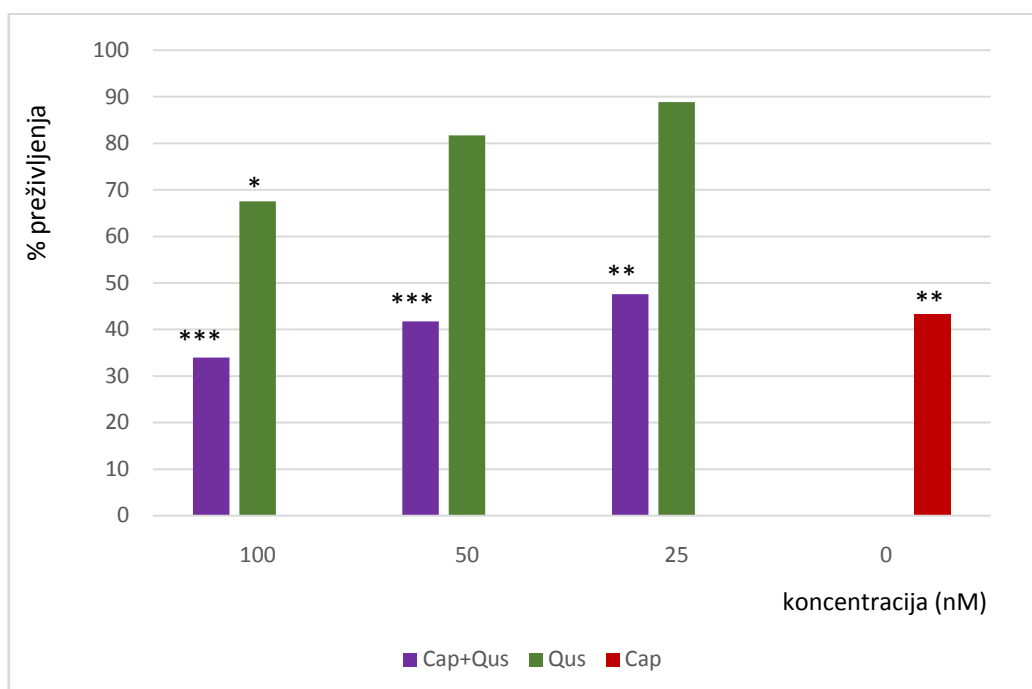
Ako uspoređujemo rezultate za 2D i 3D kulturu, uočavamo da stanice u 3D kulturi pokazuju veću osjetljivost na kapecitabin u odnosu na stanice u 2D kulturi. Razlog veće rezistencije stanica u 2D kulturi može biti promjena u ekspresiji gena. Naime, stanice u 2D kulturi nisu u svom prirodnom obliku te ekspresija nekih gena može biti promijenjena u odnosu na stanice u 3D kulturi gdje bi geni trebali biti normalno eksprimirani (Edmondson i sur., 2014). Kako je kapecitabin inaktivan oblik lijeka koji se nizom enzimskih reakcija prevodi u 5-FU (aktivni oblik lijeka) posredstvom karboksilesteraza, citidin deaminaza i timidin fosforilaza, u slučaju njihove snižene ekspresije za očekivati je smanjena proizvodnja 5-FU i manja citotoksičnost. Osim toga, i povećana ekspresija gena za enzim dihidropirimidin dehidrogenazu koji razgrađuje 5-FU ima za posljedicu sniženje koncentracije aktivnog oblika lijeka (Blum, 2001; Endo i sur., 2003) i niži učinak u 2D kulturi.

Međutim, iz dobivenih rezultata ne može se pouzdano odrediti odgovorni mehanizam, za što su potrebna dodatna istraživanja na nivou transkriptoma i proteoma.

4.2. ISTOVREMENI TRETMAN KAPECITABINOM I QUISINOSTATOM

Tablica 10. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 5 mM koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 5 | 33,952 \pm 0,921 *** | 41,762 \pm 2,234 *** | 47,586 \pm 7,863 ** | 43,201 \pm 3,443 ** |
| | 0 | 67,556 \pm 20,416 * | 81,709 \pm 13,810 | 88,840 \pm 0,946 | 100 |



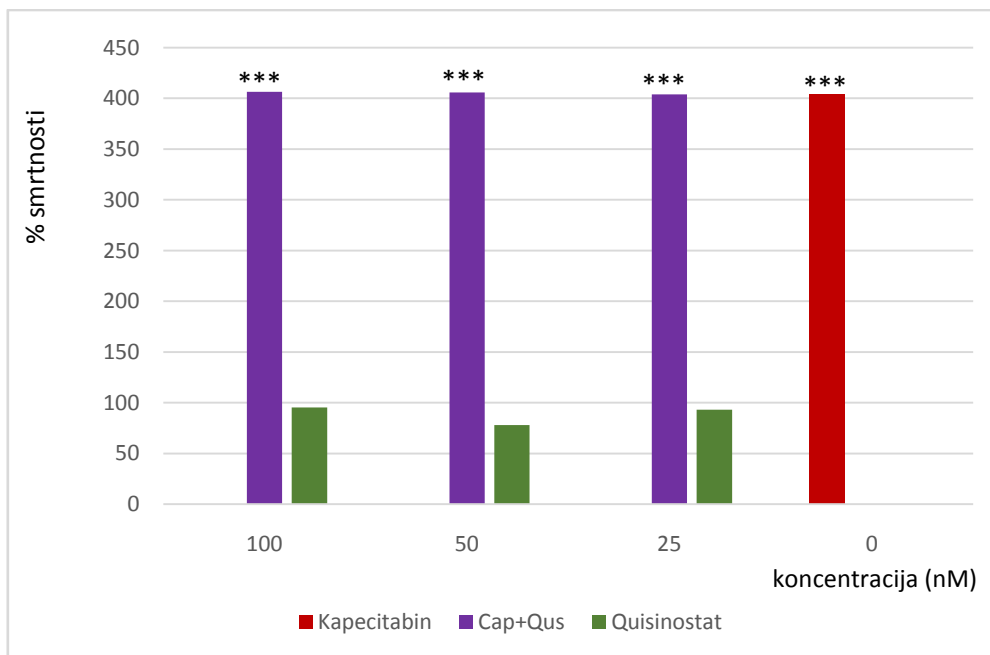
Slika 13. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 5 mM koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Iako rezultati pokazuju da quisinostat ubija određeni postotak stanica pri svim istraživanim koncentracijama, njegov učinak je značajno manji u odnosu na učinak kapecitabina koncentracije 5 mM (Tablica 10. i Slika 13.). Za razliku od ovdje prikazanih rezultata, u istraživanju u kojem su primijenjene stanične linije mijeloma, quisinostat je nakon 72 h pokazao jači učinak s IC_{50} 1-20 nM (Stühmer i sur., 2010). Znatno jači učinak pokazan je i na stanice tumora jetre gdje je nakon 72 h IC_{50} za quisinostat iznosio 30,8 nM (Li i sur., 2017).

U kombinaciji s kapecitabinom, quisinostat najveće koncentracije (100 nM) pojačava djelovanje lijeka ~1,3×. Niže koncentracije quisinostata (50 nM i 25 nM) nisu značajno utjecale na djelovanje kapecitabina. S obzirom na to da te koncentracije nisu značajno djelovale na preživljenje stanica niti kada je quisinostat dodan samostalno (preživljenje 81,71 i 88,84 %), možemo zaključiti da korištene koncentracije quisinostata nemaju adjuvantni učinak na kapecitabin u 2D kulturi stanica. U istraživanju utjecaja histon deacetilaza na citotoksičnost 5'-deoksi-5-fluorouridina (metabolita kapecitabina) na stanične linije tumora debelog crijeva korišten je vorinostat koji pripada istoj skupini histon deacetilaza kao i quisinostat. Međutim, on je pokazao puno jači sinergijski učinak povećanjem citotoksičnosti lijeka 1,4-4,4× (Di Gennaro i sur., 2010). Utjecaj inhibitora histon deacetilaza istražen je i na četiri linije tumora dojke gdje su, osim vorinostata, primijenjeni i panobinostat, entinostat i valproična kiselina (Terranova-Barberio i sur., 2015). Rezultati su također pokazali značajniji adjuvantni učinak.

Tablica 11. Smrtnost stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: *** $p < 0,001$.

| | | % smrtnosti ± SD | | | |
|---------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 4 | 406,452 ± 4,082 *** | 405,956 ± 4,908 *** | 403,846 ± 5,010 *** | 404,263 ± 20,642 *** |
| | 0 | 95,261 ± 4,864 | 77,826 ± 3,973 | 93,202 ± 4,759 | - |

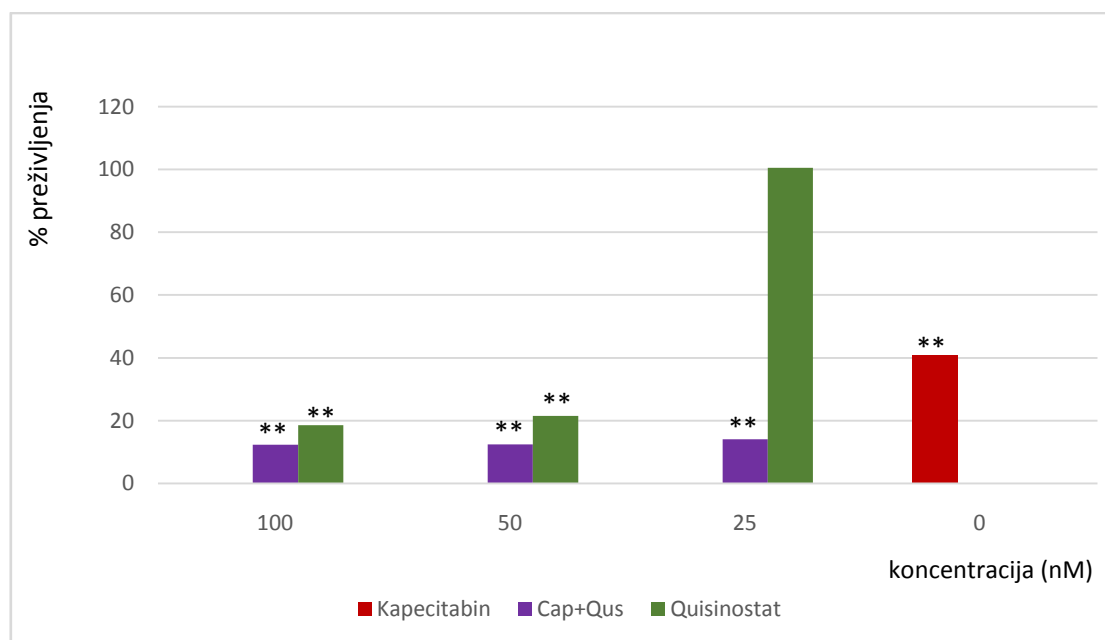


Slika 14. Smrtnost stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: *** $p < 0,001$.

Iz rezultata dobivenih CellTox Green Cytotoxicity testom (Slika 14. i Tablica 11.) vidimo da sam quisinostat u 3D kulturi nije značajno utjecao na preživljenje stanica u odnosu na netretirane uzorke. Isto tako, nije pojačao citotoksičnost kapecitabina.

Tablica 12. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 2 | 12,295 \pm 2,678 ** | 12,468 \pm 0,804 ** | 14,110 \pm 5,289 ** | 40,814 \pm 1,272 ** |
| | 0 | 18,561 \pm 0,235 ** | 21,496 \pm 0,272 ** | 100,568 \pm 1,273 | 100 |

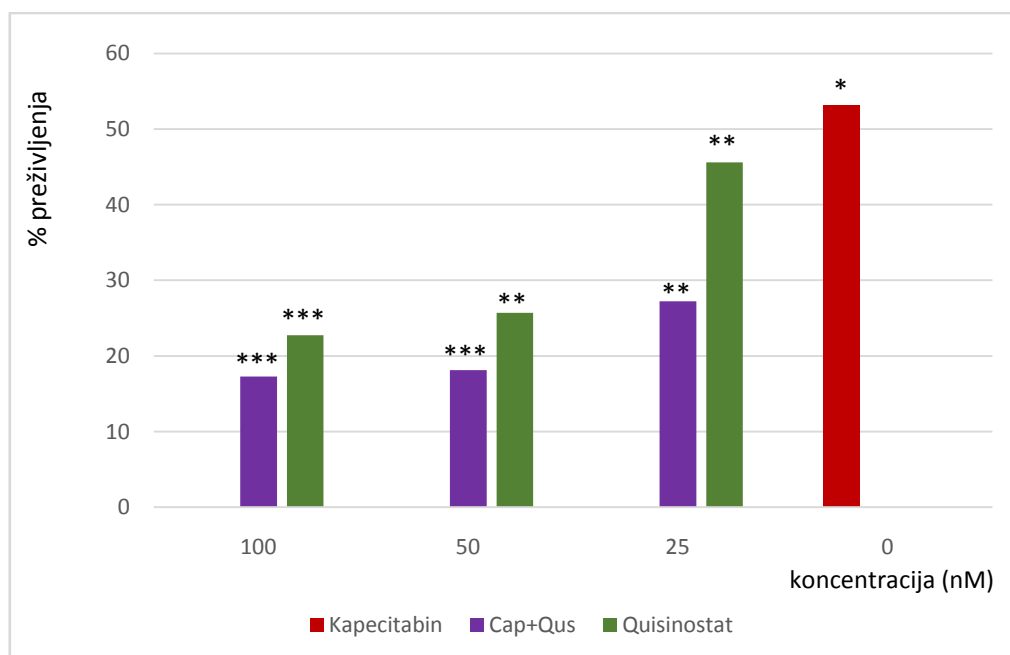


Slika 15. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$.

Iz rezultata (Tablica 12. i Slika 15.) se vidi da quisinostat smanjuje preživljenje stanica u 3D kulturi na 20 %, osim u najmanjoj koncentraciji gdje se preživljenje nije promijenilo u odnosu na netretirane stanice. Može se pretpostaviti da je kod te koncentracije došlo do neočekivanog odstupanja pri mjerenju. Quisinostat pojačava djelovanje kapecitabina $\sim 3\times$, neovisno o primijenjenoj koncentraciji.

Tablica 13. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 2 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 2 | 17,291 \pm 0,648 *** | 18,126 \pm 0,823 *** | 27,244 \pm 2,644 ** | 55,502 \pm 3,354 * |
| | 0 | 22,742 \pm 1,374 ** | 25,694 \pm 1,553 ** | 45,596 \pm 2,644 * | 100 |



Slika 16. Preživljenje stanica (%) ovisno o koncentraciji quisinostata pri 2 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rezultati prikazani Tablicom 13. i Slikom 16., dobiveni CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom, pokazuju da je sam quisinostat uzrokovao znatno smanjenje preživljenja stanica i da se preživljenje smanjuje s porastom koncentracije. Također, quisinostat je pojačao djelovanje kapecitabina $\sim 2\times$ kada je korištena koncentracija 25 nM, a $\sim 3\times$ kada su korištene koncentracije 50 nM i 100 nM.

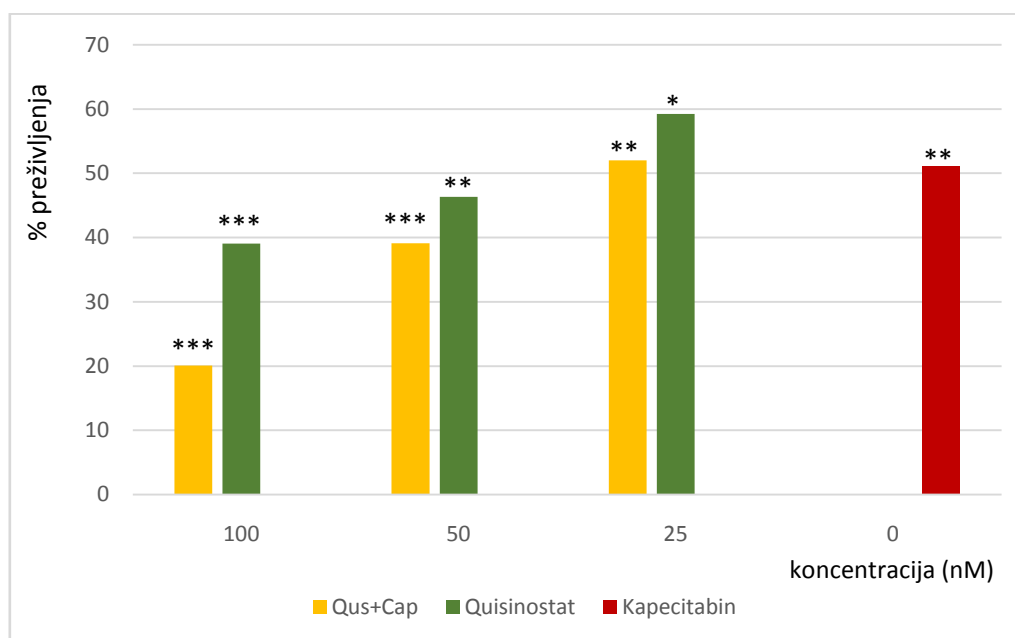
Razlika u rezultatima dobivenima različitim metodama za određivanje utjecaja lijeka na stanice u 3D kulturi može biti posljedica različite osjetljivosti metoda. Također, vrijednosti izmjerene CellTox Green Cytotoxicity testom pokazuju neočekivano odstupanje od vrijednosti dobivenih drugim testovima te su zanemarene. Usporedbom rezultata dobivenih CellTiter-Glo 3D Cell Viability i RealTime-Glo MT Cell Viability testovima možemo vidjeti da quisinostat primijenjen samostalno značajno utječe na preživljenje stanica. Isto tako, primjenom u kombinaciji s kapecitabinom, povećava citotoksičnost kapecitabina 2-3 \times , ovisno o koncentraciji.

Istovremena primjena kapecitabina i quisinostata rezultirala je jačim citotoksičnim djelovanjem kapecitabina na stanice u 3D kulturi pri svim koncentracijama quisinostata, dok je u 2D kulturi na povećanje citotoksičnosti kapecitabina utjecao samo quisinostat u najvišoj koncentraciji (100 nM) i to dvostruko manje nego pri istoj koncentraciji u 3D kulturi.

4.3. PREDTRETMAN QUISINOSTATOM I TRETMAN KAPECITABINOM

Tablica 14. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 5 mM koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 5 | 20,082 \pm 0,510 *** | 39,134 \pm 5,557 *** | 51,993 \pm 8,670 ** | 51,075 \pm 8,328 ** |
| | 0 | 39,061 \pm 0,365 *** | 46,338 \pm 6,476 ** | 59,222 \pm 6,188 * | 100 |



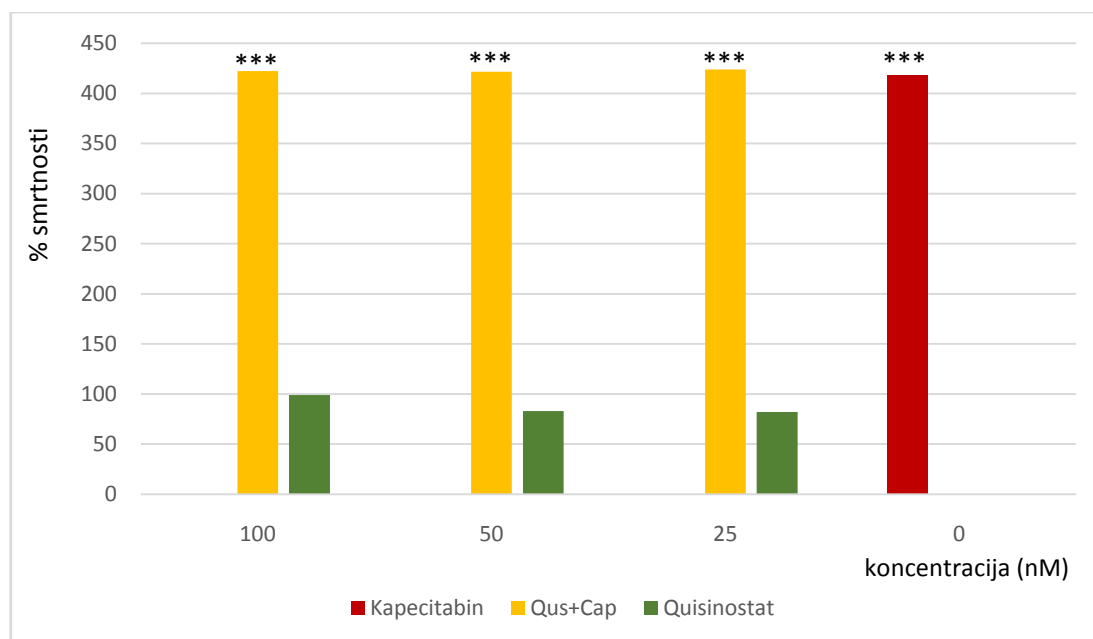
Slika 17. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 5 mM koncentraciji kapecitabina u 2D kulturi određeno resazurin testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rezultati prikazani u Tablici 14. i na Slici 17. pokazuju da je djelotvornost samog quisinostata slična djelotvornosti kapecitabina i ako usporedimo ove rezultate s rezultatima dobivenima primjenom istovremenog tretmana, vidimo da je u slučaju predtretmana quisinostat koncentracije 100 nM bio djelotvorniji otprilike 1,6 \times , dok je pri ostalim koncentracijama djelovanje približno jednako. Uočavamo da je u slučaju predtretmana quisinostat najviše koncentracije pojačao djelovanje kapecitabina približno 2,5 \times , što je gotovo dvostruko više u odnosu na istovremeni tretman, gdje je povećanje citotoksičnosti bilo 1,3 \times .

Quisinostat koncentracije 50 nM je također pojačao citotoksično djelovanje kapecitabina kada je primijenjen kao predtretman, ali samo 20 % u odnosu na istovremeni tretman.

Tablica 15. Smrtnost stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: *** $p < 0,001$.

| | | % smrtnosti ± SD | | | |
|------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 4 | 422,243 ± 5,737 *** | 421,627 ± 8,049 *** | 423,729 ± 6,202 *** | 418,048 ± 2,878 *** |
| | 0 | 98,967 ± 4,713 | 82,894 ± 3,948 | 81,977 ± 3,904 | - |

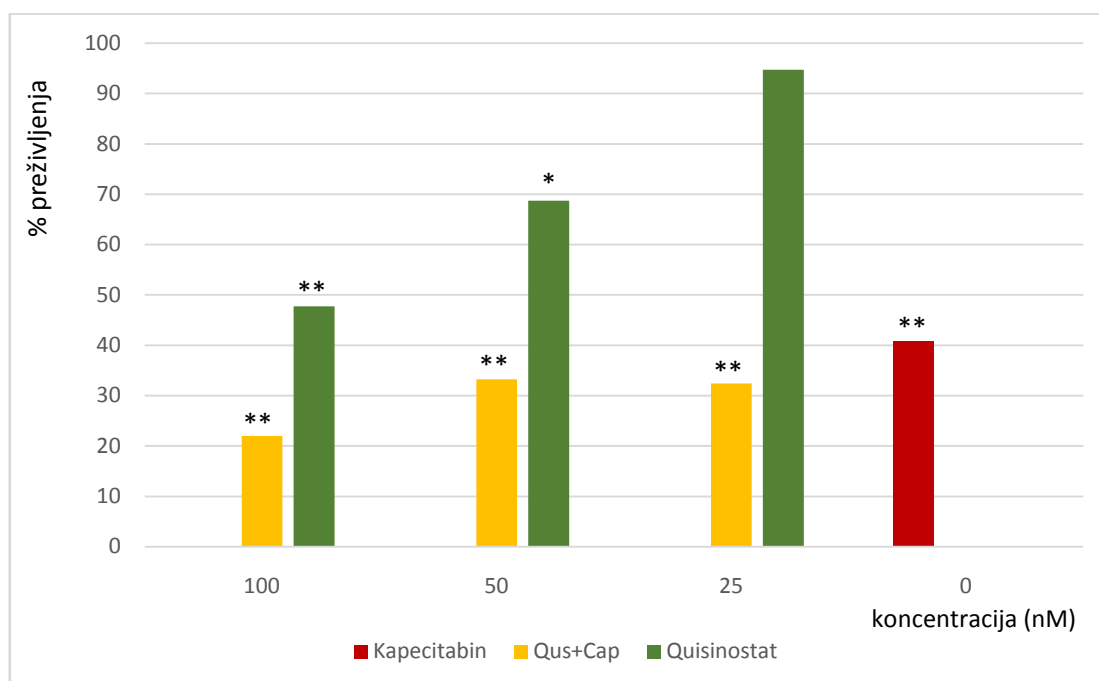


Slika 18. Smrtnost stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTox Green Cytotoxicity testom. Statistički značajna razlika: *** $p < 0,001$.

Rezultati prikazani u Tablici 15. i na Slici 18., dobiveni CellTox Green Cytotoxicity testom, pokazuju da quisinostat primijenjen kao predtretman ne utječe značajno na preživljenje stanica, a isto tako ne povećava citotoksičnost kapecitabina. Rezultati se ne razlikuju puno od onih dobivenih CellTox Green Cytotoxicity testom kod istovremenog tretmana.

Tablica 16. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 4 | 21,970 \pm 2,678 ** | 33,239 \pm 6,160 ** | 32,434 \pm 3,549 ** | 40,814 \pm 0,536 ** |
| | 0 | 47,727 \pm 0,604 ** | 68,750 \pm 0,870 * | 94,697 \pm 1,199 | 100 |



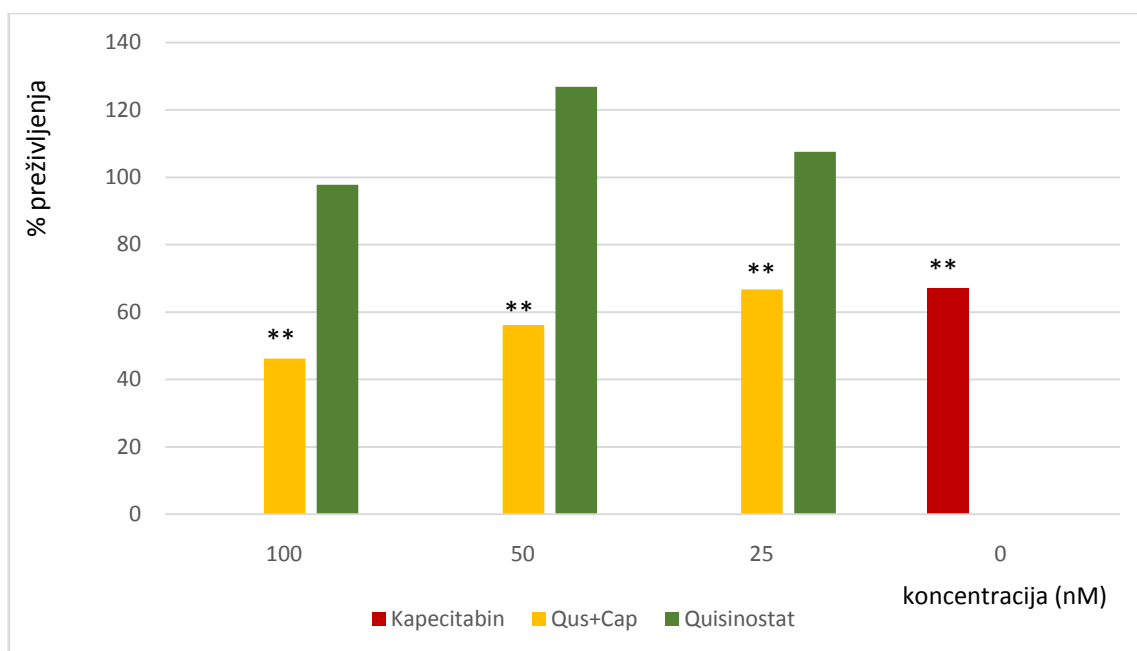
Slika 19. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 4 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određen RealTime-Glo MT Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Slika 19. i Tablica 16. pokazuju da quisinostat koncentracije 25 nM ne utječe značajno na preživljenje stanica, dok preostale dvije koncentracije utječu, posebice 100 nM koja je smanjila preživljenje na ~50 % u odnosu na netretirane stanice. Primijenjen kao predtretman kapecitabinu, quisinostat povećava njegovu citotoksičnost ~1,8 \times pri najvećoj koncentraciji, dok manje koncentracije ne utječu značajno na citotoksičnost. Usporedbom s rezultatima za istovremeni tretman, također dobivenima RealTime-Glo MT Cell Viability testom, može se

uočiti da quisinostat primijenjen kao predtretman gotovo dvostruko slabije utječe na citotoksičnost kapecitabina.

Tablica 17. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$.

| | | % preživljenja \pm SD | | | |
|------------------|---|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Koncentracija | | Quisinostat [nM] | | | |
| | | 100 | 50 | 25 | 0 |
| Kapecitabin [mM] | 2 | 46,195 \pm 8,266 ** | 56,141 \pm 5,591 ** | 66,737 \pm 2,611 ** | 67,243 \pm 0,089 ** |
| | 0 | 97,818 \pm 5,669 | 126,897 \pm 7,354 | 107,557 \pm 6,233 | 100 |



Slika 20. Preživljenje stanica (%) nakon predtretmana quisinostatom ovisno o njegovoj koncentraciji pri 2 mM koncentraciji kapecitabina u 3D kulturi određeno CellTiter-Glo 3D Cell Viability testom. Statistički značajna razlika: ** $p < 0,01$.

Rezultati prikazani u Tablici 17. i na Slici 20. pokazuju da primjena samo quisinostata nije rezultirala smanjenjem preživljenja stanica. Kada se quisinostat koncentracije 100 nM koristio kao predtretman kapecitabinu, povećao je njegovu citotoksičnost $\sim 1,5\times$, dok niže koncentracije quisinostata ne utječu značajno za djelovanje kapecitabina. Za razliku od toga, pri istovremenom tretmanu quisinostat znatno utječe na preživljenje. Također, kombinacija

kapecitabina i quisinostata s predtretmanom pokazuje manju citotoksičnost nego pri istovremenom tretiranju, i to približno 2-3×, ovisno o koncentraciji.

Iako postoje određene razlike u rezultatima za 3D kulture dobivenima pomoću različitih metoda mjerenja, njihovom međusobnom usporedbom može se zaključiti da quisinostat pri najvišoj koncentraciji uzrokuje povećanje citotoksičnosti kapecitabina ~1,6×. Međutim, na osnovu rezultata se ne može donijeti konačan zaključak o utjecaju quisinostata na preživljenje stanica kada je primijenjen samostalno jer su se izmjerene vrijednosti značajno razlikovale kod primijenjenih testova.

Usporedbom rezultata za 2D i 3D kulturu, uočavamo da je quisinostat primijenjen kao predtretman pokazao veći utjecaj na citotoksičnost kapecitabina u 2D kulturi, nego u 3D. Naime, u 2D kulturi došlo je do gotovo dvostrukog povećanja citotoksičnosti kapecitabina, dok se u 3D kulturi nije značajno povećala.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Kapecitabin ima jači citotoksični učinak na stanice raka mliječne žlijezde miša u 3D kulturi, u odnosu na 2D kulturu. Koncentracija kapecitabina koja uzrokuje smrt oko 50 % stanica je 5 mM za 2D kulturu, te 2 mM i 4 mM za 3D kulturu, ovisno o primijenjenoj metodi određivanja.
- Pomoćno sredstvo quisinostat, kojem su stanice bile izložene tijekom cijelog eksperimenta, ne utječe značajno na preživljenje stanica u 2D kulturi, dok u 3D kulturi u najvećoj koncentraciji smanjuje preživljenje na čak 20 % u odnosu na netretirane stanice.
- Predtretman stanica quisinostatom smanjuje preživljenje stanica u 2D kulturi na 45 %, dok u 3D kulturi nije moguće donijeti zaključak o njegovu djelovanju na osnovu dobivenih rezultata.
- Dodatak quisinostata u obliku istovremenog tretmana s kapecitabinom ne utječe značajno na povećanje citotoksičnosti kapecitabina prema stanicama u 2D kulturi ($\sim 1,3\times$), dok je u 3D kulturi citotoksičnost kapecitabina povećana $2-3\times$.
- Primjena quisinostata kao predtretmana kapecitabinu povećala je citotoksičnost kapecitabina u 2D kulturi $\sim 2,5\times$, za razliku od 3D kulture, gdje je povećanje citotoksičnosti bilo $\sim 1,6\times$.

6. LITERATURA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis J, i sur. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4. izd., Garland Science, New York. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26851/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2019.

Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Marušić, M., Taradi, M., Višnjić, D. (2004) *Imunologija*, 6.izd., Medicinska naklada, Zagreb.

Baba, A.I., Catoi, C. (2007) *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, Bukurešt. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553>>. Pristupljeno 21. srpnja 2019.

Blum, J.L. (2001) The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncologist* **6**, 56-64.

Canadian Cancer Society. 2019, <<http://www.cancer.ca>>. Pristupljeno 14. lipnja 2019.

Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T., Pan, Z.Q. (2002) Autoubiquitination of the BRCA1BARD1 RING ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **277**, 22085– 22092.

Chen, Q., Mao, Y., Meng, F., Wang, L., Zhang, H., Wang, W., Hua, D. (2017) Rs7911488 modified the efficacy o capecitabine-based therapy in colon cancer through altering miR-1307-3p and TYMS expression. *Oncotarget* **8**, 74312-74319.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* **6**, 1521-1533.

Cooper, G.M. (2000) *The cell: A molecular approach*, 2. izd., Sinauer Associates, Sunderland. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>. Pristupljeno 15. lipnja 2019.

Di Gennaro, E., Piro, G., Chianese, M.I., Franco, R., Di Cintio, A., Moccia, T., Luciano, A., de Ruggiero, I., Bruzzese, F., Avallone, A., Arra, C., Budillon, A. (2010) Vorinostat synergises with capecitabine through upregulation of thymidine phosphorylase. *Bri. J. Cancer* **103**, 1680-1691.

Domansky, K., Inman, W., Serdy, J., Dash, A., Lim, M., Griffith, L.G. (2010) Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering. *Lab Chip* **10**, 51-58.

Duval, K., Grover, H., Han, L., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., Chen, Z. (2017) Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* **32**, 266-277.

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L. (2014) Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Techn.* **12**, 207–218.

Endo, M., Miwa, M., Iwata, H., Iwata, M., Tanimura, H., Ishikawa, T., Miyazaki-Nose, T., Hattori, K., Shimma, N., Yamada-Okabe, H., Ishitsuka, H. (2003) Augmentation of the antitumor activity of capecitabine by a tumor selective dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitor, RO0094889. *Int. J. Cancer* **106**, 799-805.

Gelmon K., Chan A, Harbeck N. (2006) The role of capecitabine in first-line treatment for patients with metastatic breast cancer. *Oncologist* **11**, 42-51.

Gurski, L.A., Jha, A.K., Zhang, C., Jia, X., Farach-Carson, M.C. (2009) Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials* **30**, 6076-6085.

Gurski, L.A., Petrelli, N.J., Jia, X., Farach-Carson, M.C. (2010) 3D matrices for anti-cancer drug testing and development. *Oncology Issues* **25**, 20-25.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmark of cancer: *The next generation*. *Cell* **144**, 646-674.

Hongisto, V., Jernström, S., Fey, V., Mpindi, J.P., Kleivi Sahlberg, K., Kallioniemi, O., Perälä, M. (2013) High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. *Plos One* **8**, e77232.

Huang, H., Ding, Y., Sun, X.S., Nguyen, T.A. (2013) Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3D culture of MCF-7 breast cancer cells. *Plos One* **8**, e59482.

Huh, D., Hamilton, G.A., Ingber, D.E. (2011) From three-dimensional cell culture to organ-on-chips. *Trends Cell Biol.* **21**, 745-754.

Karlsson, H., Fryknäs, M., Larsson, R., Nygren, P. (2012) Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp. Cell Res.* **318**, 1577–1585.

Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Peterson, O.W., Gray, J.W., Bissell, M.J. (2007) The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol. oncol.* **1**, 84-96.

Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M.B., Dwarakanath, B.S. (2006) Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* **4**, 12.

Lee, A. Measuring cell-viability by resazurin (alamarblue) assay using Photopette cell (2017) <<http://tipbiosystems.com/products/photopette-cell-kit/>>. Pristupljeno 18. srpnja 2019.

Lee, E.Y., Muller, W.J. (2010) Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003236.

Li, F., Wang, T., Wang, Z., Chen, X., Liu, R. (2017) Histone deacetylase inhibitor quisinostat activates caspase signaling and upregulates p53 acetylation to inhibit the proliferation of HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* **16**, 6094-6101.

Lin, R.Z., Chang, H.Y. (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* **3**, 1172–1184.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4. izd., W. H. Freeman, New York. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2019.

Loessner, D., Stok, K.S., Lutolf, M.P., Huttmacher, D.W., Clements, J.A., Rizzi, S.C. (2010) Bioengineered 3D platform to explore cell–ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials* **31**, 8494–8506.

Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., Takayama, S. (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release.* **164**, 192-204.

- 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.
- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., Ishitsuka, H. (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer* **34**, 1274-1281.
- Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T.L., Wang, G. (2015) Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **20**, 3898-3941.
- Oren, M., Rotter, V. (2010) Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001107.
- Osborne, C., Wilson, P., Tripathy, D. (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **9**, 361-377.
- Paul, M., Strassl, F., Hoffmann, A., Hoffmann, M., Schlüter, M., Herres-Pawlis, S. (2018) Reaction Systems for Bubbly Flows. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2018, 2101-2124.
- Pranavathiyani, G., Raja Rajeswary Thanmalagan, Naorem Leimarembi Devi, Venkatesan, A. (2018) Integrated transcriptome interactome study of oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. *Genes & Diseases* **6**, 78-87.
- Promega Corporation. 2019, <<https://worldwide.promega.com>>. Pristupljeno 16. srpnja 2019.
- Ropero, S., Esteller, M. (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol.* **1**, 19-25.
- Shay, J.W., Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **1**, 72–76.
- Stühmer, T., Arts, J., Chatterjee, M., Borawski, J., Wolff, A., King, P., Einsele, H., Leo, E., Bargou, R.C. (2010) Preclinical anti-myeloma activity of the novel HDAC-inhibitor JNJ-26481585. *Brit. J. Haematol.* **149**, 529-536.

Takata, H., Hanafusa, T., Mori, T., Shimura, M., Iida, Y., Ishikawa, K., Yoshikawa, K., Yoshikawa, Y., Maeshima, K. (2013) Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage. *8*, e75622.

Terranova-Barberio, M., Roca, M.S., Zotti, A.I., Leone, A., Bruzzese, F., Vitagliano, C., Scogliamiglio, G., Russo, D., D'Angelo, G., Franco, R., Budillon, A., Di Gennaro, E. (2015) Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression. *Oncotarget* *7*, 7715-7731.

Théry, M. (2010) Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J. Cell. Sci.* **123**, 4201-4213.

Tibbitt, M.W., Anseth, K.S. (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 655-663.

Venugopal, B., Baird, R., Kristeleit, R.S., Plummer, R., Cowan, R., Stewart, A., Fourneau, N., Hellems, P., Elsayed, Y., Mcclue, S., Smit, J.W., Forslund, A., Phelps, C., Camm, J., Evans, J., 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**, 4262-6272.

Voigt, N., Pearman, C.M., Dobrev, D., Dibb, K.M. (2015) Methods for isolating atrial cells from large mammals and humans. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **86**, 187-198.

Walker, D.M., Boey, G., McDonald, L.A. (2003) The pathology of oral cancer. *Pathology* **35**, 376-383.

Zilfou, J.T., Lowe, S.W. (2009) Tumor suppressive function of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **00**, a001883.

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.

Ivana Marijanović
ime i prezime studenta