





Sveučilište u Rijeci  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Ivo Zlatar

**KARAKTERIZACIJA NOVIH KEMIJSKIH ENTITETA S ANTITUMORSKIM  
DJELOVANJEM NA STANICE KARCINOMA PLUĆA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Karmen Brajša, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, Selvita  
d.o.o.

Rijeka, 2026.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Ivo Zlatar

**CHARACTERISATION OF A NEW CHEMICAL ENTITIES THAT HAVE  
ANTITUMOR ACTIVITY ON LUNG TUMOR CELLS**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2026.



Mentorica: izv. prof. dr. sc. Karmen Brajša, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, Selvita d.o.o.

Doktorski rad obranjen je dana **0X. X 2026.** godine na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof. sc. Ivana Ratkaj, mag.ing.mol.biotech, Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveuciliste Rijeka, predsjednica povjerenstva
2. 2. doc. dr. sc. Marin Dominovic, Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveuciliste Rijeka, član povjerenstva
3. doc. dr. sc. Lara Saftic Martinovic, Medicinski fakultet, Sveuciliste Rljeka, član povjerenstva



Ovaj doktorski rad izrađen je u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.) u sklopu doktorskog studija „Medicinska kemija“ na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekta „AntioxPot Project Exploring the antioxidative potential of benzazole scaffold in the design of novel antitumor agents, projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-IP-2018-01-4379), glavni istraživač prof. Marijana Hranjec, 2018-2022.

## ZAHVALE

*Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Karmen Brajša na iskazanom povjerenju i upornosti, podršci, savjetima, motivaciji te svoj stručnoj i praktičnoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Posebno zahvaljujem kolegama iz Selvite koji su mi pomogli svojom stručnošću i znanjem: Martini Bosnar, Sanji Musladin, Vesni Eraković Haber, Jasni Padovan, Astrid Milić, Vlatki Bencetić Mihaljević, Bartolu Božiću, Branki Tavčar, Maji Antolić, Boški Hrvačić, Filipu Bujanu, Vuku Milutinoviću, Snježani Čužić, Mireli Janjić, Ani Peris Jurinjak, Gordani Jelić, Nori Pacenti, Ani Bosak, Sonji Vidović Iviš i Igoru Kauckom*

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Marijani Hranjec i Liviu Racanéu te ostalim suradnicima sa Zavoda za organsku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologija, Sveučilišta u Zagrebu na pripremi serija novih kemijskih entiteta koji su korišteni u ovom radu*

*Zahvaljujem kompaniji Selvita d.o.o (za vrijeme izrade rada Fidelta d.o.o.) i svim svojim dosadašnjim nadređenima koji su svojim odlukama odobrili i podržali izradu ovoga doktorskog rada.*

*Svim mojim dosadašnjim kolegama s kojima sam surađivao u različitim odjelima hvala na ugodnoj radnoj atmosferi, korisnim diskusijama, humoru, prilikama za učenje i suradnju te nesebičnoj pomoći tijekom mog dosadašnjeg profesionalnog puta.*

*Hvala mojoj predivnoj ženi Ivani za praktičnu i moralnu potporu tijekom cijelog vremena trajanja izrade i pisanja ove disertacije. Najviše hvala jer ni jednog trenutka nisi dala da odustanem. Bez tebe ovo ne bi bilo moguće.*

*Ovaj rad posvećujem svom sinu Jakovu, kao poticaj da bude dovoljno hrabar da slijedi svoje snove i da zna da u životu može postići sve što poželi.*

Ivo



## SAŽETAK

Unatoč dugotrajnom procesu istraživanja i razvoja novih molekula kao potencijalnih lijekova, vrlo mali broj njih stiže do tržišta. Uzrok visokoj stopi odljeva ispitivanih molekula (engl. attrition rate) prvenstveno je njihova neadekvatna podnošljivost, neželjeni učinci i učinkovitost u kliničkim studijama. Smatra se da je visoka stopa odljeva novih lijekova u području onkologije posljedica slabe predikcije testova u ranoj fazi testiranja novih kemijskih entiteta (NKE) na 2D staničnim linijama *in vitro*, koji su postojeći standard za testiranje potencijalnih antitumorskih lijekova. Ograničenosti staničnih testova u 2D uvjetima su neprirodni oblik stanice, drukčija izraženost gena, stanično okruženje, metabolizam i slično. Razvojem trodimenzonalnih staničnih kultura (3D) *in vitro*, postižu se uvjeti slični prirodnim uvjetima u kojima se stanice nalaze u organizmu. Ovim istraživanjem validirali smo staničnu metodu probira aktivnih molekula u 3D formatu na 3 stanične linije plućnih karcinoma (A549, HCC827 i NCI-H358), usporedili probir aktivnih antitumorskih molekula u 2D i 3D formatu na istim staničnim linijama za 5 kemijskih serija (amidini, furani, akronitrili, benzamidati i kumarini) te smo usporedili fizikalno-kemijske i farmakokinetičke parametre *in vitro* probiranih spojeva. Dva aktivna spoja iz serija amidina i furana testirali smo u *in vivo* mišjem modelu A549 ksenografta sa inokulumima tumorskih stanica pripremljenim u 2D i 3D formatu. U istom modelu analizirali smo razliku ksenografta pripremljenih u 2D i 3D formatu, što uključuje krivulju rasta tumora, težinu tumora, koncentraciju ispitne supstance u tumoru LC-MS/MS analizom, fenotipizaciju infiltriranih stanica u tkivu tumora, razinu apoptoze i proliferacije stanica u tumorskom tkivu analizom protočne citometrije.

Ključne riječi: 2D i 3D stanične kulture, stanične linije karcinoma pluća, istraživanje i razvoj novih lijekova, amidini, furani, fenotipizacija infiltriranih stanica



## SUMMARY

Despite the long-term process of research and development of new molecules as potential drugs, very few of them reach the market. The reason for the high attrition rate of test molecules (eng. attrition rate) is primarily their inadequate tolerability, adverse effects and (non)efficacy in clinical studies. The high attrition rate of new drugs in the field of oncology is believed to be a consequence of poor prediction of tests in the early phase of testing new chemical entities (NCE) on 2D cell lines *in vitro*, which are the existing standard for testing potential antitumor drugs. The limitations of cell tests in 2D conditions are the unnatural shape of the cell, different gene expression, cellular environment, metabolism and the other. By developing three-dimensional cell cultures (3D) *in vitro*, it is possible to experience similar natural conditions in which cells are found in the body. With this research, we validated the cellular method of screening active molecules in 3D format on 3 lung cancer cell lines (A549, HCC827 and NCI-H358). We compared the screening of active antitumor molecules in 2D and 3D format on the same cell lines for 5 chemical series (amidines, furans, acrones, benzamidates and coumarins) as well as the physicochemical and pharmacokinetic parameters of the *in vitro* screened compounds. We tested two active compounds from the amidine and furan series in the *in vivo* mouse model of A549 xenograft with tumor cell inoculums prepared in 2D and 3D format. In the same model, we analyzed the difference of xenografts prepared in 2D and 3D format, which includes tumor growth curve, tumor weight, concentration of test substance in tumor by LC-MS/MS analysis, phenotyping of infiltrated cells in tumor tissue, level of apoptosis and cell proliferation in tumor tissue by flow cytometry analysis.

Key words: 2D and 3D cell culture, lung cancer cell lines, drug R&D, amidines, furans, immunophenotyping of tumor infiltrating cells by flow cytometry



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Karcinom pluća .....	2
1.2. Proces istraživanja i razvoja novih lijekova .....	3
1.3. Problem velikog broja odljeva molekula (attriron rate) u procesu istraživanja i razvoja novih lijekova.....	5
1.4. Klasične metode testiranja NKE <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> te integriranje novih metoda u predkliničku fazu evaluacije novih onkoloških lijekova .....	7
1.5. Trodimenzionalne (3D) stanične kulture.....	8
1.6. <i>In vivo</i> modeli u predkliničkoj fazi istraživanja novih onkoloških lijekova....	11
1.7. Kancerogeneza.....	12
1.8. Uloga infiltriranih stanica u tumoru .....	14
1.8.1. Citotoksični T limfociti .....	16
1.8.2. Pomoćnički T limfociti .....	16
1.8.3. B limfociti .....	17
1.8.4. Prirodne stanice ubojice.....	17
1.8.5. Dendritične stanice .....	17
1.8.6. Makrofazi povezani s tumorom .....	18
1.9. Novi kemijski entiteti (NEK) kao izvor potencijalnih novih kemoterapeutika za liječenje karcinoma pluća.....	19
1.9.1. Amidini.....	20
1.9.2. Furani.....	20
1.9.3. Akrlonitrili .....	20
1.9.4. Kumarini.....	21
1.9.5. Citozinski derivati supstituirani triazolom .....	21
1.10. Farmakokinetičke metode <i>in vitro</i> za profiliranje fizikalno-kemijskih svojstava aktivnih molekula .....	21
1.11. Opis istraživanja .....	23
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1. Kemikalije i biološki materijal .....	29
3.1.1. Kemikalije za <i>in vitro</i> pokuse.....	29
3.1.2. Stanične linije.....	29
3.1.3. Kemikalije za <i>in vivo</i> pokus .....	30

3.1.4.	Životinjski model .....	31
3.1.5.	Kontrolni spojevi i novi kemijski entiteti (NKE) .....	31
3.1.6.	Protutijela korištena za određivanje statusa staničnog ciklusa <i>in vitro</i> metodom protočne citometrije .....	31
3.1.7.	Protutijelo korišteno za imunohistokemijsko bojanje histoloških preparata 2D i 3D tumora.....	31
3.1.8.	Protutijela korištena za imunofenotipizaciju infiltriranih imunoloških stanica u tumore mišjih ksenografta metodom protočne citometrije.....	32
3.1.9.	Oprema.....	32
3.1.10.	Potrošni sterilni materijal.....	33
3.2.	Metode <i>in vitro</i> .....	34
3.2.1.	Priprema serijskih razrjeđenja spojeva za testove vijabilnosti i proliferacije stanica <i>in vitro</i> .....	34
3.2.2.	Određivanje kontrole kvalitete pojedine pločice za test citotoksičnosti i proliferacije.....	34
3.2.3.	Umnožavanje stanica pojedinih staničnih linija.....	35
3.2.4.	Test vijabilnosti stanica na 2D staničnim kulturama (MTS) .....	35
3.2.5.	Test vijabilnosti stanica na 3D staničnim kulturama (CellTiter-Glo®) ...	35
3.2.6.	BrdU test proliferacije stanica na 2D i 3D pripremljenim staničnim kulturama .....	36
3.2.7.	Statistička analiza podataka dobivenih testovima vijabilnosti i proliferacije stanica <i>in vitro</i> .....	36
3.2.8.	Aneksin V test za detekciju apoptotičnih stanica tretiranih potentnim spojevima amidinske serije na A549 staničnoj liniji .....	36
3.2.9.	Analiza aktivnih i odabranih neaktivnih spojeva za određivanje farmakokinetičkih svojstava na testovima <i>in vitro</i> .....	37
3.3.	Metode <i>in vivo</i> .....	39
3.3.1.	Dobrobit životinja i odobrenje Etičkog komiteta Selvita d.o.o. CARE ..	39
3.3.2.	Uvjeti držanja Balb/C NU/NU miševa.....	40
3.3.3.	Priprema suspenzije A549 stanica za inokulaciju Balb/C NU/NU miševa za razvoj tumorskih ksenografta.....	40
3.3.4.	Inokulacija suspenzije tumorskih stanica .....	41
3.3.5.	Mjerenje rasta i izračun veličine tumora.....	41
3.3.6.	Kriterij isključivanja životinja iz pokusa.....	42
3.3.7.	Alokacija životinja po skupinama u pokusu:.....	42

3.3.8.	Formulacija testnih supstanci i IP treatment Balb/C NU/NU miševa s testnim supstancama LM-1a i CR-2 .....	42
3.3.9.	Završno uzimanje uzoraka .....	42
3.3.10.	LC-MS/MS analiza CR-2 i LM-1a u plazmi i tumoru .....	43
3.3.11.	Postupak disocijacije tumorskog tkiva i izolacija stanica za imunofenotipizaciju.....	43
3.3.12.	Protokol bojanja izoliranih stanica iz tkiva tumorskih ksenografta za imunofenotipizaciju stanica tumora protočnom citometrijom .....	44
3.3.13.	Protokol zamrzavanja i odmrzavanja stanica izoliranih iz tumora .....	45
3.3.14.	Protokol bojanja izoliranih stanica tumora za analizu Aneksin V i Ki-67 biljega protočnom citometrijom.....	45
3.3.15.	Statistička analiza podataka dobivenih u <i>in vivo</i> pokusu .....	47
3.3.16.	Histopatološka analiza tumora iz mišjih ksenografta .....	47
3.3.17.	Imunohistokemijska analiza Ki-67 pozitivnih stanica u preparatima tumora	47
3.3.18.	Određivanje koncentracije testiranih spojeva u plazmi i tumorskom tkivu ksenografta LC-MS/MS analizom .....	48
4.	REZULTATI .....	50
4.1.	Validacija metoda testiranja spojeva na staničnim kulturama humanog karcinoma pluća u 3D uvjetima.....	50
4.1.1.	Određivanje početnog broja stanica po jažici za dobivanje optimalne krivulje rasta za pojedine stanične kulture u 3D uvjetima .....	50
4.1.2.	Prikaz formiranja sfere staničnih linija u 3D uvjetima .....	52
4.1.3.	Testiranje standardnih spojeva korištenih u validaciji metoda <i>in vitro</i> u 3 D uvjetima .....	56
4.1.4.	Parametri kontrole kvalitete (QC) testnih pločica: .....	65
4.2.	Određivanje IC <sub>50</sub> vrijednosti za pojedine NKE i kontrolne spojeve u testu proliferacije i vijabilnosti stanica.....	66
4.2.1.	Amidini .....	66
4.2.2.	Furani.....	69
4.2.3.	NKE iz serije akrilonitrila, kumarina i cisteinskih derivata.....	72
4.3.	Mogući mehanizam djelovanja najaktivnijih spojeva iz amidinske serije metodom protočne citometrije .....	72
4.3.1.	Test aneksina V - apoptotičke promjene u plazmatskoj membrani .....	72
4.4.	Analiza aktivnih i odabranih neaktivnih spojeva na testovima <i>in vitro</i> za određivanje farmakokinetičkih svojstava.....	73

4.4.1.	Kinetička topljivost .....	74
4.4.2.	Kromatografska studija lipofilnosti .....	74
4.4.3.	Metabolička stabilnost u mikrosomima jetre .....	74
4.4.4.	Vežanje za proteine plazme i stabilnost u humanoj i mišjoj plazmi .....	75
4.4.5.	Stabilnost u mišjoj i humanoj plazmi .....	75
4.4.6.	MDCKII-MDR1 test permeabilnosti .....	76
4.5.	Rezultati <i>in vivo</i> pokusa .....	78
4.5.1.	Analiza broja prihvaćenih tumora u Balb/cNU/NU miševa .....	79
4.5.2.	Usporedba rasta i težine tumora netretiranih miševa inokuliranih A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima .....	80
4.5.3.	Usporedba rasta i težine tretiranih tumora u 2D .....	83
4.5.4.	Usporedba rasta i težine tretiranih tumora u 3D .....	83
4.5.5.	Imunofenotipizacija infiltriranih imunoloških stanica u mišjim ksenograftima u 2D i 3D .....	85
4.5.6.	Analiza faza staničnog ciklusa infiltriranih stanica .....	92
4.5.7.	Citokini u plazmi .....	97
5.	DISKUSIJA .....	99
5.1.	Testiranje serija spojeva .....	100
5.2.	Mogući mehanizam djelovanja .....	100
5.3.	<i>In vivo</i> rezultati .....	101
6.	ZAKLJUČAK .....	107
7.	OBJAVLJENI RADOVI IZ DOKTORSKOG RADA .....	109
8.	KONGRESNA PRIOPĆENJA IZ DOKTORSKOG RADA .....	110
9.	LITERATURA .....	111
10.	POPIS KRATICA .....	127
11.	POPIS SLIKA .....	128
12.	POPIS TABLICA .....	132
13.	PRIVITAK 1 .....	134
14.	ŽIVOTOPIS .....	140



## 1. UVOD

## 1.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća jedan je od najčešće dijagnosticiranih malignih tumora, kao i vodeći uzrok smrti diljem svijeta. Prema podacima Agencije za istraživanje raka (IARC, engl. *Agency for Research on Cancer*) iz 2022. učestalost karcinoma pluća u cjelokupnom broju dijagnosticiranih malignih bolesti bila je 12,4% (2,5 milijuna slučajeva), dok je smrtnost bila 18,7% (1,8 milijuna slučajeva). Zbog visoke incidencije i smrtnosti, ova bolest predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem (Dickson et al., 2022; La Monica, 2022).

U novije vrijeme primjećeno je da pojavnost (incidencija) ovisi o regiji, pa su Australija i Novi Zeland prvi u svijetu po incidenciji karcinoma pluća, dok zapadna Afrika ima najmanju incidenciju (Thandra et al., 2021).

Ovu regionalnu razdjeljenost možemo objasniti pokretanjem mnogobrojnih projekata u zapadnim zemljama za ranu detekciju karcinoma, posebice probira u visokorizičnim populacijama što je za karcinom pluća uključuje aktivno pušenje u dobi od 55 do 74 godina života. No unatoč svim dosadašnjim naporima da se statistika vezana za incidenciju i mortalitet karcinoma pluća poboljša, predikcije za 2026. godinu pokazuju da će smrtnost od karcinoma pluća biti viša u odnosu na ukupni broj smrti uslijed kolorektalnog karcinoma i karcinoma pankreasa, koji su trenutno drugo- i trećerangirani karcinomi po smrtnosti u svijetu (Siegel et al., 2025).

Kao i u svijetu, incidencija karcinoma pluća u zemljama Europske unije pokazuje isti statistički obrazac. U 2022. godini incidencija karcinoma pluća bila je 95 osoba na 100 000 za mušku populaciju, te 44 osobe na 100 000 za žensku populaciju. Isto tako je vodeći uzrok smrti od posljedica karcinoma. I unutar Europske unije primjećene su varijacije u incidenciji. Pa tako veću incidenciju imaju zemlje istočnog dijela poput Mađarske i Srbije (Zhou et al., 2024).

Incidencija karcinoma u Hrvatskoj je među najvišima unutar zemalja Europske unije, čak 12% viša u odnosu na prosjek Unije. Stopa smrtnosti u 2021. bila je 31% viša u odnosu na prosjek Europske unije, te je time pozicionirana na drugo mjesto, odmah iza Mađarske na listi zemalja EU. Karcinom pluća čini 16% novih dijagnosticiranih karcinoma što je isto tako više od prosjeka EU. Smrtnost od raka pluća u Hrvatskoj u 2021. godini bila je 30% viša od prosjeka Zemalja EU. Najviše zabrinjava povećanje broja pušača, posebno u ženskoj populaciji, u dobi od 15 godina i više. Kao i u ostalim zemljama EU i u Hrvatskoj su pokrenute mjere kako bi se navedeni podatci poboljšali (Nacionalni probir za rak pluća te nacionalne preventivne kampanje protiv pušenja) (OECD/European Commission, 2025).

Karcinom pluća i dalje predstavlja veliko opterećenje za zdravstveni sustav i pojedinca unatoč napretku u dijagnostičkim modalitetima kao što su gensko sekvenciranje i određivanje tumorskih markera, rani dijagnostički probir, identifikacija i prevencija čimbenika rizika, smanjenje utjecaja nepovoljnog okoliša, kao i liječenje novim pametnim lijekovima (Ibodeng et al., 2023).

Karcinom pluća se tradicionalno široko klasificira u karcinom pluća malih stanica (SCLC, od engl. *small cell lung cancer*) i karcinom pluća ne-malih stanica (NSCLC, od engl. *non-small cell lung cancer*) na temelju mikroskopskog izgleda. SCLC čini otprilike 15% svih karcinoma

pluća, a NSCLC je dominantniji i obuhvaća otprilike 85% karcinoma pluća. Prema najnovijoj klasifikaciji torakalnih tumora Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine (Travis William D, 2021), mogu se podklasificirati u epitelne tumore, neuroendokrine neoplazme pluća, tumore ektopičnog tkiva i mezenhimalne tumore specifične za pluća. Epitelni tumori su češći i mogu se podijeliti u adenokarcinomi, karcinomi pločastih stanica (SCC), karcinomi velikih stanica te pleomorfni karcinom (Ibodeng et al., 2023). S obzirom na navedenu sistematizaciju tumora može se zaključiti da i prateća terapija nije jednostavna i potrebno ju je prilagoditi svakoj vrsti tumora te samom bolesniku. Stoga je i proces otkrića novih lijekova u navedenom terapijskom području zahtjevan, dugotrajan i skup (Ibodeng et al., 2023; Travis et al., 2021).

## 1.2. Proces istraživanja i razvoja novih lijekova

Istraživanje i razvoj (R&D) novog lijeka je složen, dugotrajan i vrlo skup proces. Današnje procjene pokazuju da je potrebno 11 do 13 godina istraživanja i razvoja novog lijeka sa ulaganjima višim od tri milijarde dolara. Troškovi tog procesa su još veći ako potencijalni novi lijek ne prođe jednu od tri faze kliničkog ispitivanja te ne dođe na tržište. Unatoč dugotrajnom i vrlo detaljnom istraživanju svake molekule koja bi mogla biti novi lijek, samo nekoliko molekula tijekom predkliničkog istraživanja zadovoljava kriterije potrebne da bi molekula dobila status predkliničkog kandidata. Uspješnost dovođenja lijeka na tržište kreće se od 3 do 11% što je nedovoljno dobro naspram velikog ulaganja novaca i svih ostalih kapaciteta potrebnih da bi lijek došao na tržište (Paul et al., 2010; Simoens & Huys, 2021).

Cijeli proces koji dovodi do novog lijeka možemo podijeliti na dva velika dijela koja se međusobno u nekim fazama preklapaju a to su: faza istraživanja i faza razvoja. U procesu istraživanja novih lijekova pronalaze se i generiraju novi molekularni entiteti kojima je moguće tretirati neku bolest. Za razliku od tradicionalne medicine i slučajnih znanstvenih otkrića, taj proces se vodi isključivo na temelju znanstvenih promišljanja i znanstvenih dokaza neke hipoteze. Stoga je taj dio procesa jako ovisan o znanstvenom i tehnološkom stupnju razvoja te je logično da se brzo razvio u prošlom stoljeću kao posljedica revolucionarnih otkrića i tehnološkog napretka na području fundamentalnih prirodnih znanosti. Razvoj i napredak novih disciplina biologije (biokemije, mikrobiologije, bioinformatike, molekularne biologije, epigenetike i imunoonkologije) osigurao je osnovu za otkrivanje novih lijekova racionalnim, znanstveno utvrđenim putem. Svaki novi lijek prije ulaska u klinička ispitivanja prolazi dugotrajnu fazu predkliničkih ispitivanja koja obuhvaćaju mnogobrojna ispitivanja novog kemijskog entiteta (NKE) *in vitro* na različitim biološkim materijalima životinjskog i humanog podrijetla, kao i ispitivanja *in vivo* na pokusnim životinjama. Tim ispitivanjima identificiraju se molekule koje imaju najveću šansu postati budući učinkovit lijek za određenu terapijsku indikaciju. Osim toga, tijekom navedenog procesa ispitivanja, izbacuju se molekule za koje se smatra da je ulaganje u njihov razvoj u lijek previše rizično jer rezultati dobiveni navedenim istraživanjima ukazuju da njihova svojstva nisu u skladu sa karakteristikama koje bi trebao imati budući lijek (Sleire et al., 2017).

Tijekom šezdesetih i sedamdesetih godina farmaceutske tvrtke ispitivale su velike banke sintetskih spojeva, prirodnih produkata ili ekstrakata, testirajući njihovu učinkovitost ili u

modelima sa pokusnim životinjama ili na staničnim i organskim sustavima životinjskog i humanog podrijetla. Taj pristup otkrivanja novih lijekova danas je poznat kao klasični pristup ili fenotipski probir aktivnih molekula (Vincent et al., 2022)

Otkriće receptora suspregnutih proteinom G (GPCRs, engl. *G-protein-coupled receptors*) u devedesetima godinama prošlog stoljeća, promijenilo je pristup testiranju i odabiru aktivnih molekula na osnovi njihovog djelovanja na odabranu molekulu („ciljnu molekulu“) za koju je prethodnim istraživanjima ustanovljeno da ima ključnu ulogu u patologiji razvitka bolesti. Taj pristup otkrivanja novih lijekova naziva se istraživanje na osnovi ciljne molekule (engl. *Target based drug discovery*). Tim pristupom omogućeno je ispitivanje velikih banaka kemijskih spojeva i njihovih interakcija sa mnoštvom različitih izoliranih molekula (većinom staničnih receptora) uključenih u pojedine bolesti (Jia ZC et al., 2024).

Svaki od pristupa ima svoje prednosti i ograničenja, a odabir pristupa ovisi o raznim čimbenicima: može li se doći do čiste ciljne molekule, budućem tretmanu i vrsti bolesti. Procesom istraživanja identificiraju se učinkovite molekule koje bi mogle postati potencijalni lijek(ovi) te se one istražuju i testiraju puno detaljnije. Istražuje se njihova osnovna farmakokinetika (apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje), testiraju se različite doze te određuje njihov raspon za koji se smatra da bi bio siguran u humanoj primjeni, istražuje se može li lijek u određenoj dozi stići do ciljne molekule/organa, detektiraju se i neželjeni učinci (potencijalna toksičnost) i slično. Time se određuju molekule sa najboljim svojstvima koje potom ulaze u fazu pretkliničkog razvoja.

Pretklinički razvoj potencijalnog lijeka obuhvaća *in vitro* testiranja (testovi na stanicama i molekulama izvan njihova normalnog okruženja tj. izvan organizma) i *in vivo* testiranja (pokusi koji se provode na živim organizmima, obično pokusnim životinjama, biljkama ili ljudima).

Tim pokusima pokušava se istražiti način djelovanja molekula te profili njihovih (ne)škodljivosti jer rezultat pretkliničkih ispitivanja trebao bi dati odgovor na pitanje može li se molekula testirati dalje na ljudima. Istovremeno se ispituje mogućnost sinteze i priprema molekule u velikim količinama. Neke aktivnosti pretkliničkog razvoja (sinteza i testiranja neškodljivosti) provode se pod strogo kontroliranim uvjetima i prema propisima regulatornih agencija za lijekove (DPP, dobra proizvođačka praksa; DLP dobra laboratorijska praksa; engl. GMP i GLP) onih područja i država gdje se lijek namjerava registrirati i prodavati. Molekula koja ispuni sve zahtjeve pretkliničkog razvoja i pokaže najbolji profil rezultata testiranja, postaje klinički kandidat i time počinje faza kliničkog ispitivanja novog lijeka (Waskiewicz, 2012).

Da bi kliničko ispitivanje bilo odobreno, regulatornoj agenciji daje se na uvid Zahtjev za ispitivanje novog lijeka (IND, engl. *Investigational New Drug Application*) koji sadrži detaljne informacije o farmakološkim podacima dobivenim iz istraživanja posebno na pokusnim životinjama, te sve informacije o procesu proizvodnje aktivne molekule. Uz to moraju biti priloženi detaljni protokoli kliničkih studija uz ostalu neophodnu dokumentaciju poput informiranog pristanka ispitanika i dozvole centralnog etičkog povjerenstva (nacionalnog ili regionalnog).

Slijede faze kliničkih ispitivanja novog lijeka. Ukratko, tri su faze kliničkih ispitivanja. U prvoj fazi potencijalni lijek se testira prvi put na ljudima i to na malom broju zdravih dobrovoljaca (20 do 100). U toj fazi se prije svega prati njegova neškodljivost i farmakokinetika.

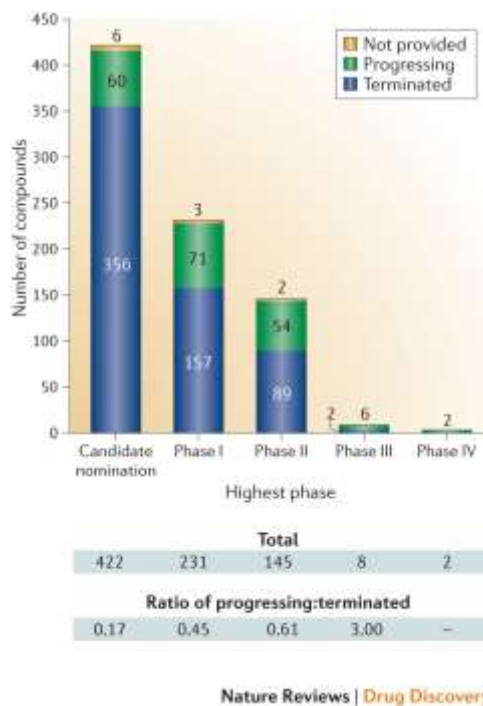
Druga faza kliničkih ispitivanja uključuje manji broj bolesnika (100 do 500) s određenom dijagnozom za koju je lijek predviđen te se prati učinkovitost lijeka i pojava neželjenih reakcija na lijek. U trećoj fazi kliničkih ispitivanja uključuje se veliki broj bolesnika (1000 do 5000) kako bi podaci za učinkovitost novog lijeka i njegove potencijalne neželjene učinke imali statističku značajnost. Ova faza ispitivanja novog lijeka je dugotrajnija i ujedno najskuplja od svih faza u procesu istraživanja i razvoja novog lijeka. Potrebno je naglasiti da se tijekom trajanja kliničkih ispitivanja paralelno nastavljaju fundamentalna istraživanja novog lijeka te izvode potrebna testiranja koja nisu u sklopu kliničkih studija.

Po završetku sve tri faze kliničkog ispitivanja i analize podataka koji su dobiveni, regulatorna agencija dobiva Zahtjev za odobravanje novog (inovativnog) lijeka (NDA, engl *New Drug Application*). Krajnji rezultat može biti odobrenje novog lijeka ili preporuka odgode odobrenja te zahtjev za dodatna ispitivanja. Nakon odobrenja stavljanja novog lijeka na tržište, istraživanja nikako ne prestaju. Lijek ulazi u četvrtu fazu ispitivanja (postmarketinška faza) tijekom koje veliki broj bolesnika konzumira novi lijek i tijekom tog perioda prate se i analiziraju mogući neželjeni učinci lijeka (posebno oni koji su vrlo rijetki te ih je nemoguće uočiti na malom broju bolesnika), interakcije sa drugim lijekovima, učinkovitost, brzina oporavka bolesnika i slično (Tianyang Wang et al., 2026).

### 1.3. Problem velikog broja odljeva molekula (attrition rate) u procesu istraživanja i razvoja novih lijekova

Unatoč dugotrajnom i vrlo detaljnom istraživanju svake molekule koja bi mogla biti novi lijek, samo nekoliko molekula tijekom pretkliničkog istraživanja zadovoljava kriterije potrebne da bi molekula dobila status pretkliničkog kandidata, a tek jedna do dvije uđu u fazu kliničkog istraživanja. Procjena je da čak 80% novih molekula ne uspije doći na tržište u svojstvu novih lijekova što nazivamo stopom osipanja ili odljeva (engl. *attrition rates*).

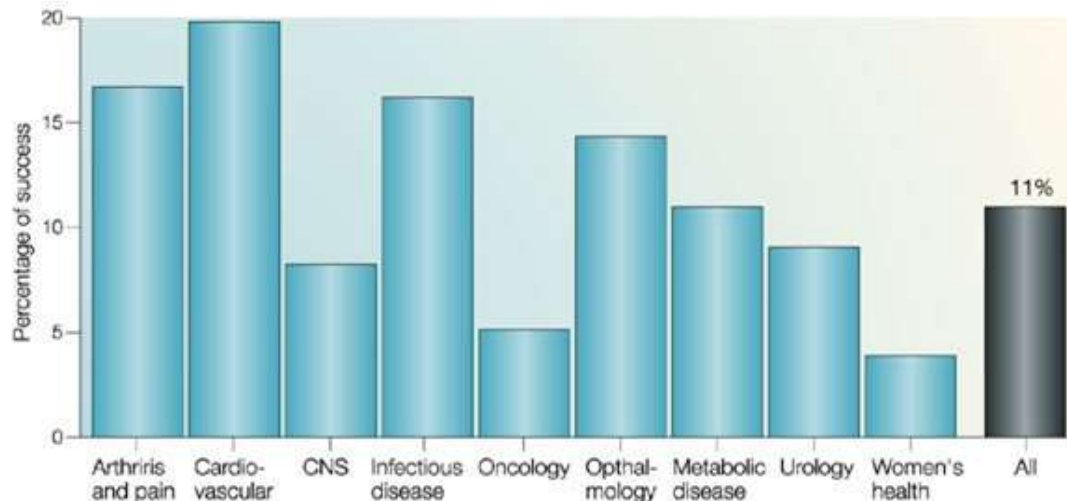
Farmaceutska industrija je pod ogromnim pritiscima koji uključuju, osim identifikacije nove molekule kao potencijalnog lijeka za određenu medicinsku indikaciju, ispunjavanje sve mnogobrojnih i oštrijih zahtjeva regulatornih agencija (EMA, FDA) koje novi lijek mora ispuniti. Osim toga, morala je razviti niz postupaka kako bi smanjila rizik od neuspjeha potencijalnog novog lijeka da ne stigne na tržište te se tako zaštitila od prevelikog gubitka uloženog novca. Procjena je da čak 80% novih molekula ne uspije doći na tržište u svojstvu novih lijekova (Slika 1) (Waring et al., 2015)



**Slika 1.** Omjer broja NKE s kojima se ulazi u preklinička istraživanja i broja molekula koje prođu sve faze kliničkih ispitivanja (preuzeto iz Waring M et al., 2015)

Najčešći razlozi zbog kojih novi lijek ne prođe neku od faza kliničkog razvoja su njegova nedovoljna učinkovitost (u 56% slučajeva) i škodljivost/toksičnost (28%) budućeg lijeka. Kao glavni razlog tako velikog broja molekula koje ne dođu na tržište navodi se korištenje određenih testova u predkliničkim fazama istraživanja novih lijekova, u svrhu određivanja primarno učinkovitosti, za koje se pokazalo da su premalo pouzdani i nedovoljno prediktivni da bi se njima mogla unaprijed procijeniti učinkovitost novog lijeka u ljudima (Gustavo Lorenzo Moretta, 2026).

Pokazano je da je najveći broj potencijalnih novih lijekova koji ne prolaze klinička ispitivanja, lijekovi za onkološku primjenu, njih više od 90% (Slika 2) (Hendriks, 2025; Kola & Landis, 2004).



**Slika 2.** Stopa osipanja ili odljeva lijekova (attririon rate) od faze FTH (od engl. first time in human) do registracije lijeka za pojedine terapijske skupine (preuzeto iz Kola I *et al.*, 2004)

Danas postoji konsenzus akademske zajednice i farmaceutske industrije da je proces istraživanja i razvoja onkoloških lijekova u potpunosti neučinkovit te ga je potrebno revidirati (Arisa *et al.*, 2024).

U posljednjih nekoliko godina identificirana su tri ključna čimbenika unutar navedenog procesa koji su uzrok njegove neučinkovitosti: testovi i modeli koji se koriste u prekliničkim ispitivanjima novih lijekova koji ne odgovaraju u potpunosti patofiziologiji bolesti u ljudi te su premalo pouzdani i nedovoljno prediktivni da bi se njima mogla unaprijed procijeniti učinkovitost novog lijeka u kliničkim ispitivanjima, nedostatak identificiranje i praćenje biomarkera tijekom cijelog procesa ispitivanja, te manjkavost translacijskih ispitivanja koji bi trebali biti prenosnica između prekliničkih ispitivanja i humane primjene (Lowenstein & Castro, 2009, Lowenstein PR *et al.*, 2009).

#### 1.4. Klasične metode testiranja NKE *in vitro* i *in vivo* te integriranje novih metoda u predkliničku fazu evaluacije novih onkoloških lijekova

Najvažnija karakteristika nekog testa *in vitro* koji se koristi za probir aktivnih novih kemijskih entiteta (NKE) je mogućnost produkcije pouzdanih i ponovljivih rezultata. Stoga je jedan bitan dio poboljšanja procesa uvođenje takvih testova u ranu fazu istraživanja čime bi se unaprijedila selekcija aktivnih NKE. Testovi koji se koriste za probir aktivnih molekula sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću u vrlo ranoj fazi procesa istraživanja i razvoja novih lijekova, tradicionalno se izvode na staničnim kulturama tumorskih stanica *in vitro* uzgojenim u dvodimenzionalnim (2D) uvjetima koje ne pružaju iste uvjete stanicama za rast i razvoj kao što je to slučaj u tumorima u živom organizmu. Ograničenosti takvih testova u 2D uvjetima su neprirodni oblik stanice (plosnat), drukčija izraženost gena, stanično okruženje, metabolizam i slično. Stoga su u posljednjih deset godina razvijeni *in vitro* stanični testovi koji imaju sličnije uvjete prirodnim uvjetima stanica u organizmu, a to su trodimenzionalne (3D) uzgojene stanične kulture (Brajša *et al.*, 2016).

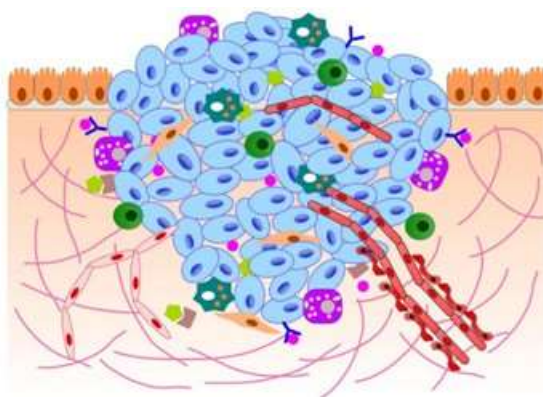
Termin „3D stanična kultura“ upotrebljava se za stanične kulture koje rastu u trodimenzionalnim uvjetima bilo na nekim nosačima ili u posebnom matriksu koji im to omogućuje. Tim terminom se naglašava suprotnost dosadašnjih dvodimenzionalnih ili 2D staničnih kultura (Cordeiro et al., 2024; Lv et al., 2017).

### 1.5. Trodimenzionalne (3D) stanične kulture

Trodimenzionalne stanične kulture imaju prednost pred dvodimenzionalnima u više aspekata. Dok se u 2D staničnim kulturama stanice adaptiraju na rast na ravnoj i čvrstoj podlozi, najčešće plastičnoj, što dovodi do promjene staničnih biokemijskih procesa, kinetike staničnog ciklusa, morfologije, funkcije i fizioloških odgovora na takvu okolinu, trodimenzionalno uzgojene (3D) *in vitro* stanične kulture mogu u potpunosti razviti rast sličniji prirodnijem okruženju (Breslin & O'Driscoll, 2013; Haycock, 2011; Jong, 2005). Ključna razlika između ova dva načina rasta je utjecaj na fizički oblik i geometriju stanice. Poznato je da oblik stanice i međustanični kontakti imaju veliki utjecaj na citoskelet stanice a on utječe na izraženost određenih gena i utiče na staničnu funkciju. U okruženju koje im omogućuje trodimenzionalni rast, stanice uglavnom spontano formiraju sferoidne oblike što u njima pobuđuje regulatorne i signalne procese. Tako formirani sferoidi sastoje se od stanica u različitim fazama staničnog ciklusa koje se nalaze na različitim nivoima sfere: gornji sloj koji je najizloženiji hranjivim tvarima čine većinom vijabilne stanice koje formiraju proliferativnu zonu sfere, dok unutrašnjost sfere čine stanice u mirovanju u hipoksičnoj zoni te apoptotične i nekrotične stanice koje čine sami centar sfere. Brzina proliferacije i morfologija stanica u takvim sferama ovisi o staničnom tipu i uvjetima u kojima se sfere stvaraju. Razlikujemo homogene 3D stanične kulture koje čine stanice jedne stanične linije i heterologne (multistanične) kulture koje čine dvije ili više vrsta stanica i/ili staničnih komponenti koje odgovaraju mikrookruženju tkiva i njegovoj kompleksnoj strukturi. U ovakvim uvjetima dolazi do prirodnijih međustaničnih interakcija, komunikacije između stanica i izvanstaničnog matirksa (Kapałczyńska et al., 2018).

Do danas su razvijeni mnogi stanični testovi koji uključuju 3D kulture (Cacciamali et al., 2022; Urzi et al., 2023).

Trodimenzionalno uzgojene (3D) *in vitro* stanične kulture mogu u potpunosti razviti sličnu tkivnu/tumorsku patologiju (Slika 3). U ovakvim uvjetima dolazi do prirodnijih međustaničnih interakcija, komunikacije između stanica i izvanstaničnog matirksa. Stanice u 3D kulturi imaju puno više sličnosti s tumorskim tkivom u morfologiji, rastu i diferencijaciji, metaboličkoj aktivnosti i funkciji nego što to imaju stanice uzgojene u dvodimenzionalnim kulturama (Asthana & Kisaalita, 2013; X. Xu et al., 2014).



**Slika 3.** Mikrookoliš tumora koji raste u trodimenzionalnim uvjetima. Uz tumorske stanice, u tumoru i ko njega nalazimo epitelne stanice, makrofage, fibroblaste, endotelne stanice, limfocite i pericite (preuzeto iz Xu *et al.* 2014.)

U ovakvim uvjetima omogućuje se interakcija između različitih vrsta stanica te stvaranja složenih sustava u kojima se može pratiti kako stanice međusobno djeluju. Stanice reagiraju na protok diferencijacijom i metaboličkom prilagodbom te primjenom takvih uvjeta u *in vitro* pokusima stanice postaju izložene uvjetima sličnim protoku krvi ili protoku intersticijske tekućine u živom organizmu. Ovakvi mikrofluidni sustavi kontinuirano osiguravaju hranjive tvari tamo gdje su potrebne, što znači da stanice i organi rastu na realističniji način.

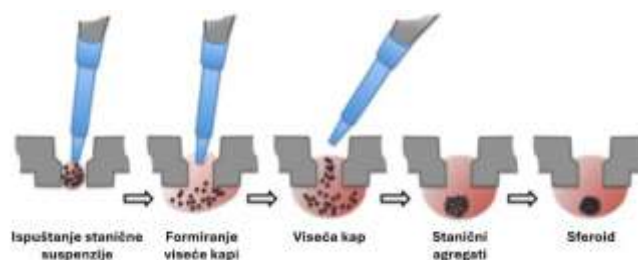
Dosadašnja istraživanja pokazala su značajne razlike u dobivenim rezultatima aktivnosti za pojedine nove molekule na testovima koji koriste 2D ili 3D uzgojene stanične kulture (Lv *et al.*, 2017)

Danas je dobro poznato da se stanice ponašaju strukturno i funkcionalno drugačije kad rastu na tankoj 2D površinskoj podlozi nasuprot debelom sloju polimernih 3D molekula. Sustavi za promatranje i analizu stanica u 2D kulturama su godinama razvijani i prilagođavani uvjetima u kojima stanice rastu. Nadalje, dostupnost literature s kojom se mogu usporediti dobiveni rezultati je značajno veća u odnosu na literaturu vezanu za 3D te su ljudi skloniji korištenju metoda i formi koji su im poznati i lakše upravljivi. Uz to 2D stanične kulture uzgajaju se na ravnim podlogama, obično izrađenim od plastike koje mogu biti obložene (eng. *coating tissues*). Iako postoji vidljiva razlika između ova dva stanična modela, biološka važnost dobivenih rezultata na 3D staničnim modelima te njihovo pozicioniranje unutar R&D procesa još nije u potpunosti evaluirana. Razlozi su mnogobrojni. Istraživački centri sa dugogodišnjim iskustvima rada sa tradicionalnim testovima na dvodimenzionalno uzgojenim staničnim linijama nisu spremni ponovno prolaziti procese validacije istih te ponovno mukotrпно prikupljanje povijesnih podataka koji omogućuju usporedbu aktivnosti sa drugim istraživačkim centrima. Osim toga, nove tehnologije iziskuju razvoj novih reagensa i opreme koji omogućuju novim testovima lakšu implementaciju i validaciju.

Jedan od prikladnijih testova za ispitivanje antitumorske aktivnosti NKE *in vitro* je metoda „viseće kapi“ (od engl. „*hanging-drop*“) (Guimaraes *et al.*, 2024; Ohguro *et al.*, 2024).

Tom metodom omogućuje se malom alikvotu suspenzije stanica, proliferacija i sferoidni rast na dnu viseće kapi medija (Foty, 2011). Danas je test moguće implementirati za probir velikog

broja spojeva u HTS formatu (HTS, engl. *high throughput screening*) te su u tu svrhu dizajnirane test pločice sa 96 i 384 jažicama (Perfecta3D) (Slika 4).

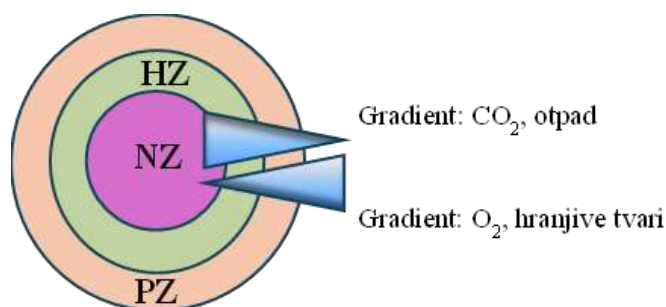


**Slika 4.** Proces formiranja sfere u 3D Biomatrix visećim pločicama. Slike preuzete iz Perfecta3D® Hanging Drop Plates Protocols (<https://3dbiomatrix.com/>).

Prednost „hanging-drop“ metode u ranoj fazi ispitivanja NKE je da ne dolazi do reakcija između spojeva i molekula nosača, već spojevi u takvom slobodnom okruženju djeluju na sferoidni rast stanica što je sličnije uvjetima u organizmu (Shri et al., 2017).

Osim toga, u tako ranoj fazi istraživanja i probira molekula u HTS formatu, malo se zna o fizikalno-kemijskim svojstvima testiranih molekula te bi svaka dodatna interakcija s drugim već postojećim molekulama u sustavu mogla dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.

Stanice koje rastu sferoidno u 3D uvjetima stvaraju proliferativnu zonu na samom rubu sfere čime im se povećava dostupnost hranjivim tvarima u mediju te se tako stvara gradijent dostupnosti kisika i hranjivih tvari i stabilnost proliferativne zone. Obrnuti gradijent stvara se prema unutrašnjosti sfere ( $\text{CO}_2$  i razgrađene tvari) te unutrašnjost sfere ispunjena stanicama u nekrozi (Slika 5) (Brajša et al., 2016; Hirschhaeuser et al., 2010).



**Slika 5.** Zone rasta sferoidnih stanica; PZ – proliferacijska zona, QZ – mirujuća ili hipoksična zona, NZ – nekrotična zona (preuzeto iz Brajša *et al.* 2016.)

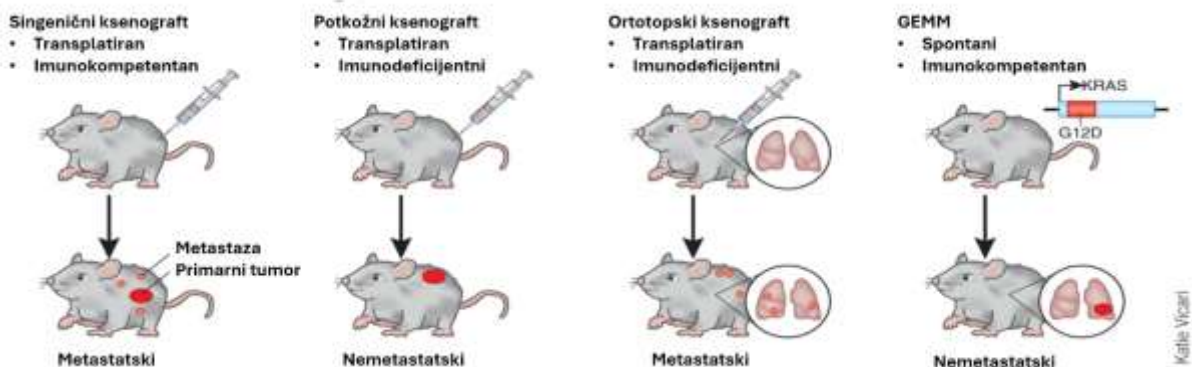
To čini ovaj sustav mnogo boljim biomimetičkim modelom koji je fiziološki relevantniji i prediktivniji u odnosu na 2D stanične kulture.

Jedna od bitnih prednosti 3D staničnih modela je smanjenje upotrebe broja životinja u *in vivo* modelima. Modeli na pokusnim životinjama pokazali su se nedovoljno pouzdani i prediktivni u razvoju novih onkoloških molekula. U skladu sa znanstvenim napretkom u istraživanju modela humanog tkiva u proteklim desetljećima novi lijekovi neće morati prolaziti testiranje isključivo

na animalnim modelima (FDA Releases Draft Guidance on Alternatives to Animal Testing in Drug Development; <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-releases-draft-guidance-alternatives-animal-testing-drug-development> (pristupljeno 10.014. 2026). Sukladno zakonima koji su prethodili, Američka agencija za hranu i lijekove (od engl. FDA, *Federal drug agency*) već je uvela način uključivanja podataka iz *in vitro* studija kao dio formalnog podnošenja dokumeata za odobrenje lijeka. (Wadman, 2023.). Osim toga, glavne europske i američke agencije počele su koristiti metodologije temeljene na dokazima, poput sustavnih pregleda i sustavnih karata, u toksikološkoj procjeni (Wadman, 2023).

### 1.6. *In vivo* modeli u predkliničkoj fazi istraživanja novih onkoloških lijekova

Najčešći model *in vivo* u predkliničkim israživanjama djelotvornosti onoloških lijekova su modeli mišjih ksenografta (Slika 6).

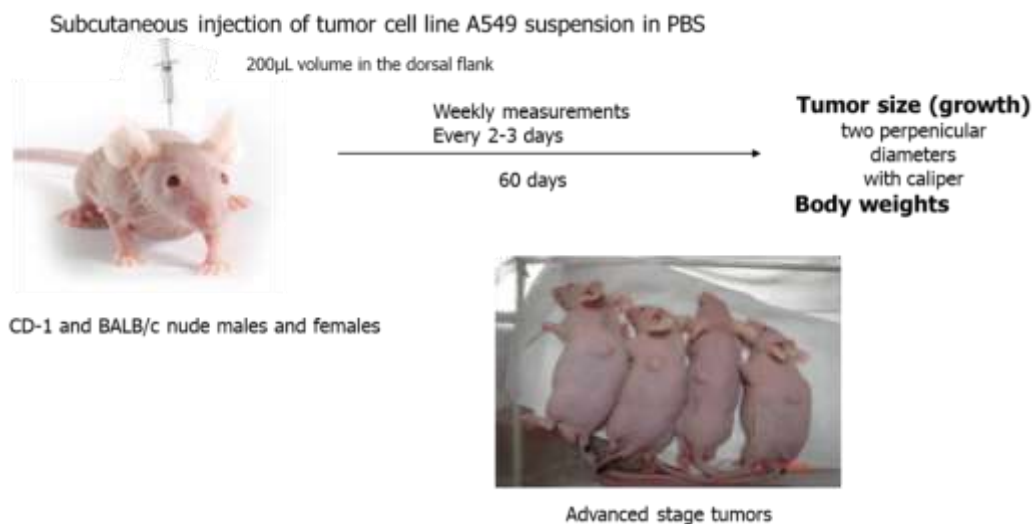


**Slika 6.** Modeli mišjih ksenografta (preuzeto i prilagođeno iz Francia et al. 2010.)

Potkožni ksenograft (SC, od engl. *subcutaneous xenograft*) je medicinski i istraživački pojam koji označava presađivanje tkiva, stanica ili organa s jedne vrste na drugu, pri čemu se taj materijal smješta ispod kože (subkutano) primatelja. Stanice raka (često humane) ubrizgavaju se pod kožu imunokompromitiranog miša (najčešće na boku ili leđima). Ova metoda je popularna zbog jednostavnosti, visoke pouzdanosti te u nekim slučajevim lakoće mjerenja volumena tumora (praćenje rasta) (C. Xu et al., 2019)

Razlikujemo singenične ksenografte (izografte) u kojima se su davatelj i primatelj ksenografta genetski identične jedinice, kod kojih je tkivna kompatibilnost vrlo visoka čime se izbjegava odbacivanje presađenog biloškog materijala, te ortotopske (grč. Orthos, ravno, ispravno; topos, mjesto) koji označava ksenografte nastale od materijala koji potječe od istog organa u koji se stanice implementiraju. Time se simulira ponašanje tumora kao u stvarnom ljudskom tijelu (van Rijt et al., 2023)

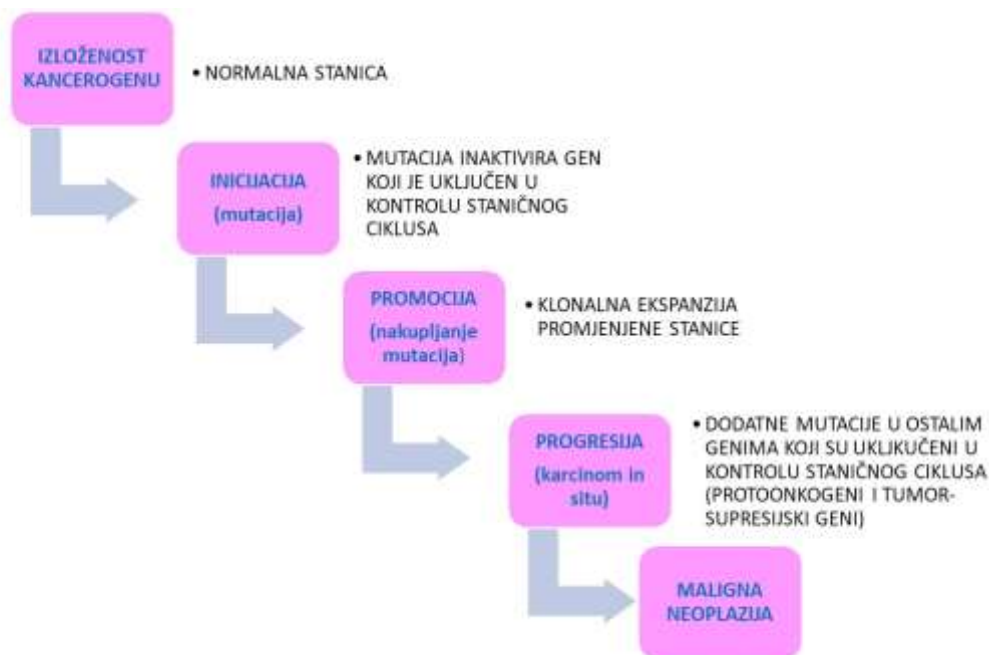
Zbog potreba mnogobrojnih onkoloških projekata i istraživanja antitumorskih lijekova, u Istraživačkom institutu PLIVA je 2011. razvijen model A549 mišjih ksenografta koji se koristi i danas.



**Slika 7.** Model A549 mišjih ksenografta razvijen u Istraživačkom institutu PLIVA. Preuzeto iz Ševeljević –Jaran D. and Hrvačić B: Reduction and refinement in a xenograft tumor efficacy study FELASA/Scand-LAS Finland, June 2010.

### 1.7. Kancerogeneza

Smatra se da je nastajanje tumora ili *kancerogeneza* postepeni proces koji se odvija u više koraka, a počinje nakupljanjem genskih mutacija u stanici te prijenosom tih mutacija na druge stanice nastale diobom. Model klonalne ekspanzije pretpostavlja nastanak tumora od jedne takve stanice sa nakupljenim genetskim mutacijama. (Slika 8.). Osim toga, stanice tumora razvijaju određeni stupanj neovisnosti od vanjskih čimbenika koji kontroliraju stanični ciklus (primjerice hormona ili čimbenika rasta).



### Slika 8. Shematski prikaz nastajanja maligne neoplazije (kancerogeneza)

Uz stanične čimbenike na razvoj tumora utječu i ostali čimbenici iz okoliša (organska otapala, neki lijekovi, policiklički aromatski ugljikovodici, radioaktivno i UV zračenje, pesticidi, virusi (HBV, HPV) i bakterije (*H. pylori*)).

Iako se mnogo zna o molekularnim promjenama u stanici, maligni tumori vrlo su složene bolesti i ne mogu se objasniti isključivo molekularnim promjenama u stanici. Tumorska masa nije sastavljena od jedne vrste stanica, već je populacijski heterogena zbog stalnih dioba stanica, nestabilnosti genoma zloćudno promijenjenih stanica i okolnog tkiva na koje tumor rastom djeluje. Stoga su Hanahan i Weinberg 2000. godine (Hanahan & Weinberg, 2000) istaknuli značajna obilježja malignog tumora:

1. stalna nekontrolirana stanična proliferacija
2. stalna prisutnost signala koji potiču stanicu na diobu (čimbenici rasta i onkogeni)
3. odsutnost signala koji u normalnim stanicama zaustavljaju proces diobe (mutacije u tumorskim supresijskim genima)
4. diferencijacija stanica i gubitak primarne funkcije
5. izostanak apoptoze (programirane smrti stanice)
6. invazivni rast (prodiranje u okolno tkivo)
7. angiogeneza: indukcija stvaranja novih krvnih žila koje opskrbljuju tumor
8. metastaziranje: širenje tumorskih stanica u druge organe putem limfe ili krvi te stvaranje novih tumorskih žarišta.

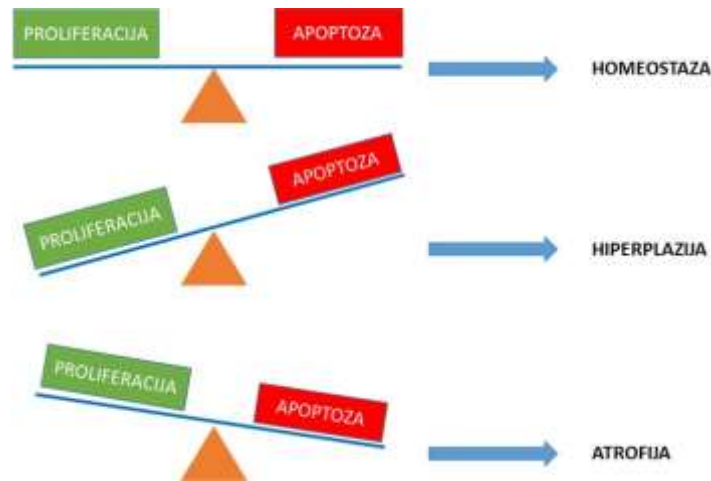
Sve navedeno potvrđuje da je rak kompleksna i višedimenzionalna bolest čije razumijevanje zahtijeva integraciju molekularnih, staničnih i okolišnih čimbenika. Time je pronalazak učinkovitog novog antitumorskog lijeka opterećen kompleksnom patofiziologijom.

Posebno je bitna karakteristika nekontrolirana proliferacija stanica. Stanica neprekidno ima uvid u svoj status, što uključuje pristup kisiku i potrebnim hranjivim tvarima, integritetu genoma i uravnoteženosti svojeg staničnog ciklusa. Ako sustav koji nadzire odvijanje staničnog ciklusa detektira bilo kakav poremećaj, primjerice nedostatak hranjivih tvari, aktivirat će sustave u stanici koji će pokrenuti procese *programirane stanične smrti ili apoptoze*. Apoptoza je kontrolirani fiziološki proces stanične smrti koji ima ključnu ulogu u regulaciji homeostaze tkiva, čime se održava ravnoteža između gubitka stanica i stvaranja novih stanica u tkivima.

Postoje razni čimbenici koji mogu aktivirati apoptozu. Uglavnom se nakon pokretanja procesa apoptoze aktiviraju proteolitički enzimi kaspaze, koji sudjeluju u cijepanju pojedinih dijelova stanice i genskog materijala. Stanica se počinje smanjivati i formira se *apoptotsko tjelešce*, koje fagocitiraju okolne stanice i rezidualni makrofazi. Stanice koje odumiru nekrozom pucaju i otpuštaju stanični sadržaj u okolno tkivo te time otpuštaju tvari koje izazivaju upalnu reakciju, dok stanice koje odumiru apoptozom ne uzrokuju upalnu reakciju okolnog tkiva.

Apoptoza i proliferacija dva su komplementarna procesa koja moraju biti strogo kontrolirana da bi se održavala ravnoteža u broju stanica. Njihov odnos ujedno je i prilagodba na potencijalno oštećenje. Poremećaj u samom procesu regulacije homeostaze može dovesti do razvitka malignog tumora jednako kao što to čini poremećaj regulacije staničnog ciklusa. Ako se odnos tih dvaju procesa naruši te prevagne jedan od njih, posljedice su za tkivo ili

hiperplazija tkiva kod pojačane nekontrolirane proliferacije ili atrofija u slučaju kad većina stanica odumire procesom apoptoze, a proces proliferacije ih nedovoljno brzo ili uopće ne nadomješta. Stoga je uvid u status apoptoze i proliferacije tumorskog jednog od bitnih čimbenika u dijagnostičkoj diferencijaciji maligne bolesti (Bai et al., 2015).



**Slika 9.** Shematski prikaz odnosa procesa proliferacije i apoptoze u tkivu. Proliferacija i apoptoza komplementarni su i kontrolirani fiziološki procesi. U narušavanju homeostaze dolazi do patoloških promjena u tkivima (hiperplazije ili atrofije).

### 1.8. Uloga infiltriranih stanica u tumoru

Tumorski mikrookoliš (TME, od engl. *tumor microenvironment*) predstavlja složen i dinamičan sustav koji okružuje tumorske stanice i aktivno sudjeluje u razvoju i napredovanju raka. Sastoji se od različitih komponenti, uključujući tumorske stanice, matične stanice raka, fibroblaste povezane s rakom, pericite, imunološke i upalne stanice, kao i izvanstanični matriks (ECM, od engl. *extracelullar matrix*) s pripadajućim faktorima rasta. Upravo zbog te kompleksne strukture TME ima ključnu ulogu u regulaciji proliferacije, preživljavanja i migracije tumorskih stanica te predstavlja neizostavan dio neoplastičnog procesa (Wang et al., 2023).

Interakcija između tumorskih stanica i mikrookoliša izrazito je složena i dvosmjerna. Normalna stroma ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i strukturalnog integriteta epitelnog tkiva. Međutim, tijekom razvoja tumora dolazi do značajnih promjena: bazalna membrana se razgrađuje, izvanstanični matriks postaje dezorganiziran uslijed pojačane aktivnosti proteaza, a istovremeno dolazi do sinteze novih, tumorski specifičnih makromolekula ECM-a. Ove promjene dovode do aktivacije strome, čime se dodatno potiče rast i invazivnost tumora (Almazrouei et al., 2025).

Jednu od ključnih komponenti tumorskog mikrookoliša čine fibroblasti, koji su odgovorni za sintezu i remodeliranje ECM-a. Osim strukturalne uloge, fibroblasti sudjeluju i u signalnim procesima jer luče faktore rasta koji aktiviraju unutarstanične signalne puteve, čime potiču proliferaciju i preživljavanje stanica. Posebno važnu ulogu imaju fibroblasti povezani s rakom (CAF, od engl. *Cancer Associated Fibroblasts*), koji predstavljaju heterogenu populaciju

aktiviranih fibroblasta prisutnih unutar tumorskog mikrookoliša. CAF-ovi najčešće potječu iz lokalnih fibroblasta, ali mogu nastati i iz drugih stanica, uključujući mezenhimalne matične stanice. Također se mogu razviti kroz procese epitelno-mezenhimalne (EMT, od engl. *epithelial-mesenchymal transition*) ili endotelno-mezenhimalne tranzicije. Njihova uloga u progresiji tumora je višestruka jer lučenjem transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ ) potiču invaziju tumorskih stanica i EMT, ali i moduliraju imunološki odgovor i mikrookoliš. Osim toga, izlučuju različite čimbenike rasta i kemokine koji potiču proliferaciju i migraciju tumorskih stanica. CAF-ovi također doprinose angiogenezi lučenjem čimbenika poput VEGF-a, FGF-a i PDGF-a, čime omogućuju stvaranje novih krvnih žila nužnih za rast tumora (Kalluri, 2016; Orimo & Weinberg, 2007).

Važan dio tumorskog mikrookoliša čine i leukociti koji infiltriraju tumor (TIL, od engl. *tumor infiltrating leukocytes*) koji se nalaze unutar tumora i njegove okoline. Oni imaju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru na tumor, ali i u određivanju prognoze bolesti. Njihov učinak ovisi o tipu i funkciji pojedinih stanica. TIL-ovi su heterogena skupina imunoloških stanica koja uključuje T limfocite, B limfocite, prirodne stanice ubojice (NK stanice), dendritičke stanice, makrofage i druge populacije. Njihovo djelovanje može biti dvosmjerno – ovisno o tipu stanica i uvjetima u mikrookolišu, mogu poticati antitumorski imunitet ili doprinositi imunosupresiji i napredovanju tumora. Povećan broj određenih populacija, poput dendritičkih stanica, prirodnih stanica ubojica (NK stanica), T limfocita i B limfocita, često je povezan s boljim kliničkim ishodima. Nasuprot tome, prisutnost većeg broja imunoloških stanica s imunosupresivnim ili protumorski nepovoljnim djelovanjem, kao što su neutrofil, monociti i regulatorni T limfociti, može biti povezana s lošijom prognozom. U idealnim uvjetima, TIL-ovi infiltriraju tumorsko tkivo i djeluju putem izravne citotoksičnosti, prezentacije antigena i lučenja citokina, čime pojačavaju imunološki odgovor protiv tumora (Binnewies et al., 2018; Fridman et al., 2012; Hanahan & Weinberg, 2011; Ma et al., 2024).

Važnu ulogu unutar tumorskog mikrookoliša imaju makrofazi, pri čemu različiti podtipovi (M1 i M2) imaju suprotne učinke na tijek bolesti. M1 makrofagi mogu djelovati protutumorski dok M2 makrofazi često potiču rast i progresiju tumora. Zbog toga omjer i funkcionalno stanje imunoloških stanica unutar TME-a značajno utječu na ishod bolesti (Mantovani et al., 2017; Qian & Pollard, 2010).

Tumorski mikrookoliš je aktivni sudionik u razvoju tumora. Razumijevanje složenih interakcija između tumorskih stanica i njihovog mikrookoliša ključno je za razvoj novih, ciljano usmjerenih terapijskih pristupa i prevladavanje postojećih ograničenja u liječenju raka.

Regrutiranje TIL-ova u tumorsko tkivo odvija se prvenstveno putem kemokinske signalizacije. Nakon dolaska u tumor, oni ulaze u složene interakcije s tumorskim stanicama i stromalnim komponentama. Međutim, tumorski mikrookoliš često je imunosupresivan, što ograničava njihovu učinkovitost. Unatoč prisutnosti u tumoru, mnogi TIL-ovi pokazuju tzv. funkcionalnu iscrpljenost, pri čemu dolazi do smanjenja njihove citotoksične aktivnosti. Ovaj fenomen povezan je s pojačanom ekspresijom molekula imunoloških kontrolnih točaka, metaboličkom konkurencijom i djelovanjem inhibitornih citokina (Binnewies et al., 2018; Griffith et al., 2014; Wherry & Kurachi, 2015).

Zbog svoje ključne uloge u antitumorskom imunitetu, TIL-ovi su u središtu suvremenih istraživanja i razvoja imunoterapije. Posebno su važni u terapijama koje uključuju blokadu imunoloških kontrolnih točaka, gdje njihova prisutnost, funkcionalno stanje i prostorna organizacija mogu značajno utjecati na terapijski odgovor. Osim toga, razvijaju se i terapije temeljene na TIL-ovima kao oblik personalizirane stanične terapije s ciljem poticanja regresije tumora (Wei et al., 2018).

*In vivo* modeli pružaju sveobuhvatniji uvid u ponašanje TIL-ova. Singenetski mišji modeli omogućuju proučavanje imunološkog odgovora u očuvanom imunološkom sustavu, dok ksenograftni modeli izvedeni od pacijenata (PDX, od engl. *patient derived xenografts*) omogućuju istraživanje ljudskih tumora, ali uz ograničenje nedostatka potpunog imunološkog sustava. Kako bi se to nadvladalo, razvijeni su i humanizirani mišji modeli u koje se uvode ljudske imunološke stanice, čime se bolje oponašaju interakcije između tumora i imunološkog sustava (Chuprin et al., 2023; Okada et al., 2019).

Leukociti koji infiltriraju u tumor imaju ključnu ulogu u biologiji tumora i predstavljaju važan cilj za razvoj novih terapijskih strategija.

#### 1.8.1. Citotoksični T limfociti

Citotoksični T limfociti (CTL,  $CD3^+ CD8^+$ ) su među najčešćim efektorskim stanicama unutar tumora, gdje se diferenciraju u CTL nakon prezentacije antigena od strane dendritičnih stanica ili drugih stanica koje prezentiraju antigen (APC, od engl. *antigen presenting cells*). Nakon aktivacije, CTL oslobađaju citolitičke granule koje sadrže perforin i granzime, započinjući apoptozu u tumorskim stanicama označenim za uništenje. Perforin stvara pore u membrani tumorskih stanica, omogućujući granzimima da uđu i aktiviraju puteve stanične smrti ovisne i neovisne o kaspazama. (Chowdhury & Lieberman, 2008; Zhong et al., 2025)

Osim izravnog ubijanja, CTL luče citokine poput interferona- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) i faktora tumorske nekroze- $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ), koji dodatno stimuliraju antitumorski imunitet. Neke citotoksični T limfociti prelaze u memorijske T stanice, uključujući memorijske T stanice rezidentne u tkivu, karakterizirane ekspresijom CD103 i CD39, koje su povezane s produljenim preživljavanjem u raznim vrstama raka. Međutim, produljena izloženost antigenu može dovesti do iscrpljivanja T stanica, smanjujući njihovu citotoksičnu funkciju i proliferativni kapacitet. Ipak, visoka gustoća CTL-ova, posebno unutar tercijarnih limfoidnih struktura, korelira s povoljnom prognozom kod mnogih vrsta tumora, dok je prisutnost memorijskih podskupina povezana sa smanjenim metastazama i poboljšanim preživljavanjem (Ahmadvand et al., 2019; Melssen et al., 2023; Molodtsov & Turk, 2018; Smazynski & Webb, 2018).

#### 1.8.2. Pomoćnički T limfociti

Pomoćnički T limfociti ( $CD3^+ CD4^+$ ) predstavljaju glavnu podskupinu TIL-ova te imaju središnju ulogu u regulaciji adaptivnog imunološkog odgovora. Izlučivanjem  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  i IL-2 pojačavaju citotoksičnost  $CD8^+$  T limfocita, potiču Th1 polarizaciju i olakšavaju

prezentaciju tumorskog antigena. Nakon aktivacije prezentacijom antigena, naivni CD4<sup>+</sup> T limfociti diferenciraju se u efektorske podskupine ovisno o citokinskim signalima i kontekstu okoline (Bevington et al., 2017). Među njima, Th1 stanice su ključne u antitumorskim odgovorima, potaknutim IL-12 i posredovanim putem STAT signalnih puteva, što kulminira ekspresijom T-bet transkripcijskog faktora i proizvodnjom proupalnih citokina. Ovi citokini regrutiraju i aktiviraju dodatne imunološke efektore, jačajući lokalni imunitet (Montauti et al., 2024).

### 1.8.3. B limfociti

Limfociti B infiltrirani koji se nalaze u u tumoru također su identificirani kao dobri prediktori terapijskog odgovora i preživljenja. Ove B stanice mogu se diferencirati u plazma stanice kako bi proizvele antitijela koja ciljaju invazivne antigene na uništavanje makrofazima ili mogu postati memorijski B limfociti. Memorijski B limfociti pomoći će imunološkom sustavu da izazove brži odgovor pri susretu s istim antigenom. Otkriveno je 15 podskupina B limfocita koji infiltriraju tumor povezanih s tumorom diferenciranih u stanice koje luče antitijela bilo ekstrasfolikularnim putem ili putem germinativnog centra. Tipovi tumora gdje B limfociti luče protutijela ekstrasfolikularnim putem pokazali su loše kliničke ishode i otpornost na imunoterapiju, što je stimuliralo imunosupresivni odgovor T limfocita. Ovakav odgovor pokazuje važnost ravnoteže intratumorskih podskupina B stanica i sugerira da bi imunoterapija usmjerena na B stanice mogla iskoristiti humoralni imunitet (Laumont et al., 2022; Ma et al., 2024).

### 1.8.4. Prirodne stanice ubojice

NK stanice (NK engl. *natural killer cells*) ili prirodne stanice ubojice, definirane su kao CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> stanice. One su ključne stanice u urođenom protutumorskom imunitetu. Mogu eliminirati tumorske stanice bez prethodne senzibilizacije otkrivanjem liganada induciranih stresom i smanjeno reguliranih molekula MHC klase I. NK stanice posreduju citotoksičnost putem oslobađanja granzima i perforina te proizvode citokine koji moduliraju imunološki odgovor (Coënon et al., 2024; Wolf et al., 2023).

Podskupine NK stanica, CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> i CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>, pokazuju različita funkcionalna svojstva. Dok je CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> vrlo citotoksična, CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> mogu postići snažnu citolitičku aktivnost nakon IL-15 pripreme. NK stanice također igraju ulogu u regrutiranju T stanica i preoblikovanju TME-a putem oslobađanja citokina i liganada smrti poput TRAIL-a i FASL-a. Međutim, njihovu funkciju često potiskuju regulatorni T limfociti, M2 makrofazi i inhibitorni citokini (IL-10, TGF-β), kao i molekule kontrolnih točaka poput PD-1 i TIM-3, koje doprinose ranoj funkcionalnoj iscrpljenosti (Coënon et al., 2024; Dean et al., 2024; Wagner et al., 2017).

### 1.8.5. Dendritične stanice

Dendritične stanice (DC, od engl. *dendritic cells*) unutar tumorskog mikrokruženja igraju ključnu ulogu u prezentaciji antigena, premošćujući urođene i adaptivne imunološke odgovore i pripremajući naivne T stanice za efektorske funkcije. DC su specijalizirane stanice koje hvataju, obrađuju i prezentiraju antigene povezane s tumorom T limfocitima, pokrećući adaptivni imunološki odgovor protiv tumora. DC patroliraju lokalnim okruženjem, koristeći

membranske i citosolne receptore za prepoznavanje signala opasnosti, uključujući one iz tumorskih stanica (Del Prete et al., 2023). Nakon unosa antigena, DC prezentiraju te antigene naivnim T limfocitima, pokrećući antigen-specifične imunološke odgovore i regulirajući toleranciju i imunitet. DC mogu prezentirati antigene putem molekula MHC klase I i MHC klase II, aktivirajući citotoksične i pomoćničke T limfocite (Ascic et al., 2024).

Unutar TME postoje različite vrste DC-a, uključujući konvencionalne DC-e (cDC1, cDC2, cDC3), DC-e izvedene iz monocita (moDC) i plazmacitoidne DC-e (pDC), svaki s različitim ulogama. cDC1 su posebno važni za unakrsnu prezentaciju, proces u kojem prezentiraju antigene na molekulama MHC klase I citotoksičnim T limfocitima, što dovodi do njihove aktivacije i citotoksične aktivnosti. Visok postotak cDC1 u TME općenito je povezan s boljom prognozom. cDC2, iako manje vješti u unakrsnoj prezentaciji od cDC1, učinkovito prezentiraju antigene povezane s MHC klasom II pomoćničkim T limfocitima, potičući odgovore T pomoćničkih limfocita. Infiltracija pomoćničkih limfocita u TME korelira s omjerom cDC2 i regulatornih T stanica. Veća učestalost DC korelira s većom infiltracijom tumora T limfocita i boljim preživljenjem (Zhang et al., 2024).

Imunosupresivni TME oštećuje funkcije dendritičnih stanica (DC), inhibirajući sazrijevanje, prezentaciju antigena i aktivaciju T-stanica, što dovodi do imunološke tolerancije i progresije tumora (Del Prete A. et al., 2023; Zhang Y. et al., 2024). TME negativno regulira sazrijevanje, migraciju i efektorske funkcije DC-a, pri čemu imunosupresivne populacije poput regulatornih T limfocita, makrofaga povezanih s tumorom te MDSC-a igraju značajnu ulogu (Del Prete et al., 2023; Zhang et al., 2024)

#### 1.8.6. Makrofazi povezani s tumorom

Mikrookruženje tumora je snažno infiltrirano imunosupresivnim stanicama koje kolektivno inhibiraju aktivaciju, širenje i citotoksičnu funkciju limfocita koji infiltriraju tumor. Ove stanice, posebno makrofazi povezani s tumorom (TAM, engl. *Tumor associated macrophages*), supresorske stanice izvedene iz mijeloida (MDSC) i regulatorne T stanice (Tregovi) stvaraju supresivnu mrežu koja ometa antitumorski imunitet na više razina, značajno doprinoseći otpornosti na TIL terapiju i inhibitore imunoloških kontrolnih točaka (Binnewies et al., 2018; Hinshaw & Shevde, 2019).

TAM-ovi su među najzastupljenijim imunološkim stanicama unutar TME-a i pokazuju visoku plastičnost, sposobni su za polarizaciju u dva glavna funkcionalna stanja: klasično aktivirane (M1) i alternativno aktivirane (M2) makrofage. M1 makrofagi imaju proupalnu, antitumorsku ulogu. Induciraju ih IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i mikrobnj produkti poput LPS-a, te eksprimiraju visoke razine inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS), reaktivnih vrsta kisika (ROS) i IL-12. M1 makrofazi potiču uništavanje tumora izravnim ubijanjem tumorskih stanica i pojačavanjem regrutiranja i aktivacije citotoksičnih T limfocita i prirodnih stanica ubojica putem lučenja različitih kemokina (CXCL9, CXCL10 i CXCL11). Također luče TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , koji pojačavaju odgovore T stanica i olakšavaju prezentaciju antigena (Kraja et al., 2025).

Nasuprot tome, M2 makrofage stimuliraju IL-4, IL-10 i IL-13 (citokini Th2 odgovora) te pokazuju snažno imunosupresivni, protumorski fenotip. Eksprimiraju CD206 i luče visoke razine IL-10 i TGF- $\beta$ , pri čemu oba potiskuju odgovore T limfocita. M2 TAM-ovi potiču

napredovanje tumora ekspresijom PD-L1, preoblikovanjem izvanstaničnog matriksa putem matriks metaloproteinaza (MMP2, MMP9), pojačavanjem angiogeneze putem faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) i regrutiranjem imunosupresivnih stanica poput Treg stanica. Oni olakšavaju epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) i metastaze. Omjer M1 i M2 makrofaga unutar tumora sve se više prepoznaje kao prognostički pokazatelj: visoka M2 infiltracija povezana je s lošim ishodima kod mnogih vrsta raka, uključujući rak dojke, pluća i kolorektalni rak (Cortese et al., 2020; Larionova et al., 2020; M. Liu et al., 2022).

### 1.9. Novi kemijski entiteti (NEK) kao izvor potencijalnih novih kemoterapeutika za liječenje karcinoma pluća

Liječenje karcinoma pluća i dalje je suočeno s brojnim izazovima, osobito u uznapredovalim stadijima bolesti. Standardne metode liječenja, poput kirurškog zahvata, radioterapije, kemoterapije i ciljane terapije, mogu biti učinkovite u ranim fazama ili kod lokalno uznapredovalih tumora. Međutim, kirurška resekcija moguća je tek kod manjeg broja bolesnika, dok kemoterapija i radioterapija često imaju ograničen učinak, uz značajne nuspojave i visoke stope povrata bolesti. Primjerice, adjuvantna kemoterapija nakon operacije karcinoma pluća nemalih stanica donosi tek skromno poboljšanje petogodišnjeg preživljenja (Merie et al., 2022; Xie et al., 2024).

U novije vrijeme imunoterapija, osobito primjena inhibitora imunoloških kontrolnih točaka, donijela je određeni napredak i produljenje preživljenja kod dijela bolesnika. Ipak, učinkovitost ovih terapija ograničena je razvojem otpornosti, sposobnošću tumora da izbjegne imunološki sustav te složenim međudjelovanjem unutar tumorskog mikrookoliša. Zbog svega navedenog, prevladavanje postojećih terapijskih ograničenja i poboljšanje ishoda liječenja ostaju ključni ciljevi suvremene onkologije (Aryal et al., 2023).

Iako je liječenje karcinoma pluća napredovalo od standardne kemoterapije koja je uključivala lijekove na bazi platine poput cisplatine ili karboplatine u kombinaciji s lijekovima poput gemcitabina, paklitaksela ili pemetrekseda do visoko personaliziranih pristupa, istraživanje novih klasičnih tradicionalnih kemoterapeutika i dalje traje.

Priroda ima jedinstvenu kolekciju malih i snažnih bioaktivnih molekula koji su od velikog značaja za medicinsku kemiju. Iskorištavanjem strukturnih značajki prirodnih proizvoda, istraživači kontinuirano otkrivaju nove klase bioaktivnih spojeva, proširuju kemijski prostor i identificiraju jedinstvene bioaktivne nosače (Grigalunas et al., 2022; Newman & Cragg, 2020). U kontekstu otkrivanja novih lijekova, prirodni proizvodi posjeduju jedinstvene karakteristike u usporedbi s konvencionalnim sintetskim molekulama. Ovaj kontrast dovodi do kombinacije prednosti i izazova tijekom procesa otkrivanja lijekova jer prirodni proizvodi pokazuju širok raspon strukturnih okvira i složenih aranžmana, što ističe njihovu bitnu ulogu u oblikovanju puta razvoja lijekova (Atanasov et al., 2021; Mathur & Hoskins, 2017). Biljke su vodeći izvor novih kemijskih entiteta koji se koriste u istraživanju novih lijekova, što se pripisuje raznolikosti njihovog kemijskog i strukturnog sastava. Istraživanja novih lijekova i dalje se vrte oko prirodnih proizvoda, potaknuta nedostacima alternativnih pristupa otkrivanju lijekova u

proizvodnji novih vodećih spojeva unutar ključnih terapijskih područja, poput infektivnih i metaboličkih bolesti. Istraživači kontinuirano proučavaju nove prirodne proizvode u svojim nastojanjima da otkriju nova terapijska sredstva (Chin et al., 2006). Metaboliti koji nastaju iz sintetičkih lijekova pokazuju smanjenu terapijsku učinkovitost i često više nuspojav (Tai & Fantegrossi, 2014). Sintetički lijekovi sastoje se od malih kemijskih molekula koje su uglavnom dizajnirane korištenjem različitih kemijskih izvora ili računalno potpomognutih metodologija, poput računalne kemije i molekularnog modeliranja, čime se koristi više resursa i vremena (Mathur & Hoskins, 2017).

Tijekom istraživanja testirala su se citotoksična i antiproliferacijska svojstva novih kemijskih entiteta iz različitih kemijskih skupina. Ispitivane spojeve sintetizirala je istraživačka skupina Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Doksorubicin (Apollo, SAD), staurosporin (Biotrend, Švicarska), vandetanib (Selleckchem, SAD) te cisplatina (Apollo, SAD) su standardni spojevi koji su služili kao kontrolni spojevi u ovom istraživanju.

Benzimidazoli, furani, kumarini, akrilonitrili i pirimidini su strukturni dijelovi brojnih biološki aktivnih spojeva koji također posjeduju različite biološke aktivnosti kao što su antihiperlglikemijske, analgetske, protuupalne, antibakterijske, antigljivične ili antitumorske aktivnosti.

#### 1.9.1. Amidini

Amidini su važan dio u raznim biološki aktivnim molekulama. Ovi spojevi imaju višestruko značenje, koje obuhvaća njihovu rasprostranjenost u prirodnim spojevima, kao i njihovu korisnost u područjima otkrivanja i sinteze lijekova. Amidini su prepoznati kao bitan okvir u raznolikom nizu bioaktivnih prirodnih proizvoda. Ove strukture su također dobro poznate kao ključni farmakofori u mnoštvu biološki aktivnih spojeva. Benzimidazoli su važni i temeljni gradivni kostur raznih esencijalnih sintetskih i prirodnih biološki važnih spojeva. Zbog strukturne sličnosti substrukture benzimidazola s prirodnim nukleotidima, njihovi derivati igraju ključnu ulogu u funkciji mnogih biološki važnih molekula i mogu lako djelovati s DNA, RNA ili različitim proteinima iz živih sustava te pokazuju širok spektar različitih bioloških svojstava (Vicini et al., 2003). Posljednjih godina, amidini su privukli značajnu pozornost, prvenstveno zbog svog širokog raspona bioloških aktivnosti koje obuhvaćaju antimikrobna (Elgemeie & Mohamed, 2019; Nandi & Jesin, 2018), antifungalna (Charaimuria & Phukan, 2024), protuupalna (He & Wang, 2021), antitumorska (Cao et al., 2020, 2021) i antivirska (Galieva et al., 2021; H. Liu et al., 2021) svojstva.

#### 1.9.2. Furani

Furani su razred organskih spojeva niza heterocikličkih aromata karakteriziranih prstenastom strukturom koja se sastoji od jednog atoma kisika i četiri atoma ugljika.

#### 1.9.3. Akrilonitrili

Iako se akrilonitril ne može pronaći samostalno u prirodi, to je strukturni motiv u brojnim prirodnim spojevima, a u medicinskoj kemiji je farmakofor koji dovodi do poboljšanja topljivosti spojeva kao i mogućnosti stvaranja hidrofobnih interakcija ili vodikovih veza (J. R.

Baker et al., 2021; Perin et al., 2022). Akrilonitrili s heteroaromatskim ili aromatskim dijelovima mogu biti biološki aktivni spojevi koji posjeduju širok raspon bioloških aktivnosti poput antikancerogenih, antituberkulozatskih, antibakterijskih ili antioksidativnih djelovanja (Pavlinac et al., 2025).

#### 1.9.4. Kumarini

Kumarini spadaju u široku obitelj sekundarnih metabolita koji se nalaze u raznim vrstama biljaka, posebno zelenih biljaka, ali i gljiva i mikroorganizama. Iako su kumarini rasprostranjeni u svim dijelovima biljke, u najvećoj koncentraciji pojavljuju se u plodovima, a slijede korijenje, stabljike i listovi (Borges et al., 2005). Naziv klase izveden je od biljke *Coumarouna odorata* (*Dipteryx odorata*) iz koje je Vogel 1820. godine izolirao najjednostavnijeg člana ove porodice, sam kumarin (Barot et al., 2015). Kumarini zauzimaju značajno mjesto unutar domene prirodnih produkata. Njegova temeljna struktura tvori osnovni kostur različitih polifenola, alkaloida i kromena, doprinoseći njegovoj širokoj prisutnosti i širokoj rasprostranjenosti među biološki aktivnim spojevima naglašavaju njegovu ključnu ulogu unutar kemijskog prostora prirodnih produkata (M. I. Hussain et al., 2019; Stefanachi et al., 2018). Kumarini imaju nekoliko farmakoloških djelovanja, među ostalim i antikoagulantna, antimikrobna, protuupalna, neuroprotektivna, antidijabetička i antiproliferativna (Srikrishna et al., 2016). Ovaj višestruki farmakološki profil naglašava njihov veliki značaj u otkrivanju i razvoju lijekova, a njihov doprinos proteže se od pružanja molekularnih okvira za medicinsku kemiju do služenja kao izvora inspiracije za inovativne terapije (M. K. Hussain et al., 2024). U zadnjih nekoliko godina ima puno dokaza njihovog antiproliferativnog djelovanja na različitim staničnim linijama (A. Musa et al., 2012; Kawaii et al., 2001; Wada et al., 2023).

#### 1.9.5. Citozinski derivati supstituirani triazolom

Pirimidini su neophodne molekule za život stanica te jedni od najvažnijih heterocikličkih spojeva. Uz to, heterociklički spojevi na bazi pirimidina zanimljivi su kao potencijalne bioaktivne molekule jer posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti poput antikancerogenog, antibakterijskog, antifungalnog, antivirusnog, protuupalnog, antituberkuloznog i antimalarijskog djelovanja (Mohana et al., 2013). Modificirani pirimidinski nukleozidi bili su među prvim kemoterapeutskim sredstvima koja su uvedena u medicinsko liječenje raka (Ferrero & Gotor, 2000). U literaturi je objavljeno puno radova u kojima je niz pirimidinskih derivata s potentnim biološkim svojstvima pripremljen supstitucijom s 1,2,3-triazolom vezanim za pirimidinski nukleozid; s 1,2,3-triazolom kao supstituentom na pirimidinskom prstenu; sa šećernim dijelom ili šećernim imitatorom te imaju izraženu citostatsku aktivnost (Babić et al., 2017).

#### 1.10. Farmakokinetičke metode *in vitro* za profiliranje fizikalno-kemijskih svojstava aktivnih molekula

Kinetička topljivost je *in vitro* test koji se koristi u ranim fazama procesa istraživanja i razvoja novih lijekova, za testiranje velikog broja NKE (HTS format) kako bi se utvrdila njihova

topljivost što je ključan parametar iz dva razloga: za odabir i daljnju optimizaciju aktivnih molekula te u slučaju testiranja većeg broja molekula iste serije, identifikacija potencijalnog ranog problema lošije topljivosti. Kinetička topljivost mjeri koncentraciju pri kojoj prezasićena otopina prvi put postaje nestabilna na taloženje. Topljivost nekog spoja općenito ovisi o njegovoj strukturi i uvjetima u kojima se topljivost ispituje, poput pH, ionske jakosti vremena i temperature medija (Kerns et al., 2008).

Lipofilnost je važan fizikalno-kemijski parametar koji orijentacijski pokazuje kakva je propusnost membrane za određeni spoj što utječe na aprosciju i distribuciju supstance te njegovu eliminaciju metaboličkim jetrenim putem ili putem bubrega. Lipofilnost se izražava logaritamskom vrijednosti particijskog koeficijenta ( $\log P$ ) koji ukazuje da li je spoj više topiv u vodi ili mastima. Izražavanje lipofilnosti putem distribucijskog koeficijenta ( $\log D$ ) koristi se više za ionizirajuće spojeve i u otapalima čiji je pH sličniji fiziološkim tekućinama: pH 7.4 (krv) te 6.5 (crijeva). Treba napomenuti da su vrijednosti koje se dobivaju navedenim metodama orijentacijske i pomoć u daljnjem odabiru potencijalno optimalnih molekula (Arnott & Planey, 2012; Testa et al., 2000).

Da bi lijek ili njegov aktivni metabolit mogao djelovati na željenu ciljnu molekulu i/ili proces, potrebno je da se zadrži u tijelu određeno vrijeme. Poželjno vrijeme može određivati sama bolest ili terapijsko područje za koje se potencijalni lijek razvije. Stoga je bitno u ranoj fazi istraživanja odrediti brzinu metaboličke transformacije lijeka u jetri. U tu svrhu spojevi se testiraju na testu metaboličke stabilnosti *in vitro* koristeći humane, mišje, štakorske ili pseće mikrosome mjerenjem brzine nestanka izvornog spoja. Poželjno je testiranje u ranoj fazi napraviti na mišjim i huanim mikrosomima te odbaciti one molekule koje pokazuju preveliku razliku u stabilnosti između vrsta. Ako su spojevi jako stabilni na mišjim mikrosomima a slabo na humanima, molekula nije pogodna za daljnji farmakološki razvoj jer će se problem brze razgradnje teško moći riješiti u kasnoj fazi razvoja lijeka. I obrnuto: ako su jako nestabilni u testu sa mišjim mikrosomima a stabilni u humanim, teško ćemo moći koristiti miša kao pokusnu životinju i na temelju dobivenih podataka napraviti predikciju klirensa u ljudi. Korištenjem jetrenih mikrosoma s NADPH<sup>+</sup>, ovi testovi prvenstveno pokazuju metabolizam faze I (CYP450) Rezultati se koriste za izračun intrinzičnog klirensa i optimizaciju kemijskih struktura kako bi se smanjila brza razgradnja (Attwa et al., 2023; J. A. Baker et al., 2018; Słoczyńska et al., 2019).

Većina lijekova veže se za proteine plazme (najčešće albumini) i čini reverzibilni kompleks s njima. Današnja hipoteza je da djelovanje postiže samo nevezana frakcija lijeka. Iako je poznato da postoje visokoučinkoviti lijekovi sa visokim afinitetom vezanja za proteine (poput varfarina; PPB 99%) procjena vezanja lijeka za protein *in vitro* ključna je komponenta u ranoj fazi razvoja novih lijekova (Akshara et al., 2024; Bowman & Benet, 2018).

Isto tako, ključne su i metode za određivanje stabilnosti lijeka u plazmi *in vitro* kojima se određuje brzina razgradnje lijeka. Navedenim testovima može se predvidjeti poluvijek same supstance *in vivo*. U tu svrhu, NKE inkubiraju se u plazmi humanog, mišjeg ili štakorskog podrijetla na 37°C i u određenim vremenskim razmacima mjeri se koncentracija izvornog spoja. I u ovom testu, stabilnost se može razlikovati među vrstama te je ključni parametar u

odabiru životinjske vrste za daljnje farmakodinamske, farmakokinetičke i posebno toksikološke testove (Di et al., 2005).

Jedan od testova za procjenu propusnosti lijeka kroz membranu te mogućih interakcija sa transportnim molekulama poput P-gP-a, koristi se MDCK-MDR1 model (stanice Madin-Darby psećeg bubrežnog epitela adenokarcinoma ljudskog debelog crijeva) *in vitro*. Osim toga, moguće je procijeniti pasivnu propusnost kroz stanice crijeva te prelaz krvno-moždane granice (Irvine et al., 1999; Volpe, 2011).

Stanična linija MDCK-MDR1 transficirana je ljudskim genom MDR1 čime se prekomjerno eksprimira P-glikoprotein (P-gp), koji može biti supstrat za ispitivani spoj.

### 1.11. Opis istraživanja

Ovo istraživanje obuhvaća validaciju 3D staničnih kultura na 3 stanične linije plućnih karcinoma (A549, HCC827 i NCI-H358). Kao 3D stanični model koristen je „hanging-drop“ model koji smanjuje mogućnost interakcije NKE sa drugim supstratima koji se koriste kao nosači u trodimenzionalnom uzgoju stanica. Za svaku staničnu liniju definirao sam krivulju rasta te dinamiku formiranja sferoida, testirajući različitu početnu koncentraciju stanica. Na temelju toga odredio sam vrijeme početka inkubacije sferoida sa NKE iz serije amidina (16), furana (18), akronitrila (21) te benzamida (13) tijekom 24 do 48 sati. Spojevima je određena antitumorska aktivnost provedena MTS testom te antiproliferativna aktivnost mjerena BrdU testom. Testove sam proveo paralelno i na dvodimenzionalno (2D) uzgojenim navedenim staničnim kulturama te usporedili vrijednosti inhibitornih koncentracija (IC<sub>50</sub>). U testovima sam kao standardne supstance koristio najmanje dva do 4 testiranih kemoterapeutika (doksorubicin, gemcetabin, pemetreksed, cisplatinu, vandetanib i staurosporina) kojima sam prethodno validirao testove provedene na 3D staničnim kulturama. Analizom protočnim citometrom, aktivnim supstancama iz serije amidina, potvrdio sam mehanizam djelovanja određivanjem broja apoptotičnih stanica u populaciji i to detekcijom aneksina V, kao i određivanjem proliferativnog markera Ki-67. Svim aktivnim spojevima odredio sam farmakokinetička svojstva *in vitro* (topljivost, lipofilnost, permeabilnost, metaboličku stabilnost i vezanje na proteine plazme) kako bi odredio „*drugability*“ spojeva, te kako bi odredili spoj koji bi mogao biti apliciran miševima. U drugom dijelu istraživanja, uspostavom mišjeg *in vivo* modela A549 ksenografta, staničnom linijom uzgojenom dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim načinom, praćen je rast tumora i određena krivulja rasta te određeno vrijeme prihvaćanja tumora i dinamika njegovog rasta. Time se željelo utvrditi koje su stvarne prednosti implementacije staničnih kultura uzgojenih u 3D uvjetima u rano profiliranje novih kemijskih entiteta u procesu istraživanja i razvoja novih lijekova.

Svi navedeni testovi uvedeni su u Selviti d.o.o. (prije FidelTI d.o.o.) unutar probira novih kemijskih entiteta te se rutinski izvode u daljnjim istraživanjima.



## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja je bio odrediti prednosti testiranja NKE u ranoj fazi procesa detekcije potentnih molekula sa antitumorskim djelovanjem na 3D kulturama stanica u odnosu na konvencionalno testiranje u 2D formatu.

Istraženi novi kemijski entiteti (NKE) iz 5 kemijskih serija, testirani su u prethodno validiranim metodama za određivanje aktivnosti ( $IC_{50}$ ) na tri stanične linije humanih plućnih tumora *in vitro* u 2D i 3D uvjetima. Testirana je njihova citotoksičnost (test vijabilnosti stanica) te utjecaj na proliferaciju (test prliferacije). Odabrani aktivni spojevi profilirani su *in vitro* na panelu za određivanje farmakokinetičkih karakteristika te su usporedbom dobivenih rezultata odabrana dva spoja za testiranje u modelu A549 mišjih ksenografta *in vivo*.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- Validirati biološki sustav 3D uvijeta staničnih kultura za testiranje novih kemijskih entiteta (NKE) iz kemijskih serija s potencijalnom antitumorskom aktivnosti kako bi se izdvojile najpotentnije molekule u 2D i 3D uvjetima i detektirale podudarnosti i razlike u aktivnosti za pojedine spojeve.
- Potvrditi mogući mehanizam djelovanja najaktivnijeg NKE iz skupine amina koji osim dobrog učinka na stanice karcinoma pluća u 2D i 3D, ima i prihvatljive farmakokinetičke parametre koji mu omogućuju ulazak u stanice (tkivo tumora).
- Odabrati kemijske molekule sa optimalnim navedenim karakteristikama dobivenim u *in vitro* studijama (odnos toksičnosti i aktivnosti) za testiranje u modelu A549 mišjih ksenografta *in vivo* te procijeniti dobivene rezultate kao mogućnost odabira potencijalnog predkliničkog kandidata.
- Implementirati model mišjih ksenografta koristeći 2D i 3D stanični inokulum te testirati odabranu molekulu sa praćenjem slijedećih parametara:
  - Krivulja rasta i težina tumora u svrhu usporedbe dinamike progresije tumorskog rasta
  - Fenotipizacija infiltriranih stanica u tumorske ksenografte
  - Određivanje koncentracije testirane molekule u plazmi i tumorskom tkivu LC-MS/MS metodom



### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. Kemikalije i biološki materijal

#### 3.1.1. Kemikalije za *in vitro* pokuse

Dimetil sulfoksid, DMSO (Sigma, CatN°D8418, LotN°RNBD)  
RPMI-1640 Medij (Gibco, kat. br. A10491-01, LotN°1868634)  
Ham F-12 (Gibco, kat. br. 21765-029, LotN°1825583)  
EMEM (ATCC, kat. br. 30-2003, LotN°64174097)  
DMEM (Sigma, kat. br. D5796)  
Glutamax-100 (Sigma, kat. br. G8541)  
Antibiotic/Antimycotic (Invitrogen, kat. br. 15240)  
Trypan blue, 0.4% (Sigma, kat. br. T8154)  
MEM Non-essential amino acids, MEM NEAA (Sigma, kat. br. M7145)  
Fetalni serum goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Biowest, kat. br. S1810-500, LotN°S16141S1810)  
Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Assay (Promega, kat. br. G3581, LotN°171446)  
CellTiter-Glo 96<sup>®</sup> 3D Cell Viability Assay (Promega, kat. br. G9628, LotN°0000270792)  
Cell Proliferation ELISA, BrdU, colorimetric (Sigma, kat. br. 11647229001, LotN°24890800)  
TrypLE (Sigma, kat. br. T3924, LotN°SLBR9330V)

#### 3.1.2. Stanične linije

**Tablica 1.** Stanične linije korištene za testiranje NKE

Stanična linija	Vrsta stanica	Proizvođač
A549	Humani karcinom pluća	ATCC CCL-185
HCC827	Humani adenokarcinom pluća	ATCC CRL-2868
NCI-H358	Humani karcinom pluća	ATCC, CRL-5807
MRC-5	Humani normalni fibroblasti pluća	ATCC, CCL-185
MDCKII-MDR1	Madine-Darby pseće epitelne stanice bubrega	Solvo Biotechnologies,

##### 3.1.2.1. Hranjivi mediji za uzgoj stanica

###### *Stanična linija karcinoma pluća A549 (ATCC CCL-185)*

Hamova F-12 hranjiva mješavina (F-12, Gibco, SAD) s L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 1,176 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 10% fetalnog govedeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS, inaktiviran na 56°C 30 min)

###### *Stanična linija adenokarcinoma pluća HCC827 (ATCC CRL-2868)*

Roswell Park Memorial Institute 1640 medij (RPMI-1640, Gibco, SAD) s 4500 mg/L glukoze, 2.383 mg/L HEPES, L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 110 mg/L

natrijevog piruvata obogaćen s 10% fetalnog seruma goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS, inaktiviran na 56°C 30 min).

*Stanična linija karcinoma pluća NCI-H358 (ATCC®, kat. br. CRL-5807)*

RPMI-1640 medij (RPMI-1640, Gibco, SAD) s 4500 mg/L glukoze, 2.383 mg/L HEPES, L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 110 mg/L natrijevog piruvata obogaćen s 10% fetalnog seruma goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS, inaktiviran na 56°C 30 min).

*Stanična linija normalnih fibroblasta pluća MRC-5 (ATCC CCL-185)*

Eagleov minimalni esencijalni medij (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM, ATCC, SAD) s neesencijalnim aminokiselinama, 2 mM L-glutaminom, 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM natrijevog piruvata obogaćenog s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Biowest, inaktiviran na 56°C 30 min).

*Stanična linija Madin-Darby epitelne stanice psećeg bubrega MDCKII-MDR1 (sonbo Technologies)*

Dulbeccov modificirani Eagleov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, Sonbo Technologies, SAD) s 1% Glutamax-100, 1% antibiotik/antimikotik, 1% MEM NEAA obogaćenog s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Biowest, inaktiviran na 56°C 30 min).

### 3.1.3. Kemikalije za *in vivo* pokus

Xylazine 2%, Alfasan International B.V., Netherlands,

Narkamon, Bioveta, Czech Republic

NaCl 0.9%, HZTM, ref. 1449113

Formalfix, Shandon™ Formal-Fixx USA, ref. 302200

1 mL syringes, BD Plastipak, ref. 300013,

Sterilne igle, za jednokratnu upotrebu; BD MICROLANCE, 25G 5/8", Nr. 20 ref. 300600, Becton Dickinson Drogheda, Ireland;

Sterilne igle, za jednokratnu upotrebu; BD MICROLANCE, 27G 3/4", Nr. 20 ref. 300635, Becton Dickinson Drogheda, Ireland;

Isofluran (tekućina za inhaliranje) Piramal, Healthcare;

Elektroničko digitalno pomično mjerilo (engl. *Electronic digital caliper*)

Grijaća podloga (engl. *Heating pad*)

F-12 (Gibco, kat. br. 31765) (500ml)

10 % FBS (50mL) (BioWest, Kat. br. S1810-500) heat inactivated 56°C, 30 min

EDTA-Na<sub>2</sub> (Sigma, kat. br. E-4884) 0.38 g otopljeno u 1000 mL slane (Natrii chloridi infundible PLIVA) otopine i sterilizirano autoklaviranjem (121 oC 20min)

0.01M PBS pH 7.4

1 vrećica PBS (Sigma, P-3813) u 1 litru deionizirane vode, sterilizirano (121 oC 20min)

TRYPSIN Sigma, kat. br. T3924

### 3.1.4. Životinjski model

BALB/c nu/nu (engl. *nude*) miš je osnovni imunodeficijentni ksenograftski model kojem nedostaju timus i funkcionalne T-stanice, a koji se intenzivno koristi za uzgoj staničnih linija humanih tumora (CDX) i tkiva zbog niske stope odbacivanja transplantata. Za mišji model ksenografta korišteni su miševi stari 6 tjedana u vrijeme unosa inokuluma 2D i 3D stanične kulture. Uzorkovanje je provedeno nakon 6-7 tjedana.

Miševi su uzgajani u Selviti d.o.o. u laboratoriju Znanost o laboratorijskim životinjama.

### 3.1.5. Kontrolni spojevi i novi kemijski entiteti (NKE)

**Tablica 2.** Kontrolni kemijski spojevi korišteni za validaciju metode 2D i 3D staničnih kultura *in vitro* za testiranje novih kemijskih entiteta

<b>Kemijski spoj</b>	<b>Proizvođač</b>
Cisplatina	Sigma, kat. br. P4394, LotN°MKCD9167
Doksorubicin	Apollo Scientific, kat. br. BID0120, LotN°AS456845
Staurosporin	Apollo Scientific, kat. br. BIS0504, LotN°AS435501
Vandetanib	ChemSelleck, kat. br. T1912-5mg, LotN°SLBX600

Sve serije spojeva su sintetizirane na Zavodu za organsku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije (FKIT) Sveučilišta u Zagrebu. Testirani spojevi, njihove strukture i mase prikazani su u PRIVITKU A.

**Tablica 3.** Kemijske serije i broj testiranih novih kemijskih entiteta

<b>Ime serije</b>	<b>Broj testiranih spojeva</b>
Amidini	16
Furani	18
Akilonitrili	21
Citozinski derivati supstituirani triazolom	13
Kumarini	17

### 3.1.6. Protutijela korištena za određivanje statusa staničnog ciklusa *in vitro* metodom protočne citometrije

Annexin V Conjugates for Flow Cytometry (Thermo Fisher Scientific, kat. br. A23204)  
Ki-67 (Miltenyi Biotec, kat. br. 130-120-416)

### 3.1.7. Protutijelo korišteno za imunohistokemijsko bojanje histoloških preparata 2D i 3D tumora

Anti-Ki67 antibody [SP6] (Abcam, SAD, kat. br. ab16667)  
ImmPRESS HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase (Vector Laboratories, SAD, kat. br. MP-7401)

3, 3'-diaminobenzidine Liquid DAB+, 2-component system, Immunohistochemistry Visualization, 1100 tests, 110 mL (DAKO, SAD, kat. br. K3468)

### 3.1.8. Protutijela korištena za imunofenotipizaciju infiltriranih imunoloških stanica u tumore mišjih ksenografta metodom protočne citometrije

Anti-Mouse MHC ClassII (I-A/I-E) eFluor450 (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 48-5321-82)  
Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD8a Antibody (BioLegend, kat. br. 100752)  
Live/Dead Yellow Dead Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. br. L34959)  
BV711 Rat Anti-Mouse F4/80 (BD Bioscience, kat. br. 565612)  
FITC labeled anti-mouse CD11b (BD Bioscience, kat. br. 553310)  
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD3 Antibody (BioLegend, kat. br. 100218)  
Ly-6C Monoclonal Antibody (HK1.4), PE (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 12-5932-82)  
PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD4 (BD Bioscience, kat. br. 562285)  
Anti-Human CD326 (EpCAM) PE 100 tests (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 12-9326-42)  
PE-Cy 7 Rat Anti-Mouse Ly-6G (BD Bioscience, kat. br. 560601)  
BD Pharmingen™ APC Hamster Anti-Mouse CD11c (BD Bioscience, kat. br. 550261)  
CD45R (B220) Monoclonal Antibody (RA3-6B2), Alexa Fluor 700 (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 56-0452-82)  
anti-mouse CD45 APC-eF780 (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 47-0454-82)  
Liberase™ TL Research Grade (Sigma/Roche, kat. br. 05401020001)  
DNase I (Sigma/Roche, kat. br. D5025)  
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, Mouse BD Fc Block™ (BD Bioscience, kat. br. 553142)  
APC anti-mouse CD64 (FcγRI) Antibody (BioLegend, kat. br. 139306)  
Rat anti-CD11b BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 700 (BD Bioscience, kat. br. 557960)

### 3.1.9. Oprema

Janus robotska pipetorska jedinica za tekuće reagense (Perkin Elmer, SAD)  
Mosquito HV (SPT Labtech, SAD, kat. br. )  
Sysmex XS-500i (Sysmex, Japan, kat. br. )  
Centrifuga SL40 (Thermo Fisher Scientific, SAD, kat. br. 75004527)  
EnVision (PerkinElmer, SAD)  
Zeiss Axio Imager.A1 upright mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH)  
Canon EOS 60D (18.0-megapixel CMOS sensor, APS-C)  
gentleMACS Octo disocijator (Miltenyi Biotec, Germany, kat. br. 130-096-427)  
Attune NxT protočni citometar (Thermo Fisher Scientific, SAD, kat. br. A24858)  
Aparat za fiksiranje, bojanje, rezanje sa fluorescentni mikroskop Dako Autostainer Link48 automated system  
Histological slide scanner (Axioscan.Z1, Zeiss, Germany)  
Multi channel pipette 8x10 (Eppendorf, kat. br. O12471C)  
Multi channel pipette 8x100 (Eppendorf, kat. br. Q15402C)  
Automatic pipette Xplorer 8x1200 (Eppendorf, kat. br. P36880C)

LC-MS/MS (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

3.1.10. Potrošni sterilni materijal

TP90151 TPP®Tissue Culture Flask, T150, Filter Cap (TPP, kat. br. 90151)

Nunclon™ Sphera™ Flasks (Thermo Fisher Scientific, SAD, kat. br. 174951)

15mL Conical Centrifuge Tubes, STRL, PP (TPP, kat. br. 91017)

50 mL TPP Premium Centrifuge Tube, Conical, PP (TPP. Kat. br. 91050)

Eppendorf safe lock tubice 2.0 mL (Eppendorf, kat. br. 30 120 094)

Eppendorf safe lock tubice 1.5 mL (Eppendorf, kat. br. 30 120 086)

96-Well Hanging Drop pločice (3D Biomatrix, kat. br. HDP1096)

96 well, PS, F-bottom, LUMITRAC 200, white (Greiner Bio One, kat. br. 655075)

96 well, PS, F-bottom, crystal clear, with lid (Greiner Bio One, kat. br. 655180)

96 well, PP, V-bottom, clear (Greiner Bio One, kat. br. 651201)

epTIPS Reloads 0.1-10 µL (Eppendorf, kat. br. 0030 073 363)

epTIPS Reloads 0.1-20 µL (Eppendorf, kat. br. 0030 073 380)

epTIPS Reloads 20-300 µL (Eppendorf, kat. br. 0030 073 444)

epTIPS Reloads 20-200 µL (Eppendorf, kat. br. 0030 073 428)

epTIPS Reloads 50-1000 µL (Eppendorf, kat. br. 0030 073 460)

Pipette 2.5 µL (Eppendorf, kat. br. 2830466)

Pipette 10 µL (Eppendorf, kat. br. 3310966)

Pipette 20 µL (Eppendorf, kat. br. 3496856)

Pipette 100 µL (Eppendorf, kat. br. 3376982)

Pipette 200 µL (Eppendorf, kat. br. 2020236)

Pipette 1000 µL (Eppendorf, kat. br. 3393296)

Pipette 5000 µL (Eppendorf, kat. br. 1362493)

### 3.2. Metode *in vitro*

#### 3.2.1. Priprema serijskih razrjeđenja spojeva za testove vijabilnosti i proliferacije stanica *in vitro*

Matične pločice (96- well; V dno, polipropilen, Greiner Bio-one, kat.br. 651201) sa serijskim razrjeđenjima kontrolnih spojeva pripremljene su od otopina početne koncentracije 10 mM (doksorubicin); 5 mM (vandetanib) i 2 mM (staurosporin) u DMSO-u te 300 mM (cisplatina) u vodi, na Janus robotskoj pipetorskoj jedinici (Perkin-Elmer). Kontrolni spojevi su razrijeđeni u omjeru 1:3. Početna koncentracija kontrolnog spoja doksorubicina bila je 30  $\mu$ M (2D stanična kultura) ili 100  $\mu$ M (3D stanična kultura). Početna koncentracija staurosporina bila je 1  $\mu$ M u oba testa (2D i 3D), dok je početna koncentracija vandetaniba bila 25  $\mu$ M (2D stanična kultura) ili 50  $\mu$ M (3D stanična kultura).

Matične pločice (96- well; V dno, polipropilen, Greiner Bio-one, kat. 651201) sa serijskim razrjeđenjima novih kemijskih entiteta (NKE) pripremljene su od otopina početne koncentracije 10 mM u DMSO-u na Janus robotskoj pipetorskoj jedinici (Perkin-Elmer).

Spojevi su razrijeđeni u omjeru 1:3. Početna koncentracija testnih spojeva bila je 50  $\mu$ M (2D stanična kultura) ili 100  $\mu$ M (3D stanična kultura).

S matične pločice na testnu pločicu preneseno je 500 nL (za 2D staničnu kulturu) ili 400 nL (za 3D staničnu kulturu) otopine spoja na pomoću Mosquito-a (SPT labtech). Postotak DMSO-a u testnim koncentracijama bio je 0.5 – 1.0 %.

#### 3.2.2. Određivanje kontrole kvalitete pojedine pločice za test citotoksičnosti i proliferacije

Za određivanje kontrole kvalitete pojedine pločice za test citotoksičnosti i proliferacije korišteni su Z'-faktor (Z') te signal u odnosu na pozadinski signal (engl. *signal-to-background*, S:B). Z' je metrika kvalitete testa, izračunata iz pozitivnih i negativnih kontrola, koja kvantificira odvojenost između signala i pozadine, uzimajući u obzir i njihove srednje vrijednosti i standardne devijacije. Služi za validaciju robusnosti testa prije probira uzoraka, navodeći jesu li signal i pozadina dovoljno različiti za otkrivanje pravih rezultata (Azargoshasb et al., 2023; Bar & Zweifach, 2020).

Z'-faktor je određen s četiri parametra: srednjim vrijednostima ( $\mu$ ) i standardnim devijacijama ( $\sigma$ ) pozitivne (p) i negativne (n) kontrole ( $\mu_p$ ,  $\sigma_p$ , and  $\mu_n$ ,  $\sigma_n$ ). S obzirom na ove vrijednosti, Z'-faktor je definiran kao:

$$Z' \text{ faktor} = 1 - \frac{3 * (\sigma_p - \sigma_n)}{(\mu_p - \mu_n)}$$

Nasuprot tome, S:B je osnovni omjer koji uspoređuje srednje vrijednosti ( $\mu$ ) željenog signala s srednjim vrijednostima pozadine, pri čemu je S:B manje robustan (u odnosu na Z') jer zanemaruje devijacije podataka.

$$S:B = \frac{\mu_p}{\mu_n}$$

### 3.2.3. Umnožavanje stanica pojedinih staničnih linija

Sve stanične linije (tablica 1) komercijalno su nabavljene od American Type Cell Culture (ATCC, SAD).

Stanična linija karcinoma pluća A549 uzgajana je u F-12K mediju s 10% fetalnog govedeg seruma (FBS, Biowest, inaktiviran na 56°C 30 min).

Stanična linija adenokarcinoma pluća HCC827 uzgajana je u RPMI-1640 mediju s 10% fetalnog govedeg seruma.

Stanična linija karcinoma pluća NCI-H358 (ATCC, kat. br. CRL-5807) uzgajana je u RPMI-1640 mediju obogaćenog s 10% fetalnog govedeg seruma.

Stanične linije normalnih fibroblasta pluća MRC-5 (ATCC, kat. br. CCL-185) uzgajane su u minimalnom esencijalnom mediju, EMEM, obogaćenog s 10% fetalnog govedeg seruma.

Stanična linija psećeg bubrega MDCKII-MDRI (Madin-Darby epitelne stanice, Solvo Biotechnology) uzgajana je u Dulbeccovom modificiranom Eagleovom mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, Sonbo Technologies, SAD) s 1% Glutamax-100, 1% antibiotik/antimikotik, 1% MEM NEAA obogaćenog s 10% fetalnog govedeg seruma (FBS, Biowest, inaktiviran na 56°C 30 min).

Sve stanične linije uzgajane su u CO<sub>2</sub> inkubatoru (INCO<sub>2</sub>, Memmert) pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti zraka. Za sve prikazane pokuse, navedene stanične kulture korištene su između 5. i 15. pasaže. U trenutku kada stanice dosegnu 90% konfluencije presađivane su u sterilnim uvjetima. Stanice su tripsinizirane u 0,25 %-tnoj otopini tripsina 10 minuta pri 37°C, a reakcija je zaustavljena dodatkom medija sa serumom. Prosječni ukupni broj stanica je određen na elektronskom brojaču stanica Sysmex XS-500i.

### 3.2.4. Test vijabilnosti stanica na 2D staničnim kulturama (MTS)

Stanice su uzgajane u polistirenskim pločicama s 96 jažica ravnog dna. Stanice su posijane 4 sata prije tretmana u koncentraciji 10 000 stanica/jažici nakon čega su dodani spojevi u padajućim koncentracijama. Test vijabilnosti stanica (Mosmann, 1983) proveden je nakon 72 sata inkubacije prema uputama proizvođača, korištenjem vodene otopine CellTiter-Glo 96<sup>®</sup>, MTS kit (Promega, Madison, WI, SAD). Inkubacija sa MTS-om je trajala od 0.5–2 sata. Pločice su očitane korištenjem PE EnVision apsorbancije na 492 nm.

Rezultati za svaki od testiranih spojeva prikazani su kao postoci rasta iz dvije neovisne krivulje rasta stanica u usporedbi s netretiranim stanicama.

### 3.2.5. Test vijabilnosti stanica na 3D staničnim kulturama (CellTiter-Glo<sup>®</sup>)

Stanice su uzgajane u 96-jažičnim visećim pločicama Perfecta 3D s 5000 stanica/jažici tijekom 4 dana dok se nisu formirale sfere. Nakon formiranja sfera, stanice su tretirane spojevima, nakon čega je slijedila 72-satna inkubacija. Test vijabilnosti stanica u 3D formatu, proveden je prema uputama proizvođača, korištenjem CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D za 3D staničnu kulturu (Promega); inkubacija stanica trajala je 5 minuta na tresilici, a zatim 25 minuta u mraku. Pločice su očitane pomoću PE EnVision luminescencije. Rezultati za svaki od testiranih spojeva prikazani su kao postoci rasta iz dvije neovisne krivulje rasta stanica u usporedbi s netretiranim stanicama.

### 3.2.6. BrdU test proliferacije stanica na 2D i 3D pripremljenim staničnim kulturama

Test proliferacije proveden je korištenjem ELISA testa za proliferaciju stanica, BrdU (Sigma, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, 48 sati nakon dodavanja spoja, u svaku jažicu dodano je 10  $\mu$ M BrdU i inkubirano sljedećih 24 sata. Nakon inkubacije, pripremljena je suspenzija pojedinačnih stanica za 3D staničnu kulturu u novoj ploči s 96 jažica. Pločice su centrifugirane i supernatanti su uklonjeni iz svake pločice (za 2D i 3D staničnu kulturu), nakon čega je slijedila inkubacija od 60 minuta na 60°C. Dodano je 200  $\mu$ L otopine FixDenat i inkubirano 30 minuta. Nakon što je otopina FixDenat uklonjena, u svaku jažicu dodan je anti-BrdU konjugiran s peroksidazom i inkubiran 90 minuta, nakon čega su slijedila 3 koraka ispiranja. U svaku jažicu dodano je 100  $\mu$ L supstrata, inkubirano 5-30 minuta, reakcija je zaustavljena dodatkom 25  $\mu$ L 1M sulfatne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Pločice su očitane korištenjem PE EnVision apsorbanije na 450 nm.

### 3.2.7. Statistička analiza podataka dobivenih testovima viabilnosti i proliferacije stanica *in vitro*

Izračun IC<sub>50</sub> vrijednosti, krivulja i kontrola kvalitete (engl. *quality control*, QC) analize proveden je korištenjem Microsoft Office (Microsoft, CA, SAD) i GraphPadPrism softvera (La Jolla, CA, SAD), v. 5.03. Ukratko, pojedinačne krivulje djelovanja spojeva u različitim koncentracijama generiraju se crtanjem logaritma koncentracije testiranih spojeva (X) u odnosu na odgovarajuće postotne vrijednosti inhibicije (Y) korištenjem metode nelinearnog regresijskog modela (log(inhibitor) vs. odgovor sa promjenjivim nagibom (četveroparametarska logistička ili 4PL)). Ovaj model definira sigmoidalni oblik krivulje pomoću četiri parametra: vrhunac, dno, IC<sub>50</sub> i Hillov nagib (nagib krivulje).

Vrijednosti IC<sub>50</sub> najboljeg prilagođavanja izračunavaju se korištenjem jednadžbe Log(inhibitor) u odnosu na normalizirani odgovor – varijabilni nagib, gdje je  $Y = 100 / (1 + 10((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))$ . Parametri QC kriterija (Z', S:B, R<sup>2</sup>, HillSlope) provjereni su za svaku IC<sub>50</sub> krivulju.

### 3.2.8. Aneksin V test za detekciju apoptotičnih stanica tretiranih potentnim spojevima amidinske serije na A549 staničnoj liniji

Apoptotski test Aneksina V proveden je korištenjem konjugata Aneksina V Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, 1\*10<sup>5</sup> A549 stanica je posijano na pločicu s 24 jažice i tretirano s IC<sub>50</sub> koncentracijom odabranih spojeva iz amidinske serije tijekom 36 sati.

Suspenzije stanica su sakupljene nakon inkubacije u 5 mL Falcon epruvete, isprane i centrifugirane 2 puta (jednom s DPBS-om, a zatim s puferom za vezanje aneksina V (engl. *Annexin V Binding Buffer*, AVBB)) tijekom 5 minuta, 400 g na sobnoj temperaturi. U svaku epruvetu dodano je 100  $\mu$ L AVBB-a, a zatim 2  $\mu$ L konjugata aneksina V Alexa Fluor 488 i

inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice su isprane u AVBB-u tijekom 5 minuta, 400 g na RT. Za detekciju kasnih apoptotičkih i nekrotičnih stanica korišten je SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific). U svaku epruvetu dodano je 1 µL SYTOX AADvanced-a i inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta u mraku. Dodano je 500 µL AVBB-a i uzorci su čuvani na ledu do analize. Rezultati za svaki od testiranih spojeva prikazani su kao postotak vijabilnih stanica ((Aneksin V<sup>-</sup> / SytoxAAD<sup>-</sup>), apoptotičkih stanica (Aneksin V<sup>+</sup> / SytoxAAD<sup>-</sup>), kasnih apoptotičkih/nekrotičnih stanica (Aneksin V<sup>+</sup> / SytoxAAD<sup>+</sup>) i nekrotičnih stanica (Aneksin V<sup>-</sup> / SytoxAAD<sup>+</sup>)).

### 3.2.9. Analiza aktivnih i odabranih neaktivnih spojeva za određivanje farmakokinetičkih svojstava na testovima *in vitro*

#### 3.2.9.1. Kinetička topljivost

Testirani i kontrolni spojevi (sulfafenazol i  $\alpha$ -naftoflavon) serijski su razrijeđeni u DMSO-u faktorom 3,3x, 3x, 3,3x i 3x (5 različitih koncentracija) u pločicama sa 96 jažica ravnog dna. Fosfatni pufer (50 mM, pH 7,4) obogaćen je razrijeđenim testnim spojevima i kontrolama s konačnim rasponom koncentracija u testu kako slijedi: 100, 30, 10, 3 i 1 µM (1% DMSO). Pločice su zatim inkubirane uz lagano trešenje (200-300 rpm) tijekom 1 sata i 45 minuta na 37 °C. Nakon 15 minuta na sobnoj temperaturi (bez trešnje), apsorbancija pločice na 620 nm izmjerena je čitačem mikropločica Tecan, Infinite F500 (ukupno vrijeme inkubacije = 2 sata).

#### 3.2.9.2. Studija kromatografske lipofilnosti

Kako bi se odredio raspon lipofilnosti, indeks kromatografske hidrofobnosti mjeren je gradijentom HPLC-a s reverznom fazom pri fiziološkom pH. Radne otopine uzoraka pripremljene su od 10 mM DMSO osnovnih otopina razrjeđivanjem acetonitrilom do konačne koncentracije od 1,25 mM i analizirane na Agilent 1100 Series tekućinskom kromatografskom sustavu s HPLC diodno-niznim detektorom (DAD) spojenim s Micromass Quattro micro API masenim spektrometrom. Uzorci su ubrizgani na HPLC kolonu (Phenomenex Luna C18, 50x 3 mm, 5 µm) i eluirani gradijentom na sobnoj temperaturi (temperatura uzorka 15°C). Mobilna faza sastojala se od 50 mM amonijevog acetata, pH = 7,4 i acetonitrila. Ukupno vrijeme rada bilo je 5 minuta, s brzinom protoka od 1 mL/min (u uvjetima gradijenta). HPLC sustav je inicijalno kalibriran korištenjem kalibracijskog seta od 10 spojeva s literarnim CHI vrijednostima. Eksperimentalno određena vremena zadržavanja gradijenta prikazana su u odnosu na vrijednosti CHI7.4 objavljene u literaturi, što je rezultiralo jednadžbom dobivenom linearnom regresijskom analizom. Ova jednadžba je dalje korištena za izračun CHI7.4 za ispitivane spojeve iz određenih vremena zadržavanja glavnog kromatografskog vrha iz UV kromatograma za svaki spoj. Dobivene vrijednosti CHI7.4 dalje su pretvorene u Chrom log D7.4 na sljedeći način:  $CHI7.4 \times 0.0857 - 2$ .

#### 3.2.9.3. Metabolička stabilnost u mikrosomima jetre

Testirani spojevi (konačna koncentracija 1 µM, 0,1% DMSO), kao i testosteron i propranolol kao pozitivne kontrole i kofein kao negativna kontrola, inkubirani su u fosfatnom puferu (50 mM, pH 7,4) tijekom 60 minuta na 37 °C s mikrosomima jetre (humanim i mišjim) u odsutnosti

i prisutnosti kofaktora NADPH. Sustav za stvaranje NADPH pripremljen je u fosfatnom puferu i sastojao se od nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP, 0,38 mM), glukoza-6-fosfata (1,49 mM), glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (1,5 U) i magnezijevog klorida (0,1 mM). Alikvotni uzorci su uzeti u različitim vremenskim točkama (0, 10, 20, 30, 45 i 60 min) i reakcija je prekinuta dodatkom smjese MeCN/MeOH (2:1) koja sadrži diklofenak kao interni standard. Uzorci su zatim centrifugirani (pri 4500 okretaja u minuti, pri 4 °C, tijekom 30 minuta) i dobiveni supernatanti su podvrgnuti LC-MS/MS analizi.

Poluvrijeme *in vitro* ( $t_{1/2}$ ) određeno je iz nagiba linearne regresije  $\ln$  % preostalog matičnog spoja u odnosu na vrijeme inkubacije. Intrinzični klirens *in vitro*, izražen kao  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  jetre, određen je iz poluvrijeme *in vitro* ( $t_{1/2}$ ) i normaliziran za koncentraciju proteina u inkubacijskoj smjesi. Predviđeni jetreni klirens *in vivo* određen je iz intrinzičnog klirensa *in vitro* uz pretpostavku 52,5 mg proteina/g jetre i korištenje konstantnih vrijednosti za težinu jetre/tjelesnu težinu [g/kg] (25,7 za ljude, 87,5 za miševe) i protok krvi u jetri (LBF) [ml/min/kg] (21 za ljude i 131 za miševe).

#### 3.2.9.4. Vežanje proteina plazme

Stupanj vežanja proteina plazme procijenjen je metodom ravnotežne dijalize. Plazma (humana i mišja) obogaćena je ispitivanim spojevima i trima kontrolnim spojevima (nikardipin i verapamil kod obje vrste, acebutolol kod humane i kofein u mišjoj plazmi) kako bi se dobila konačna koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  (0,5% DMSO). Hidrirane membrane umetnute su u jedinicu za ravnotežnu dijalizu (HT dijaliza) prema uputama proizvođača. Strana dijalizata zatim je napunjena odgovarajućim volumenom pufera, dok je isti volumen obogaćene plazme dodan u stranu uzorka. Inkubacija je trajala 4 sata na 37°C uz lagano trešnju. Nakon toga, taloženje proteina provedeno je miješanjem alikvota plazme ili pufera usklađenog s matricom s 3 volumena smjese MeCN/MeOH (2:1), koja sadrži interni standard (diklofenak). Nakon centrifugiranja (pri 4000 okretaja u minuti, na 4°C, tijekom 30 minuta) dobiveni supernatanti podvrgnuti su LC-MS/MS.

#### 3.2.9.5. Stabilnost u mišjoj i humanoj plazmi

Testirani spojevi (konačna koncentracija 5  $\mu\text{M}$ , 0,5% DMSO) inkubirani su 4 sata na 37 °C u humanoj i mišjoj plazmi. Alikvoti su uzeti u različitim vremenskim točkama (0, 30, 120 i 240 min) i reakcija je prekinuta dodatkom smjese MeCN/MeOH (2:1) koja sadrži unutarnji standard (diklofenak). Uzorci su zatim centrifugirani (pri 4500 rpm, pri 4 °C, tijekom 30 min) i dobiveni supernatanti su podvrgnuti LC-MS/MS analizi. Isti postupak je praćen za kontrole korištene u testu: propranolol (obje vrste), benfluoreks (miš) i eukatropin (čovjek).

#### 3.2.9.6. MDCKII-MDR1 test permeabilnosti

Procjena permeabilnosti i P-glikoproteinskog supstrata provedena je na MDCKII-hMDR1, Stanice su pripremljene za transportne studije sijanjem na umetke za staničnu kulturu s 96 jažica (Millipore, MA, SAD) u koncentraciji od  $0,25 \times 10^6$  stanica po ml. Stanice su hranjene svježim medijem 24 sata nakon sijanja i uzgajane do konfluencije 3 dana prije upotrebe. Na dan eksperimenta, stanični monoslojevi su isprani i uravnoteženi transportnim medijem

(DPBS, pH 7,4 koji sadrži 1% DMSO) sa ili bez specifičnog inhibitora P-gp, elakridara (2 $\mu$ M) tijekom 45 minuta (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlažnosti). Otopina ispitivanog spoja sastojala se od ispitivane tvari (10  $\mu$ M) u D-PBS mediju koji je sadržavao luciferin (100  $\mu$ M) i 1% DMSO). Ispitivanja transporta provedena su u smjeru od apikalnog do bazolateralnog (A2B) i bazolateralnog do apikalnog (B2A) smjera. Monoslojevi su inkubirani s otopinom spoja 60 minuta na 37 °C uz lagano miješanje. Apikalni i bazolateralni odjeljci uzorkovani su na kraju eksperimenta transporta, dok su **otopine donora** također uzorkovane na početku eksperimenta kako bi se odredila početna koncentracija. Koncentracije ispitivane tvari u oba odjeljka određene su LC-MS/MS. U ispitivanju je korišteno nekoliko kontrola: 1) amprenavir (0,5  $\mu$ M) služio je kao niskopropusna kontrola, a ujedno je i P-gp supstrat; 2) diklofenak (10  $\mu$ M) korišten je kao visokopropusna kontrola; 3) Luciferin, fluorescentni marker za transport kroz paracelularnu membranu, korišten je kao kontrola integriteta staničnog monosloja.

### 3.2.9.7. LC-MS/MS analiza

Svi ADME uzorci analizirani su na Sciex API 4000 ili Sciex API4500 trostrukom kvadrupolnom masenom spektrometru (Sciex, Framingham, MA, SAD) spojenom na UHPLC sustav (Shimadzu Nexera X2; Shimadzu, Kyoto, Japan). Uzorci su ubrizgani na UPLC kolonu (HALO2 C18, 2,1x20 mm, 2  $\mu$ m ili Phenomenex Luna Omega Polar C18, 30x2,1 mm, 1,6  $\mu$ m) i eluirani gradijentom na temperaturi od 50°C. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila (s 0,1% mravlje kiseline) i 0,1% mravlje kiseline u deioniziranoj vodi. Ukupno vrijeme mjerenja bilo je 1 ili 1,5 minuta, s protokom od 0,7 mL/min (u uvjetima gradijenta). Za detekciju masenom spektrometrijom korišten je mod pozitivnog iona s turbo raspršivanjem, temperatura izvora iona od 500 °C i vrijeme zadržavanja od 150 ms. Višestruko praćenje reakcija (MRM) korišteno je na specifičnim prijelazima za svaki testirani spoj/kontrolu: spoj 5c: 361,9  $\rightarrow$  304,9; spoj 5d: 344,8  $\rightarrow$  287,9; spoj 5e: 349,8  $\rightarrow$  292,9; spoj 5g: 350,8  $\rightarrow$  293,9; spoj 5h: 344,0  $\rightarrow$  286,9; spoj LM-1: 276,9  $\rightarrow$  220,0; spoj 5b: 319,0  $\rightarrow$  262,0; spoj 6b: 302,1  $\rightarrow$  245,1; spoj 6c: 344,9  $\rightarrow$  288,0; spoj 6d: 333,0  $\rightarrow$  276,0; spoj 6e: 316,1  $\rightarrow$  259,0; spoj 6f: 327,1  $\rightarrow$  270,0; spoj 6g: 377,1  $\rightarrow$  320,1; testosteron: 289,3  $\rightarrow$  97,1; propranolol: 260,1  $\rightarrow$  182,8; kofein: 195,2  $\rightarrow$  138,1; acebutolol: 337,2  $\rightarrow$  116,2; nikardipin: 480,2  $\rightarrow$  315,0; verapamil: 455,4  $\rightarrow$  165,1; amprenavir: 506,2  $\rightarrow$  245,4; diklofenak: 296,1  $\rightarrow$  213,7 ili 296,2  $\rightarrow$  215,3; eukatropin: 292,2  $\rightarrow$  109,1; benfluoreks: 352,1  $\rightarrow$  230,3 i varfarin: 309,2  $\rightarrow$  163,2.

## 3.3. Metode *in vivo*

### 3.3.1. Dobrobit životinja i odobrenje Etičkog komiteta Selvita d.o.o. CARE

Sva istraživanja vezana uz životinje odobrena su i provedena u skladu s Direktivom 2010/63/EU i nacionalnim zakonodavstvom koje regulira korištenje laboratorijskih životinja u znanstvenim istraživanjima i u druge svrhe (Narodne novine 55/13). Institucionalni odbor za etiku istraživanja životinja (engl. Institutional Committee on Animal Research Ethics, CARE-Zg) nadgledao je da postupci vezani uz životinje ne ugrožavaju dobrobit životinja.

Istraživanja vezana uz životinje provode se u skladu s regionalnim zakonodavstvom o zaštiti životinja i Europskom konvencijom o zaštiti kralježnjaka koji se koriste u eksperimentalne i

druge znanstvene svrhe. Institucionalni zahtjevi ispunjavaju se opravdanjem potrebe za ovim istraživanjem pred Odborom za etiku istraživanja životinja - Zagreb i dobivanjem njegovog službenog odobrenja

### 3.3.2. Uvjeti držanja Balb/C NU/NU miševa

Nakon prihvata, po 10 životinja smješteno je u kaveze (Sealsafe plus mouse IVC green line system TECNIPLAST S.p A., Italy) tijekom aklimatizacijskog perioda od 5 dana. Miševi su držani na visokoupijajućoj podlozi od celuloznih vlakana, promjera čestica 5mm (ALPHA-dri dust free bedding, LBS Serving Biotechnology) pri temperaturi od 25°C. Peletirana hrana (SDS VRF 1 (P), UK) bila je dostupna *ad libitum* kao i voda za piće (boce TECNIPLAST S.p.A. Italy).

### 3.3.3. Priprema suspenzije A549 stanica za inokulacija Balb/C NU/NU miševa za razvoj tumorskih ksenografta

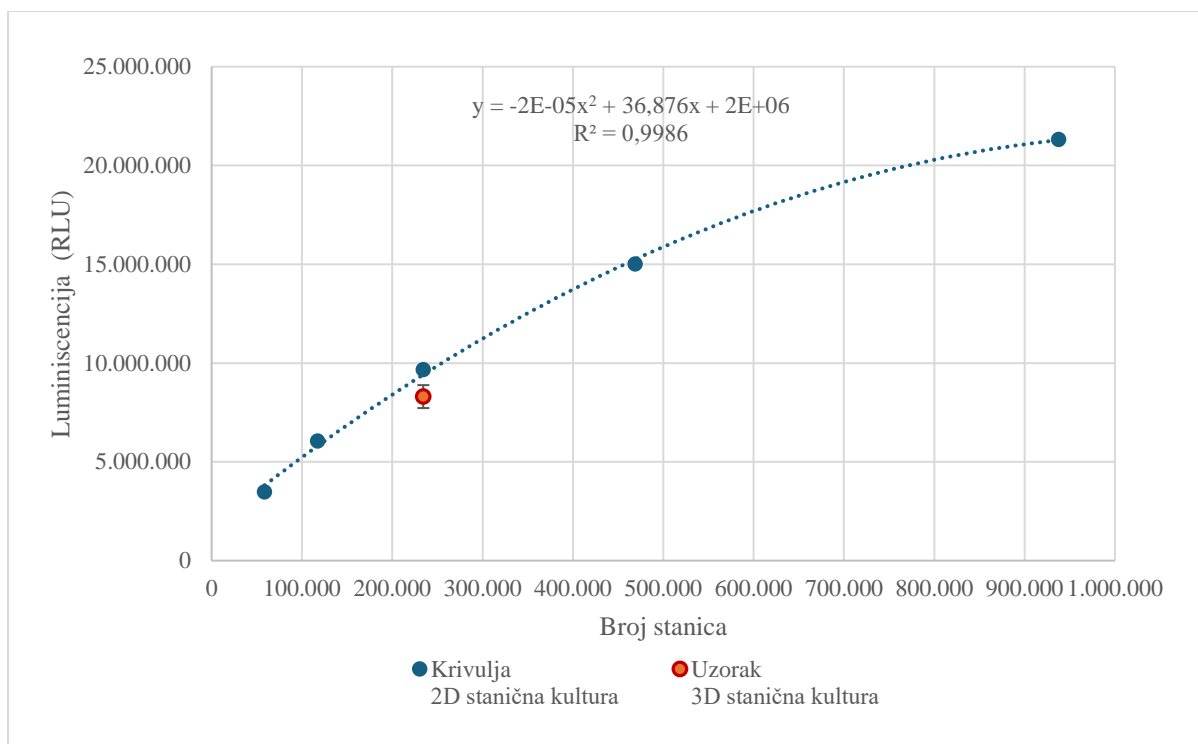
#### 3.3.3.1. Priprema suspenzije A549 stanica u 2D formatu

Na dan eksperimenta, stanice A549 su sakupljene u 7. pasaži 2D stanične kulture te su tripsinizirane, centrifugirane (1100 okretaja u minuti/5 minuta na 21°C), resuspendirane DPBS-u te im je broj podešen je na  $1 \times 10^7$  stanica po mL. Stanice su pohranjene na ledu do inokulacije miševima.

#### 3.3.3.2. Priprema suspenzije A549 stanica u 3D formatu

Da bi se postigao isti broj stanica inokuluma za 2D i 3D ksenografte, potrebno je bilo izračunati broj stanica u 3D sferi. Stanice iz 2D stanične kulture korištene su za izradu baždarne krivulje. Stanice su tripsinizirane, centrifugirane (1100 okretaja u minuti/5 minuta na 21°C), resuspendirane, procijeđene, te prenesene u pločicu s 96 jažica i razrijeđene 1:2 kako bi se napravilo 5 razrjeđenja s početnim brojem stanica od  $1 \times 10^6$  stanica u 50  $\mu$ L po jažici u duplikatu. Paralelno, stanice iz 3D stanične kulture u obliku malih sfera su centrifugirane i suspenzija je mehanički pripremljena trešnjom. Deset nerazrijeđenih uzoraka od 50  $\mu$ L posijano je u pločicu s 96 jažica. Za mjerenje broja vijabilnih stanica dodan je CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Luminescent Cell Viability Assay (Promega, #G7573)) i luminiscencija je očitana na EnVision 2104. Prema formuli za polinomsku liniju trenda (reda 2) iz Office 2019 (Microsoft, Redmond, WA, SAD), određen je broj stanica po mL volumena održavanih u 3D staničnoj kulturi (slika 11). Sa tom metodom smo odredili broj stanica  $3.8 \times 10^6$  cells po tikvici T75 FLASK NUNCLON SPHERA u tjedan dana umnožavanja stanica. Tako smo izračunali koliko nam je tikvica i vremena potrebno za uzgoj broja stanica za pokus *in vivo*.

Na dan eksperimenta, stanice A549 su sakupljene u 5. pasaži 3D stanične kulture.



**Slika 10.** Polinomska krivulja reda dva za određivanje broja A549 stanica u 3D sferi u odnosu na broj stanica u 2D staničnoj kulturi

### 3.3.4. Inokulacija suspenzije tumorskih stanica

Prije inokulacije miševi su anestetizirani u indukcijskoj komori inhalacijske anestezije, koristeći smjesu kisika i 4% izoflurana. Tijekom postupka miševi su smješteni na grijajuću podlogu kako bi se spriječila hipotermija. Svi postupci su se provodili sterilnim načinom rada.

Svaki miš inokuliran je stanicama A549 potkožno potkožno u intraskapularno područje leđa pomoću hipodermične igle (25G BD, Becton Dickinson) postavljene na jednokratnu štrcaljku od 1 ml BD. Tijekom injekcije igla je umetnuta potkožno 5 do 10 mm od mjesta uboda. Koncentracija stanica po mišu bila je  $1 \times 10^6$  u 100  $\mu$ l. Nakon aplikacije stanica miševi su vraćeni u kavez. Ukupan broj inokuliranih miševa bio je 60 (30 miševa sa stanicama pripremljenim u 2D uvjetima i 30 miševa sa stanicama pripremljenim u 3D uvjetima).

### 3.3.5. Mjerenje rasta i izračun veličine tumora

Tjelesna težina miševa mjerena je 3 puta tjedno do žrtvovanja, a rast tumora praćen je svaka dva dana. Razvoj tumora praćen je makroskopski, a nakon što su tumori postali palpabilni, mjerenje je započeto digitalnim kaliperom (Mitutoyo). Tumori su mjereni u dvije dimenzije (Tomayko MM et al, 1989): duljina (najduža dimenzija) i širina (najuža dimenzija). Volumen tumora je aproksimiran sljedećom formulom:  $(\text{Duljina} \times \text{Širina}^2) / 2$  [ $\text{mm}^3$ ].

Kad je volumen tumora dosegao približno  $100 \pm 50 \text{ mm}^3$ , miševi su uključeni u istraživanje kako bi se osiguralo da je prosječni volumen transplantiranog tumora kod miševa prije liječenja bio oko  $100 \text{ mm}^3$ . Miševi su podijeljeni u skupine prema tretmanu.

### 3.3.6. Kriterij isključivanja životinja iz pokusa

Miševi su uključeni u pokus dok težina tumora ne dosegne 10% tjelesne težine ili dok tumor ne postane ulceriran/nekrotičan, što god nastupi prije. Miševi koji nisu razvili tumor ili su ga odbacili (prestanak rasta) isključeni su iz pokusa (Kim Kmet al, 2017).

### 3.3.7. Alokacija životinja po skupinama u pokusu:

Kod životinja inokuliranih tumorskim stanicama uzgojenim u 2D uvjetima, 29 od 30 životinja pokazalo je palpabilne i mjerljive tumore do 14. dana, kada je počeo tretman sa test supstancama.

Životinje inokulirane tumorskim stanicama uzgojenim u 3D uvjetima, 11 životinja nije pokazalo nikakvo palpabilno tumorsko tkivo, a 5 životinja je pokazalo manje tumore od veličine koja je potrebna za uključivanje u pokus. Zbog smanjenog broja životinja koje su ušle u pokus, smanjen je broj grupa u pokusu te su životinje malocirane u grupe metodom randomizacije (Tablica 26)

### 3.3.8. Formulacija testnih supstanci i IP treatment Balb/C NU/NU miševa s testnim supstancama LM-1a i CR-2

Prije upotrebe, cjelokupna količina testnih spojeva pohranjena je na +4 °C. Testirani spojevi su vagani i otopljeni u 1% Natrosol (HEC)/5% DMSO (v/v)) sa finalnom koncentracijom spoja 2.5 mg/mL što odgovara dozi od 25mg/kg. Alikvoti tako pripremljenih formuliranih spojeva pohranjeni su na -20 °C za svaki dan doziranja. Miševi su tretirani dva puta tjedno (IP) u volumenu od 100 µL po mišu.

### 3.3.9. Završno uzimanje uzoraka

#### 3.3.9.1. Uzorkovanje plazme:

Na 39. dan, krv je prikupljena od životinja u skupinama tretiranim spojevima CR-2 i LM-1a (skupine 3, 4 i 6) punkcijom lateralne repne vene (~100 µL u K<sub>2</sub>EDTA epruvetu). Pet uzoraka plazme pripremljeno je za PK analizu. Plazma je pripremljena centrifugiranjem uzoraka krvi pri 3500 rpm/10 min/+4 °C, te je alikvotirana i pohranjena na -80 °C do bioanalize.

#### 3.3.9.2. Uzorkovanje tumora:

Na dan završetka eksperimenta, provedena je eutanazija natrijevim pentobarbitalom i cervikalnom dislokacijom kako bi se smanjila patnja životinja. Zabilježena je tjelesna težina miševa, a cijela tumorska masa je sakupljena, izvagana i odabrana za različite analize: tumori za histopatološku analizu stavljeni su u 10% puferirani formalin i fiksirani, tumori za analizu protočnom citometrijom stavljeni su u RPMI stanični medij bez seruma, a tumori za bioanalizu stavljeni su u Precellys epruvetu, brzo zamrznuti i pohranjeni na -80 °C.

### 3.3.10. LC-MS/MS analiza CR-2 i LM-1a u plazmi i tumoru

Spojevi CR-2 i LM-1a otopljeni su u DMSO-u u koncentraciji od 1 mg/mL. Otopine za dodavanje pripremljene su u rasponu koncentracija od 5 do 50 000 ng/mL koristeći gore navedenu otopinu. Kalibracijski i QC standardi pripremljeni su korištenjem iste osnovne otopine. Kao metoda ekstrakcije odabrana je metoda taloženja proteina.

Uzorci plazme *in vivo* čuvani su smrznuti na -20 °C i odmrznuti na dan analize. Volumen od 20 µL plazme pomiješan je s 20 µL vode i 2 µL DMSO-a kako bi se postigli uzorci usklađeni s kalibracijskim standardima. Proteini u uzorcima plazme taloženi su korištenjem 300 µL otopine za taloženje (acetonitril:metanol 2:1 sa 100 ng/mL diklofenaka kao internog standarda). Nakon dodavanja svih komponenti, cijela smjesa je dobro promiješana u vrtlogu i centrifugirana pri 4500 rpm i 4 °C tijekom 30 minuta.

Kalibracijski i QC standardi, slijepi i dvostruko slijepi uzorci svježe su pripremljeni korištenjem slijepa matrice na isti način kao i *in vivo* uzorci. Otopine analita pripremljenih u DMSO-u dodane su kalibracijskim uzorcima i QC-ovima, dok je DMSO bez analita dodan uzorcima, slijepim i dvostrukim slijepim uzorcima. Nakon centrifugiranja, supernatanti su pomiješani s vodom (1:2) u LCMS pločici. Konačne razine koncentracije bile su 0,5-5000 ng/mL, a razine koncentracije QC-a pripremljene su kako bi pokrile analitički raspon.

Uzorci tumorskog tkiva homogenizirani su u 2 volumena vode, koristeći epruvete s kuglicama i homogenizator Precellys (3 puta pri 6000 rpm tijekom 30 sekundi, s pauzom od 10 sekundi između). Ciklus homogenizacije proveden je dva puta s pauzom od 10 minuta, držeći uzorke na ledu između. Nakon homogenizacije, uzorci su razrijeđeni 5 puta u plazmi (1:4 v/v) i nakon toga obrađeni su na isti način kao i uzorci plazme.

Ekstrakti uzoraka plazme i tkiva razrijeđeni su vodom 1:1 (v/v) prije analize, a zatim je ubrizgano 1 µL ove smjese. Analiza je provedena LC-MS/MS sustavom korištenjem kromatografske kolone Acquity UPLC BEH C18 (21 mm x 50 mm x 1,7 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, SAD) na 50 °C instalirane u Shimadzu Nexera tekućinskom kromatografu (LC) povezanom s AB Sciex Instruments QTRAP 6500 detektorom mase. Ista LC metoda primijenjena je za oba analita. Ukupni protok bio je 0,500 mL/min. Kao mobilna faza A korištena je 0,1 % mravlja kiselina i 10 mM amonijev acetat u vodi, a kao mobilna faza B acetonitril. Gradijent: 0 min 10 % B; 0,90-1,40 min 90 % B; 1,80-2,40 min 10% B.

Koncentracija oba analita izračunata je korištenjem omjera površine vrha analita/unutarnjeg standarda za najintenzivniji prijelaz praćenja višestrukih reakcija (MRM) u MS/MS.

### 3.3.11. Postupak disocijacije tumorskog tkiva i izolacija stanica za imunofenotipizaciju

Svaki tumor je ispran u Petrijevoj zdjelici koja je sadržavala Dulbeccovu fosfatno puferiranu otopinu soli (DPBS) kako bi se uklonila preostala krv. Tumori su prebačeni u odgovarajuću gentleMACS C epruvetu koja je sadržavala 2.5 mL enzimske smjese (liberaza i DNaza I) te su inkubirani 30 minuta u inkubatoru na 37°C. Nakon toga, 10 µM EDTA je dodano u konačnoj koncentraciji u medij za digestiju i stanice su inkubirane dodatnih 5 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, gentleMACS C epruvete su postavljene na gentleMACS Octo disocijator te su

tumori disocirani u suspenziju stanica na programu m\_tumor\_1.1. Nakon disocijacije, dodano je 5 mL ledeno hladnog DPBS-a u svaku epruvetu. Stanična suspenzija je nanescena na cjedilo za stanice od 70  $\mu\text{m}$  (Falcon, 352350) postavljeno na vrh epruvete Falcon od 50 ml i sakupljena. Epruveta GentleMACS C je isprana s 10 mL ledeno hladnog DPBS-a i isti volumen je nanesen na cjedilo za stanice od 70  $\mu\text{m}$ . Stanične suspenzije su centrifugirane pri 300 g tijekom 10 minuta na 4°C.

Nakon odstranjenja supernatanta, stanični talog je resuspendiran u 5 mL 1X pufera za lizu (10X pufer za lizu crvenih krvnih stanica razrijeđen na 1X radnu koncentraciju s deioniziranom vodom, BioLegend, #420302) i inkubiran na ledu 4 minute uz povremeno protresanje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 25 mL DPBS. Stanice su centrifugirane 10 minute pri 300 g na 4°C i supernatant je odbačen.

Stanični talog je resuspendiran u 1 mL pufera za bojanje stanica (2 mM EDTA s 2% fetalnog goveđeg seruma, FBS). Dobivena stanična suspenzija je propuštena kroz cjedilo za stanice od 40  $\mu\text{m}$  i stanice su prebrojane na Sysmex XS-500i.

### 3.3.12. Protokol bojanja izoliranih stanica iz tkiva tumorskih kenografta za imunofenotipizaciju stanica tumora protočnom citometrijom

Bojanje za analizu protočnom citometrijom provedeno je odmah nakon izolacije stanica.  $1 \times 10^6$  stanica preneseno je po jažici pločice s 96 jažica i U-dnom (BD Biosciences, 357711) u 50  $\mu\text{L}$  pufera za bojenje stanica, nakon čega je dodano 50  $\mu\text{L}$  DPBS-a s bojom za mrtve stanice (Live/Dead yellow Dead Stain Kit, Invitrogen, L34959) razrijeđenom 1:1000. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon inkubacije, u svaku jažicu dodano je 100  $\mu\text{L}$  pufera za bojenje stanica (2 % FBS fi 2 mM EDTA u DPBS-u) i pločica je centrifugirana na 500 g tijekom 5 minuta. Nakon odbacivanja supernatanta, dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine antitijela za blokiranje FcR-a (BD Biosciences, 553142) prethodno razrijeđene 1:50 u puferu za bojenje stanica i inkubirano na sobnoj temperaturi 10 minuta. Bez ispiranja, dodan je koktel primarno obilježenih antitijela za svaku ploču u odgovarajućem razrjeđenju u puferu za bojenje stanica (tablica 4). Uzorci su lagano pomiješani višekanalnom pipetom i ostavljeni 30 minuta na 4°C zaštićeni od svjetlosti. Nakon inkubacije, u svaku jažicu dodano je 150  $\mu\text{L}$  pufera za bojenje stanica, stanice su centrifugirane na 500 g tijekom 5 minuta na 4°C. Supernatant je uklonjen i korak ispiranja ponovljen je još 2 puta (ukupno 3 ispiranja) s 250  $\mu\text{L}$  pufera za bojenje stanica. Nakon odbacivanja supernatanta, u svaku jažicu dodano je 250  $\mu\text{L}$  pufera za bojenje stanica te je 100  $\mu\text{L}$  uzorka analizirano na Attune NxT protočnom citometru.

**Tablica 4.** Popis biljega analiziranih u tumorskom tkivu sa pripadajućim primarnim protutijelima

<b>Imunofenotipiziranje tumorskih stanica</b>					
<b>Biljeg</b>	<b>Fluorokrom</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Volumen u 100 <math>\mu</math>L</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Klon</b>
MHC ClassII	eFluor450	Thermo Fisher Scientific	1 $\mu$ L	48-5321-82	M5/114.15.2
CD8a	BV510	BioLegend	1.25 $\mu$ L	100752	53-6.7
F4/80	BV711	BD Biosciences	1 $\mu$ L	565612	T45-2342
CD11b	FITC	BD Biosciences	0.5 $\mu$ L	553310	M1/70
CD3	PerCP-Cy5.5	BioLegend	1.25 $\mu$ L	100218	17A2
Ly-6C	PE	Thermo Fisher Scientific	1 $\mu$ L	12-5932-82	HK1.4
CD4	PE-CF594	BD Biosciences	1 $\mu$ L	562285	RM4-5
CD326 (EpCAM)	PE	eBioscience	0.25 $\mu$ L	12-9326-42	1B7
Ly-6G	PE-Cy7	BD Biosciences	1 $\mu$ L	560601	1A8
CD11c	APC	BD Biosciences	1 $\mu$ L	550261	HL3
CD45R (B220)	AF700	eBioscience	1.25 $\mu$ L	56-0452-82	RA3-6B2
CD45	APC-eF780	eBioscience	1.25 $\mu$ L	47-0454-82	104
Live/Dead yellow Dead Stain Kit		Invitrogen	0.1 $\mu$ L	L34959	na

### 3.3.13. Protokol zamrzavanja i odmrzavanja stanica izoliranih iz tumora

#### 3.3.13.1. Zamrzavanje stanica

Stanice su centrifugirane 5 minuta pri 300 x g na 4 °C, a stanični talozi su lagano resuspendirani u mediju za zamrzavanje (10% DMSO + 90% FBS) u koncentraciji od 20x10<sup>6</sup> stanica/mL, alikvotirane u krioviale i pohranjene na -150°C do upotrebe.

#### 3.3.13.2. Odmrzavanje stanica

Krioviale su odmrznute kratkom inkubacijom u vodenoj kupelji na 37°C, a 1 mL stanične suspenzije otpipetirano je u 10 mL RPMI 1640 medija nadopunjenog s 10% FBS-a i 1% otopine antibiotika i antimikotika. Stanice su centrifugirane 10 minuta pri 300xg na sobnoj temperaturi. Supernatanti su uklonjeni, stanični talog resuspendirani u 1 mL DPBS-a i prebrojani na hematološkom analizatoru Sysmex XS 500i. Vijabilnost stanica određena je bojenjem tripanskim plavilom i automatskim brojanjem stanica Countess II.

### 3.3.14. Protokol bojanja izoliranih stanica tumora za analizu Aneksin V i Ki-67 biljega protočnom citometrijom

50  $\mu$ L stanične suspenzije u koncentraciji od 6x10<sup>6</sup>/mL stavljeno je u pločicu s 96 jažica (300 000 stanica po jažici) s U-dnom (BD Biosciences, 357711), nakon čega je dodano 50  $\mu$ L boje za vijabilnost prethodno razrijeđene 1:500 u DPBS-u. Uzorci su inkubirani na sobnoj

temperaturi 20 minuta. U svaku jažicu dodano je 100  $\mu$ L pufera za bojenje stanica (DPBS + 2 mM EDTA + 2 % FBS) i pločice su centrifugirane na 500 $\times$ g tijekom 5 minuta. Supernatanti su odbačeni, a pločice pažljivo protresene.

Nakon uklanjanja supernatanata, dodano je 50  $\mu$ L otopine antitijela za blokiranje FcR-a (BD Biosciences, 553142) prethodno razrijeđene 1:50 u puferu za bojenje stanica po jažici i inkubirano na sobnoj temperaturi 10 minuta. Bez ispiranja, dodan je koktel primarno obilježenih antitijela (EpCAM i CD45) u odgovarajućem razrjeđenju u puferu za bojenje stanica (tablice 5 i 6). Uzorci su lagano pomiješani višekanalnom pipetom i ostavljeni 30 minuta na 4°C zaštićeni od svjetlosti. Nakon inkubacije, u svaku jažicu dodano je 150  $\mu$ L pufera za bojenje stanica, stanice su centrifugirane na 500 g tijekom 5 minuta na 4°C. Supernatant je uklonjen i korak ispiranja ponovljen je jednom s 250  $\mu$ L pufera za bojenje stanica. Nakon posljednjeg ispiranja, uzorci su podijeljeni u 2 skupine: jedna skupina je obojena aneksinom V i SytoxAAD-om za određivanje statusa apoptoze i održivosti, dok je druga skupina obojena s Ki67 za određivanje statusa proliferacije.

**Tablica 5.** Popis biljega analiziranih za proliferacijski status stanica u tumorskom tkivu

Panel za analizu proliferacijskog statusa stanice					
Biljeg	Fluorokrom	Proizvođač	Volumen u 100 $\mu$ L	Kataloški broj	Klon
CD326 (EpCAM)	PE	eBioscience	0.25 $\mu$ L	12-9326-42	1B7
Ki-67	APC	Miltenyi Biotec	1 $\mu$ L	130-120-416	REA183
CD45	APC-eF780	eBioscience	1.25 $\mu$ L	47-0454-82	104
Live/Dead yellow Dead Stain Kit		Invitrogen	0.1 $\mu$ L	L34959	na

#### 3.3.14.1. Protokol bojenja Ki-67 izoliranih stanica tumora

Pripremljen je 70%-tni etanol i ohlađen na -20°C. Stanice su dva puta isprane s DPBS-om, centrifugirajući na 350 $\times$ g tijekom 5 minuta. Supernatant je odbačen i 3 mL hladnog 70%-tnog etanola je dodano kap po kap u talog stanica uz vrtloženje. Stanice su vrtložene još 30 sekundi, a zatim inkubirane na -20°C tijekom 2 sata. Uzorci su isprani 3X puferom za bojenje stanica. 100  $\mu$ L razrijeđenog Ki-67 antitijela dodano je svakom uzorku i inkubirano na sobnoj temperaturi u mraku tijekom 30 minuta. Uzorci su isprani dva puta puferom za bojenje stanica, a zatim resuspendirani u 200  $\mu$ L pufera za bojenje stanica za protočnu citometrijsku analizu.

$$Ki67 = \left( \frac{\% \text{ Ki67 pozitivnih stanica}}{\text{Ukupan broj analiziranih stanica}} \right) * 100$$

#### 3.3.14.2. Protokol bojenja aneksina V

Prije eksperimenta pripremljen je 10x koncentrirani pufer za vezanje aneksina (engl. *Annexin Binding Buffer, ABB*) koji se sastoji od 100 mM HEPES, 1400 mM NaCl, 40 mM KCl, 7,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM CaCl<sub>2</sub> s pH 7,4. 1X pufer za vezanje aneksina pripremljen je miješanjem 1 dijela 10X pufera za vezanje s 9 dijelova destilirane vode.

Stanice su jednom isprane u DPBS-u, a zatim jednom u 1X puferu za vezanje aneksina. Nakon posljednjeg ispiranja, stanice su resuspendirane u 90  $\mu$ L 1X pufera za vezanje aneksina. U svaki uzorak dodano je 10  $\mu$ L 20x razrijeđenog antitijela aneksina V i inkubirano 15 minuta na sobnoj

temperaturi, zaštićeno od svjetlosti. Zatim je dodano 150  $\mu\text{L}$  1X pufera za vezanje aneksina i uzorci su centrifugirani pri 500 x g tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, a stanice su dva puta isprane u 250  $\mu\text{L}$  1X pufera za vezanje aneksina. Nakon posljednjeg ispiranja, stanice su resuspendirane u 90  $\mu\text{L}$  1X pufera za vezanje aneksina, dodano je 10  $\mu\text{L}$  100x razrijeđene otopine za bojenje vijabilnosti SytoxAAD i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. U svaku jažicu dodano je 150  $\mu\text{L}$  1X pufera za vezanje aneksina, a uzorci su analizirani na Attune NxT protočnom citometru.

**Tablica 6.** Popis biljega analiziranih za apoptotski status stanica u tumorskom tkivu

Panel za analizu apoptotskog statusa stanice					
Biljeg	Fluorokrom	Proizvođač	Volumen u 100 $\mu\text{L}$	Kataloški broj	Klon
Annexin V	AF488	Invitrogen	0.2 $\mu\text{L}$	A13201	M1/70
CD326 (EpCAM)	PE	eBioscience	0.25 $\mu\text{L}$	12-9326-42	1B7
CD45	APC-eF780	eBioscience	1.25 $\mu\text{L}$	47-0454-82	104
SytoxAAD		Invitrogen	0.1 $\mu\text{L}$	S10274	na

### 3.3.15. Statistička analiza podataka dobivenih u *in vivo* pokusu

Rezultati *ex vivo* analiza statistički su obrađeni Mann-Whitney U-testom kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između netretiranih i tretiranih (s aktivnom molekulom dobivenom testiranjem *in vitro*) životinja kojima je implementiran inokulum stanica razvijenih u 2D ili 3D staničnoj kulturi u infiltraciji odabranih leukocita u tumorsko tkivo, koncentraciji testirane molekule u plazmi i tumoru te postoji li razlika između 2D i 3D. Razina značajnosti bit će  $p < 0.05$ .

Statistička analiza i grafički prikaz proveo sam korištenjem GraphPad Prism softvera (verzija 9). Razlike između skupina smatraju se statistički značajnima kada je  $p < 0,05$ .

### 3.3.16. Histopatološka analiza tumora iz mišjih ksenografta

Histološki uzorci tumora fiksirani su po primitku u 10%-tnom formalinu i uklopljeni. Uzorci uklopljeni u parafin su secirani na debljinu od 1  $\mu\text{m}$  i obojeni H&Es. Histopatološkom analizom, opisane su citološke i stromalne značajke, kao i mitotička aktivnost tumorskog tkiva.

### 3.3.17. Imunohistokemijska analiza Ki-67 pozitivnih stanica u preparatima tumora

IHC je proveden s uzorcima fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin. Uzorci su deparafinizirani u ksilenu i silaznom nizu alkohola u vodi, nakon čega je provedena prethodna obrada histopatoloških preparata u puferu na 95°C (PT Link, Dako). Histološki preparati su obojeni u automatiziranom sustavu Dako Autostainer Link48 za Ki-67 (Abcam, ab16667). Sekundarno zečje protutijelo s dodatkom normalnog konjskog seruma korišteno je za detekciju primarnog protutijela (Vector, Horse anti rabbit kit, MP-7401). Vizualizacija pozitivnog kromogenog signala postignuta je dodavanjem 3,3'-diaminobenzidina (DAB, DAKO, K3468). Preparati su kontrastirani hemalaum bojom, dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola i ksilena te prekriveni pokrovnim stakalcem. Svi histološki uzorci skenirani su u histološkom skeneru za

slajdove (Axioscan.Z1, Zeiss, Njemačka). Analizirana je i opisana jačina ekspresije signala i položaj proteina u stanici.

### 3.3.18. Određivanje koncentracije testiranih spojeva u plazmi i tumorskom tkivu kesnografa LC-MS/MS analizom

Spojevi CR-2 i LM-1a otopljeni su u DMSO-u u koncentraciji od 1 mg/mL. Otopine za dodavanje pripremljene su u rasponu koncentracija od 5 do 50 000 ng/mL koristeći gore navedenu otopinu. Kalibracijski i QC standardi pripremljeni su korištenjem iste osnovne otopine. Kao metoda ekstrakcije odabrana je metoda taloženja proteina.

Uzorci plazme *in vivo* čuvani su smrznuti na -20 (ili -80 °C) i odmrznuti na dan analize. Volumen od 20 µL plazme pomiješan je s 20 µL vode i 2 µL DMSO-a kako bi se postigli uzorci usklađeni s kalibracijskim standardima. Proteini u uzorcima plazme taloženi su korištenjem 300 µL otopine za taloženje (acetonitril:metanol 2:1 sa 100 ng/mL diklofenaka kao internog standarda). Nakon dodavanja svih komponenti, cijela smjesa je dobro promiješana i centrifugirana pri 4500 rpm i 4 °C tijekom 30 minuta.

Kalibracijski i QC standardi, slijepi i dvostruki slijepi uzorci svježe su pripremljeni korištenjem slijepa matrice na isti način kao i *in vivo* uzorci. Otopine analita pripremljenih u DMSO-u dodane su kalibracijskim uzorcima i QC-ima, dok je DMSO bez analita dodan uzorcima, slijepim i dvostrukim slijepim uzorcima. Nakon centrifugiranja, supernatanti su pomiješani s vodom (1:2) u LCMS ploči. Konačne razine koncentracije bile su 0,5-5000 ng/mL, a razine QC koncentracije pripremljene su kako bi pokrile analitički raspon.

Uzorci tumorskog tkiva homogenizirani su u 2 volumena vode, koristeći epruvete s kuglicama i homogenizator Precellys (3 puta pri 6000 rpm tijekom 30 sekundi, s pauzom od 10 sekundi između). Ciklus homogenizacije proveden je dva puta s pauzom od 10 minuta, držeći uzorke na ledu između. Nakon homogenizacije, uzorci su razrijeđeni 5 puta u plazmi (1:4 v/v) i nakon toga obrađeni su na isti način kao i uzorci plazme.

Ekstrakti uzoraka plazme i tkiva razrijeđeni su vodom 1:1 (v/v) prije analize, a zatim je ubrizgano 1 µL ove smjese. Analiza je provedena LC-MS/MS sustavom korištenjem kromatografske kolone Acquity UPLC BEH C18 (21 mm x 50 mm x 1,7 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, SAD) na 50 °C instalirane u Shimadzu Nexera tekućinskom kromatografu (LC) povezanom s AB Sciex Instruments QTRAP 6500 detektorom mase. Ista LC metoda primijenjena je za oba analita. Ukupni protok bio je 0,500 mL/min. Kao mobilna faza A korištena je 0,1 % mravlja kiselina i 10 mM amonijev acetat u vodi, a kao mobilna faza B acetonitril. Gradijent: 0 min 10 % B; 0,90-1,40 min 90 % B; 1,80-2,40 min 10% B.

Koncentracija oba analita izračunata je korištenjem omjera površine vrha analita/internog standarda za najintenzivniji prijelaz praćenja višestrukih reakcija (MRM) u MS/MS. MRM korišten za CR-2 bio je m/z 407,100 → 302,000 Da, za prijelaz LM-1a bio je m/z 277,219 → 220,000 Da, a za interni standard diklofenak bio je m/z 296,000 → 214,100 Da.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Validacija metoda testiranja spojeva na staničnim kulturama humanog karcinoma pluća u 3D uvjetima

Validacija metode je dokumentirani proces kojim se dokazuje pouzdanost, točnost i reproducibilnost određene analitičke metode. To je sveobuhvatan postupak koji uključuje testiranje i statističku evaluaciju. Potrebna je pri razvoju novih metoda i/ili prijenosu metoda na druge mjerne instrumente te laboratorije. Tijekom validacije sustavno se procjenjuju parametri poput točnosti, preciznosti, specifičnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, linearnosti i robusnosti testa (analize). Procjenom navedenih parametara, validacija osigurava točne i usporedive podatke.

Testovi za probir aktivnih supstanci ne smiju biti prerobusni (lažno negativni rezultati) a niti previše propusni (lažno pozitivni rezultati) te je njihova validacija u tom smislu presudna za upotrebu testa za detekciju aktivnih spojeva u ranoj fazi procesa istraživanja i razvoja.

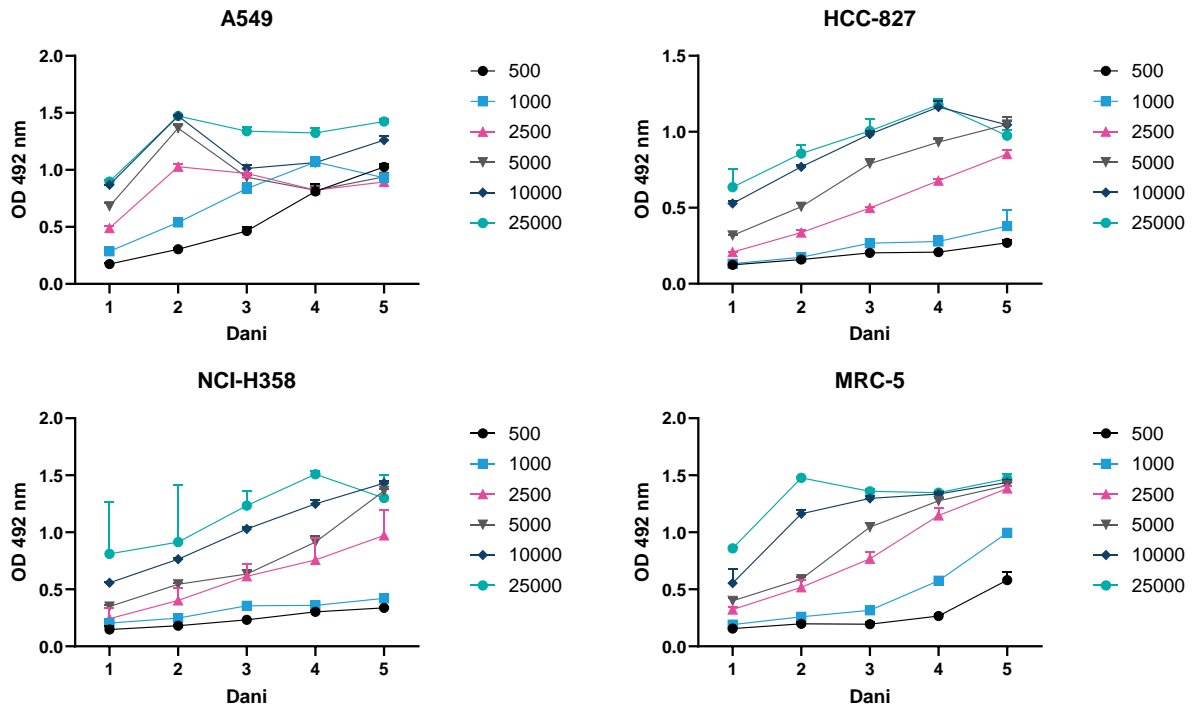
Kroz opsežnu evaluaciju, validacija rano otkriva slabosti metode ili testa, smanjujući rizik od pogrešaka u reguliranim uvjetima rada. Prihvatljivi postotak lažno pozitivnih rezultata prilikom validacije testa za korištenje u HTS probirima (eng. **high throughput screening**) je maksimalno 10% od ulaznog broja testiranih spojeva (Myler et al., 2022).

Validacija testiranja spojeva u 3D kulturi u HTS probiru obuhvaćala je: određivanje broja stanica za optimalni rast određen krivuljom rasta, rast sfere stanica i određivanje dana početka tretmana sa standardnim spojevima te određivanje  $IC_{50}$  vrijednosti standardnih spojeva u prethodno određenim uvjetima.

#### 4.1.1. Određivanje početnog broja stanica po jažici za dobivanje optimalne krivulje rasta za pojedine stanične kulture u 3D uvjetima

Validacija testiranja spojeva u 3D uvjetima uspoređivana je s testovima u 2D uvjetima staničnih kultura. Za validaciju određivan je broj stanica po jažici koji daje u vremenskom periodu (5 dana) krivulju rasta sa vidljivim eksponencijalnim rastom (Slika 12). Podatak broja stanica po jažici i vremena formiranja sferičnog rasta potreban je zbog određivanja početka tretmana standardnim spojevima.

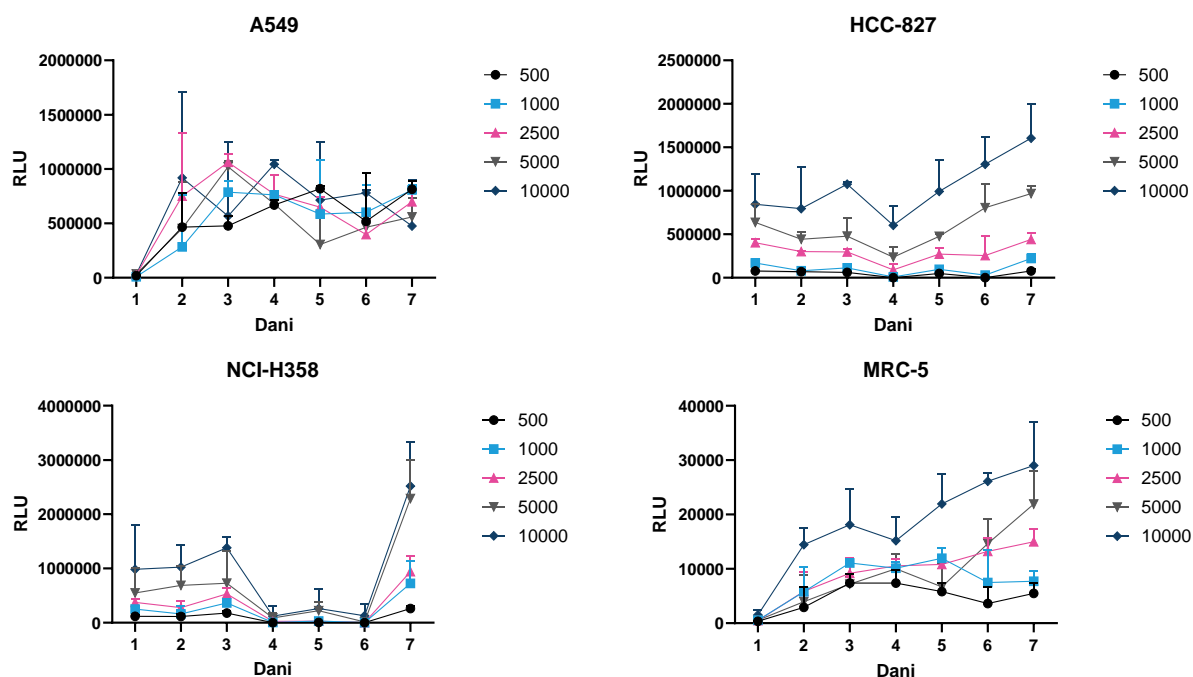
## Krivulje rasta 2D staničnih kultura



**Slika 11.** Krivulje rasta staničnih linija u 2D staničnoj kulturi ovisne o početnoj koncentraciji stanica po jažici tijekom 5 dana. Odabrani broj stanica je za sve stanične linije 10 000 po jažici.

Rezultati su pokazali da je početni broj stanica dovoljan za eksponencijalan rast za sve stanične linije u 2D kulturi 10 000 stanica po jažici dok je za 3D stanične kulture potrebno 5 000 stanica po jažici. Krivulje rasta u 2D i 3D uvjetima prikazane su na slikama 12 i 13. Kod svih staničnih linija u 3D uvjetima, krivulja rasta pokazala je pad između 3 i 4 dana te ponovni eksponencijalni rast do 7 dana. Usporedbom sa praćenjem sferičnog rasta staničnih linija optičkim mikroskopom (Slika 14-17) pad krivulja rasta poklapa se sa formiranjem sfera koje imaju manju proliferativnu zonu na površini te se broj stanica povećava daljnjim rastom sfere i time krivulja ponovno pokazuje eksponencijalni rast (6. i 7. dan).

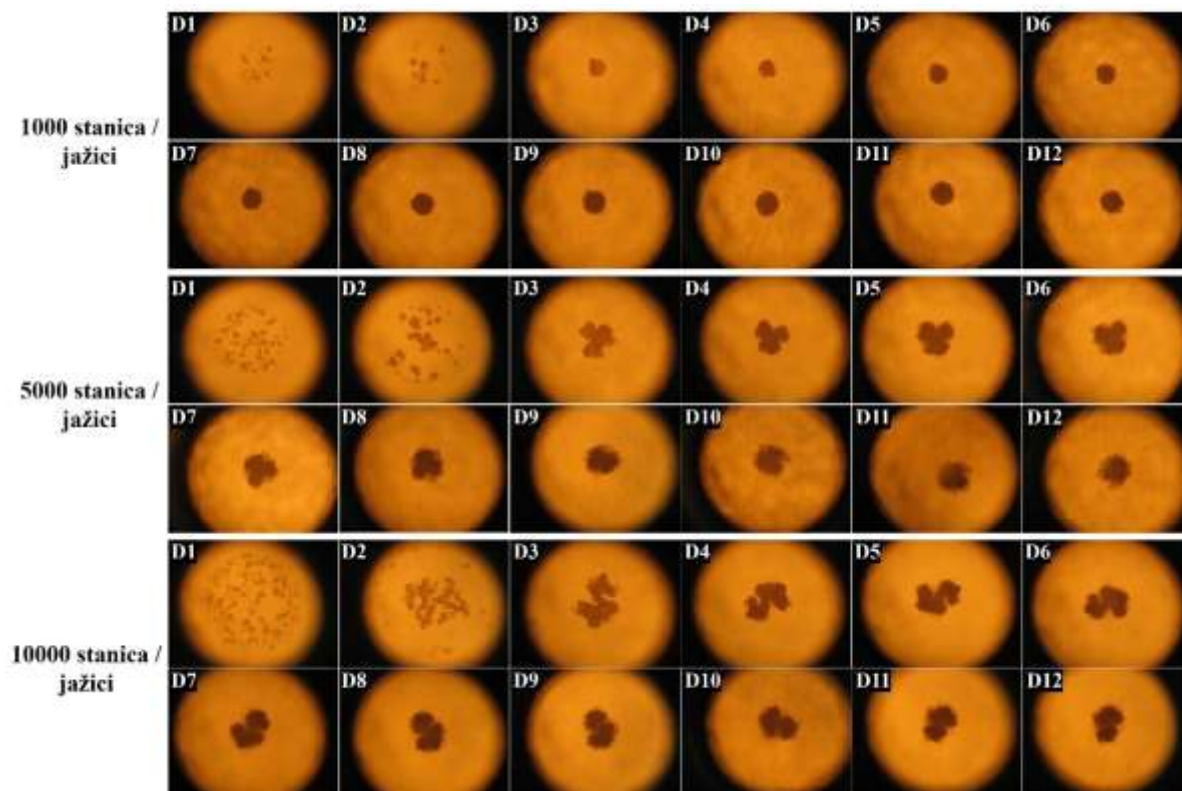
## Krivulje rasta 3D staničnih kultura



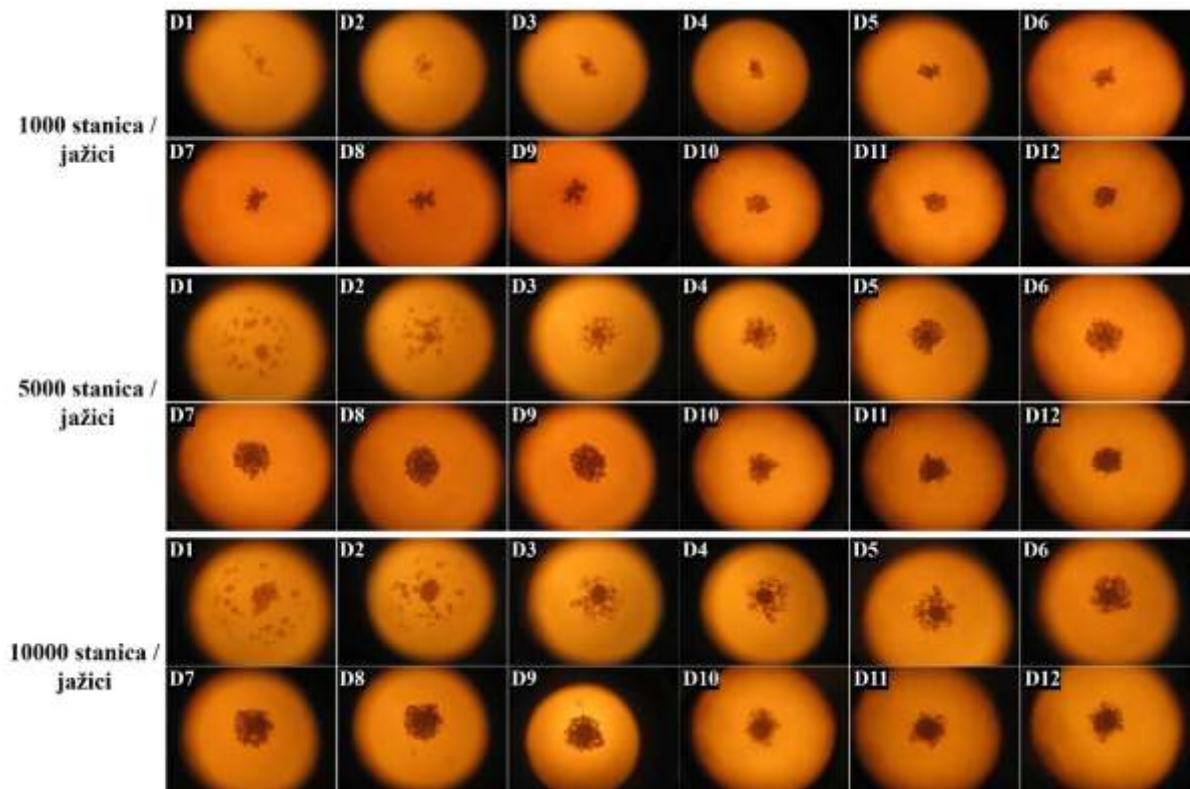
**Slika 12.** Krivulje rasta staničnih linija u 3D staničnoj kulturi ovisne o početnoj koncentraciji stanica po jažici tijekom 5 dana. Odabrani broj stanica za sve stanične linije je 5 000 stanica po jažici.

### 4.1.2. Prikaz formiranja sfere staničnih linija u 3D uvjetima

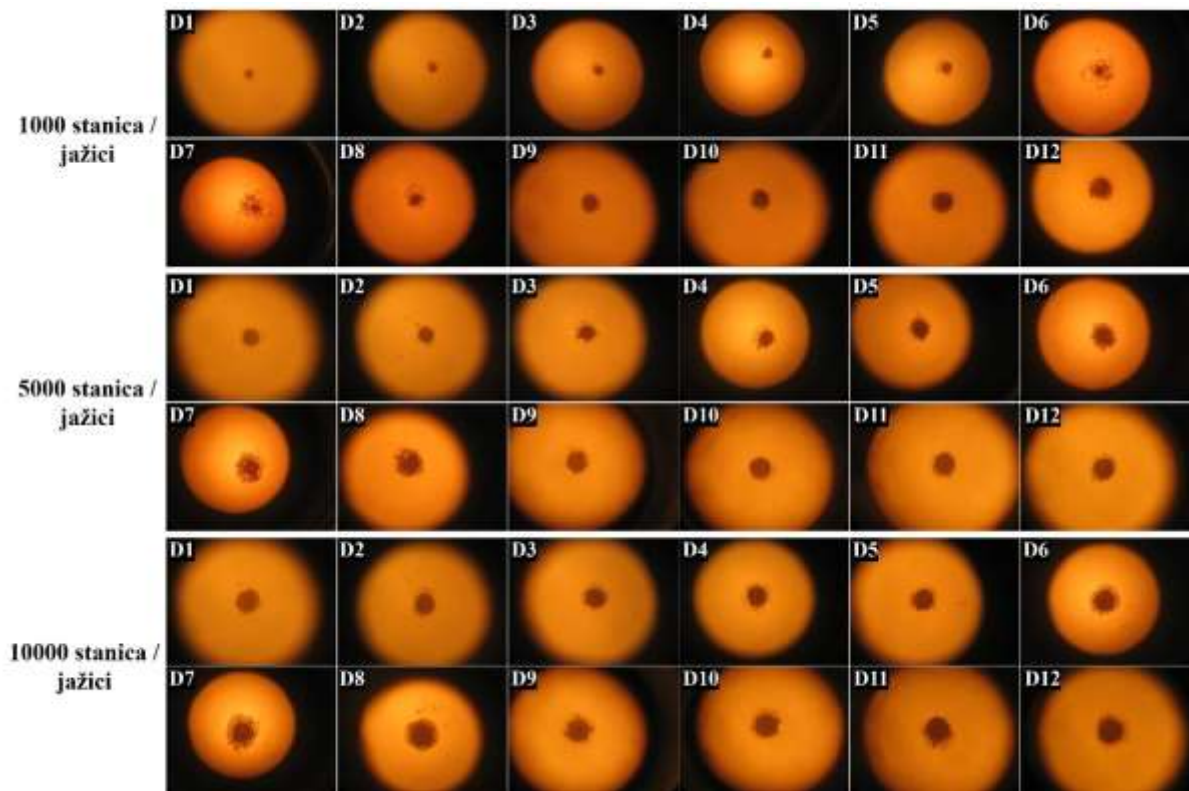
Rast svih staničnih linija u 3D uvjetima u praćen je optičkim mikroskopom u kulturi “hanging drop” (viseća kap) na Perfecta 3D pločicama te je formiranje sfera pojedinih staničnih kultura dokumentirano fotografijama prikazanim na slikama 14-17. Stanice su sadene u koncentraciji od 500 do 10 000 stanica po jažici i praćene 12 dana. Formiranje sfera je trajalo do 4 dana a nakon toga je uslijedio rast sfere do konačnog volumena. Za određivanje početka tretmana sa standardnim i novim kemijskim spojevima u obzir je uzet izgled i veličina sfere: formirana stabilna sfera koja se ne raspada prilikom manipulacije sa pločicom. Za sve stanične linije odabran je 4. dan od inokulacije stanica za početak tretmana standardnim i NKE testiranim spojevima.



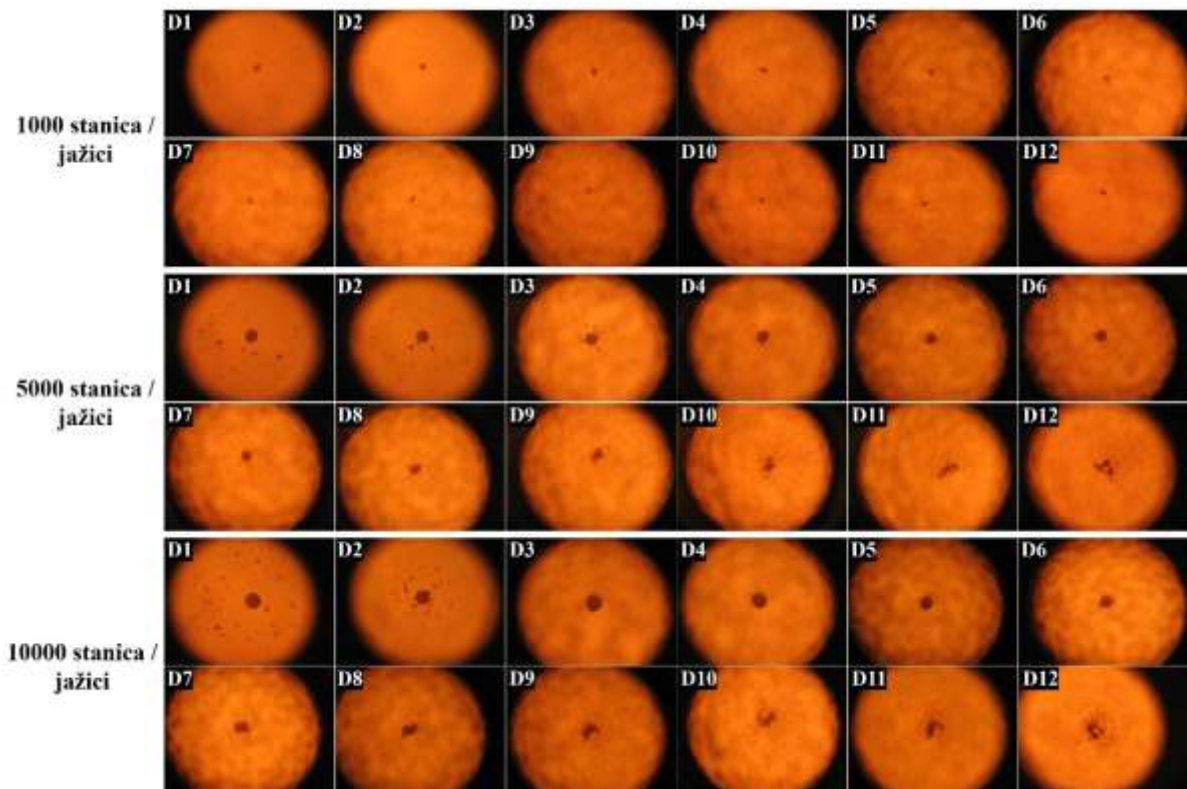
**Slika 13.** Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju A549 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici.



**Slika 14.** Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju HCC-827 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje standardnih je 5000 stanica po jažici.



**Slika 15.** Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju NCI-H358 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici. Na slici je vidljivo stagniranje rasta sfere 4. i 5. dana što se podudara sa dobivenom krivuljom rasta.



**Slika 16.** Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju MRC-5 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici. MRC-5 stanična linija je linija humanih plućnih fibroblasta i nije podložna sferičnom rastu u hanging drop kulturi, te su sfere manje izražene u usporedbi sa drugim staničnim linijama.

#### 4.1.3. Testiranje standardnih spojeva korištenih u validaciji metoda *in vitro* u 3 D uvjetima

Kako bih provjerio djelovanje standardnih kemoterapeutika pod uvjetima koje sam odredio krivuljom rasta i vremenom početka tretmana sa testiranim spojevima testirao sam standardne spojeve u MTS testu citotoksičnosti koji daje informacije o broju živih stanica (metabolički aktivnih stanica). Izradio sam krivulje rasta za svaki pojednini standardni spoj na svim staničnim kulturama u 2D i 3D uvjetima (Slike 19-21) te izračunao pripadajuće  $IC_{50}$  prema dobivenim krivuljama (Tablice 7 do 10).

Dobiveni rezultati pokazali su da je korištenje očitavanja pločica 72 sata nakon dodatka spoja optimalno za testiranje NKE.

#### 4.1.3.1. Doksorubicin

Doksorubicin je jedan od najčešće korištenih kemoterapijskih lijekova za liječenje brojnih karcinoma. Inducira staničnu smrt putem višestrukih unutarstaničnih ciljeva: interkalacijom u DNA te dolazi do pokretanja apoptoze i zaustavljanja staničnog ciklusa i prekida popravka DNA posredovanog topoizomerazom II. Pri tom se stvaraju slobodni radikal te dolazi do oštećenja stanične membrane, DNA i proteina (Sritharan & Sivalingam, 2021).

#### 4.1.3.2. Staurosporin

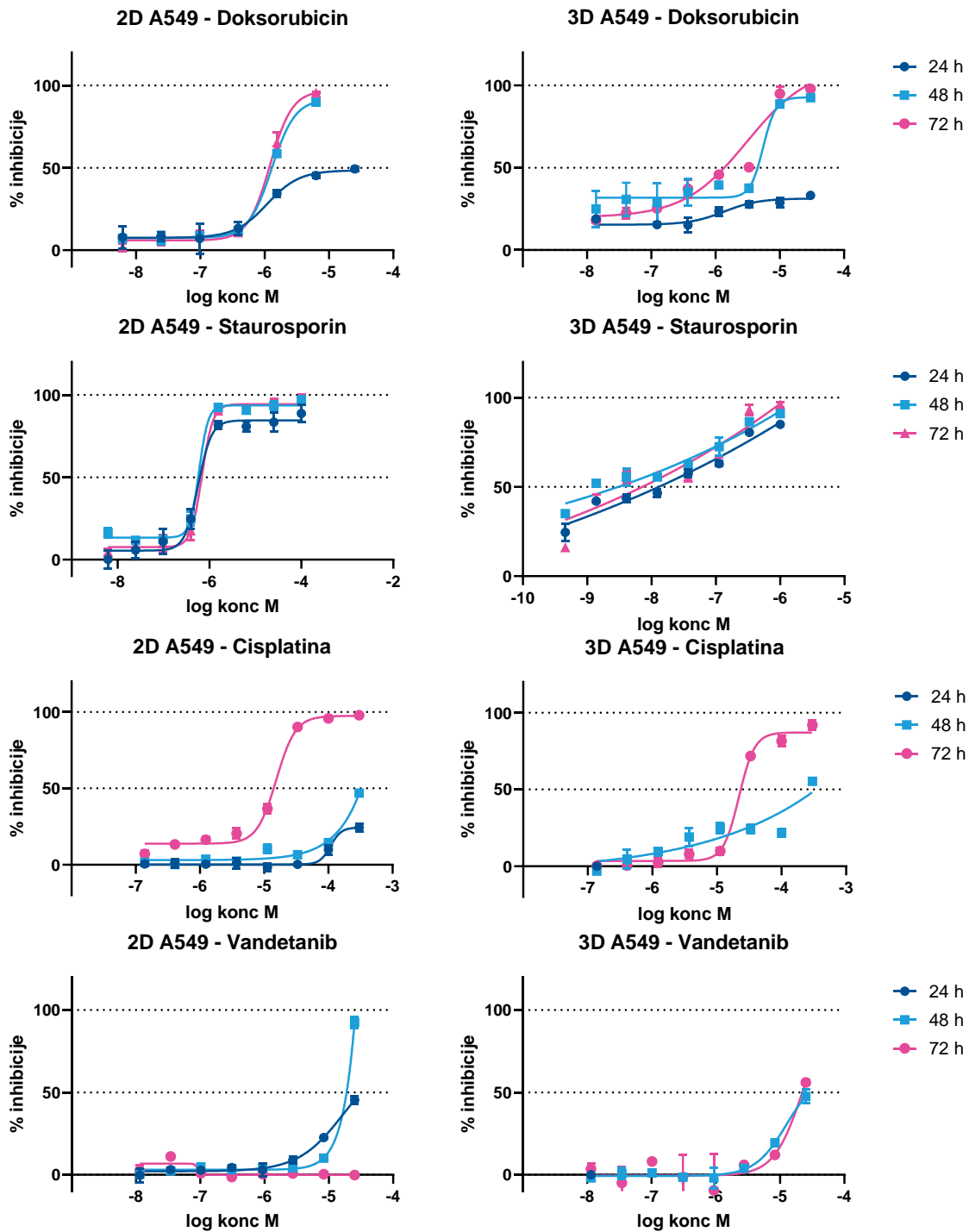
Staurosporin inhibira enzim protein kinaze putem blokiranja ATP-veznog džepa protein kinaze, blokira ekspresije proteina staničnog ciklusa i zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi, aktivira kaspazu-3 te inducira apoptozu (Park et al., 2013; Toledo, et al., 2022).

#### 4.1.3.3. Cisplatina

Cisplatina je kemoterapeutik na bazi platine (kemijska formula  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ) koji se koristi za liječenje raznih vrsta karcinoma, uključujući karcinome testisa, jajnika, mjehura, pluća i glave/vrata, oštećujući DNA stanica karcinoma, zaustavljajući diobu stanica i uzrokujući staničnu smrt. Kovalentnim vezanjem platine na purinske baze gvanin i adenin dovodi do unakrsnih veza unutar i između DNA koje uzrokuju naknadne lomove DNA – nespecifična citotoksičnost. Učinkovita je u ciljanju stanica koje se brzo dijele (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; Tchounwou et al., 2021).

#### 4.1.3.4. Vandetanib (Zactima)

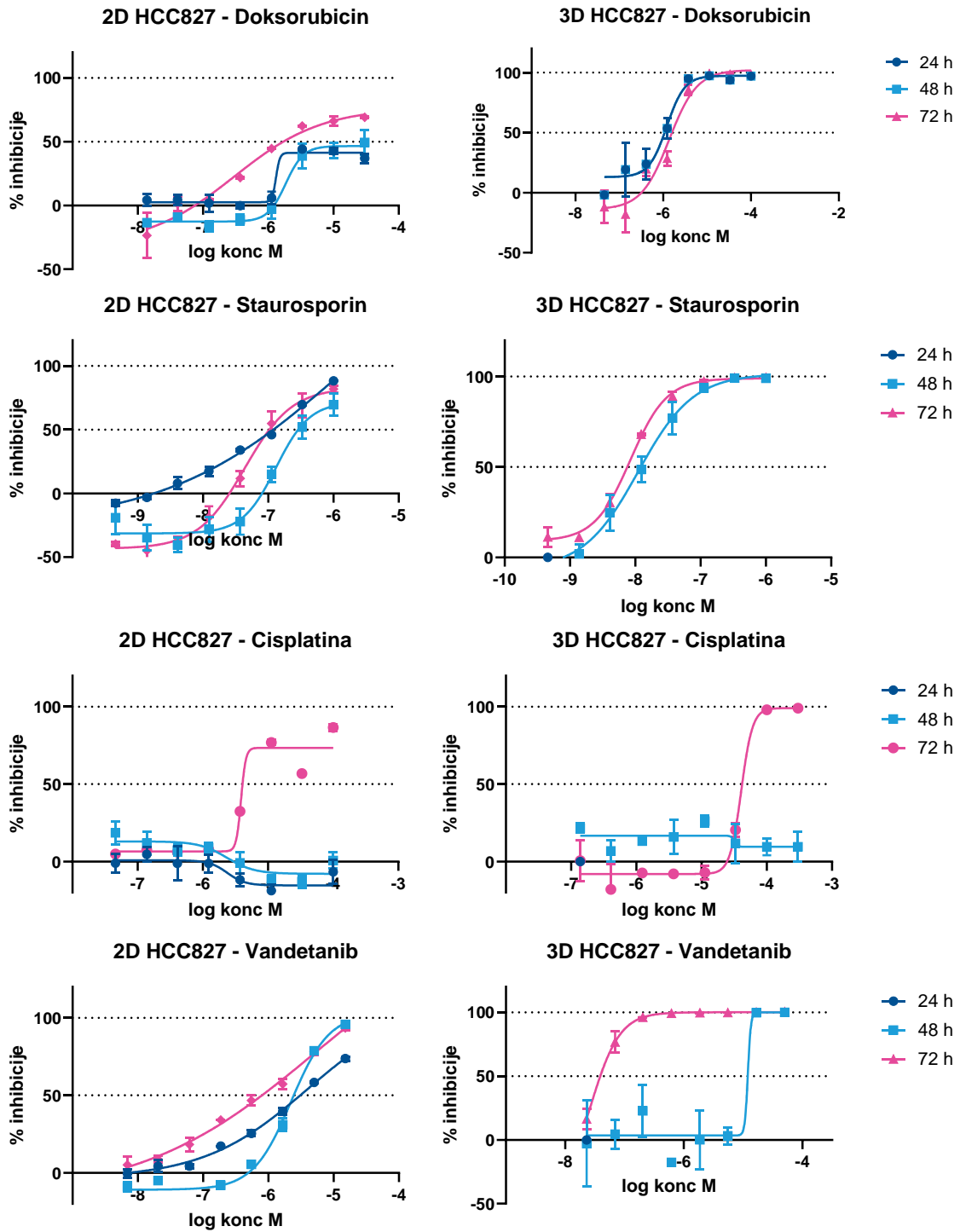
Vandetanib je lijek protiv karcinoma koji se koristi za liječenje određenih tumora kao što su tumori štitnjače i karcinomi pluća. Djeluje kao inhibitor kinaze brojnih staničnih receptora, među kojima selektivno inhibira aktivnost tirozin kinaze receptora 2 faktora rasta vaskularnog endotela (VEGFR2), čime blokira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica stimuliranu VEGF-om i smanjuje propusnost tumorskih krvnih žila. Također blokira aktivnost tirozin kinaze receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), receptora tirozin kinaze koji posreduje u proliferaciji i migraciji tumorskih stanica te angiogenezi. Stanična linija A549 je rezistentnija na vandetanib zbog niske izražajnosti receptora 2 faktora rasta vaskularnog endotela (VEGFR2) (Belani et al., 2012; Siegfried et al., 2012).



**Slika 17.** Test vijabilnosti kontrolnih spojeva u 2D i 3D uvjetima rasta stanica A549 stanične linije. Stanična linija A549 je rezistentnija (Siegfried JM *et al*, 2012) na vandetanib zbog niske izražajnosti receptora 2 faktora rasta vaskularnog endotela (VEGFR2).

**Tablica 7.** IC<sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na A549 staničnoj kulturi u 2D I 3D uvjetima

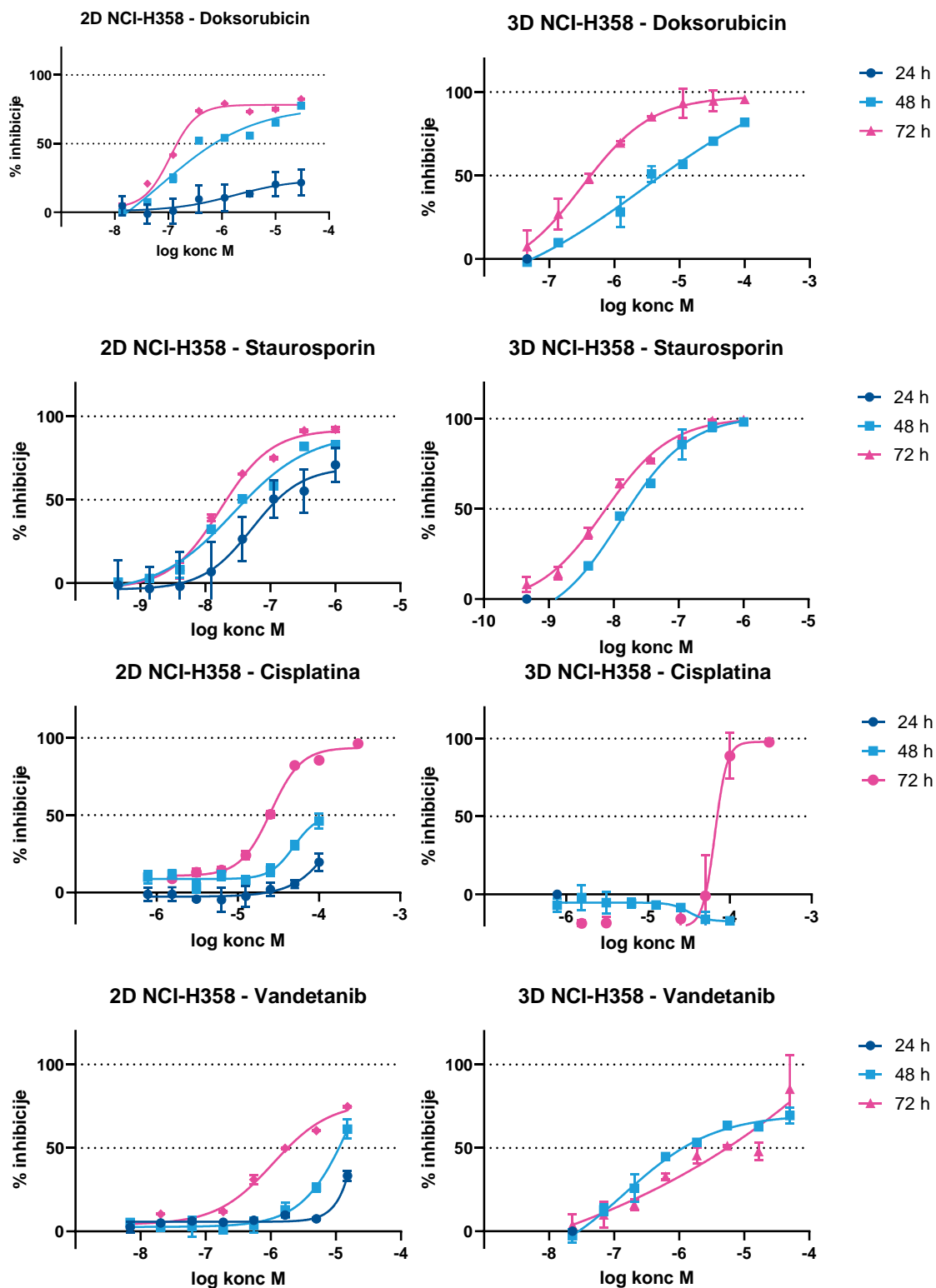
Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
A549 / Standardni spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	24 h		48 h		72 h	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
Doksorubicin	1.09±0.01	>100	1.29±0.02	6.23±1.85	1.21±0.14	2.42±0.94
Staurosporin	0.56±0.04	0.05±0.02	0.81±0.17	0.14±0.11	0.68±0.00	0.09±0.11
Cisplatina	>300	>300	>300	>300	30.81±0.21	19.32±0.13
Vandetanib	>25	>50	>25	>50	>25	>50



Slika 18. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama HCC827 stanične linije

**Tablica 8.** IC<sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na HCC827 staničnoj kulturi u 2D i 3D uvjetima

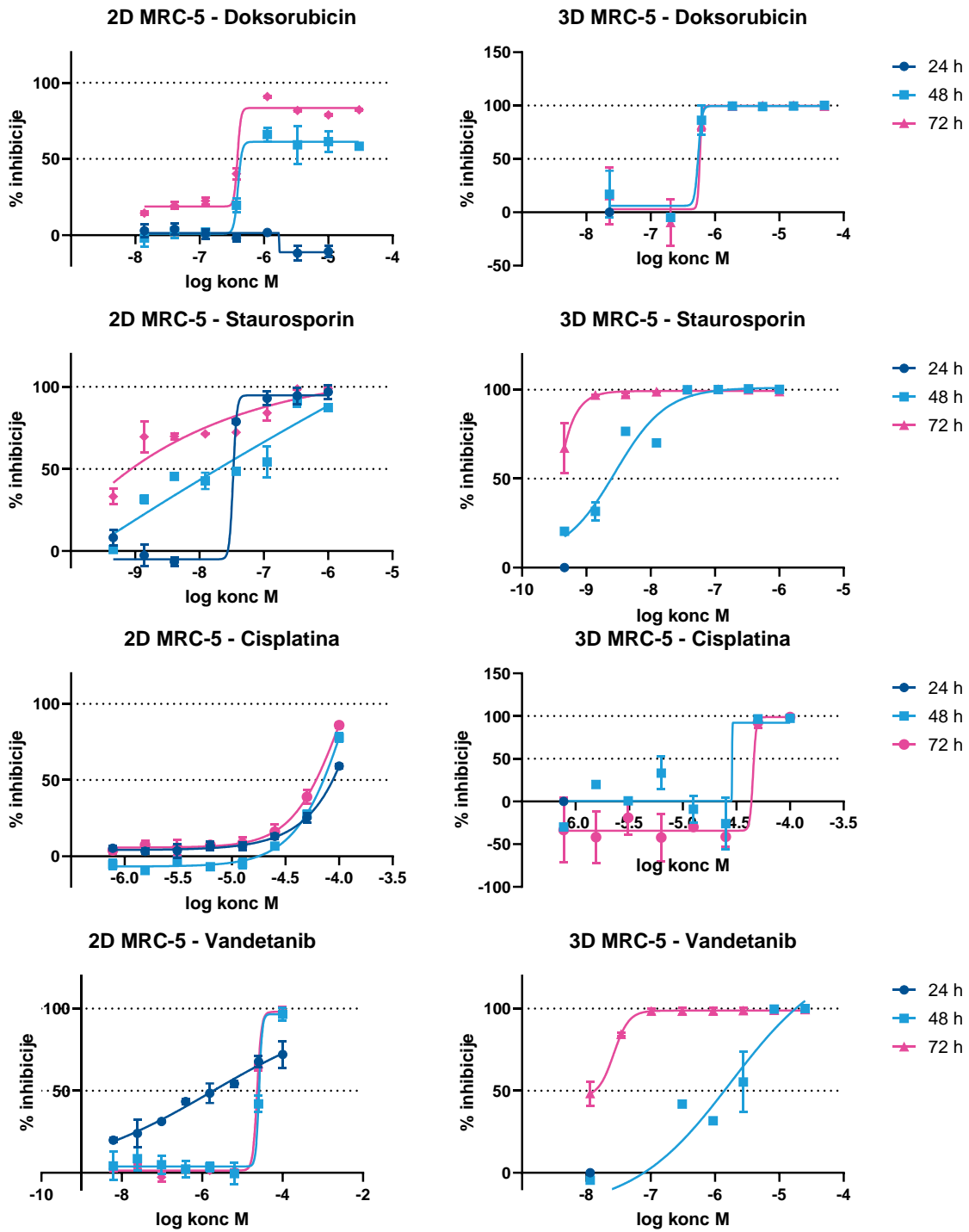
Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
HCC827 / Standardni spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	24 h		48 h		72 h	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
Doksorubicin	>30	>100	1.90±0.37	1.27±0.07	0.30±0.36	1.34±0.31
Staurosporin	8.07±0.01	0.01±0.001	0.13±0.01	0.01±0.001	0.044±0.01	0.008±0.001
Cisplatina	>300	>300	>300	>300	12.9±0.06	64.59±90.80
Vandetanib	4.13±1.25	>50	2.28±0.22	11.09±3.78	5.84±1.66	0.02±0.003



Slika 19. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama NCI-H358 stanične linije

**Tablica 9.** IC<sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na NCI-H358 staničnoj kulturi u 2D I 3D uvjetima

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
NCI-H358 / Standardni spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	24 h		48 h		72 h	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
Doksorubicin	>30	>100	0.44±0.08	0.54±0.05	0.38±0.01	0.48±0.10
Staurosporin	0.03±0.0003	>1	0.12±0.05	0.003±0.001	0.0015.00	0.0003±0.00
Cisplatina	>300	61.99±35.68	>300	84.04±0.81	330±51.84	64.95±37.16
Vandetanib	>25	>50	8.55±0.01	6.09±5.43	7.43±0.4	0.027±0.003



Slika 20. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama MRC-5 stanične linije

**Tablica 10.** IC<sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na NCI-H358 staničnoj kulturi u 2D i 3D uvjetima

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
MRC-5 / Standardni spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	24 h		48 h		72 h	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
Dokсорubicin	>30	>100	0.077±0.02	2.31±3.23	0.11±0.002	0.31±0.05
Staurosporin	0.052±0.004	>1	0.027±0.002	0.013±0.001	0.017±0.002	0.007±0.002
Cisplatina	>300	>300	>300	>300	25.52±0.48	60.97±1.2
Vandetanib	>25	>50	1.08±0.02	2.52±0.12	1.09±0.08	5.77±3.48

#### 4.1.4. Parametri kontrole kvalitete (QC) testnih pločica:

Osim navedenih parametara u procesu validacije potrebno je pratiti zadane parametre koji određuju kvalitetu provedenog testa. U ovom slučaju, kontrolni parametri se određuju za svaku testiranu pločicu i za HTS uvjete zadani su prema literaturnim podacima (Zhang J-H *et al*, 1999)

Kvaliteta testa određuje se za svaku pločicu izračunom  $Z'$  (Z-faktor) i S:B (engl. *signal to background*) parametara. Za pokuse sa staničnim linijama,  $Z'$  potreban za prihvatanje rezultata na testnoj pločici kreće se od 0.4 do 1.00. (Bar H *et al*, 2020). Parametar S:B je odnos signala pozitivne kontrole i negativne kontrole te je prihvatljiv veći od 2.0. (Azargoshasb S *et al*, 2023). Ako pločica ne zadovoljava navedene parametre ona se isključuje iz pokusa i testiranje spojeva na toj pločici se ponavlja.

U tablici 11 prikazane su vrijednosti navedenih parametara od dva nezavisna pokusa. Kako su pokusi u 2D uvjetima pokazali da će optimalno vrijeme inkubacije biti veće od 24 sata, u pokusu u 3D uvjetima testirani su spojevi od 48 i 72 sata. Visoke vrijednosti S:B parametra za 3D su posljedica korištenja testa CellTiter-Glo® kojim se mjeri koncentracija ATP-a (indikator metaboličke aktivnosti stanica) metodom luminiscencije. Tijekom testiranja standardnih spojeva kao i NKE vrijednosti kontrole kvalitete testa bile su u dozvoljenim navedenim rasponima.

**Tablica 11.** Vrijednosti parametara kontrole testnih pločica za pojedine stanične linije tretirane standardnim spojevima u 2D i 3 D uvjetima

		A549		HCC827		NCI-H35		MRC-5	
		2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
<b>Z'</b>	24 h	0,92		0,87		0,82		0,75	
	48h	0,88	0,73	0,85	0,7	0,84	0,82	0,83	0,38
	72h	0,86	0,91	0,82	0,48	0,89	0,53	0,86	0,41
<b>S:B</b>	24 h	20,15		7,37		7,53		8,80	
	48h	20,21	137	8,0	287	9,65	137	11,14	103
	72h	19,2	165	10,63	165	12,88	163	12,25	121

#### 4.2. Određivanje IC<sub>50</sub> vrijednosti za pojedine NKE i kontrolne spojeve u testu proliferacije i vijabilnosti stanica

Testirao sam NKE spojeve 5 različitih kemijskih serija (amidini, furani, akrilonitrili, kumarini i citozinski derivati supstituirani triazolom) u MTS testu citotoksičnosti i u BrdU testu proliferacije. MTS test nam daje informacije o broju živih stanica, u ovom slučaju metabolički aktivnih stanica, dok BrdU proliferacijski test daje mjeru stanične populacije u fazi aktivne diobe.

Kako bih izbjegao da neke aktivne spojeve odbacim u ranoj fazi probira testirao sam spojeve u 2D i 3D uvjetima. Za 2D test koristio sam klasični dvodimenzionalni *in vitro* test (Mosmann T, 1983), a kao 3D test koristio sam test proliferacije stanica visećom kapljicom. (Brajša *et al*, 2016. još ref)

Spojevi visoke aktivnosti (ref) smatraju se oni kojiima je IC<sub>50</sub> u rasponu od 0.1 μM do 10 μM; umjerenom aktivnosti u rasponu od 10 μM – 50 μM te slaboaktivni u rasponu od 51 μM – 100 μM.

##### 4.2.1. Amidini

Novo sintetizirani amidin supstituirani derivat benzimidazola/benzotiazola 5a-5i i 6a-6g testirao sam na tri stanične linije humanog karcinoma pluća: A549, HCC827 i NCI-H358. Standardni spojevi u testu su bili doksorubicin, staurosporin i vandetanib. Antiproliferativna (citotoksična) aktivnost za svaki spoj prikazana je kao IC<sub>50</sub> vrijednost izračunata pomoću programa GraphPadPrism (La Jolla, CA), v. 5.03., i izražena je kao srednja vrijednosti iz tri neovisne krivulje rasta ovisne o dozi. Dobivene inhibitorne koncentracije IC<sub>50</sub> u 2D i 3D uvjetima prikazane su za svaku staničnu liniju u Tablici 12-17).

Kao što je prikazano u Tablici 12, nekoliko spojeva, uglavnom derivati benzotiazola (5c–e, 5 g, 5 h) i jedan derivat benzimidazola, 6a (LM-1a), pokazali su citotoksičnu aktivnost u 2D kao i u 3D testovima na sve tri tumorske stanične linije. Derivati benzotiazola 5c i 5d pokazali su istu ili nešto nižu aktivnost u 2D MTS testu u usporedbi s 3D testom. Aktivnost derivata benzotiazola 5e, 5 g, 5 h također je bila ista ili niža u 2D formatu u usporedbi s IC<sub>50</sub> vrijednostima na 3D formatu testa, s izuzetkom stanične linije A549 (Tablica 12) gdje su spojevi pokazali veću aktivnost u 3D formatu. U proliferativnom (BrdU) testu, aktivnost derivata benzotiazola 5d, 5e, 5g bila je ista ili niža u 2D u usporedbi s 3D (Tablica 13), dok su 5c i 5h pokazali isti obrazac aktivnosti kao i prethodni spojevi, s izuzetkom staničnih linija A549 i NCI-H358 gdje je aktivnost bila suprotna: viša u 3D formatu testa.

Najpotentniji spoj bio je derivat benzimidazola 6a (LM-1a) supstituiran fenilnim prstenom na položaju 2 s najnižim IC<sub>50</sub> vrijednostima u oba testa, MTS i BrdU, te u formatu testa, 2D i 3D.

Ostali testirani spojevi pokazali su vrlo nisku aktivnost ili uopće nisu bili aktivni. Svi aktivni spojevi (5c–e, 5 g, 5 h i 6a) pokazali su snažnu aktivnost u BrdU testu na staničnoj liniji NCI-H358, u usporedbi s MTS testom za istu staničnu liniju, što znači da spojevi imaju obećavajući antiproliferativni učinak s nižim citotoksičnim učinkom. Kao što sam prethodno opisao, stanice uzgojene u 3D uvjetima održavaju svoj prirodni 3D fizički oblik, jer se žive stanice u fazi proliferacije uglavnom nalaze na vanjskom sloju sfere i više su izložene mediju. Pretpostavljam da su niske vrijednosti IC<sub>50</sub> u 3D testovima za neke aktivne spojeve posljedica izloženijeg vanjskog sloja proliferativnih stanica na sferoidima. Ipak, brzina proliferacije stanica u sferoidima ovisi o tipovima stanica, broju stanica u inokulumu, uvjetima u kojima se stanice uzgajaju, ali prije svega o osjetljivosti stanične linije i podložnosti antitumorskim lijekovima.

Poznato je da je stanična linija A549 manje osjetljiva u usporedbi s druge dvije stanične linije i stoga su vrijednosti IC<sub>50</sub> veće (Siegfried JM *et al*, 2012). U usporedbi sa standardnim lijekovima, svi derivati bili su značajno manje aktivni osim nekoliko spojeva (5c–e, 5 g, 5 h i 6a) koji su bili aktivniji na staničnoj liniji A549 u usporedbi s vandetanibom jer je A549 stanična manje osjetljiva na vandetanib. Što se tiče dobivenih rezultata proliferacijske aktivnosti (Tablica 13), dobiveni su slični rezultati, s tim da su spojevi 5c–e, 5 g, 5 h i 6a (LM-1a) najaktivniji (Racané *et al*, 2021a).

**Tablica 12.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti u 2D i 3D uvjetima na staničnim kulturama za NKE amidinske serije i standardne spojeve (\*kasnije u tekstu Lm-1a)

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)								
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2							
	A549		HCC827		NCI-H358		MRC-5	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
5a	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
5b	>50	60±1.44	>50	>100	>50	>100	>50	>100
5c	34±8.65	16±0.65	7±0.45	12±0.16	23±0.79	34±0.70	7±0.50	4±3.75
5d	>50	16±1.3	14±2.09	>100	20±2.53	40±4.89	7±0.12	4±0.73
5e	36±6.37	23±6.24	7±0.12	22±9.45	16±0.98	34±0.16	7±0.10	5±2.44

5f	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
5g	41±0.54	15±1.35	19±2.21	17±0.93	26±0.30	31±0.05	8±0.14	4±0.24
5h	38±3.68	14±0.38	6±0.05	12±0.26	10±1.00	31±0.33	6±0.24	2±0.58
5i	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
<b>6a*</b>	15±1.70	13±1.46	6±0.5	9±3.05	13±0.28	17±1.94	3±0.45	13±2.06
6b	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
6c	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
6d	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
6e	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
6f	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
6g	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	2±0.23	5±0.26	0.39±0.05	0.78±0.08	0.76±0.01	1.17±0.09	0.11±0.01	0.7±0.19
Staurosporin	1±0.07	0.16±0.11	0.15±0.01	0.023±0.003	0.01±0.00	<0.0046	0.15±0.02	0.12±0.0
Vandetanib	>25	>50	0.81±0.05	2±0.11	13.83±4.1	3±0.85	>25	>50

**Tablica 13.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (µM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE amidinske serije i standardne spojeve

Test proliferacije IC <sub>50</sub> vrijednosti (µM)								
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (µM)±SD; N=2							
	A549		HCC827		NCI-H358		MRC-5	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
5a	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
5b	>50	87±0.11	>50	>100	>50	>100	24±0.62	
5c	48±0.73	13±0.78	15±2.18	21±1.41	16±4.14	5.00	12±3.42	
5d	1	16±1.30	11±0.17	32±11.68	9±0.31	13±1.65	3±0.09	
5e	16±0.39	23±6.24	10±1.21	24±7.63	9±0.65	16±11.63	4±0.36	
5f	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
5g	7±2-31	14±3.07	18±0.76	17±0.93	13±0.45	7±2.02	2±0.13	
5h	10±0.78	14±0.06	9±0.83	12±0.26	7±0.07	1±0.36	4±0.35	
5i	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
<b>6a</b>	11±5.56	12±0.28	7±0.35	12±0.25	7±0.3	4±0.25	8±0.16	
6b	>50	>100	>50	>100	>50	>100	18±3.31	
6c	>50	>100	>50	>100	>50	12.00	10±1.44	
6d	>50	>100	>50	>100	>50	>100	15±9.79	
6e	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
6f	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
6g	>50	>100	>50	>100	>50	>100	>50	
Doksorubicin	0.06±0.01	0.39±0.02	0.02±0.00	1.03±0.71	0.04±0.00	0.39±0.06	0.006±0.001	
Staurosporin	0.23±0.05	0.16±0.06	0.06±0.01	0.04±0.01	0.15±0.02	0.16±0.11	0.006±0.001	
Vandetanib	>50	1.25±2.82	2.82±1.98	0.87±1.15	1±0.28	1±1.16	3±0.29	

Navedeni rezultati objavljeni su u Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry: Racané *et al*, 2021a. Preclinical in vitro screening of newly synthesised amidino substituted benzimidazoles and benzothiazoles.

#### 4.2.2. Furani

Novosintetizirane benzimidazole i furane supstituirane derivatima benzotiazola 4 – 22 testirao sam na 2D i 3D testovima stanične kulture *in vitro* na tri stanične linije humanog karcinoma pluća A549, HCC827 i NCI-H358 u testovima na antiproliferativnu aktivnost. Kao standardne spojeve koristio sam doksorubicin, staurosporin i vandetanib.

Dobivene IC<sub>50</sub> vrijednosti testiranih spojeva, kao i za standardne spojeve u 2D i 3D uvjetima staničnih kultura u MTS testu citotoksičnosti prikazane su u Tablici 14. Kao što je prikazano u Tablici 14, nitro supstituirani spoj 5 (u daljnjem tekstu CR-2) koji nosi izopropil amidinsku skupinu pokazao je visoku citotoksičnu aktivnost u 2D testu na staničnim linijama A549 i NCI-H358 te umjerenu na HCC827. Osim toga, spoj CR-2 ima umjerenu citotoksičnu aktivnost na zdrave plućne fibroblaste MRC-5, što je obećavajuće i može biti dobar početak za daljnju optimizaciju molekule. Spoj 6 s imidazolinskom skupinom pokazao je visoki potencijal citotoksične aktivnosti u 2D i 3D uvjetima testiranja. Ovaj spoj je također djelovao na staničnu liniju MRC-5 u 2D uvjetima. Spoj 8 pokazao je sličnu aktivnost na staničnim linijama karcinoma pluća u 2D uvjetima dok je izraženiju aktivnost pokazao na staničnoj liniji A549 u 3D uvjetima u usporedbi s druge dvije stanične linije HCC827 i NCI-H358. Aktivnost kloro supstituiranog spoja 8 bila je značajno viša u 2D uvjetima na dvije stanične linije HCC827 i NCI-H358 u usporedbi s aktivnošću u 3D uvjetima. Isti obrazac aktivnosti pokazali su i imidazolinskom supstituirani spojevi 9 i 15 (visoka aktivnost u 2D uvjetima i srednja aktivnost u 3D uvjetima). Razlog veće aktivnosti spojeva u 2D uvjetima u odnosu na 3D uvjete je vjerojatno nemogućnost djelovanja spoja na prodiranje u staničnu sferu. Spoj 20 nije bio aktivan na A549 i pokazao je vrlo nisku aktivnost na drugim staničnim linijama, osim na HCC827 u 3D formatu ispitivanja ( $9,48 \pm 1,15 \mu\text{M}$ ). Spojevi 8 i 9 pokazali su sličnu aktivnost na MRC-5, kao i na preostale 3 stanične linije, dok je spoj 15 bio neaktivan na MRC ali je pokazao aktivnost u staničnim linijama karcinoma A549, HCC827 i NCI-H358 samo pri najvišoj testiranoj dozi. Dodatno, osim spoja 15 koji je pokazao vrlo nisku aktivnost na svim staničnim linijama i u oba testirana formata, svi ostali testirani spojevi nisu pokazali aktivnost u testu citotoksičnosti.

Navedeni spojevi furanske serije neselektivno su aktivni prema svim testiranim staničnim linijama. Osim toga, u tablicama su prikazane i IC<sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih standardnih spojeva (doksorubicin, staurosporin i vandetanib) koje su pokazale istu neselektivnu aktivnost protiv staničnih linija karcinoma pluća na kojima su testirani. Iako u tako ranoj fazi probira aktivnih spojeva ovo nije isključujući faktor za daljnje profiliranje klasičnih kemoterapeutskih spojeva, treba imati na umu da može utjecati na daljnji razvoj spojeva povezanih s akutnom i kroničnom toksičnošću u smislu ograničavanja doze i ne dosizanja očekivanog učinka

**Tablica 14.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE furanske serije i standardne spojeve (\*kasnije u tekstu CR-2)

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
4	>50	>100	>50	>100	>50	>50
<b>5*</b>	8.76±1.69	26.44±13.37	19.33±1.72	43.59±6.45	9.97±0.59	14.80±0.57
6	2.12±0.21	4.01±0.95	5.13±0.97	7.02±3.25	0.85±0.05	1.73±0.01
7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
8	6.74±0.19	9.31±0.78	6.26±0.33	20.46±8.63	6.48±0.11	16.00±9.38
9	4.39±0.79	16.81±2.61	5.9±0.58	19.99±7.92	4.48±0.30	15.49±0.07
10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
12	>50	>100	>50	>100	>50	>100
13	>50	>100	>50	>100	>50	>100
14	>50	>100	>50	>100	31.07±0.67	>100
15	24.29±0.40	55.84±8.29	22.70±0.04	65.42±5.04	19.39±0.57	81.62±7.71
17	>50	>100	>50	>100	3.50±1.14	>100
18	>50	>100	>50	>100	3.58±0.95	>100
19	>50	>100	>50	>100	>50	>100
20	>50	>100	>50	>100	>50	>100
21	>50	>100	>50	>100	>50	>100
22	>50	>100	43.53±8.17	9.48±1.15	31.08±4.42	>100
Doxorubicin	1.31±0.11	5.86±1.10	0.32±0.03	1.47±0.12	0.15±0.06	0.99±0.15
Staurosporin	0.047±0.007	0.095±0.01	0.033±0.002	0.002±0.0001	0.041±0.007	0.002±0.001
Vandetanib	>25	>50	0.58±0.03	0.16±0.04	3.12±35.99	0.38±0.20

Uspoređujući aktivnost spojeva u antiproliferativnom testu prikazanih u Tablici 15 s aktivnošću spojeva u testu citotoksičnosti (Tablica 14), može se zaključiti da su svi spojevi, osim spoja 15, također pokazali antiproliferativnu aktivnost. Najaktivniji spoj 6 u testu citotoksičnosti također je pokazao najizraženiju antiproliferativnu aktivnost osim na staničnoj liniji HCC827 u 2D uvjetima kod kojeg je antiproliferativna aktivnost bila umjerena.

Spoj 8 pokazao je visoku aktivnost na A549 i NCI-358 u 2D uvjetima testiranja, ali je pokazao umjerenu aktivnost u 3D uvjetima testiranja. Osim toga antiproliferativna aktivnost bila je umjerena na staničnoj liniji HCC827 u obje vrste uvjeta testiranja. Spojevi 5 i 9 pokazali su isti raspon i obrazac aktivnosti kao u testu citotoksičnosti (veća aktivnost u 2D u usporedbi s 3D uvjetima) s izuzetkom NCI-H358 u 3D formatu testa, u kojem je 9 pokazao promjenu aktivnosti od umjerene aktivnosti u testu citotoksičnosti do visoke aktivnosti u testu proliferacije. Spoj 22 nije bio aktivan na A549 u 2D uvjetima dok je pokazao je umjerenu aktivnost na drugim staničnim linijama i visoku aktivnost na HCC827 u 3D uvjetima testa kao i u testu citotoksičnosti. Zanimljivo je da, osim spoja 15, koji je pokazao vrlo nisku aktivnost na svim

staničnim linijama u 2D i 3D uvjetima i nije bio aktivan u proliferativnom testu osim na NCI-H358, spojevi 13 i 14, dodatno su pokazali nisku antiproliferativnu aktivnost u staničnoj liniji NCI-H358 u 2D uvjetima. Svi ostali testirani spojevi nisu pokazali aktivnost u testu proliferacije.

Navedeni rezultati objavljeni su u *Molecules*: Racané et al, 2021. Biological Activity of Newly Synthesized Benzimidazole and Benzothiazole 2,5-Disubstituted Furane Derivatives

**Tablica 15.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE furanske serije i standardne spojeve

Test proliferacije IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
4	>50	>100	>50	>100	>50	>100
<b>5*</b>	4.76±1.03	65.93±3.66	13.66±3.13	14.69±13.36	3.56±0.18	14.29±0.84
6	2.27±0.13	5.52±0.10	16.69±9.39	7.63±5.00	1.10±0.001	2.36±1.17
7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
8	8.78±3.62	19.94±2.19	13.48±0.81	17.75±4.24	6.68±0.15	11.27±0.49
9	9.97±5.37	17.01±3.53	8.69±2.79	20.28±13.87	5.57±0.81	6.39±3.29
10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
12	>50	>100	>50	16.85±8.33	>50	>100
13	22.73±0.54	>100	>50	>100	15.67±0.86	>100
14	>50	>100	>50	>100	20.20±0.71	>100
15	>50	>100	>50	>100	20.08±2.82	>100
17	>50	>100	>50	>100	>50	>100
18	>50	>100	>50	>100	>50	>100
19	>50	>100	>50	>100	>50	>100
20	>50	>100	>50	>100	>50	>100
21	>50	>100	>50	>100	>50	>100
22	43.86±54.27	>100	>50	>100	14.36±6.46	>100
Doxorubicin	0.13±0.01	0.48±0.03	0.25±0.28	1.89±2.30	0.07±0.04	2.30±1.91
Staurosporin	0.047±0.007	0.095±0.01	0.0005±0.0001	0.003±0.002	0.0005±0.00003	0.02±0.01
Vandetanib	>25	>50	0.20±0.11	0.08±0.02	>25	0.38±0.17

#### 4.2.3. NKE iz serije akrilonitrila, kumarina i cisteinskih derivata

Spojevi iz serije akrilonitrila, kumarina i cisteinskih derivata nisu pokazali značajniju aktivnost. Rezultati spojeva i pripadajućih kontrolnih spojeva prikazani su u obliku tablica u Prिवitak 1.

Od ukupno 21 testiranog spoja iz serije akrilonitrila, jedan spoj, PC-5, pokazao je vrlo slabu aktivnost na svim staničnim linijama u 2D i 3D uvjetima testiranja (Tablice 21. i 22.).

Iz serije kumarina, od ukupno 17 testiranih spojeva, tri spoja su pokazala umjerenu aktivnost u oba testa većinom u 2D uvjetima (Tablice 23. i 24.) dok iz skupine MOR spojeva ni jedan od 13 testiranih spojeva nije pokazao aktivnost (Tablice 25. i 26.).

Od testiranih spojeva iz 5 serija za daljnje profiliranje fokusirao sam se na spojeve iz serije amidina i furana.

#### 4.3. Mogući mehanizam djelovanja najaktivnijih spojeva iz amidinske serije metodom protočne citometrije

Među svim poznatim dušikovim heterociklima, benzimidazolni i benzotiazolni dijelovi prepoznati su kao važni i dobro poznati sastojci biološki važnih molekula u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji. Osim antimikrobnih, antivirusnih, protuupalnih, antihistaminskih te antioksidativnih, među njihovim svestranim farmakološkim svojstvima bitna su i antitumorska svojstva (Irfan et al., 2020; Racané, Rep, et al., 2021). Jedna od najčešće korištenih klasa kemoterapijskih sredstava u medicinskoj kemiji i dalje su molekule koje interagiraju s DNA/RNA. U takvu skupinu molekula spadaju i NKE iz skupina amidina i furana koje sam koristio u ovom radu.

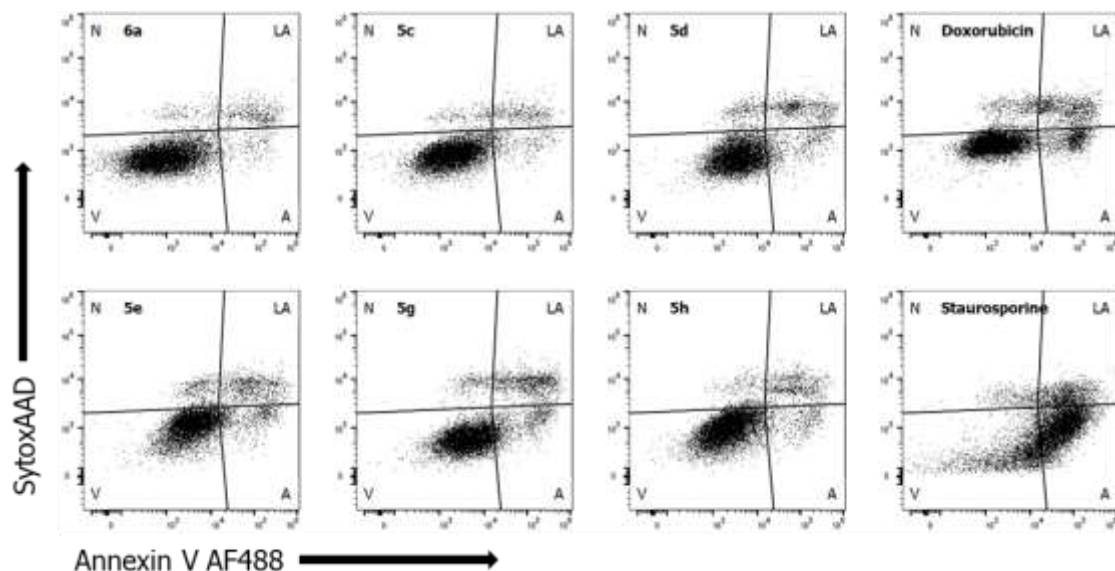
Iz tog razloga je odabran doksorubicin kao standardni kontrolni spoj u 2D i 3D testovima. Doksorubicin je snažan antraciklinski kemoterapijski lijek koji djeluje prvenstveno interkalacijom u DNK i inhibicijom topoizomerase II, sprječavajući replikaciju i transkripciju DNA. Uzrokuje oštećenje DNA, potiče proizvodnju slobodnih radikala što dovodi do oksidativnog stresa i pokreće apoptozu (staničnu smrt) u brzo dijelećim stanicama raka (Thorn et al., 2011). Spojevi iz amidinske i furanske serije trebali bi imati slično djelovanje te sam njihov mogući način djelovanja istražio praćenjem apoptoze u tretiranim stanicama.

##### 4.3.1. Test aneksina V - apoptotičke promjene u plazmatskoj membrani

U fiziološkim uvjetima, kolinski fosfolipidi (fosfatidilkolin, sfingomijelin) izloženi su na vanjskom dijelu stanične membrane, dok su aminofosfolipidi (fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin) isključivo smješteni na citoplazmatskoj površini lipidnog dvosloja. Ova asimetrija se poremećuje tijekom apoptoze kada se fosfatidilserin izloži na izvanstaničnoj strani membrane (Wlodkowic et al., 2009). Fosfatidilserin se detektira antikoagulantnim proteinom Aneksinom V (označenim fluorokromom) koji se reverzibilno veže za ostatke fosfatidilserina na izvanstaničnoj strani membrane.

Mehanizam djelovanja većine aktivnih spojeva u antiproliferativnom testu, testirani su derivati benzotiazola 5c, 5d, 5e, 5g, 5h i jedan derivat benzimidazola 6a. Kao što je prikazano na slici 22, svi aktivni spojevi imaju sličan način djelovanja na staničnu liniju A549 kao standardni

spoj doksorubicin. Ovi rezultati su u skladu s predloženom kemijskom strukturom novih amidino supstituiranih derivata benzimidazola/benzotiazola koji sugeriraju moguću interkalaciju u DNA zbog strukturne sličnosti benzimidazolskog skeleta s prirodno prisutnim purinima (Racané et al., 2014; Racané, Rep, et al., 2021). Slični rezultati dobiveni su i za druge testirane stanične linije (nisu prikazani).



**Slika 21.** Bojenje aneksinom V za mjerenje apoptoze. Stanice A549 tretirane su aktivnim spojevima (6a, 5c, 5d, 5e, 5g i 5h) ili standardnim spojevima (doksorubicin i staurosporin) pri određenoj vrijednosti IC<sub>50</sub> tijekom 36 sati kako bi se inducirala apoptoza u 2D staničnoj kulturi (V – vijabilne stanice, A – apoptotičke, LA – kasno apoptotičke, N – nekrotične). (pruzeto iz Racané *et al*, 2021.a)

#### 4.4. Analiza aktivnih i odabranih neaktivnih spojeva na testovima *in vitro* za određivanje farmakokinetičkih svojstava

Analizom dobivenih rezultata, fokusirao sam se na daljnje profiliranje spojeva iz dviju serija sa najvećim brojem aktivnih spojeva: amidini i furani. Da bih utvrdio je li aktivnost spojeva posljedica boljih farmakokinetičkih parametara, testirao sam aktivne i neaktivne spojeve iz navedenih serija: 6 aktivnih i 7 neaktivnih iz serije amidina te 4 aktivna i 1 neaktivni iz skupine furana na panelu za određivanje farmakokinetičkih parametara *in vitro*. Odabrani spojevi i njihova aktivnost prikazani su u tablici 16.

**Tablica 16.** Odabrani spojevi za farmakokinetičko profiliranje *in vitro* prema njihovim aktivnostima na testu citotoksičnosti u 2D i 3D uvjetima na staničnim kulturama humanog karcinoma pluća

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)							
	Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
		A549		HCC827		NCI-H358	
		2D	3D	2D	3D	2D	3D
	5c	34±8.65	16±0.65	7±0.45	12±0.16	23±0.79	34±0.70

Aktivni spojevi amidinske serije	5d	>50	16±1.3	14±2.09	>100	20±2.53	40±4.89
	5e	36±6.37	23±6.24	7±0.12	22±9.45	16±0.98	34±0.16
	5g	41±0.54	15±1.35	19±2.21	17±0.93	26±0.30	31±0.05
	5h	38±3.68	14±0.38	6±0.05	12±0.26	10±1.00	31±0.33
	<b>6a (LM-1a)</b>	15±1.70	13±1.46	6±0.5	9±3.05	13±0.28	17±1.94
Neaktivni spojevi amidinske serije	5b	>50	60±1.44	>50	>100	>50	>100
	6b	>50	>100	>50	>100	>50	>100
	6c	>50	>100	>50	>100	>50	>100
	6d	>50	>100	>50	>100	>50	>100
	6e	>50	>100	>50	>100	>50	>100
	6f	>50	>100	>50	>100	>50	>100
	6g	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Aktivni spojevi furanske serije	<b>5 (CR-2)</b>	8.76±1.69	26.44±13.37	19.33±1.72	43.59±6.45	9.97±0.59	14.80±0.57
	6	2.12±0.21	4.01±0.95	5.13±0.97	7.02±3.25	0.85±0.05	1.73±0.01
	8	6.74±0.19	9.31±0.78	6.26±0.33	20.46±8.63	6.48±0.11	16.00±9.38
	9	4.39±0.79	16.81±2.61	5.9±0.58	19.99±7.92	4.48±0.30	15.49±0.07
Neaktivni spoj furanske serije	10	>50	>100	>50	>100	>50	>100

Navedeni spojevi profilirani su na farmakokinetičkom panelu *in vitro* koji se sastoji od slijedećih testova: određivanje kinetičke topljivosti, lipofilnosti (logD), metabolička stabilnost u mišjim i humanim mikrosomima, vezanje za mišje i humane proteine plazme (PPB), te permeabilnost kroz staničnu membranu (*MDCKII-MDR*). Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 17, 18 i 19).

#### 4.4.1. Kinetička topljivost

Većina spojeva amidinske serije pokazala je dobru (>100  $\mu\text{M}$ ) ili umjerenu topljivost (30-100  $\mu\text{M}$ ), s izuzetkom slabo topljivih (10-30  $\mu\text{M}$ ) spojeva (5h, 6d i 6e), dok su furani pokazali vrlo slabu topljivost (3 do 10  $\mu\text{M}$ ) sa iznimkom spoja 9.

#### 4.4.2. Kromatografska studija lipofilnosti

Većina aktivnih i neaktivnih spojeva amidinske serije ima vrijednosti  $\text{chromlogD}_{7.4}$  u rasponu od 1-3 što pokazuje optimalnu lipofilnost. Iznimka su aktivni spojevi 5c, 5e i 5h te slabo lipofini 6a/LM-1a. Svi spojevi iz furanske serije pokazali su jaku lipofilnost (>3).

#### 4.4.3. Metabolička stabilnost u mikrosomima jetre

Svi aktivni i neaktivni spojevi iz amidinske serije imaju niski klirens, osim LM-1a koji ima umjereni klirens, dok su spojevi iz serije furana pokazali niski klirens osim neaktivnog spoja (10).

**Tablica 17.** Prikaz rezultata za *in vitro* ADME svojstva aktivnih spojeva iz amidinske serije

	5c	5d	5e	5g	5h	6a / LM-1a
Raspon kinetičke topljivosti nakon 2h ( $\mu$ M)	>100	30-100	30-100	30-100	10-30	>100
Chrom logD	3.31	2.87	3.19	2.71	3.31	0.92
Mikrosomi (1 $\mu$ M) Predviđanje za <i>in vivo</i> hep CL expressed (%LBF)						
Miš	<30	<30	63	<30	<30	41
Čovjek	<30	<30	<30	<30	<30	56
PPB % vezanih (oporavak)						
Miš	97.5 (86)	96.0 (82)	98.7 (82)	96.0 (85)	97.3 (85)	62.9 (79)
Čovjek	97.0 (89)	94.7 (76)	97.9 (79)	95.1 (94)	97.6 (80)	59.7 (75)
Sabilnost u plazmi (% remaining nakon 4h)						
Miš	94	85	77	81	85	79
Čovjek	83	81	82	86	74	73
MDCKII-MDR1 Papp(A2B), Papp(B2A), Efflux ratio (w/o-> w/ P-gp inhibitor)	<0.1 -> 6.6 21.5 -> 5.8 >200 -> 0.9	<0.1 -> 6.5 15.8 -> 5.6 >158 -> 0.9	<0.1 -> 2.0 7.6 -> 1.8 >78 -> 1.0	<0.1 -> 3.9 16.5 -> 5.7 >17 -> 2.0	<0.1 -> 0.7 7.7 -> 1.8 >77 -> 3.5	0.4 -> 0.7 1.4 -> 0.9 3.7 -> 1.5

#### 4.4.4. Vežanje za proteine plazme i stabilnost u humanoј i mišjoj plazmi

Testirani spojevi pokazuju različit raspon vežanja za proteine humane i mišje plazme. Općenito, niže vežanje opaženo je u skupini neaktivnih spojeva, s izuzetkom 6g, a aktivni spojevi iz iste skupine pokazali su jače vežanje za proteine plazme. Spojevi iz skupine furana pokazali su visoki postotak vežanja za proteine plazme (>98%).

#### 4.4.5. Stabilnost u mišjoj i humanoј plazmi

Svi testirani spojevi stabilni su i u humanoј i u mišjoj plazmi (>70% nakon 4 sata inkubacije), osim neaktivnog spoja iz furanske serije (39% i 50%).

**Tablica 18.** Prikaz rezultata za *in vitro* ADME svojstva neaktivnih spojeva iz amidinske serije

	5b	6b	6c	6d	6e	6f	6g
Raspon kinetičke topljivosti nakon 2h ( $\mu\text{M}$ )	>100	>100	>100	10-30	10-30	30-100	30-100
Chrom logD	2.18	1.17	2.60	2.43	1.38	2.18	3.27
Mikrosomi (1 $\mu\text{M}$ ) Predviđanje za <i>in vivo</i> hep CL expressed (%LBF)							
Miš	<30	<30	<30	71	78	77	31
Čovjek	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
PPB % vezanih (oporavak)							
Miš	75.1 (98)	63.5 (87)	87.0 (117)	93.9 (89)	74.1 (91)	88.0 (102)	99.7 (95)
Čovjek	66.6 (93)	54.3 (91)	85.6 (97)	92.6 (86)	65.1 (81)	81.0 (91)	98.5 (96)
Sabilnost u plazmi (% remaining nakon 4h)							
Miš	95	119	94	92	84	NA	81
Čovjek	86	98	96	95	98	106	85
MDCKII-MDR1							
Papp(A2B),	0.59	0.92	0.69	0.11	0.57	0.78	0.02
Papp(B2A),	20.5	1.02	1.93	0.86	2.17	2.49	0.2
efflux ratio	35.4	1.13	2.82	7.75	3.89	3.23	6.6

#### 4.4.6. MDCKII-MDR1 test permeabilnosti

MDCKII-MDR1 su Madin-Darby epitelne stanice psećeg bubrega koje prekomjerno ekspimiraju gen za višestruku otpornost na lijekove (MDRI) kodirajući P-glikoprotein (P-gp). Predstavljaju dobar model za brzi *in vitro* probir pasivne propusnosti i za procjenu potencijala humanog P-gp za transport spojeva od interesa.

Aktivni i neaktivni spojevi iz serije amidina pokazuju nisku permeabilnost, s vrijednostima Papp(A2B) ispod  $2 \times 10^{-6}$  cm/s u smjeru A2B bez inhibitora P-gp (Tablica 23 i 24). U prisutnosti elakridara (testiranog samo za aktivne spojeve), propusnost A2B, tj. pasivna propusnost, postaje umjerena za aktivne spojeve 5c, 5d, 5e i 5g. Za preostala dva spoja, 5h i 6a / LM-1a, propusnost ostaje niska ( $< 2 \times 10^{-6}$  cm/s) čak i u prisutnosti inhibitora P-gp. Osim toga, svi aktivni spojevi mogli bi se klasificirati kao supstrati P-gp s omjerom efluksa  $> 2$  u odsutnosti inhibitora P-gp i njegovim značajnim smanjenjem (najmanje 50%) u prisutnosti elakridara. Neaktivni spojevi također bi se mogli klasificirati kao supstrati P-gp na temelju omjera efluksa ( $> 2$ ) u odsutnosti inhibitora. Jedina iznimka je 6b (neaktivni amidin), spoj niske propusnosti čiji transport kroz membranu, čini se, nije pod utjecajem P-gp (omjer efluksa  $< 2$ ). Spojevi iz skupine furana imaju nisku permeabilnost ( $< 0$ ) osim neaktivnog spoja 10 (0.6).

**Tablica 19.** Prikaz rezultata za *in vitro* ADME svojstva spojeva iz furanske serije

	<b>5/CR-2</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Raspon kinetičke topljivosti nakon 2h ( $\mu$ M)	3-10 (#10-30)	10-30	10-30 (#3-10)	30-100	1-3
Chrom logD	3.38	3.13	4.22	3.97	5.89
Mikrosomi (1 $\mu$ M) Predviđanje za <i>in vivo</i> hep CL expressed (%LBF)					
Miš	<30	34	<30	<30	69
Čovjek	<30	<30	<30	<30	66
PPB % vezanih (oporavak)					
Miš	98.7 (94)	98.9 (83)	99.8 (95)	99.9 (84)	100 (58)
Čovjek	97.8 (88)	99.1 (85)	99.7 (96)	99.9 (98)	100 (56)
Sabilnost u plazmi (% remaining nakon 4h)					
Miš	100	88	100	95	39
Čovjek	94	96	98	100	50
MDCKII-MDR1 Papp(A2B), Papp(B2A), Efflux ratio (w/o-> w/ P-gp inhibitor)	<0.1; =12.9 >128	<0.1; <0.1 =NA	<0.1; =1.56 =NA	<0.1; <0.1 =NA	0.6; =0.66 =1.0

Kod odabranih spojeva, LM-1a iz amidinske serije i CR-2 iz furanske serije, nije bilo sličnosti prilikom analize njihovih *in vitro* ADME svojstava.

LM-1a spoj je pokazao dobru topljivost (>100mM), dok je CR-2 pokazao nisku topljivost (3-10uM). LM-1a je slabo lipofilan spoj (logD 0.92) dok CR-2 jako lipofilan (logD3.38).

LM-1a je u kategoriji umjerenog klirensa (30-70%), a CR-2 je u kategoriji niskog klirensa (<30) što znači da se LM-1a slabije metabolizira dok se CR-2 slabije ili uopće ne metabolizira. Rezultati klirensa *in vitro* moraju se potvrditi u *in vivo* pokusima jer ponekad spojevi pokazuju različito djelovanje u *in vivo* studijama u odnosu na dobivene rezultate *in vitro*, te se ovako mogu uzeti samo kao orijentacija u probiru za daljnje profiliranje spoja. Osim toga, potrebno je da testirani spoj pokazuje donekle slične rezultate između vrsta, u ovom slučaju između humanih i mišjih mikrosoma, da bi se izbjegao odabir spojeva koji imaju preveliku razliku te bi to moglo dovesti do komplikacija u kasnijem razvoju potencijalnog lijeka.

U testovima stabilneta u mišjoj i humanoj plazmi oba spoja su pokazala vrlo dobru stabilnost, a kod vezanja za proteine plazme, LM-1a spoj je pokazao niže vrijednosti (63 i 60%) od CR-

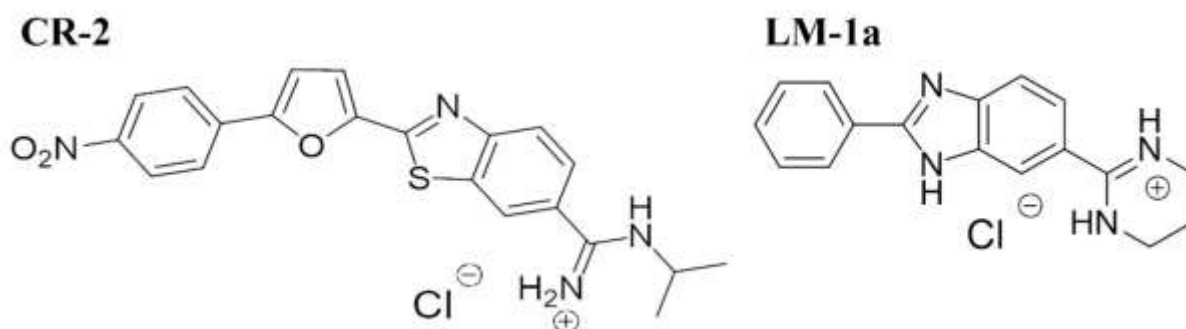
2 spoja (98 i 99%). Podatak govori o potencijalno slobodnoj frakciji spoja u plazmi jer samo nevezani spoj može biti aktivan. No u primjeni su spojevi koji imaju vrlo visoki postotak spoja vezanog za proteine plazme i pokazuju visoku aktivnost poput varfarina (Di L. et al, 2017). Bitna je kinetika vezanja i otpuštanja slobodne frakcije spoja. Stoga na temelju podatka o vezanju spoja na proteine plazme spoj se ne eliminira iz plana daljnjeg profiliranja.

Mjerenje permeabilnosti u testu na MDCKII-MDR1 pokazalo je da oba spoja imaju nisku permeabilnost (<0.1%) i da su oba potencijalni supstrati za P-gp eflux pumpu što znači da ih stanica putem pumpe može izbacivati van te teško mogu pasivno ulaziti u stanicu kroz staničnu membranu.

Odlučio sam u *in vivo* pokusu testirati 6a/LM-1a i 5/CR-2 prema dobivenim rezultatima o aktivnosti spojeva, njihovoj potencijalnoj toksičnosti na stanicama te *in vitro* farmakokinetičkim parametrima.

#### 4.5. Rezultati *in vivo* pokusa

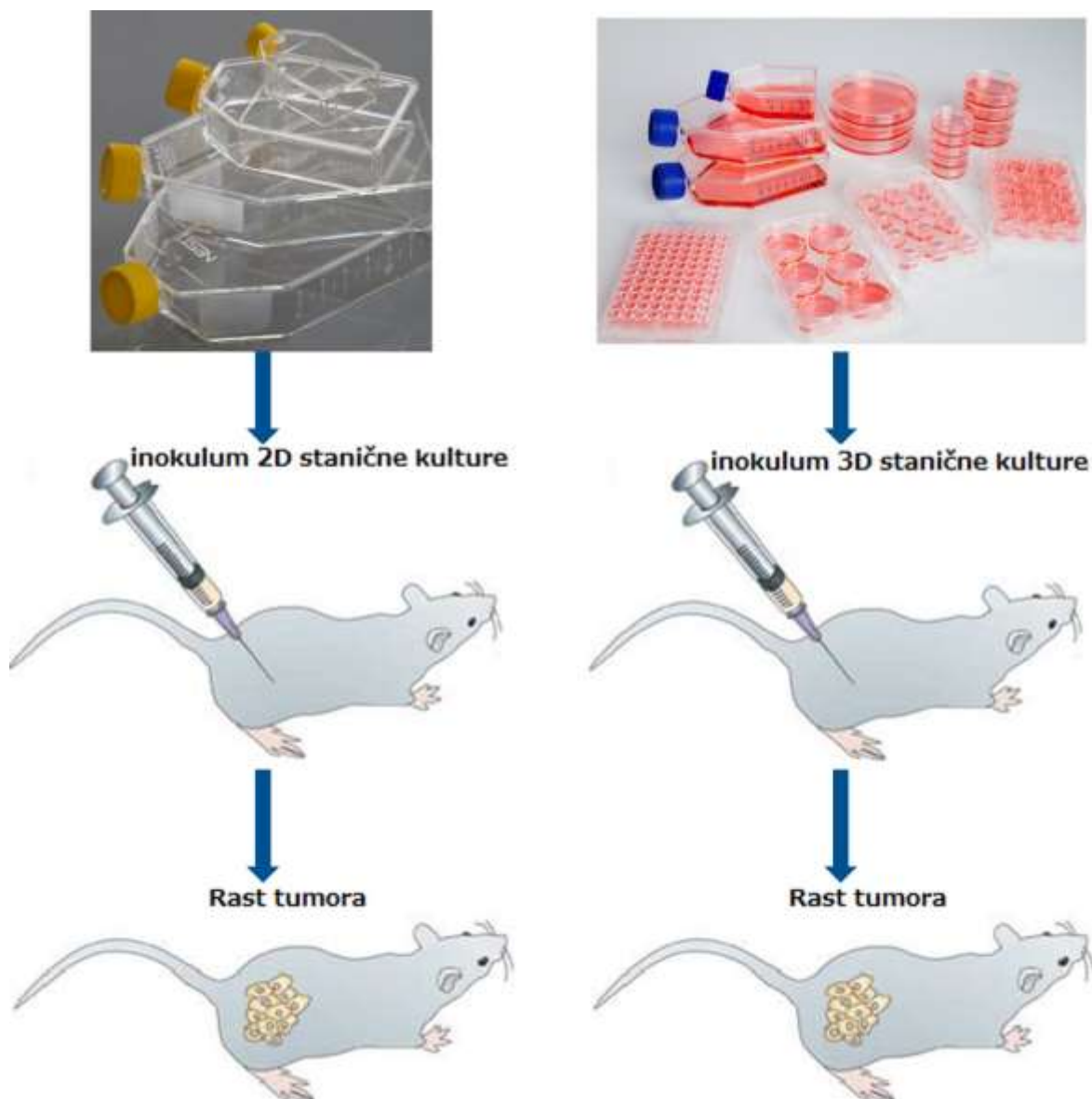
Oba spoja, odabrana za *in vivo* pokus, 6a/LM-1a i 5/CR-2 (slika 23), sintetizirana su u količini potrebnoj za cjelokupni tretman životinja. Spojevi su sintetizirani korištenjem prethodno objavljenih eksperimentalnih postupaka koji nisu modificirani (CR-2 je spoj 5 iz rada objavljenog u *Molecules*; LM-1a spoj 6a iz rada objavljenog u *J. Enz. Inh. Med. Chem.*). Rekrystalizirani su iz etanola; čistoća im je potvrđena HPLC/MS-om (CR-2: 98,8 %; LM-1a: 100,0 %). Podaci o strukturnoj karakterizaciji u skladu su s prethodno objavljenim spektroskopskim podacima (Racané, Cindrić, et al., 2021; Racané, Zlatar, et al., 2021). Tako sintetizirani spojevi čuvani na suhom i tamnom mjestu na sobnoj temperaturi do upotrebe.



**Slika 22.** CR-2 je derivat furana, MW 442.92 g/mol. LM-1a je derivat amidina, MW 312.8 g/mol. Oba spoja su liofilizirana i držana u mraku na sobnoj temperaturi (Racané, Cindrić, et al., 2021; Racané, Zlatar, et al., 2021)

Da bi ustanovili razliku kojom stanice uzgojene u 2D i 3D uvjetima nakon inokulacije razvijaju ksenografe u NU/NU mišvima, pripremili smo potrebni broj stanica u 3D uvjetima u posebnim tikvicama koje promoviraju sferični rast stanica i u 2D uvjetima na klasični način.

Plan poksa prikazan je na slici 24:



**Slika 23.** Plan pokusa inokulacije A549 stanica uzgojenih u 2D i 3D uvjetima

#### 4.5.1. Analiza broja prihvaćenih tumora u Balb/cNU/NU miševa

Od 30 životinja inokuliranih sa staničnom suspenzijom A549 pripremljenom u 2D uvjetima, tumor je prihvatilo 29 životinja. Veličina tumora je zadovoljavala kriterije postavljene za uključivanje u pokus tijekom 39 dana trajanja pokusa. Početak tretmana bio je 14 dana, a nakon završetka pokusa i određivanja krivulje rasta, tumori životinja dani su na dodatne pripadajuće analize (Tablica 20.)

Od 30 životinja inokuliranih sa staničnom suspenzijom A549 pripremljenom u 3D uvjetima, 11 tumora nije bilo palpabilno, a 5 nije postiglo željeni rast. Preostalih 14 životinja alocirano je u dvije grupe po prioritetima dobivanja potrebnih rezultata. Makro patološkom razudbom utvrđeno je da kod 11 životinja koji nisu razvili palpabilne tumore, tumori su se razvili dublje u tkivu te nisu bili ni detektabilni ni mjerljivi.

**Tablica 20.** Grupe životinja u pokusu s tretmanom, postupcima i uzorkovanjem

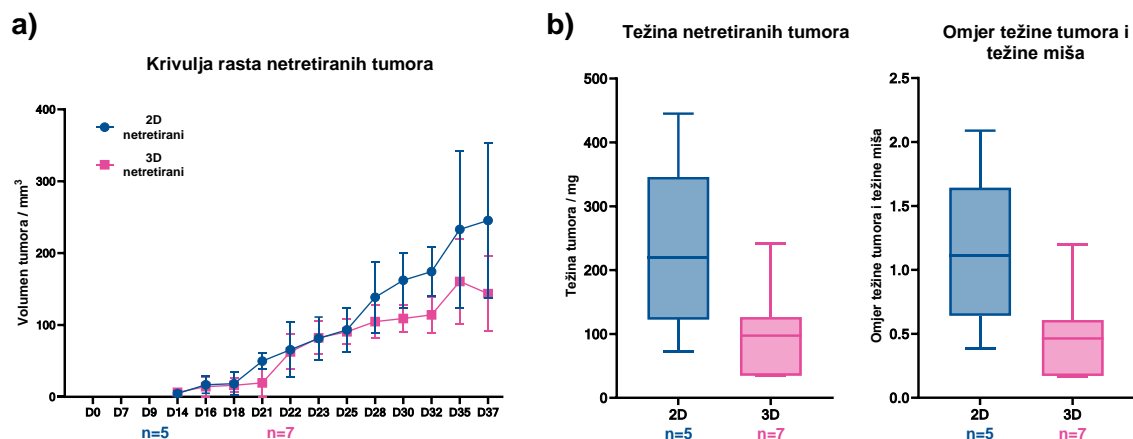
Inokulum	Broj grupe	N/Group	Tretman (D10*-D30** and D40*-60**)#	Postupci i uzorkovanje
<b>Inokulirani s A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima</b>	1	5	Netretirani miševi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tjelesna težina 3x/tjedno</li> <li>• Veličina tumora 3x/tjedno</li> <li>• Uzorci uzeti na dan žrtvovanja miševa:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Težina tumora</li> <li>○ Uzorci krvi za bioanalizu</li> <li>○ Uzorkovanje tumora za analizu protočnom citometrijom</li> <li>○ PK analiza histopatologija</li> </ul> </li> </ul>
	2	4	Vehicle IP 2x tjedno, 100 $\mu$ L/mišu	
	3	10	<b>CR-2</b> 25 mg/kg IP 2x tjedno, 100 $\mu$ L/mišu	
	4	10	<b>LM-1a</b> 25 mg/kg IP 2x tjedno, 100 $\mu$ L/mišu	
<b>Inokulirani s A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima</b>	5	7	Netretirani miševi	
	6	7	<b>LM-1a</b> 25 mg/kg IP 2x tjedno, 100 $\mu$ L/mišu	

#### 4.5.2. Usporedba rasta i težine tumora netretiranih miševa inokuliranih A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima

Prije nego rast tumora postane vidljiv, životinje se periodički prate. Učestalost ovisi o tome koliko brzo rast tumora postaje vidljiv nakon inokuliranja stanica. Kako približno vrijeme rasta tumora za inokulum stanica iz 3D kulture nije bilo poznato, životinje su pažljivo praćene, svaki drugi dan. Nakon što je rast tumora potvrđen, životinje su praćene tri puta tjedno. Za modele solidnih tumora opterećenje tumorom ne bi smijelo prelaziti 5 % izmjerene težine životinja. (Workman et al, 2010.) Tijekom ovog pokusa nije bilo takvog opterećenja kod nijedne životinje.

Usporedba krivulja rasta tumora netretiranih životinja inokuliranih A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima pokazala je da tumori nastali iz stanica uzgojenim u 2D uvjetima rastu brže nego tumori nastali iz stanica uzgojenim u 3D uvjetima (Slika 24a). Brži rast tumora nastalih iz stanica uzgojenim u 2D uvjetima primjećen je od 25. dana od inokulacije stanica.

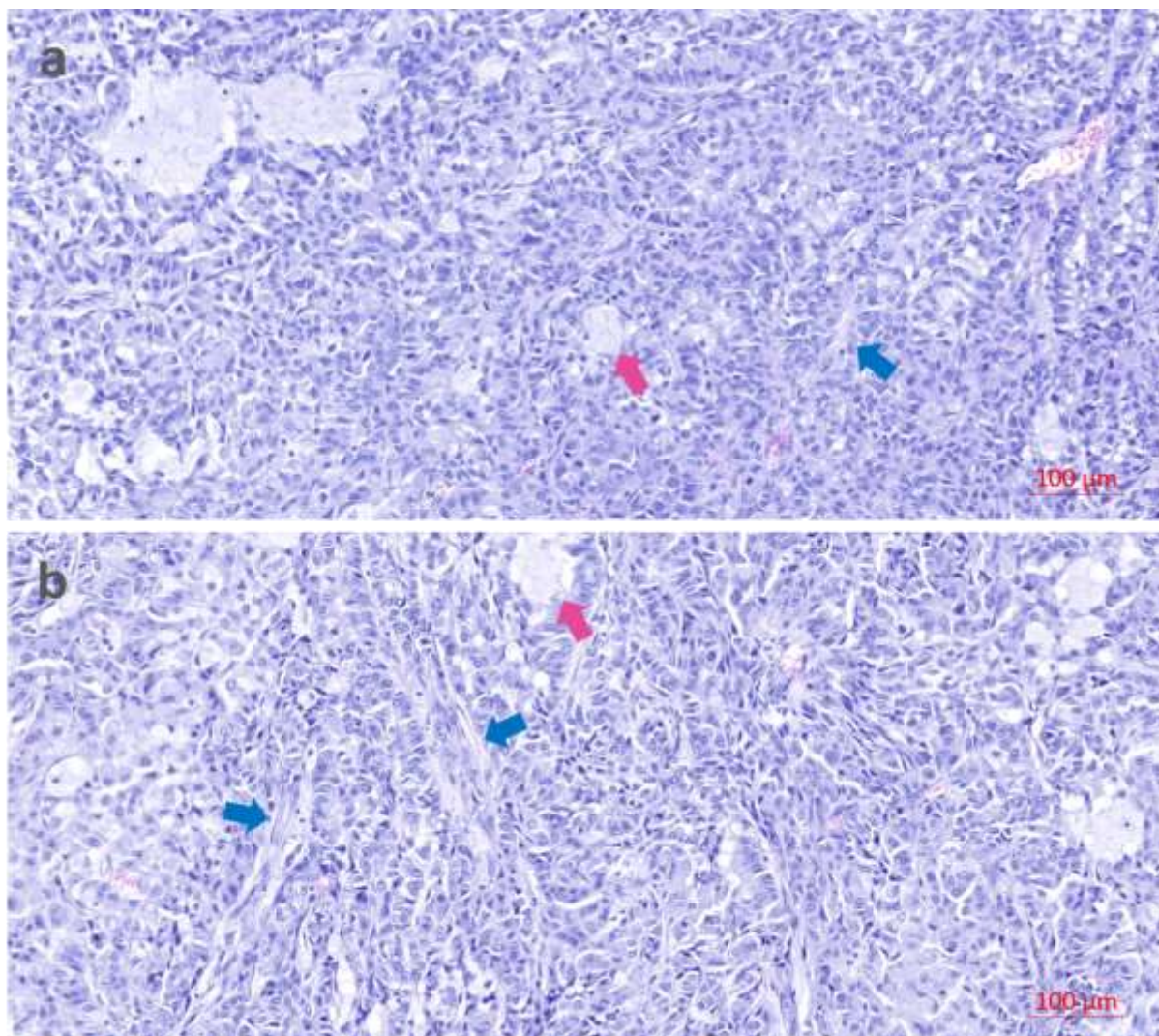
Na dan završetka pokusa usporedba težine tumora (Slika 24b) pokazala je da su tumori nastali iz stanica uzgojenim u 2D uvjetima bili puno teži ( $t = 231 \pm 137$  mg) u odnosu na tumore nastale iz stanica uzgojenim u 3D uvjetima ( $t = 105 \pm 71$  mg).



**Slika 24. a)** Krivulja rasta tumora nastalih iz inokuluma 2D i 3D staničnih kultura (Volumen tumora računat prema formuli:  $\text{Volumen tumora} = \text{dužina tumora} * (\text{širina tumora})^2 / 2$ ). **b)** Težina netretiranih tumora na dan žrtvovanja (39. dan pokusa). Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.2.1. Patohistološka usporedba ksenografta iz netretiranih miševa

Patohistološkom analizom tumora u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D (Slika 25a) i 3D (Slika 25b) uvjetima kod netretiranih životinja primjećeno je da se uočene promjene podudaraju u oba uvjeta te nije bilo značajnije razlike među analiziranim uzorcima.

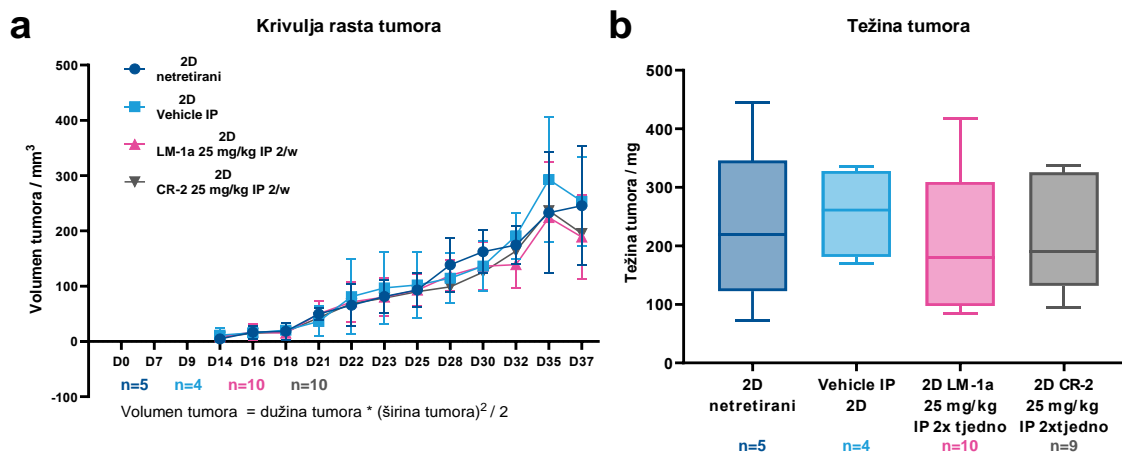


**Slika 25.** Patohistološka usporedba tumora u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D (a) i 3D (b) uvjetima kod netretiranih životinja. Histološki prikaz netretiranih stanica u mišu obojen hematoksilin-eozinom (H&E). Tumorske stanice su okrugle, s obilnom bazofilnom citoplazmom te hiperkromatskim, okruglim do ovalnim jezgrama. Prisutna fibro-vaskularna stroma te multifokalna područja nekroze. Mitotska aktivnost je niska (1–2 mitoze/HPF). Povećanje 5x (Zen, Zeiss)

#### 4.5.3. Usporedba rasta i težine tretiranih tumora u 2D

Usporedba krivulja rasta tumora netretiranih životinja i životinja tretiranih sa spojevima Lm-1a i CR-2 inokuliranih A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima pokazala je da tumori netretiranih životinja rastu brže nego tumori nastali u životinja tretiranih sa spojevima (Slika 26a). Brži rast tumora kod netretiranih životinja primjećen je od 32. dana od inokulacije stanica.

Na dan završetka pokusa usporedba težine tumora (Slika 26b) pokazala je da su tumori iz netretiranih životinja bili teži ( $t_{2D}$  Netretirani =  $231 \pm 137$  mg,  $t_{2D}$  Vehicle =  $257 \pm 77$  mg) u odnosu na tumore iz tretiranih životinja ( $t_{2D}$  LM1-a =  $209 \pm 119$  mg,  $t_{2D}$  CR-2 =  $213 \pm 95$  mg).

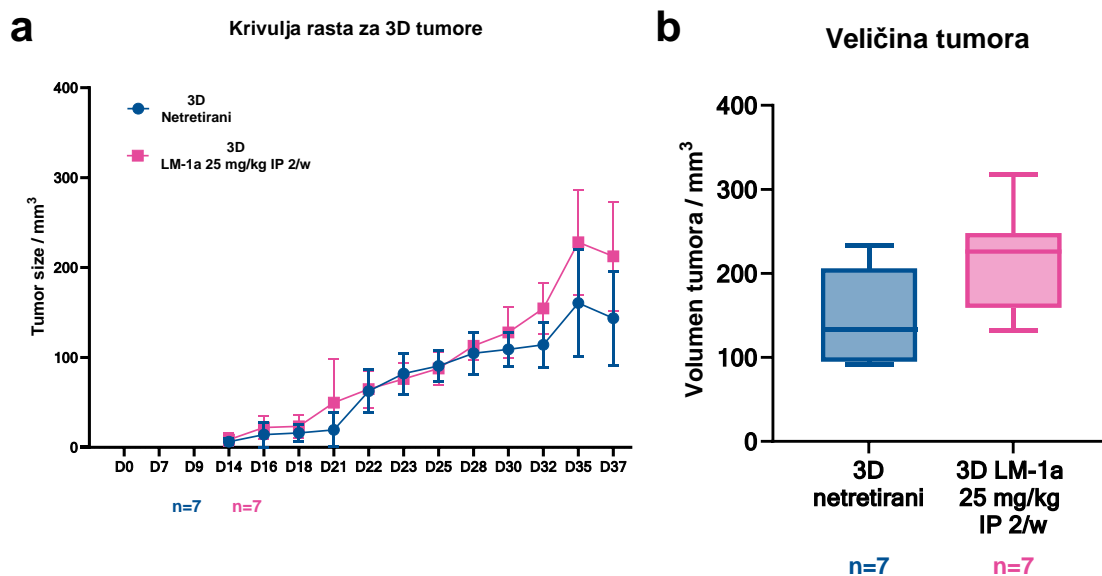


**Slika 26.** Usporedba netretiranih sa životinjama tretiranim s NKE. **a)** Krivulja rasta mišjih ksenografa tokom vremena nastalih iz inokuluma 2D staničnih kultura; **b)** Težine tumora na dan (39. dan) rezudbe. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.4. Usporedba rasta i težine tretiranih tumora u 3D

Usporedba krivulja rasta tumora netretiranih životinja i životinja tretiranih sa spojem Lm-1a inokuliranih A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima pokazala je da tumori netretiranih životinja rastu sporije nego tumori nastali u životinja tretiranih sa spojem Lm-1a (Slika 27a). Brži rast tumora kod tretiranih životinja primjećen je od 30. dana od inokulacije stanica.

Na dan završetka pokusa usporedba težine tumora (Slika 27b) pokazala je da su tumori iz netretiranih životinja bili lakši ( $t_{3D}$  netretirani =  $105 \pm 71$  mg) u odnosu na tumore iz životinja tretiranih s LM-1a spojem ( $t_{3D}$  LM1-a =  $191 \pm 52$  mg).



**Slika 27.** Usporedba netretiranih sa životinjama tretiranim s NKE. **a)** Krivulja rasta mišjih ksenografa tokom vremena nastalih iz inokuluma 3D staničnih kultura; **b)** Veličina tumora na dan razudbe. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.4.1. Analiza koncentracije spojeva u plazmi i tumoru tretiranih miševa

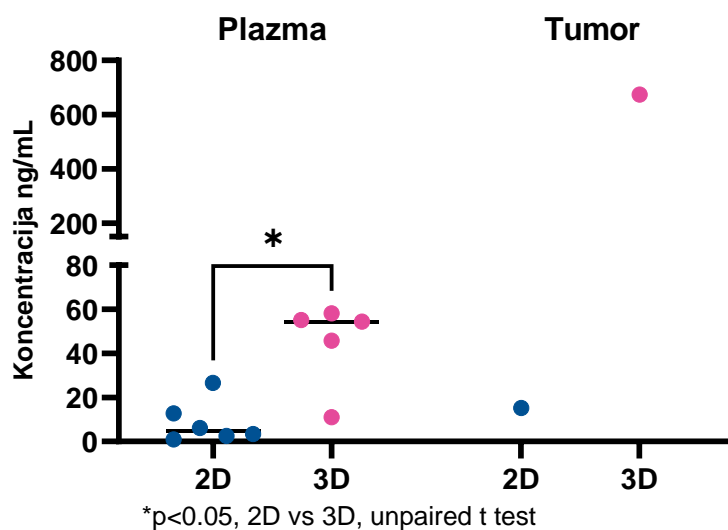
Koncentracija oba analita izračunata je korištenjem omjera površine vrha analita/internog standarda za najintenzivniji prijelaz praćenja višestrukih reakcija (MRM) u MS/MS. MRM korišten za CR-2 bio je  $m/z$  407,100  $\rightarrow$  302,000 Da, za prijelaz LM-1a bio je  $m/z$  277,219  $\rightarrow$  220,000 Da, a za interni standard diklofenak bio je  $m/z$  296,000  $\rightarrow$  214,100 Da.

LCms bioanalizom supstanca CR2 je bila nedetekabilna dok je LM-1a bila detektabilna te je bila povišena u plazmi životinja koje su imale ksenografte nastale u 2D uvjetima (Slika 28).

S obzirom na samo 1 tumor vidljivo je da se ta supstanca nakuplja i u ksenograftu iako zbog manjka uzoraka nije bilo moguće napraviti statističku analizu.

Zbog lošijih farmakokinetičkih svojstava spoja CR-2 prikazanih u A549 mišjim ksenograftima nastalih iz inokuluma 2D staničnih kultura, u A549 mišjim ksenograftima nastalih iz inokuluma 3D staničnih kultura životinje su tretirane samo s LM-1a spojem (IP, 25 mg/kg, 2x tjedno).

Bolju aktivnost na 2D tumorima je imala supstanca LM-1a, dok na 3D tumorima rezultat djelovanja LM-1a nije ponovljen.



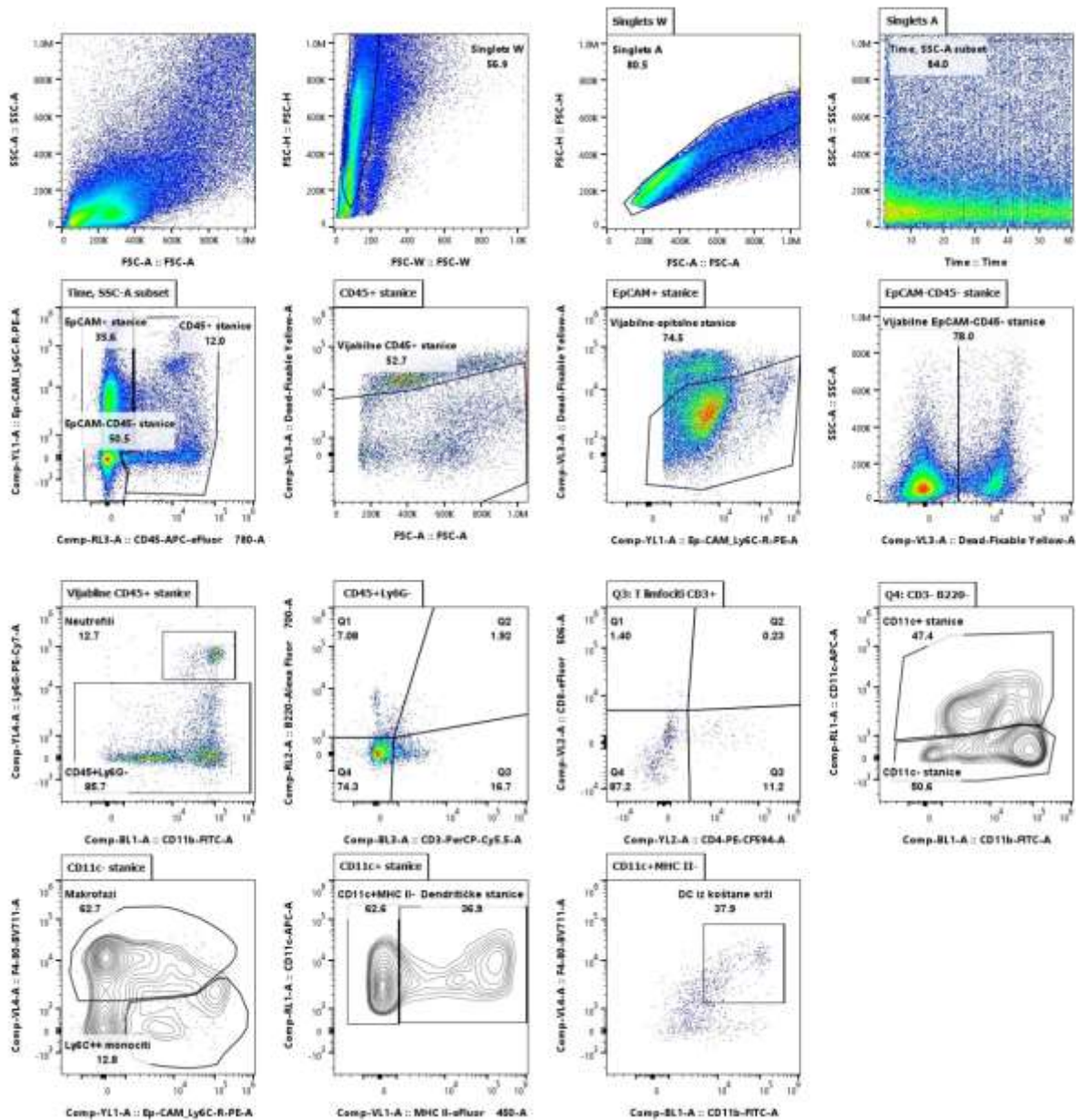
**Slika 28.** LC-MS/MS bioanaliza *in vivo* uzoraka koncentracije supstance LM-1a u plazmi i tumoru tretiranih miševa terminalnog dana pokusa (39. dan)

#### 4.5.5. Imunofenotipizacija infiltriranih imunoloških stanica u mišjim ksenograftima u 2D i 3D

U svaku jažicu je dodano po  $1 \cdot 10^6$  stanica te je na tom broju stanica napravljena imunofenotipizacija. Na protočnom citometru je analizirano 100  $\mu\text{L}$  uzorka (od 250  $\mu\text{L}$  u koliko je uzorak resuspendiran nakon imunofenotipizacije. Postotak dobiven analizom je kasnije korišten za izračun ukupnog broja stanica određene populacije u svakom uzorku iz ukupnog broja stanica koje su izolirane iz tumora svake životinje. Za analizu dobivenih podataka korišten je FlowJo softver v10.8. Protokol za određivanje stanica u tumorskom tkivu protočnom citometrijom prikazan je na slici 29. Prvi korak pri analizi je pregled prikaza s raspodjelom stanica prema veličini i granularnosti (prikaz A: FSC-A/SSC-A) gdje je u donjem lijevom kutu prikazan tzv. „otpad“ (engl. *debris*), odnosno raspadnute stanice koje ne ulaze u analizu te prilikom prikupljanja uzorka nisu sačuvane. Pregledom idućeg prikaza (prikaz B: FSC-W / FSC-H i FSC-A / FSC-H) odvajaju se stanice koje su jedna po jedna prošle kroz protočnicu (engl. *singlets*). Potom se analizira prikaz  $\text{CD45}^+$  stanica u odnosu na  $\text{Ep-CAM}^+$  stanica (prikaz D:  $\text{CD45 APC-eF780-A} / \text{Ep-CAM PE-A}$ ) gdje se određuju leukociti ( $\text{CD45}^+$ ), epitelne stanice ( $\text{Ep-CAM}^+$ ) te ostale stanice ( $\text{CD45}^-$ ,  $\text{Ep-CAM}^-$ ). Zatim se analizira prikaz živih  $\text{CD45}^+$ ,  $\text{Ep-CAM}^+$  i ostalih stanica. Stanice su žive ukoliko su Fixable Yellow negativne (prikaz G i H: FSC-A / Dead Fixable Yellow -A). Iz populacije živih leukocita određene su subpopulacije leukocita. Prvo se analizira prikaz Ly6G u odnosu na CD11b gdje su izdvojeni neutrofilni ( $\text{Ly6G}^+$ ). Iz populacije  $\text{Ly6G}^- / \text{CD11b}^{\pm}$  napravljen je prikaz T (Q3:  $\text{CD3}^+$ ) i B (Q1:  $\text{B220}^+$ ) limfocita. Dodatno je analizirana populacija T limfocita na pomoćničke ( $\text{CD4}^+$ ) i citotoksične ( $\text{CD8}^+$ ) T limfocite. Zatim je iz Q4:  $\text{CD3}^- \text{B220}^-$  napravljen prikaz CD11b u odnosu na CD11c gdje su odvojene  $\text{CD11c}^+$  od  $\text{CD11c}^-$  populacija. Iz  $\text{CD11c}^+$  populacije napravljen

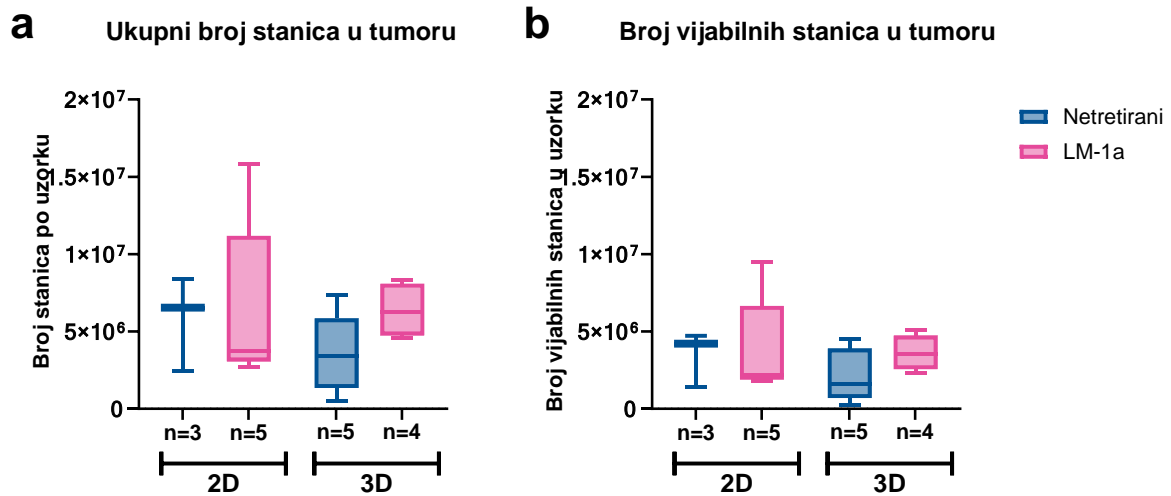
je prikaz MHC II u odnosu na CD11c te su tu određene dendritičke stanice (DC, CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> stanice). CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup> stanice su dodatno analizirane na F4/80 i CD11b markere. Ustanovljeno je da bi dvostrukopozitivna populacija (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) mogla biti skupina dendritičnih stanica iz koštane srži.

Iz CD11c<sup>-</sup> populacije napravljen je prikaz Ly6C u odnosu na F4/80 gdje su određeni makrofazi (F4/80<sup>+</sup>) i monociti (Ly6C<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>)



**Slika 29.** Protokol za određivanje stanica u tumorskom tkivu protočnom citometrijom

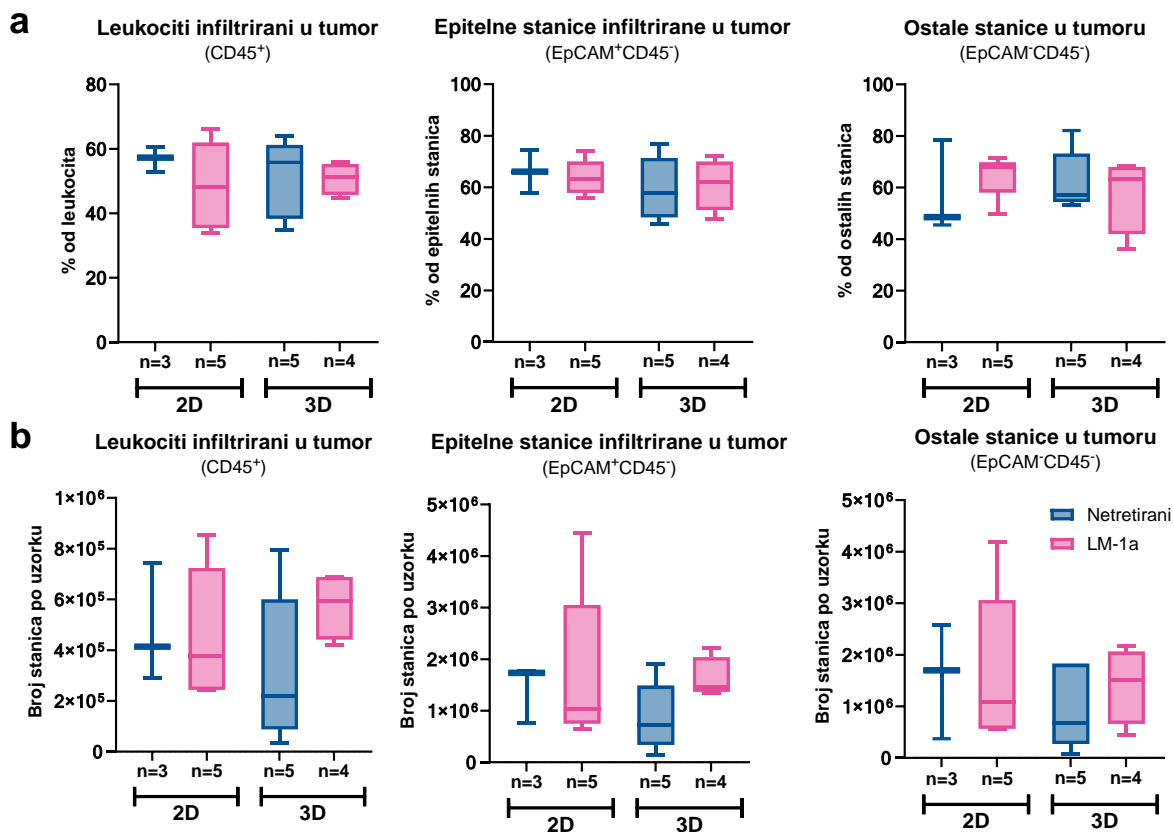
Vijabilnost izoliranih stanica iz tumora bila je veća od 50 % za leukocite i ostale stanice dok je za epitelne stanice bila veća od 60 %.



**Slika 30. a)** Ukupni broj stanica izoliranih iz mišjih ksenografta **b)** Ukupni broj vijabilnih stanica izoliranih iz mišjih ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).

Ukupni broj stanica izoliranih iz tumora na dan završetka pokusa (slika 30a) nije pokazivao značajnu razliku između tretiranih i netretiranih životinja iz ksenografta dobivenih stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima. Ukupni broj stanica tretiranih životinja u ksenograftima dobivenih uzgojem stanica u 3D uvjetima bio je nešto viši u odnosu na broj stanica iz ksenografta dobiveni inokulacijom stanica uzgojenih u 2D uvjetima ( $3,76 \times 10^6$  vs  $6,23 \times 10^6$ ). Analiza broja vijabilnih stanica nije pokazala značajne razlike među uspoređivanim grupama (30b)

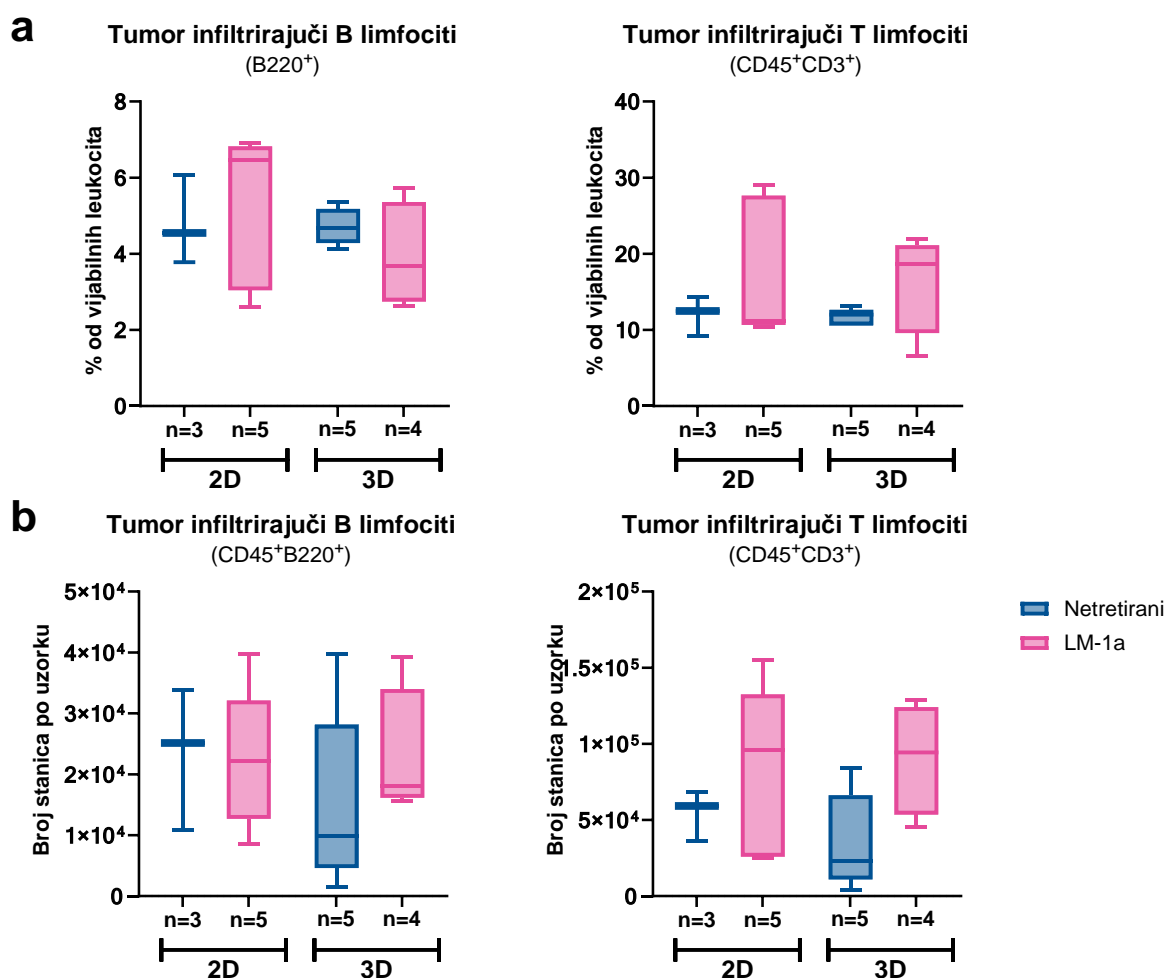
Na slici 31. prikazan je broj i frekvencija pojedinih populacija stanica infiltriranih u ksenograft:



**Slika 31. (a)** Učestalost vijabilnih populacija iz mišjih ksenografa i **(b)** ukupan broj živih leukocita (CD45<sup>+</sup>), epitelnih (EpCAM<sup>+</sup>) i ostalih stanica (CD45<sup>-</sup> EpCAM<sup>-</sup>), u tkivu mišjih ksenografa netretiranih i tretiranih životinja dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D uvjetima. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.5.1. Limfociti

S obzirom na soj miševa, NU/NU Balb c, koji je korišten (J. Chen et al., 2022) u ovom istraživanju, nije bilo očekivano da će se detektirati veće količine limfocita. U tumorima su detektirani B limfociti (3.93 – 5.24 %) i T limfociti (12 – 17.56 %) s manjim razlikama između analiziranih grupa. Nije bilo značajne razlike u učestalosti između tretiranih i netretiranih životinja te između miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima (Slika 32).

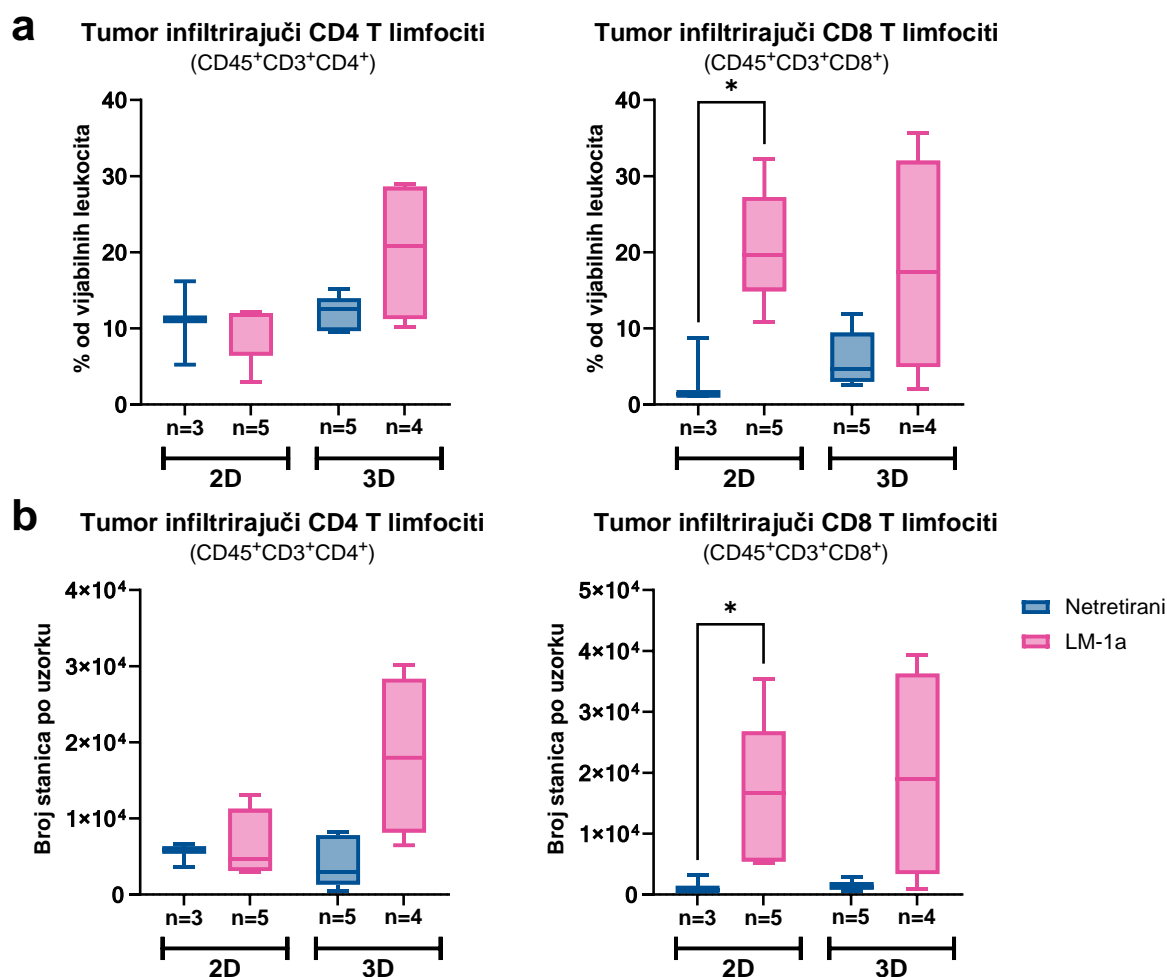


**Slika 32.** Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) B i T limfocita u tumorskom tkivu netretiranih i tretiranih životinja kojima je injiciran 2D i 3D inokulum Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

Veći ukupan broj i učestalost infiltrirajućih pomoćničkih limfocita (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) primijećen je kod miševa tretiranih s 6a/LM-1a spojem te inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima.

Statistički značajno povećanje učestalosti i apsolutnih brojeva citotoksičnih limfocita T ( $CD45^+ CD3^+ CD8^+$ ) primjećeno je kod miševa tretiranih s 6a/LM-1a spojem te inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima (slika 33).

Za razliku od njih, kod miševa tretiranih s 6a/LM-1a spojem te inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima vidljiv je trend u povećanju učestalosti i apsolutnih brojeva citotoksičnih limfocita T u odnosu na netretirane životinje ali nije statistički značajno.

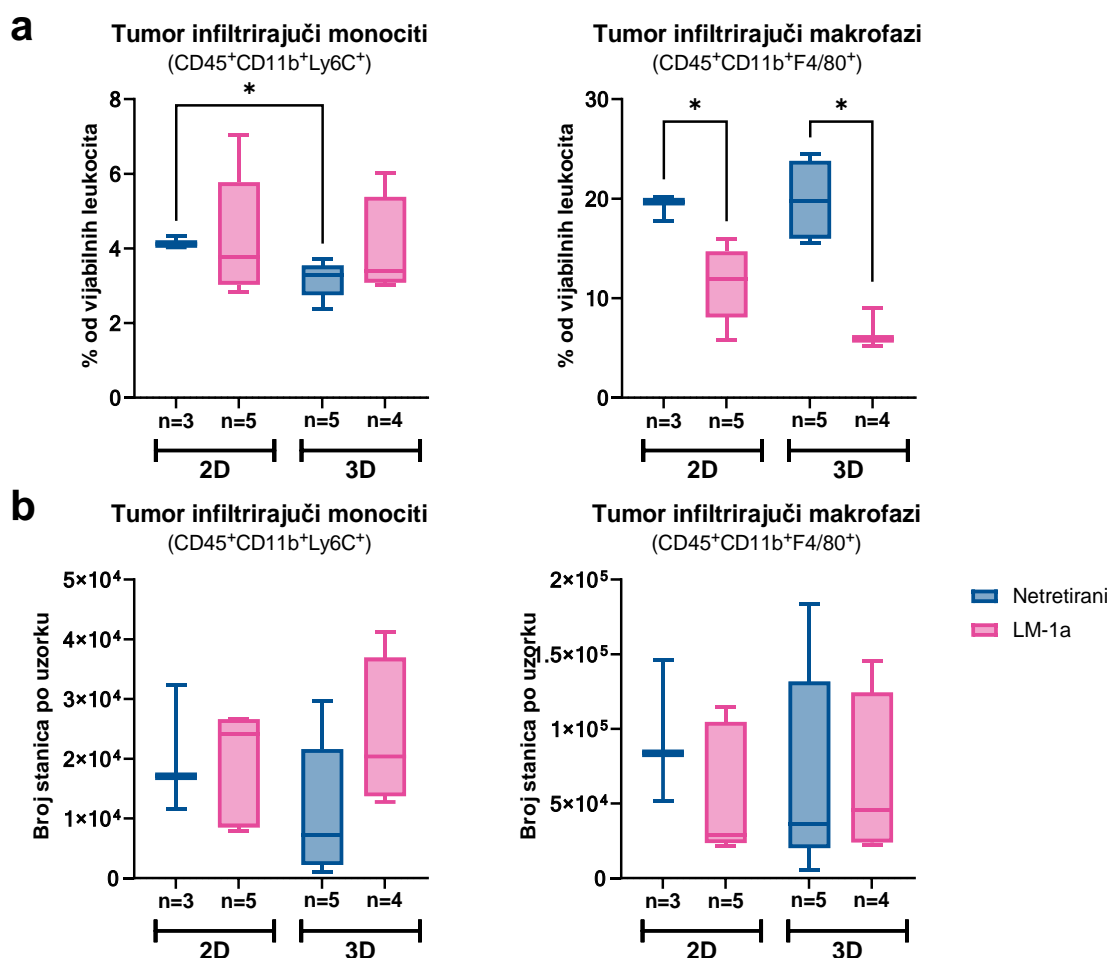


**Slika 33.** Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) CD4 i CD8 T limfocita u tumorskom tkivu netretiranih i tretiranih životinja kojima je injiciran 2D i 3D inokulum. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \* p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.5.2. Mijeloidna populacija

Veća učestalost infiltrirajućih monocita ( $CD45^+ CD11b^+ Ly6C^+$ ) primjećena je kod miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima te je to izraženije kod netretiranih ( $4.16 \pm 0.16$ ) u odnosu na tretirane životinje ( $3.17 \pm 0.5$ ). Spoj 6a/LM-1a je značajno smanjio učestalost tumor infiltrirajućih makrofaga ( $CD45^+ CD11b^+ F4/80^+$ ) kod miševa inokuliranih s

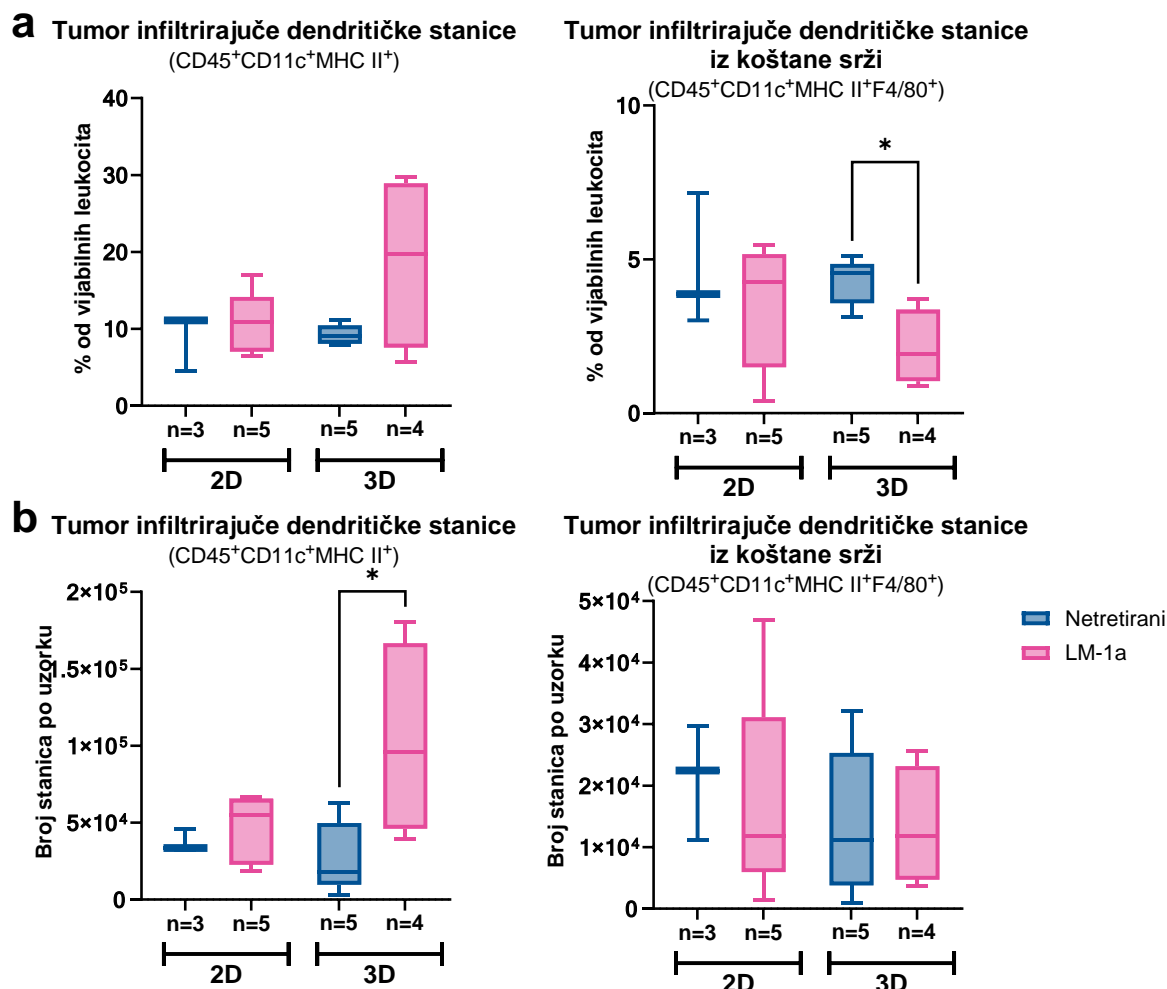
A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima. Smanjenje učestalosti infiltrirajućih makrofaga bilo je izraženije kod miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima (slika 34). Razlika u ukupnim brojevima izoliranih makrofaga nije vidljiva.



**Slika 34.** Usporedba frekvencije **(a)** i ukupnih brojeva **(b)** monocita i makrofaga u 2D i 3D tumorskom tkivu kod netretiranih i tretiranih životinja. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.  
\*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

Slična učestalost infiltrirajućih dendritičkih stanica (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>) i infiltrirajućih dendritičkih stanica iz koštane srži (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) primjećena je kod netretiranih miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima. Tretman sa spojem 6a/LM-1a nije utjecao na učestalost i brojnost infiltrirajućih dendritičkih stanica miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D uvjetima, dok je kod miševa tretiranih sa spojem 6a/LM-1a te inokuliranih stanicama uzgojenim u 3D uvjetima primjećen značajno veći ukupni broj učestalost infiltrirajućih dendritičkih stanica u odnosu na netretirane životinje. Nasuprot tome, tretman sa spojem 6a/LM-1a značajno je smanjio učestalost infiltrirajućih

dendritičkih stanica iz koštane srži kod miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima (slika 35).



**Slika 35.** Usporedba frekvencije **(a)** i ukupnih brojeva **(b)** DC i DC nastalih iz koštane srži u 2D i 3D tumorskom tkivu kod netretiranih i tretiranih životinja. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.6. Analiza faza staničnog ciklusa infiltriranih stanica

Uz imunofenotipizaciju stanica iz tumora, praćena je i programirana stanična smrt ili apoptoza. U ranim fazama apoptoze događaju se promjene na površini stanice. Jedna od promjena plazmatske membrane je translokacija fosfatidilserina s unutarnje strane plazmatske membrane na vanjsku stranu, što ga čini izloženim na površini stanice. Aneksin V je protein koji ima visoki afinitet za vezanje fosfatidilserina te detektira početnu fazu apoptoze u kojoj je stanična membrana još očuvana. Međutim, translokacija fosfatidilserina nije svojstvena samo za apoptozu, već se događa i tijekom nekroze stanica.

Rana apoptoza karakterizirana je netaknutom staničnom membranom, smanjenjem stanice i eksternalizacijom fosfatidilserina. Kasnu fazu apoptoze karakterizira fragmentacija DNA (karioreksis), koja započinje nakon završetka nuklearne kondenzacije (piknoza). Posredovana je i ovisnim i neovisnim putovima o kaspazama. U kasnoj fazi također dolazi do značajnih morfoloških i fenotipskih promjena kao što su citoplazmatsko i stanično skupljanje, reorganizacija organela te fragmentacija (nastajanje apoptotičnih tijela) i gubitak integriteta membrane. Trajanje kasne apoptoze može trajati 24 do 48h sati dok se promjene na stanici tokom rane apoptoze mogu primjetiti i nakon 30 minuta od početka apoptoze.

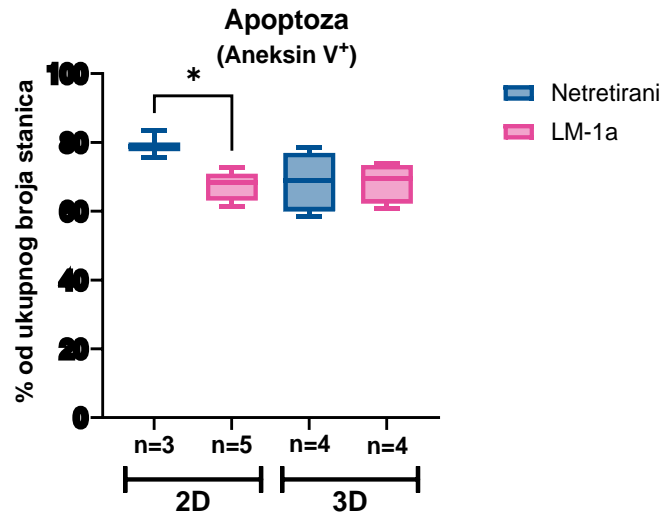
Razlika između ova dva oblika stanične smrti je u tome što tijekom početnih faza apoptoze stanična membrana ostaje netaknuta, dok u trenutku kada se dogodi nekroza stanična membrana gubi svoj integritet i postaje propusna. Za razlikovanje apoptoze od nekroze te rane od kasne apoptoze, koristi se bojanje propidij jodidom (PI) ili novijim molekulama koje veže DNA molekule. Zbog sposobnosti ulaska u stanice s oštećenom membranom, takve molekule služe kao indikator kasne apoptoze (Wlodkowic D et al. 2009).

Kako bi dodatno odredio status stanice, pratio sam status proliferacije metodom protočne citometrije. Ki-67 je protein koji služi kao marker proliferacije stanica te je ključan u patohistološkoj analizi tumora. Prisutan je u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa, a odsutan u stanicama mirovanja. Veći postotak Ki-67 (obično >20 %) ukazuje na bržu diobu i agresivniji tumor (National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/ki-67-proliferation-index>).

#### 4.5.6.1. Apoptoza

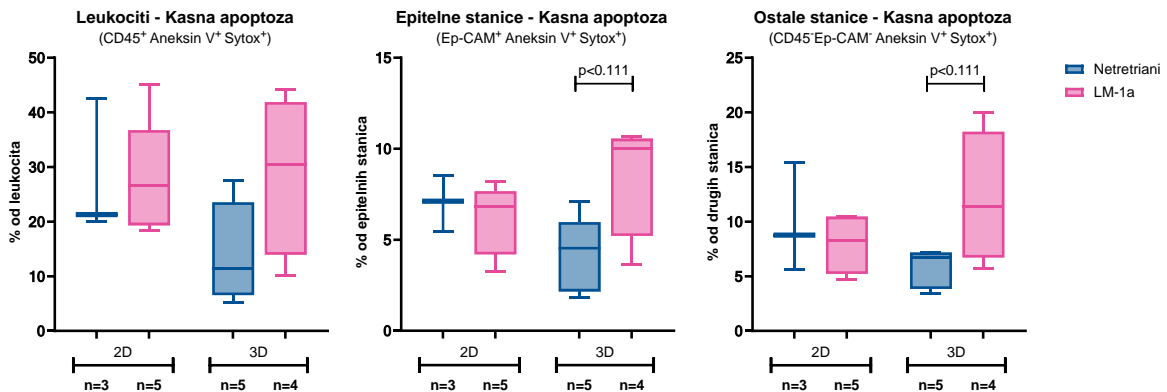
Programirana smrt stanica u 2D i 3D tumorskom tkivu kod netretiranih i tretiranih životinja praćena je kod svih stanica. Udio apoptotskih stanica u suspenziji stanica iz tumorskog tkiva mjeren je protočnom citometrijom uz upotrebu protutijela za aneksina V.

Najznačajnija razlika je uočena kod životinja inokuliranih s stanicama uzgojenim u 2D staničnoj kulturi stanicama, gdje je kod skupine miševa tretiranih (67.26±4.27) s LM-1a spojem (IP, 25 mg/kg, 2x tjedno) primjećena niža razina apoptotičnih stanica u odnosu na skupinu netretiranih miševa (79.23±4.03) (Slika 35).



**Slika 36.** Ekspresija Aneksina V u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku stanica u mišjem modelu ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

Osim apoptoze, praćena je i kasna apoptoza ili nekroza. Udio nekrotičnih stanica bio je viši kod životinja inokuliranih stanicama uzgojenim u 3D uvjetima te tretiranih sa spojem 6a/LM-1a kod svih praćenih populacija (leukociti, epitelne stanice, ostale stanice).



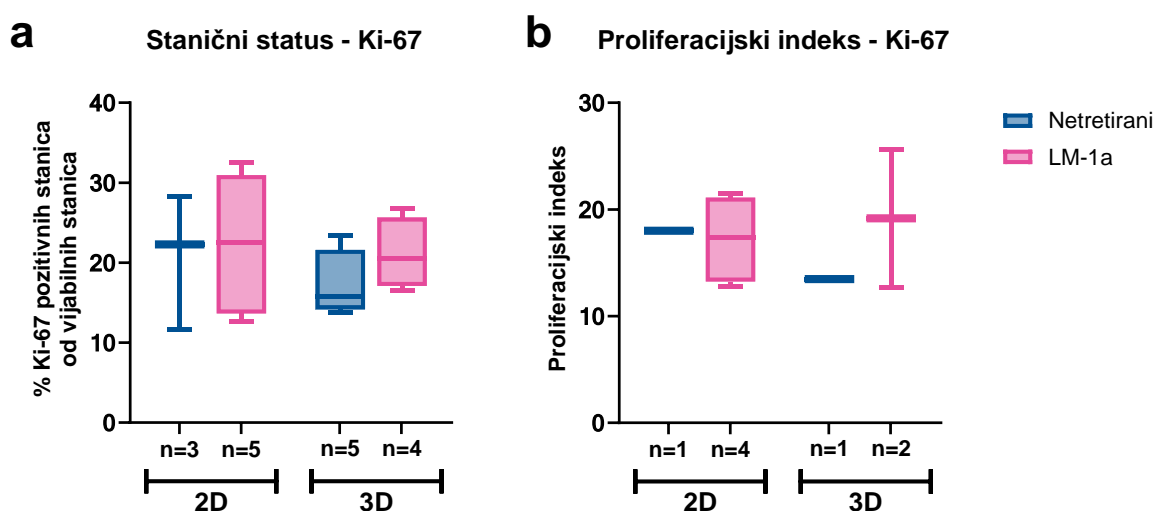
**Slika 37.** Programirana smrt stanica. Ekspresija Aneksina V u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku stanica u mišjem modelu ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \*  $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

#### 4.5.6.2. Proliferacija

Proliferacija stanica mjerena je klasičnim markerom proliferacije stanica Ki-67 koji je prisutan u jezgri stanica u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu) a nije prisutan u fazi mirovanja (G0) (Scholzen & Gerdes, 2000). Ekspresija Ki-67 ukupnom uzorku vijabilnih stanica u uzorku A549 ksenografta prikazana je na slici 37.

Osim analizom indeksa proliferacije s protočnom citometrijom, ekspresija Ki-67 je analizirana klasičnom ICH patohistološkom metodom (slika 39).

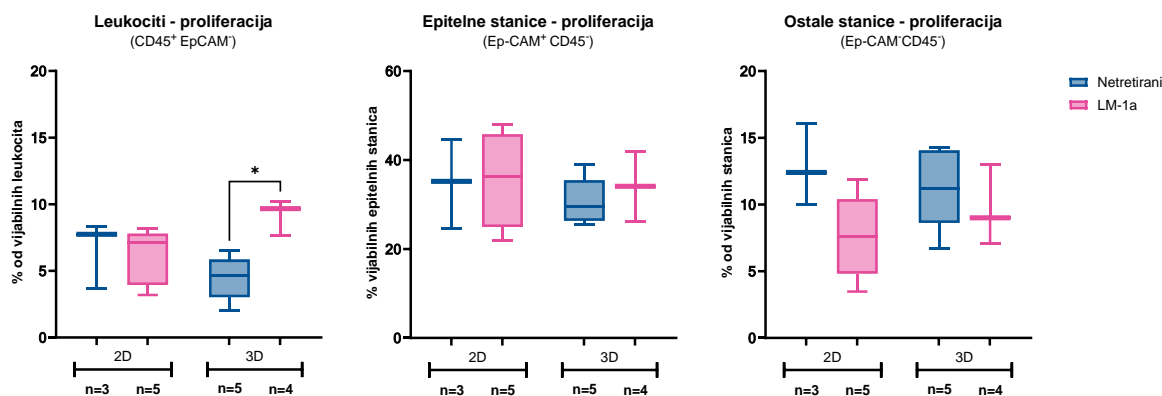
Proliferativni indeks nije se značajno razlikovao kod analiziranih grupa.



**Slika 38. a)** Ekspresija Ki-67 mjerena protočnom citometrijom u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku vijabilnih stanica. **b)** Proliferacijski indeks mjerena ekspresijom Ki-67 IHC metodom u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja. (Proliferacijski indeks =  $(\text{Ki67 pozitivne} / \text{Ki67 pozitivne} + \text{negativne}) \times 100$ ). Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.  $p > 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney)

Međutim, kad se uspoređi indeks proliferacije pojedinih subpopulacija, leukocita, epitelnih stanica te ostalih stanica (A549 stanice tumora, mišji fibroblasti, endotel i mišja stroma) uočena je statistička značajnost unutar subpopulacije vijabilnih leukocita (slika 38). Ekspresija Ki-67 je povećana u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 3D uvjetima kod tretiranih životinja u usporedbi s 3D netretiranom skupinom. Kod druge dvije skupine takva razlika nije uočena.

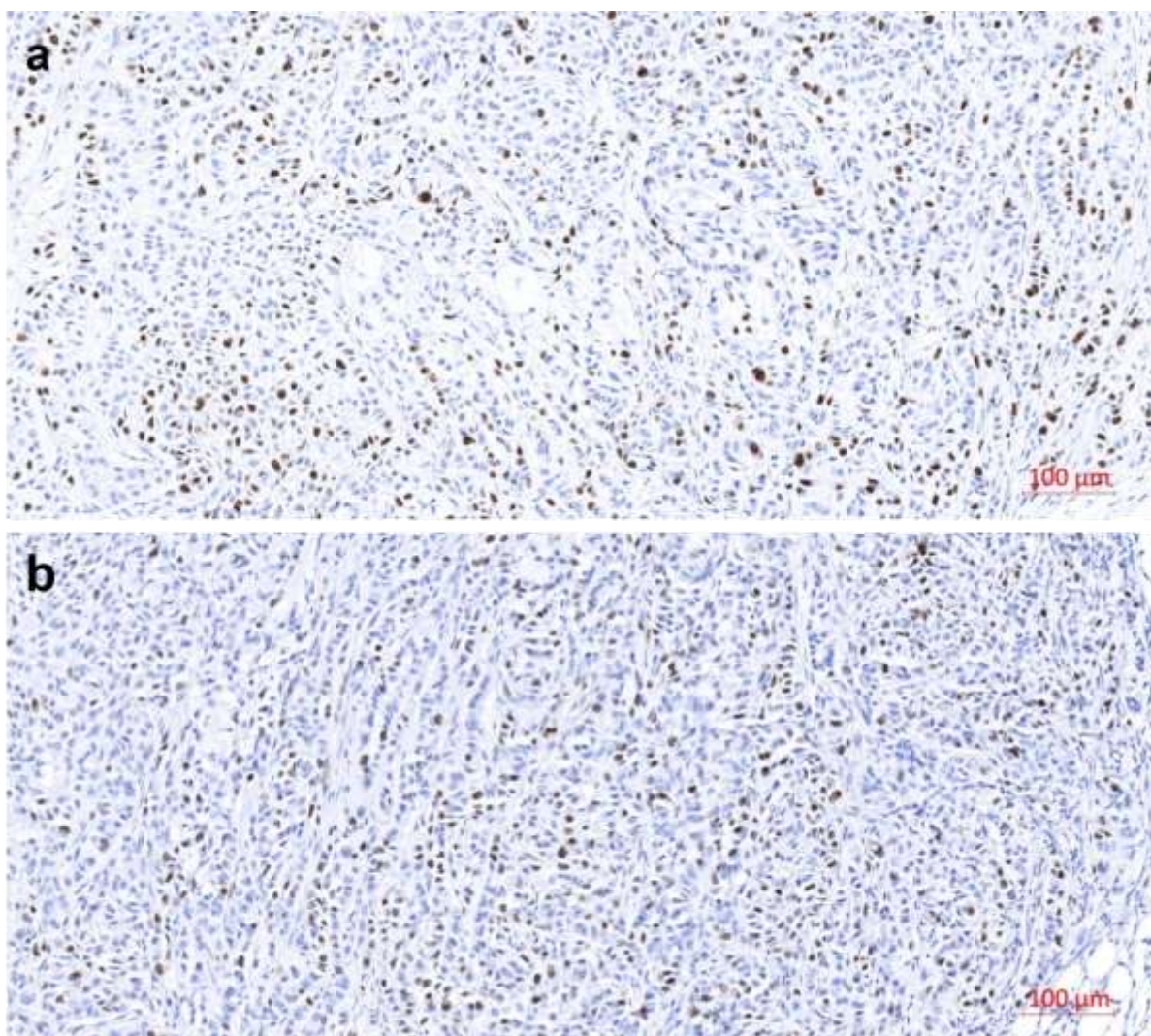
Kad se uspoređi indeks proliferacije (% stanica pozitivnih na Ki-67 u odnosu na sve stanice iste populacije) stanica unutar različitih vrsta stanica, primjetno je da epitelne stanice imaju puno višu učestalost proliferacije što ukazuje na brzu diobu tih stanica bez obzira na tretman i vrstu inokuluma (Slika 38).



**Slika 39.** Ekspresija Ki-67 u tkivu A549 mišjih ksenografta netretiranih i tretiranih životinja dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D uvjetima u analiziranim subpopulacijama. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \* $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney)

(ostale stanice – A549 stanice tumora, mišji fibroblasti)

Patohistološkom analizom nije dobivena nikakva značajna razlika u ekspresiji Ki-67 antigena kod životinja inokuliranih sa staničnim inokulumima pripremljenih od A549 stanica uzgojenih u 2D i 3D staničnim kulturama (nije prikazano). Analiza je napravljena pomoću softwera za digitalnu patologiju (Visiopharm, Danska).

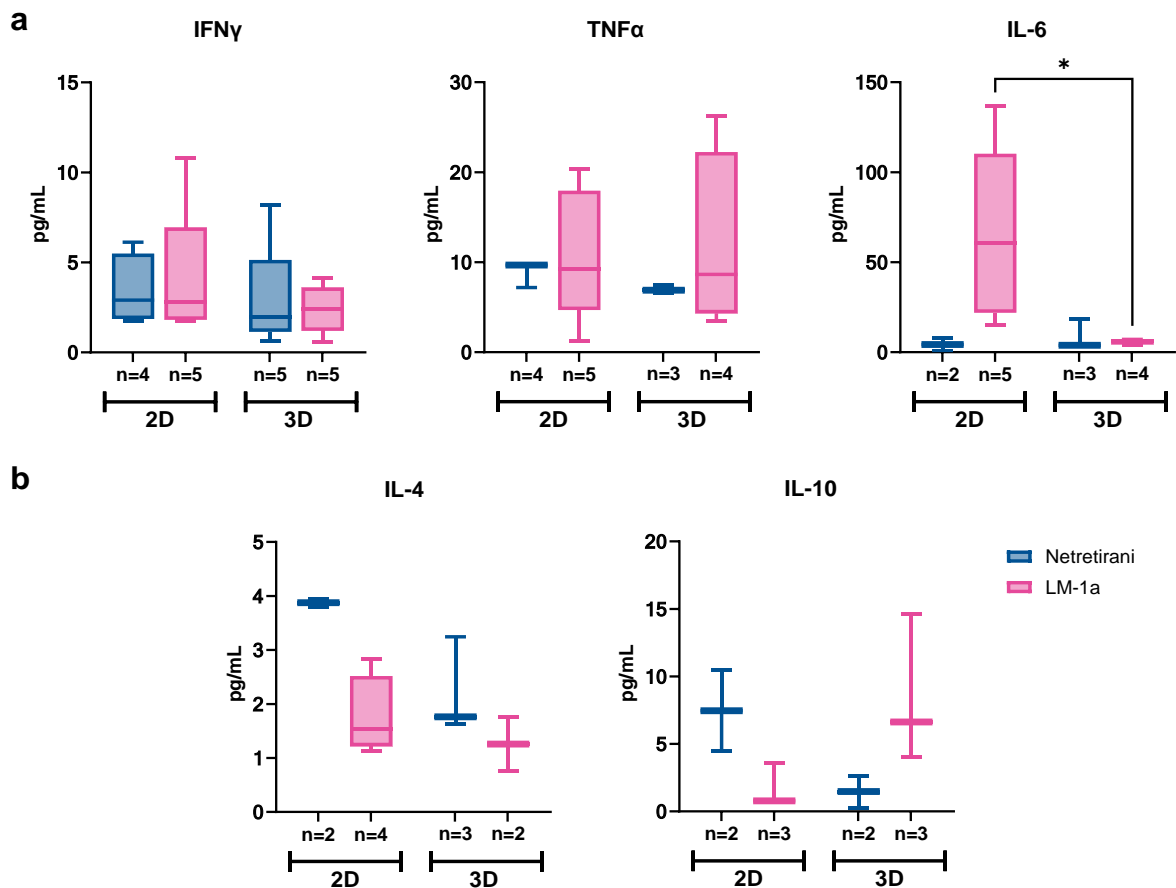


**Slika 40.** Ekspresija Ki-67 u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D (a) i 3D (b) uvjetima kod netretiranih životinja u ukupnom uzorku vijabilnih stanica u uzorku ksenografta obojen na IHC Ki67. Tumorske stanice s izraženim proliferativnim jezgrama. Povećanje 5x (Zen, Zeiss)

#### 4.5.7. Citokini u plazmi

Proupalni odgovor mjereno je proupalnim (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6) i protuupalnim (IL-4 i IL-10) citokinima. Općenito je bio veći kod miševa injektiranih stanicama uzgojenim u 2D staničnoj kulturi u odnosu na miševe injektiranih stanicama uzgojenim u 3D staničnoj kulturi.

IL-4 i IL-10 pokazali su puno niže koncentracije te nisu pokazali značajnije promjene u uspoređenim grupama. Najznačajnija razlika je uočena kod životinja tretiranih s LM-1a spojem gdje je koncentracija IL-6 u plazmi bila značajno veća kod miševa injektiranih stanicama uzgojenim u 2D ( $65.03 \pm 48.25$ ) staničnoj kulturi u odnosu na miševe injektiranih stanicama uzgojenim u 3D ( $5.89 \pm 1.45$ ) staničnoj kulturi.



**Slika 41.** Proupalni (a) i protuupalni (b) citokini u plazmi kod A549 mišjih ksenografa dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. \* $p < 0,050$  (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test)

## 5. DISKUSIJA

Da bi proces testiranja novih kemijskih entitea bio točan i reproducibilan validirao sam sve korake unutar analize. To uključuje dobivanje optimalne krivulje rasta s obzirom na početni broj stanica u jažici, vrijeme potrebno za stvaranje sfere, optimalnu veličinu sfere i njezinu koherentnost te određivanje dana tretmana sa standardnim kemoterapeutičim u odnosu na razvoj sfere i određivanje vremena očitavanja (24h, 48h i 72h) s obzirom da se testiranje provodilo u HTS formatu. Osim toga outread različitih metoda je dodatno validiran.

Testiranje novih spojeva s potencijalnom antitumorskom aktivnošću nije toliko učestalo u ranoj fazi istraživanja i razvoja lijekova u HTS formatu. Zlatni standard je još uvijek testiranje na tumorskim staničnim kulturama u 2D uvjetima. S obzirom na veliki broj novih metoda koje koriste razne 3D uvjete, vrlo je teško naći potrebne literaturne podatke koji bi pomogli u usmjeravanju procesa validacije pojedinih metoda (Brajša et al., 2016; Hikage et al., 2019).

Odabir *hanging drop* metode bio je pogodan za korištenje u HTS uvjetima prvenstveno zbog toga što spojevi djeluju na stanice unutar kapi medija i ne ulaze u nikakve interakcije s mogućim površinskim spojevima koji se koriste u pločicama da bi se stanice forsirale u sferični rast (Zanoni et al., 2016). To je vrlo bitno u ranoj fazi testiranja gdje je potrebno izbjeći interakcije s drugim spojevima i materijalima jer fizikalno kemijska svojstva NKE još nisu poznata. Osim navednog, poteškoće u validaciji navedene metode bile su nepostojanje specifičnih kemikalija i opreme na tržištu koje bi se koristile u provođenju validiranja ovom 3D metodom, već sam morao koristiti kemikalije koje su prilagođene za testiranje u 2D uvjetima. Primjerice: nije postojao specifični puffer kojim bi se stanice sfere mogle dovesti u stanje stanične suspenzije bez oštećenja proteina na vanjskoj strani membrane već se do te faze dolazilo laganom trešnjom i pipetiranjem do zadovoljavajućeg izgleda; određivanje broja stanica nije bilo moguće direktno izračunati te sam morao uvesti usporednu metodu indirektnog izračuna stanica. Danas se 3D stanične kulture koriste u drugim istraživanjima, te je tehnologija prilagođena posebno za primarne stanične kulture (engl. *stem cells*)

Za određivanje djelovanja NKE u testu citotoksičnosti i proliferacije korišteni su kitovi koji se koriste i za 2D kulture (MTS i BrdU). Jedini prilagođeni kit koji sam mogao koristiti za 3D stanične kulture je *CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D* koji se koristi za praćenje metaboličke aktivnosti stanica u tkivima.

Zbog svega navedenog, testove validacije radio sam paralelno s komercijalnim testovima prilagođenim za 2D uvjete. Od testiranih parametara poklapali su se početni broj stanica (u klasičnom 2D testu bio 10000 stanica dok je za formiranje sfere bilo potrebno 5000 stanica po jažici). Ako se uspoređuju krivulje rasta u 2D i 3D uvjetima, veći rasap vrijednosti dobiven je za 3D kulturu stanica s obzirom da se radi o vanjskom proliferativnom dijelu sfere.

Osim toga, krivulje rasta na 3D staničnim kulturama pokazale su pad četvrti dan od početka stanične kulture što pripisujem stagnaciji rasta sfere te ponovnom eksponencijalnom rastu koji se događa od petog dana. To potvrđuju i fotografije rasta sfera koje sam pratio na optičkom mikroskopu.

Navedena faza validacije obuhvaćala je testiranje standardnih kemoterapeutika te određivanje  $IC_{50}$  vrijednosti kao i kontrolu kvalitete pojedinog testa.

Odabir i broj standardnih terapeutika bio je širi od navedenog međutim zbog specifičnosti metode nismo uspjeli validirati dio spojeva. Uspješno sam validirao doksorubicin (Casey et al., 2016), staurosporin (Glassmann et al., 2018) te cisplatinu (N. Baek et al., 2016; Dasari & Bernard Tchounwou, 2014) i vandetanib (Siegfried et al., 2012). Za cisplatinu i vandetanib sam pokazao da stanična linija A549 pokazuje rezistentnost u 2D i 3D uvjetima.

Parametri kontrole testnih pločica bili su zadovoljavajući te su i za 2D i 3D kulture pokazali vrijednosti unutar zadanih okvira.

### 5.1. Testiranje serija spojeva

Od pet testiranih serija NKE, spojevi iz dviju testiranih serija, amidina (16 spojeva) i furana (18 spojeva), pokazali su potencijalnu antitumorsku aktivnost na 3 stanične linije karcinoma pluća.

Kod NKE iz preostale tri serije, akrilonitrila, kumarina i cisteinskih derivata aktivnost je pokazao vrlo mali broj spojeva dok je aktivnost bila slaba do srednje jaka.

Niti jedan spoj iz serije cisteinskih derivata nije pokazao zadovoljavajuću aktivnost.

Također, u prethodnim istraživanjima, u kojima je testirano 40 NKE u testovima za ispitivanje njihove potencijalne antitumorske aktivnosti, i to paralelno na dvodimenzionalno (2D) i trodimenzionalno (3D) uzgojenim različitim staničnim kulturama tumorskih stanica, pokazala su razliku vrijednosti inhibitornih koncentracija rasta ( $IC_{50}$ ) za pojedine molekule (Zlatar et al., 2017).

Po protokolu u laboratoriju u kojem sam radio ovaj rad, svaka kemijska serija testira se na više staničnih testova usmjerenih na druga terapijska područja za široku primjenu novih testova i indikacija. Neaktivnost navedenih kemijskih serija u testu antitumorskog djelovanja ne mora značiti da serije neće biti aktivne na nekim drugim setovima testova usmjerene na druge medicinske indikacije (u drugim područjima) s obzirom da se radi o kemijskim strukturama koje su poznati dijelovi mnogih biološki aktivnih spojeva poput antihiperlipidemijskih, analgetika, fungicida, protuupalnih spojeva i antibiotika (ref, patent).

Fokus daljnjih istraživanja bio je na spojevima iz serija amidina i furana te sam pojedine spojeve iz tih serija profilirao kroz daljnje testove.

### 5.2. Mogući mehanizam djelovanja

Jedan od daljnjih koraka bio je određivanje mehanizma djelovanja spojeva iz amidinske serije. Prethodna istraživanja grupe autora koji su sintetizirali navedenu seriju detektirala su mogućnost interkalacije spojeva u DNA i inhibiciju enzima topoizomeraze II te time sprječavanje proliferacije stanice (Racané et al., 2014; Racané, Rep, et al., 2021). Da bi proširio znanja o djelovanju amidinskih spojeva, testirao sam 6 najaktivnijih spojeva iz serije na staničnoj liniji A549 protočnom citometrijom mjereći aneksin V koji je marker za stanice u apoptozi. Dok stanice koje umiru apoptozom odstranjuju imunološke stanice domaćina a da

pritom ne dolazi do oslobađanja medijatora upale, to nije slučaj kod stanica koje umiru nekrozom izazivajući upalu te otpuštaju enzime koji oštećuju okolno tkivo te u nekim slučajevima mogu pogoršati kliničku sliku (više od 3 ref). Literaturno je poznato da doksorubicin nakon interkalacije u DNA potiče proces apoptoze i zaustavlja stanični ciklus te sam ga odabrao kao kontrolni spoj (N. H. Baek et al., 2016; Damiani et al., 2016; Thorn et al., 2011). Staurosporin također uvodi stanicu u apoptozu aktivirajući druge stanične signalne puteve (Glassmann et al., 2018). Rezultati su pokazali moguću interkalaciju spojeva u DNA i uvođenje stanice u apoptozu. grafovi dobiveni analizom protočnom citometrijom za testirane spojeve pokazali su podudarnost s grafom za doksorubicin (Racané, Cindrić, et al., 2021).

U daljnjem profiliranju želio sam odgovoriti na pitanja je li aktivnost spojeva posljedica farmakokinetičkih parametara koji spojevima omogućuju prodor u formiranu sferu te njihovo djelovanje na stanice. Nadalje, ako se pokaže da su farmakokinetički parametri bitni za aktivnost spoja usljed lakšeg prodiranja u sferu to bi bila velika prednost korištenja 3D staničnih kultura za daljnje probiranje NKE u testiranjima *in vivo*. U tu svrhu testirao sam aktivne i neaktivne spojeve na *in vitro* ADME svojstva i utvrdio da je kod aktivnih spojeva većina svojstava bolja u odnosu na neaktivne spojeve. Ovakav sustav mogao bi se koristiti u odabiru novih molekula za daljnje farmakološko profiliranje. Rezultati su pokazali da aktivni spojevi u odnosu na neaktivne spojeve iz serija amidina i furana imaju bolje farmakokinetičke parametre određene *in vitro*. (stabilnost u plazmi, stabilnost u mikrosomima

### 5.3. In vivo rezultati

Klasično farmakološko profiliranje spojeva s potencijalnim antitumorskim djelovanjem uključuje model mišjih ksenografta na NU/NU Balb c miševima (Fogh & Giovanella, 1979, 1983; Pantelouris, 1968; Pantelouris & Hair, 1970). Želio sam usporediti ksenografte miševa dobivenih u 3D uvjetima u odnosu na klasični model. U tu svrhu odabrao sam dvije molekule, jednu iz serije amidina drugu iz serije furana, te ih testirao u oba navedena modela (Jung et al., 2010).

Iako postoji puno dostupnih podataka kako pripremiti mišji model ksenografta sa stanicama uzgojenim u 2D uvjetima, to nije bio slučaj za stanice uzgojene u 3D uvjetima. U laboratoriju u kojem sam radio ovaj rad, u zadnjih desetak godina uspostavljen je humani model ksenografta. U tom modelu je određen broj stanica koji se inokulira u životinje, u kojem volumenu te u kojem vremenskom periodu se prati rast tumora i kad završava studija.

Broj životinja koje su razvile mjerljivi ksenograft je bio puno manji kod životinja koje su primile stanice uzgojene u 3D uvjetima. Iako su obje vrste inokuluma dane u istoj koncentraciji subkutano, kod razudbe životinja primjećeno je da su tumori nastali iz stanica uzgojenih u 3D uvjetima ušli puno dublje u tkivo u odnosu na ksenografte nastale iz kulture stanica u 2D uvjetima te zbog toga nije mogao biti praćen rast tumora kroz vrijeme. Razlog agresivnijem prodiranju 3D ksenografta mogao bi biti zbog adhezijskih molekula koje bi se mogle bolje eksprimirati na stanicama uzgajanim u 3D uvjetima, a koje nisam karakterizirao te bi u sljedećim pokusima trebalo napraviti analizu i takvih tumora.

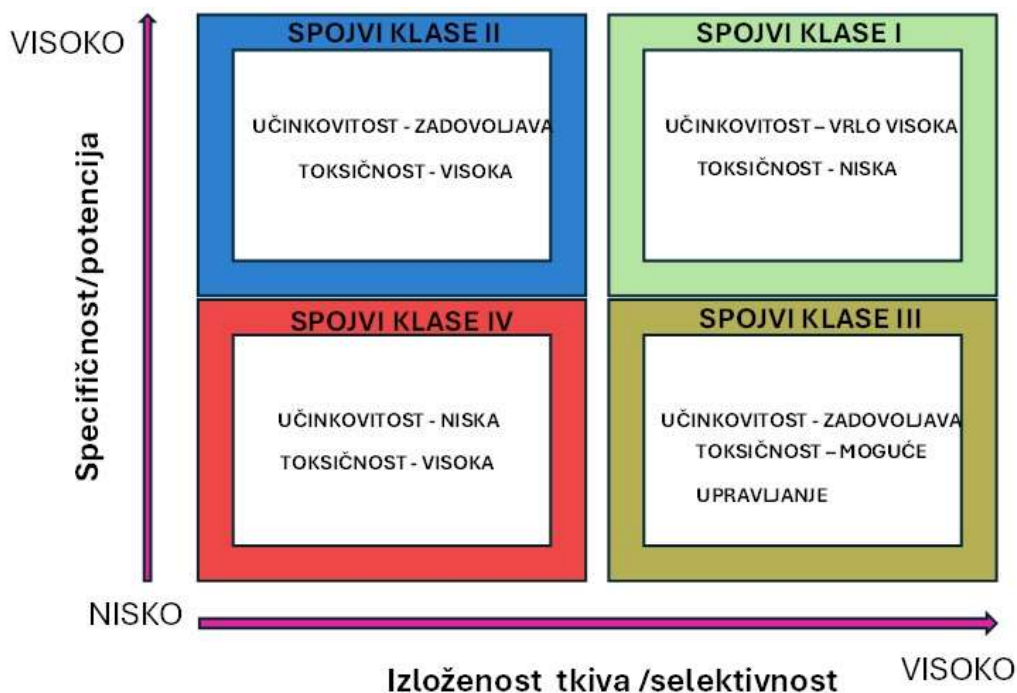
Bez obzira što broj životinja nije bio uniforman po grupama, želio sam napraviti kvantitativnu analizu. Pokazalo se da tumori nastali iz stanica uzgojenih u 3D uvjetima rastu nešto sporije u odnosu na klasični model ksenografta te da imaju manji rasap kod mjerenja veličine tumora kroz vrijeme te težine tumora na kraju pokusa. Tumori iz oba modela rastu jednakom brzinom do 25. dana nakon čega kreće eksponencijalni rast tumora nastalih is inokuluma stanica uzgojenih u 2D uvjetima. Ovaj rezultat bi značio da bi se životinje s ksenograftima iz 3D uvjeta duže mogle tretirati s testnim spojevima jer je rast tumora sporiji te bi se na taj način dalo više vremena novim spojevima da djeluju u *in vivo* uvjetima. Budući da nisam imao podatke o toksičnosti testiranih spojeva, u pokosu je korištena najmanja doza s obzirom na rezultate dobivene u farmakokinetičkoj analizi.

Usporedba krivulja rasta inokuluma iz 2D i 3D staničnih kultura pokazala je da su 3D tumori nešto sporije rasli i imali manji rasap veličine i težine tumora. Isto se pokazalo za težine tumora gdje se pokazalo da su tumori iz 2D bili teži u odnosu na 3D.

Literaturno je poznato da su tumorski modeli u miševa limitirani veličinom tumora i samim stanjem životinja zbog čega je ograničeno vrijeme tretmanom spojevima (ref). Uspoređujući rast ksenografta tumora 3D kao i niže težine netretiranih tumora mogu biti prednost u produljenom tretmanu miševa sa supstancom te se time povećava šansa da supstanca pokaže statistički značajnu inhibiciju rasta tumora. Time bi korištenjem ksnograta iz 3D bili prednost u korištenju u modelu mišjih ksenografta.

Težina tumora može biti posljedica povećane nekroze i količine vode u samom ksenograftu zbog količine upalnih procesa. Patohistološkom usporedbom ksenografta iz netretiranih životinja inokuliranim sa stanicama uzgojenim i u 2D i u 3D ustanovio sam da kvalitativno nema nikakve razlike u njihovom izgledu. Tumorske promjene se podudaraju u životinja inokuliranim sa stanicama uzgojenim u 2D i u 3D uvjetima. S obzirom na navedeno, patohistološka analiza nije limitirajući faktor za korištenje 3D inokuluma u daljnjem korištenju ovog modela.

U klasičnom modelu ksenografta kojem su za inokulum korištene stanice uzgojene u 2D uvjetima testirao sam 2 spoja, LM-1a iz amidinske serije i CR-2 iz furanske serije. (Sun et al., 2022)



**Slika 42.** Prikaz STAR modela (engl. *Structure–tissue selectivity/exposure–activity relationship*) za odabir supsatnce u ranoj fazi R&D procesa za daljnju optimizaciju i farmakološko profiliranje. Za spojeve klase I i III potrebna je mala doza za učinkovito djelovanje dok je za spojeve klase II i IV za željeni učinak potrebna visoka doza. Pri tom se spojevi klase IV u pravilu ne uzimaju u faze daljnjeg farmakološkog profiliranja (prilagođeno iz (Sun et al., 2022))

U istom modelu testirao sam vehicle (koji) koji nije znatno utjecao na promjenu rasta tumora pa ga u daljnjoj obradi rezultata nisam prikazao. Nisam dobio nikakve značajne razlike između tretiranih i netretiranih životinja.

Usporedba rasta i težina ksenografta iz 3D modela pokazala je da ksenograft nešto brže raste u odnosu na netretirane što je pokazalo i mjerenje težine tumora na dan žrtvovanja.

Analiza koncentracije supstance LCms/MS metodom u plazmi i tumoru pokazala je da je koncentracija supstance LM-1a statistički značajno povišena u plazmi životinja inokuliranih stanicama uzgojenih u 3D uvjetima u odnosu na 2D ksenografta. Što se tiče koncentracije iste supstance u tumoru, može se zaključiti istu tendenciju nakupljanja u tumoru u odnosu na 2D. dok supstanca CR-2 nije bila detektirana ni u plazmi ni u tumoru. Daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena na dokazivanje pokazanih rezultata sa većim brojem životinja i većim brojem supstanci, kako bi se moglo zaključiti da tumorski model s stanicama uzgojenim u 3D uvjetima ima prednost u odnosu na klasični model kako bi se nove molekule mogle dalje profilirati.

#### Protočna citometrija

Broj dobivenih stanica iz tumora može se činiti pretjerano velik. Razlog bi mogao biti u uređaju koji je korišten za mjerenje broja izoliranih stanica iz tumora u suspenziji. Sysmex XN350 je prvenstveno kalibriran na hematološke stanice te pokazuje manju preciznost na drugim vrstama

stanica. U ovom radu dobio sam nekoliko zanimljivih rezultata povezanih s infiltracijom imunoloških stanica u tumor.

Tumorski mikrookoliš predstavlja složen i dinamičan sustav koji okružuje tumorske stanice i aktivno sudjeluje u razvoju i napredovanju raka. Sastoji se od različitih komponenti, uključujući tumorske stanice, matične stanice raka, fibroblaste povezane s rakom, pericite, imunološke i upalne stanice, kao i izvanstanični matriks s pripadajućim faktorima rasta. Važan dio tumorskog mikrookoliša čine i tumor-infiltrirajući leukociti, koji se nalaze unutar tumora i njegove okoline. Oni imaju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru na tumor, ali i u određivanju prognoze bolesti. Njihov učinak ovisi o tipu i funkciji pojedinih stanica. Povećan broj određenih populacija, poput dendritičkih stanica, prirodnih stanica ubojica (NK stanica), T limfocita i B limfocita, često je povezan s boljim kliničkim ishodima. Nasuprot tome, prisutnost većeg broja imunoloških stanica s imunosupresivnim ili protumorski nepovoljnim djelovanjem, kao što su neutrofili, monociti i regulatorni T limfociti, može biti povezana s lošijom prognozom (Brummel et al., 2023; Lança & Silva-Santos, 2012).

CD8<sup>+</sup> citotoksični T limfociti glavni su efektori u solidnim i hematološkim malignim bolestima, a njihova tumoricidna aktivnost posredovana je citokinima poput IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Međutim, trajna izloženost antigenu u TME često izaziva iscrpljenost T stanica - disfunkcionalno stanje obilježeno pojačanom regulacijom inhibitornih receptora poput PD-1 i CTLA-4 te smanjenom proizvodnjom efektorskih citokina. Inhibitori imunoloških kontrolnih točaka koji ciljaju ove puteve pokazali su značajan uspjeh u ponovnom oživljavanju TIL odgovora u solidnim tumorima, dok je njihova primjena u hematološkim malignim bolestima i dalje manje robusna. Značajno je da prisutnost terciarnih limfoidnih struktura (TLS) unutar solidnih tumora korelira s pojačanom aktivacijom TIL-a i poboljšanim kliničkim ishodima, jer ovi ektopični limfoidni agregati olakšavaju lokalnu prezentaciju antigena i pripremu T stanica

Analizom različitih populacija imunoloških stanica u tumorima primjetio sam da je povećana frekvencija citotoksičnih T limfocita u životinjama tretiranim s LM-1a spojem u odnosu na netretirane životinje, bez obzira na tip inokuluma (2D ili 3D). Uz to, povećana je frekvencija i ukupni broj dendritičnih stanica u životinja koje su inokulirane sa stanicama uzgojenim u 3D uvjetima te su tretirane s Lm-1a spojem. Kad se ovi rezultati povežu s povećanom proliferacijom leukocita u životinja koje su inokulirane sa stanicama uzgojenim u 3D uvjetima i koje su tretirane s Lm-1a spojem moglo bi se zaključiti da spoj LM-1a potiče imunološku reakciju u samom tumoru. Kako nisam koristio markere za detekciju molekula kontrolnih točaka poput PD-1 i TIM-3 koje doprinose ranoj funkcionalnoj iscrpljenosti ne mogu sa sigurnošću tvrditi da je ovakva imunološka reakcija protumorska iako bi visoka gustoća citotoksičnih T limfocita i dendritičnih stanica to trebala potvrditi jer korelira s povoljnom prognozom kod mnogih vrsta tumora (Coënon et al., 2024; Kazemi et al., 2022; Piroozkhah et al., 2023).

Zanimljivo je da se frekvencija CD4<sup>+</sup> T limfocita povećala u životinja tretiranim s LM-1a spojem u odnosu na netretirane životinje iako nije bilo očekivano da T limfociti imaju značajniju ulogu u ovom modelu (J. Chen et al., 2022). Značajnija razlika je primjećena kod tretiranih životinja inokuliranih s stanicama uzgojenim u 3D uvjetima u odnosu na 2D.

Analizom rezultata također je uočeno je kako spoj 6a/LM-1a značajno smanjuje učestalost tumor infiltrirajućih makrofaga ( $CD45^+ CD11b^+ F4/80^+$ ) kod miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima. Smanjenje učestalosti infiltrirajućih makrofaga bilo je izraženije kod miševa inokuliranih s A549 stanicama uzgojenim u 3D uvjetima. Unutar tumorskog mikrookoliša postoje dva tipa makrofaga, protumorski i protutumorski. M1 makrofazi djeluju protutumorski, a M2 makrofazi protumorski potičući rast i progresiju tumora. U literaturi se spominje CD206 kao marker za razlikovanje M2 makrofaga (Cortese et al., 2020). Budući da nisam koristio protutijela kojima bih razlikovao M1 i M2 makrofage ne mogu zaključiti na koju vrstu makrofaga je spoj 6a/Lm-1a djelovao.

Dobiveni rezultati pokazuju tendenciju da spoj bolje djeluje u 3D uvjetima, ali rezultati su individualno vezani po mišu te broj analiziranih miševa po grupi nije dovoljan za donošenje konačnog zaključka. U idućim pokusima bi trebalo imati više životinja po grupi, više različitih protutijela za detekciju više subpopulacija kojima bi se točno utvrdila vrsta stanica u tumoru te možda i druge organe (kao limfne čvorove povezane s tumorom) kojim bi se dala sveobuhvatnija slika za inokulume nastale iz 3D uvjeta.

#### Apoptoza

Indukcija apoptoze u tumorskim stanicama predstavlja ključni mehanizam smanjenja tumorskog rasta u ksenograft modelima, budući da ravnoteža između proliferacije i stanične smrti određuje progresiju tumora. Aktivacija kaspaza dovodi do eliminacije tumorskih stanica i smanjenja proliferacije, dok poremećaji apoptotskih puteva doprinose rastu tumora (Carneiro & El-Deiry, 2020; Y. Chen et al., 2019). Iako se LM-1a akumulira u tumorima nastalim inokulacijom stanica nastalih u 3D uvjetima nije se postigla dovoljna koncentracija spoja u tumoru za djelovanje na stanice.

Proliferacija stanica u uzorku tumora je praćena s Ki-67, staničnim markerom za proliferaciju. Na patohistološkim rezovima je primjećeno da nema značajne razlike u proliferaciji između tumora nastalih inokulacijom stanica uzgojenih u 2D uvjetima i 3D uvjetima, tako da bi se 3D model mogao koristiti za buduće pokuse.

Dobiveni rezultati za indeks proliferacije određen histološkom metodom i metodom protočne citometrije također se preklapaju te bi se obje metode mogle koristiti za praćenje proliferacije u ovakvoj studiji. Prednost protočne citometrije je u tome što se točno može odrediti koja populacija stanica proliferira. Proliferativni indeks je bio najviši kod imunoloških stanica u životinja koje su inokulirane sa stanicama uzgojenim u 3D uvjetima te su tretirane s Lm-1a spojem (Slika 39,  $p = 0.0357$ ).

Patohistološkom analizom tumora primjećeno je da je nekroza manja u životinja koje su inokulirane sa stanicama uzgojenim u 3D uvjetima. Uz to, koncentracija IL-6 je značajno manja u životinja koje su inokulirane sa stanicama uzgojenim u 3D uvjetima. IL-6 potiče rast tumora pojačavanjem izbjegavanja imunološkog odgovora i suzbijanjem infiltracije imunoloških stanica u tumore, dok njegova inhibicija dovodi do smanjenog rasta tumora i povećane infiltracije imunoloških stanica (Kwon & Hui, 2024; Song et al., 2014). Ovi rezultati se podudaraju sa rezultatima za rast i težinu tumora. U kontekstu mišjeg modela ksenografta,

ovakvi rezultati bi pogodovali uvođenju inokuluma nastalog u 3D uvjetima jer bi životinje duže živjele bez da im se dodatno naruši zdravstveno stanje te bi dalo više vremena novim kemijskim entitetima da djeluju unutar životinja.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Uvođenje testiranja na 3D staničnim kulturama u ranu fazu testiranja NKE probira aktivnih molekula sa potencijalnim antitumorskim djelovanjem, dovodi do poboljšanja i unapređenja samog procesa jer su uvjeti testiranja sličniji prirodnim uvjetima stanica u organizmu.
2. Zbog nedostatka validiranih metoda i usklađenih protokola, te mnogobrojnih modela koji se koriste u laboratorijima diljem svijeta, u detektiranju aktivnih molekula sa potencijalnim antitumorskim djelovanjem, testiranja na 3D staničnim modelima ne mogu biti jedini test koji se provodi, te je najbolje provesti oba testiranja istih supstanci na tradicionalnim 2D staničnim kulturama i 3D staničnim kulturama bilo da se 3D testiranje razvije kao primarni ili sekundarni probir (u kojem se testiraju samo supstance koje su pokazale aktivnost u 2D uvjetima).
3. Metoda „viseće kapi“ (od engl. *hanging-drop*) vrlo je prikladna za uvođenje u ranu fazu testiranja NKE sa potencijalnim antitumorskim djelovanjem i moguće ju je uspješno validirati na sferidnim 3D kulturama *in vitro*.
4. Prednost same metode je izostanak interakcije NKE sa nekim polimernim molekulama kojim su obložene jažice ili nekim drugim nosačima koji omogućuju sferični rast stanica. U tako ranoj fazi to je presudno jer se ne zna puno o stabilnosti spojeva, fizikalno-kemiskim svojstvima, te potencijalnim interakcijama s drugim spojevima i stvaranjima kemijskih ostataka, koji mogu imati željeno djelovanje i/ili povećati toksičnost same supstance.
5. Metoda „viseće kapi“ vrlo je prikladna i za testiranje prvih fizikalno-kemijskih parametara NKE i dobivanja potrebne prioritete liste daljnjeg farmakološkog profiliranja aktivnih spojeva, s obzirom da je broj supstanci koje se mogu dalje profilirati često limitiran raznim resursima.
6. Mišji model stvaranja potkožnog ksenografta *in vivo* je jednostavna metoda čija je prednost lako praćenje rasta tumora od inicijacije do završetka terapije NKE. Prednosti ksenografta formiranih od staničnih linija uzgojenih u 3D uvjetima su: manji broj miševa koji su odbacili tumor u odnosu na ksenografte formirane od staničnih linija uzgojenih u 2D uvjetima, kao i bolji opći zdravstveni status životinja (niži IL-6 u sistemske cirkulaciji) što omogućuje duži tretman određenom supstancom ne narušavajući pravila o dobrobiti životinja. Time se supstanci daje veća šansa da pokaže učinkovitost.
7. Mjerenje rasta samog tumora nije prednost korištenja staničnih linija uzgojenih u 3D uvjetima jer se pokazalo da takvi tumori rastu više u dubinu životinje i time ne postaju palpabilni. Stoga je potrebno uvesti drugu metodu mjerenja rasta tumora poput raznih slikovnih metoda cijelog miša (engl. *whole-mouse imaging*) koje obuhvaćaju niz tehnika koje omogućuju vizualizaciju anatomije, funkcionalnih procesa ili molekularnih promjena unutar cijelog tijela laboratorijskog miša.
8. Najveća prednost u primjeni ksenografta dobivenih staničnim inokulumom dobivenim iz uzgoja stanica u 3D uvjetima pokazana je u analizi koncentracije spojeva u plazmi i tumoru tretiranih miševa te je bitna u procesu odabira predkliničkog kandidata. Potrebno ju je dodatno validirati na većem broju životinja.

9. Imunofenotipizacija infiltriranih stanica u mišje ksenografte dobivene stanicama uzgojenim u 2D i 3D uvjetima uglavnom je bila podjednaka, međutim vidljivo je da je brojnost viabilnih stanica nešto veća u tumorima dobivenih stanicama uzgojenim 3D uvjetima. Osim toga, moguće je promatrati status staničnog ciklusa (apoptoza vs proliferacija; te raznih faza procesa apoptoze) upotrebom metode protočne citometrije te se time može izbjeći upotreba većeg broja životinja koje prolaze imunohistokemisku i patohistološku analizu. Te bi se analize radile isključivo za manji broj uzoraka čime bi se ekspertiza mogla usmjeriti na mehanizme djelovanja i patofiziološke promjene.

## 7. OBJAVLJENI RADOVI IZ DOKTORSKOG RADA

1. Brajša K, Jelić D, Trzun M, **Zlatař I**, Vujasinović I, Karminski-Zamola G, Hranjec M: 2D and 3D in vitro antitumor activity of amidino substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a]quinoline derivatives. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 2016.; 6: 1139-1145 doi:10.3109/14756366.2015.1101093
2. Brajša K, Trzun M, **Zlatař I**, Jelić D: Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Periodicum bibliogorum*, 2016; 118: 59-65 doi:10.18054/pb.2016.118.1.3940
3. **Zlatař I**, Jelić D, Kelava V, Cindrić Jarak I, Koštrun S, Karminski-Zamola G, Gabelica Marković V, Hranjec M, Brajša K. Comparison of antitumor activity of some Benzothiophene and Thienothiophene Carboxanilides and Quinolones in 2D and 3D cell culture system. *Croatica chemica acta*. 2017; 90: 413-424 doi:10.5562/cca3139
4. Perin N, Bobanović K, **Zlatař I**, Jelić D, Kelava V, Koštrun S, Gabelica Marković V, Brajša K, Hranjec M: Antiproliferative activity of amino substituted benzo[b]thieno[2,3-b]pyrido[1,2-a]benzimidazoles explored by 2D and 3D cell culture system. *European journal of medicinal chemistry*, 2017.; 125: 722-735 doi:10.1016/j.ejmech.2016.09.084
5. Racané L, Cindrić M, **Zlatař I**, Kezele T, Milić A, Brajša K, Hranjec M: Preclinical in vitro screening of newly synthesised amidino substituted benzimidazoles and benzothiazole. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2021.; 36: 163-174 doi:10.1080/14756366.2020.1850711
6. Racané L, **Zlatař I**, Perin N, Cindrić M, Radovanović V, Banjanac M, Shanmugam S, Radić Stojković M, Brajša K, Hranjec M: Biological activity of newly synthesized benzimidazole and benzothiazole 2,5-disubstituted furane derivatives// *Molecules*, 26 (2021), 16; 4935, 21 doi:10.3390/molecules26164935
7. Perin N, Cindrić M, **Zlatař I**, Persoons L, Daelemans D, Radovanović V, Banjanac M, Brajša K, Hranjec M: Biological evaluation of novel bicyclic heteroaromatic benzazole derived acrylonitriles: synthesis, antiproliferative and antibacterial activity // *Medicinal chemistry research*, 31 (2022), 8; 1339-1350 doi:10.1007/s00044-022-02915-w
8. **Zlatař I**, Bujan F, Hrvačić B, Božić B, Tavčar B, Bencetić V, Antolić M, Milutinović V, Čužić S, Racané L, Hranjec M, Brajša K: *Characterization of mice xenografts induced by A549 tumor cell inoculum prepared in 2D and 3D conditions. ( in progress)*

## 8. KONGRESNA PRIOPĆENJA IZ DOKTORSKOG RADA

1. **Zlatar I**, Jelić D, Perin N, Bobanović K, Hranjec M, Brajša K. Comparison of antitumor activity of some benzothiophene, thienothiophene, carboxanilides and quinolones in 2D and 3D cell culture. Tumour Microenvironment and Signalling; EMBL Heidelberg, Germany; 3 - 6 April 2016.
2. Perin, Nataša; Bobanović, Kristina; Brajša K; Jelić D, **Zlatar I**; Hranjec M: Antitumor activity of novel amino substituted pentacyclic benzimidazole derivatives tested in 2D and 3D cell culture system // 17th Tetrahedron Symposium Challenges in Biological, Bioorganic, Organic & Medicinal Chemistry, Sitges, Španjolska 2016.; Sitges, Španjolska: Elsevier, 2016. str. 16-16 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Cindrić M, Racane L, Nataša P, Boček I, Beč A, **Zlatar I**, Brajša K, Hranjec M: 26. Antiproliferativna aktivnost amidino supstituiranih benzimidazola I benzotiazola ispitana 2D I 3D stabničnim linijama. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka / Galić, Nives; Rogošić, Marko (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2019. str. 116-116 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Racané L, **Zlatar I**, Perin N, Cindrić M, Radovanović V, Banjanac V, Butković K, Shanmugam S, Radić Stojković M, Brajša K, Hranjec, M: Biological activity of benzimidazole and benzothiazole 2,5-disubstituted furane derivatives // 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog : Book of Abstracts / Marković, Dean ; Meštrović, Ernest ; Namjesnik, Danijel ; Tomašić, Vesna (ur.). Zagreb: Croatian Chemical Society, 2021. str. 130-130 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

## 9. LITERATURA

- A. Musa, M., Zhou, A., & A. Sadik, O. (2012). Synthesis and Antiproliferative Activity of New Coumarin-Based Benzopyranone Derivatives Against Human Tumor Cell Lines. *Medicinal Chemistry*, 7(2). <https://doi.org/10.2174/157340611794859280>
- Ahmadvand, S., Faghih, Z., Montazer, M., Safaei, A., Mokhtari, M., Jafari, P., Talei, A. R., Tahmasebi, S., & Ghaderi, A. (2019). Importance of CD45RO+ tumor-infiltrating lymphocytes in post-operative survival of breast cancer patients. *Cellular Oncology*, 42(3). <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00430-6>
- Akshara, K. T., Prasanth, S. S., Jisha, U., Sanooja, P. K., Sibina, M. K., Riya Rajan, Ajay, A., & Mohamed Farooq, P. (2024). Protein Binding In Drug Development: A Systematic Review Of Mechanisms, Pharmacokinetics, And Clinical Implications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 02(08).
- Almazrouei, K. M., Mishra, V., Pandya, H., Sambhav, K., & Bhavsar, S. N. (2025). Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Progression: An Integrative Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.92707>
- Arisa, O. T., Beatson, E. L., Reno, A., Chau, C. H., Aurigemma, R., Steeg, P. S., & Figg, W. D. (2024). Navigating the oncology drug discovery and development process with programmes supported by the National Institutes of Health. In *The Lancet Oncology* (Vol. 25, Number 12). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(24\)00348-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(24)00348-6)
- Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 7, Number 10). <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>
- Aryal, S., Park, S., Park, H., Park, C., Kim, W. C., Thakur, D., Won, Y. J., & Key, J. (2023). Clinical Trials for Oral, Inhaled and Intravenous Drug Delivery System for Lung Cancer and Emerging Nanomedicine-Based Approaches. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 18). <https://doi.org/10.2147/IJN.S432839>
- Ascic, E., Åkerström, F., Nair, M. S., Rosa, A., Kurochkin, I., Zimmermannova, O., Catena, X., Rotankova, N., Veser, C., Rudnik, M., Ballocci, T., Schärer, T., Huang, X., de Rosa Torres, M., Renaud, E., Santiago, M. V., Met, Ö., Askmyr, D., Lindstedt, M., ... Pereira, C. F. (2024). In vivo dendritic cell reprogramming for cancer immunotherapy. *Science*, 386(6719). <https://doi.org/10.1126/science.adn9083>
- Asthana, A., & Kisaalita, W. S. (2013). Biophysical microenvironment and 3D culture physiological relevance. In *Drug Discovery Today* (Vol. 18, Numbers 11–12). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.12.005>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn,

- G. K., Braidly, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Number 3). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Attwa, M. W., Alsibae, A. M., Aljohar, H. I., Abdelhameed, A. S., & Kadi, A. A. (2023). Development of a Fast and Sensitive UPLC–MS/MS Analytical Methodology for Fenebrutinib Estimation in Human Liver Microsomes: In Vitro and In Silico Metabolic Stability Evaluation. *Separations*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/separations10050302>
- Azargoshasb, S., Boekestijn, I., Roestenberg, M., KleinJan, G. H., van der Hage, J. A., van der Poel, H. G., Rietbergen, D. D. D., van Oosterom, M. N., & van Leeuwen, F. W. B. (2023). Quantifying the Impact of Signal-to-background Ratios on Surgical Discrimination of Fluorescent Lesions. *Molecular Imaging and Biology*, *25*(1). <https://doi.org/10.1007/s11307-022-01736-y>
- Babić, M. S., Ratković, A., Jukić, M., Glavaš-Obrovac, L., Drenjančević, D., Raić-Malić, S., & Kraljević, T. G. (2017). Synthesis, cytostatic and antibacterial evaluations of novel 1, 2, 3-triazolyl-tagged pyrimidine and furo[2, 3-d]pyrimidine derivatives. *Croatica Chemica Acta*, *90*(2). <https://doi.org/10.5562/cca3165>
- Baek, N. H., Seo, O. W., Kim, M. S., Hulme, J., & An, S. S. A. (2016). Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *OncoTargets and Therapy*, *9*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S112566>
- Baek, N., Seo, O. W., Lee, J., Hulme, J., & An, S. S. A. (2016). Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S108004>
- Bai, Y., Qiu, J., Shang, X., Liu, P., Zhang, Y., Wang, Y., Xiong, Y., & Li, T. (2015). Differential diagnosis and cancer staging of a unique case with multiple nodules in the lung - lung adenocarcinoma, metastasis of colon adenocarcinoma, and colon adenocarcinoma metastasizing to lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer*, *6*(3). <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12173>
- Baker, J. A., Altman, M. D., & Martin, I. J. (2018). Interpretation of in Vitro Metabolic Stability Studies for Racemic Mixtures. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *9*(8). <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00259>
- Baker, J. R., Russell, C. C., Gilbert, J., McCluskey, A., & Sakoff, J. A. (2021). Amino alcohol acrylonitriles as broad spectrum and tumour selective cytotoxic agents. *RSC Medicinal Chemistry*, *12*(6). <https://doi.org/10.1039/d1md00021g>
- Bar, H., & Zweifach, A. (2020). Z' Does Not Need to Be > 0.5. *SLAS Discovery*, *25*(9). <https://doi.org/10.1177/2472555220942764>

- Barot, K. P., Jain, S. V., Kremer, L., Singh, S., & Ghate, M. D. (2015). Recent advances and therapeutic journey of coumarins: Current status and perspectives. In *Medicinal Chemistry Research* (Vol. 24, Number 7). <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1350-8>
- Belani, C. P., Goss, G., & Blumenschein, G. (2012). Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 38, Number 3). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.05.009>
- Bevington, S. L., Cauchy, P., Withers, D. R., Lane, P. J. L., & Cockerill, P. N. (2017). T cell receptor and cytokine signaling can function at different stages to establish and maintain transcriptional memory and enable T helper cell differentiation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Number MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00204>
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabrielovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12(8). <https://doi.org/10.2174/0929867053507315>
- Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2018). An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.008>
- Brajša, K., Trzun, M., Zlatar, I., & Jelić, D. (2016). Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Periodicum Biologorum*, 118(1). <https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3940>
- Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 18, Numbers 5–6). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- Brummel, K., Eerkens, A. L., de Bruyn, M., & Nijman, H. W. (2023). Tumour-infiltrating lymphocytes: from prognosis to treatment selection. In *British Journal of Cancer* (Vol. 128, Number 3). <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02119-4>
- Cacciamali, A., Villa, R., & Dotti, S. (2022). 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836480>
- Cao, V. Do, Jo, D. G., Kim, H., Kim, C., Yun, S., & Joung, S. (2021). Utilization of Borane-Catalyzed Hydrosilylation as a Dearomatizing Tool: Six-Membered Cyclic Amidine

- Synthesis from Isoquinolines and Pyridines. *Synthesis (Germany)*, 53(4).  
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1707323>
- Cao, V. Do, Mun, S. H., Kim, S. H., Kim, G. U., Kim, H. G., & Joung, S. (2020). Synthesis of cyclic amidines from quinolines by a borane-catalyzed dearomatization strategy. *Organic Letters*, 22(2). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b04275>
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 17, Number 7). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Casey, A., Gargotti, M., Bonnier, F., & Byrne, H. J. (2016). Chemotherapeutic efficiency of drugs in vitro: Comparison of doxorubicin exposure in 3D and 2D culture matrices. *Toxicology in Vitro*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.022>
- Charaimuria, S., & Phukan, P. (2024). Green synthesis of N-sulfonyl amidine using a CuI-incorporated CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nano-catalyst in aqueous medium. *Green Chemistry*, 26(24). <https://doi.org/10.1039/d4gc04033c>
- Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Q., Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H. F., & Pan, Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007579>
- Chen, Y., Xu, Y., Zhu, K., Cao, Z., & Huang, Z. (2019). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand modulates angiogenesis and apoptosis to inhibit non-small cell lung carcinoma tumor growth in mice. *Journal of International Medical Research*, 47(7). <https://doi.org/10.1177/0300060519854293>
- Chin, Y.-W., Balunas, M. J., Chai, H. B., & Kinghorn, A. D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8(2). <https://doi.org/10.1007/bf02854894>
- Chowdhury, D., & Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: Granzyme pathways of programmed cell death. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 26). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>
- Chuprin, J., Buettner, H., Seedhom, M. O., Greiner, D. L., Keck, J. G., Ishikawa, F., Shultz, L. D., & Brehm, M. A. (2023). Humanized mouse models for immuno-oncology research. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 20, Number 3). <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00721-2>
- Coënon, L., Geindreau, M., Ghiringhelli, F., Villalba, M., & Bruchard, M. (2024). Natural Killer cells at the frontline in the fight against cancer. In *Cell Death and Disease* (Vol. 15, Number 8). <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06976-0>
- Cordeiro, S., Oliveira, B. B., Valente, R., Ferreira, D., Luz, A., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2024). Breaking the mold: 3D cell cultures reshaping the future of cancer research. In

*Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 12).

<https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1507388>

- Cortese, N., Carriero, R., Laghi, L., Mantovani, A., & Marchesi, F. (2020). Prognostic significance of tumor-associated macrophages: past, present and future. In *Seminars in Immunology* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101408>
- Damiani, R. M., Moura, D. J., Viau, C. M., Caceres, R. A., Henriques, J. A. P., & Saffi, J. (2016). Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. In *Archives of Toxicology* (Vol. 90, Number 9). <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1759-y>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 740). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dean, I., Lee, C. Y. C., Tuong, Z. K., Li, Z., Tibbitt, C. A., Willis, C., Gaspal, F., Kennedy, B. C., Matei-Rascu, V., Fiancette, R., Nordenvall, C., Lindfors, U., Baker, S. M., Stockmann, C., Sexl, V., Hammond, S. A., Dovedi, S. J., Mjösberg, J., Hepworth, M. R., ... Withers, D. R. (2024). Rapid functional impairment of natural killer cells following tumor entry limits anti-tumor immunity. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44789-z>
- Del Prete, A., Salvi, V., Soriani, A., Laffranchi, M., Sozio, F., Bosisio, D., & Sozzani, S. (2023). Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 20, Number 5). <https://doi.org/10.1038/s41423-023-00990-6>
- Di, L., Kerns, E. H., Hong, Y., & Chen, H. (2005). Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *International Journal of Pharmaceutics*, 297(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.022>
- Dickson, J. L., Horst, C., Nair, A., Tisi, S., Predecki, R., & Janes, S. M. (2022). Hesitancy around low-dose CT screening for lung cancer. In *Annals of Oncology* (Vol. 33, Number 1). <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.008>
- Elgemeie, G. H., & Mohamed, R. A. (2019). Microwave chemistry: Synthesis of purine and pyrimidine nucleosides using microwave radiation. In *Journal of Carbohydrate Chemistry* (Vol. 38, Number 1). <https://doi.org/10.1080/07328303.2018.1543430>
- Ferrero, M., & Gotor, V. (2000). Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides. *Chemical Reviews*, 100(12). <https://doi.org/10.1021/cr000446y>
- Fogh, J., & Giovanella, B. C. (1979). The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research. *The Quarterly Review of Biology*, 54(1). <https://doi.org/10.1086/411071>

- Fogh, J., & Giovanella, B. C. (1983). The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research. Volume 2. *The Quarterly Review of Biology*, 58(2). <https://doi.org/10.1086/413365>
- Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments*, (51). <https://doi.org/10.3791/2720>
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sauts-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Number 4). <https://doi.org/10.1038/nrc3245>
- Galieva, N. A., Saveliev, D. A., Eltsov, O. S., Bakulev, V. A., Lubec, G., Xing, J., Fan, Z., & Beryozkina, T. V. (2021). Antimicrobial activity of new benzazolyl N-sulfonyl amidines. *Mendeleev Communications*, 31(4). <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.07.019>
- Glassmann, A., Garcia, C. C., Janzen, V., Kraus, D., Veit, N., Winter, J., & Probstmeier, R. (2018). Staurosporine induces the generation of polyploid giant cancer cells in non-small-cell lung carcinoma A549 cells. *Analytical Cellular Pathology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1754085>
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Grigalunas, M., Brakmann, S., & Waldmann, H. (2022). Chemical Evolution of Natural Product Structure. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 144, Number 8). <https://doi.org/10.1021/jacs.1c11270>
- Guimaraes, A. P. P., Calori, I. R., Bi, H., & Tedesco, A. C. (2024). SpheroMold: modernizing the hanging drop method for spheroid culture. *Frontiers in Drug Delivery*, 4. <https://doi.org/10.3389/fddev.2024.1397153>
- Gustavo Lorenzo Moretta. (2026). Pharmaceutical Drug Lifecycle: A Comprehensive Scientific Review of Research and Development Phases, Attrition Rates, and Global Disparities. *Preprint.Org*.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. In *Cell* (Vol. 100, Number 1). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Number 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haycock, J. W. (2011). 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 695). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1)
- He, Y., & Wang, X. (2021). Synthesis of Cyclic Amidines by Iridium-Catalyzed Deoxygenative Reduction of Lactams and Tandem Reaction with Sulfonyl Azides. *Organic Letters*, 23(1). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03953>

- Hendriks, H. (2025). Advancing oncology drug development: Innovative approaches to enhance success rates while reducing animal testing. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1880, Number 6).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189467>
- Hikage, F., Atkins, S., Kahana, A., Smith, T. J., & Chun, T. H. (2019). HIF2A-LOX Pathway Promotes Fibrotic Tissue Remodeling in Thyroid-Associated Orbitopathy. *Endocrinology*, *160*(1). <https://doi.org/10.1210/en.2018-00272>
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. In *Cancer Research* (Vol. 79, Number 18).  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, *148*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>
- Hussain, M. I., Syed, Q. A., Khattak, M. N. K., Hafez, B., Reigosa, M. J., & El-Keblawy, A. (2019). Natural product coumarins: biological and pharmacological perspectives. In *Biologia* (Vol. 74, Number 7). <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00242-x>
- Hussain, M. K., Khatoon, S., Khan, M. F., Akhtar, M. S., Ahamad, S., & Saquib, M. (2024). Coumarins as versatile therapeutic phytomolecules: A systematic review. In *Phytomedicine* (Vol. 134). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155972>
- Ibodeng, G., Uche, I. N., Mokuia, R., Galo, M., Odigwe, B., Galeas, J. N., & Dasgupta, S. (2023). A snapshot of lung cancer: where are we now?—a narrative review. *Annals of Translational Medicine*, *11*(6). <https://doi.org/10.21037/atm-22-4479>
- Irfan, A., Batool, F., Zahra Naqvi, S. A., Islam, A., Osman, S. M., Nocentini, A., Alissa, S. A., & Supuran, C. T. (2020). Benzothiazole derivatives as anticancer agents. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Vol. 35, Number 1).  
<https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1698036>
- Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E., & Grove, J. R. (1999). MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *88*(1).  
<https://doi.org/10.1021/js9803205>
- Jong, B. K. (2005). Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 15, Number 5 SPEC. ISS.).  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.002>
- Jung, S. Y., Lee, S. H., Kang, H. B., Park, H. A., Chang, S. K., Kim, J., Choo, D. J., Oh, C. R., Kim, Y. D., Seo, J. H., Lee, K. T., & Lee, J. Y. (2010). Antitumor activity of 3,4-dihydroquinazoline

- dihydrochloride in A549 xenograft nude mice. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(22). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.020>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 16, Number 9). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4). <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Kawai, S., Tomono, Y., Ogawa, K., Sugiura, M., Yano, M., & Yoshizawa, Y. (2001). The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Research*, 21(2 A).
- Kazemi, M. H., Sadri, M., Najafi, A., Rahimi, A., Baghernejadan, Z., Khorramdelazad, H., & Falak, R. (2022). Tumor-infiltrating lymphocytes for treatment of solid tumors: It takes two to tango? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1018962>
- Kerns, E., Di, L., & Carter, G. (2008). In Vitro Solubility Assays in Drug Discovery. *Current Drug Metabolism*, 9(9). <https://doi.org/10.2174/138920008786485100>
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8). <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- Kraja, F. P., Jurisic, V. B., Hromić-Jahjefendić, A., Rossopoulou, N., Katsila, T., Mirjagic Martinovic, K., De Las Rivas, J., Diaconu, C. C., & Szöőr, Á. (2025). Tumor-infiltrating lymphocytes in cancer immunotherapy: from chemotactic recruitment to translational modeling. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 16). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1601773>
- Kwon, Y. Y., & Hui, S. (2024). IL-6 promotes tumor growth through immune evasion but is dispensable for cachexia. *EMBO Reports*, 25(6). <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00144-3>
- La Monica, S. (2022). EGFR Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. In *Cells* (Vol. 11, Number 8). <https://doi.org/10.3390/cells11081344>
- Lança, T., & Silva-Santos, B. (2012). The split nature of tumor-infiltrating leukocytes. *Oncot Immunology*, 1(5). <https://doi.org/10.4161/onci.20068>
- Larionova, I., Tuguzbaeva, G., Ponomaryova, A., Stakheyeva, M., Cherdyntseva, N., Pavlov, V., Choinzonov, E., & Kzhyshkowska, J. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.566511>

- Laumont, C. M., Banville, A. C., Gilardi, M., Hollern, D. P., & Nelson, B. H. (2022). Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 22, Number 7).  
<https://doi.org/10.1038/s41568-022-00466-1>
- Liu, H., Pang, Z., Hao, L., Sun, J., Zhang, Z., Wen, F., & Xia, C. (2021). Sulfonylimination of Proline with Sulfonylazides Involving Aldehyde-Induced Decarboxylation Coupling. *Organic Letters*, 23(4). <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c04187>
- Liu, M., Liu, L., Song, Y., Li, W., & Xu, L. (2022). Targeting macrophages: a novel treatment strategy in solid tumors. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 20, Number 1).  
<https://doi.org/10.1186/s12967-022-03813-w>
- Lowenstein, P., & Castro, M. (2009). Uncertainty in the Translation of Preclinical Experiments to Clinical Trials. Why do Most Phase III Clinical Trials Fail? *Current Gene Therapy*, 9(5).  
<https://doi.org/10.2174/156652309789753392>
- Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncology Letters*.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>
- Ma, J., Wu, Y., Ma, L., Yang, X., Zhang, T., Song, G., Li, T., Gao, K., Shen, X., Lin, J., Chen, Y., Liu, X., Fu, Y., Gu, X., Chen, Z., Jiang, S., Rao, D., Pan, J., Zhang, S., ... Gao, Q. (2024). A blueprint for tumor-infiltrating B cells across human cancers. *Science*, 384(6695).  
<https://doi.org/10.1126/science.adj4857>
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Number 7). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
- Mathur, S., & Hoskins, C. (2017). Drug development: Lessons from nature. *Biomedical Reports*, 6(6). <https://doi.org/10.3892/br.2017.909>
- Melssen, M. M., Sheybani, N. D., Leick, K. M., & Slingluff, C. L. (2023). Barriers to immune cell infiltration in tumors. In *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (Vol. 11, Number 4).  
<https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006401>
- Merie, R., Gee, H., Hau, E., & Vinod, S. (2022). An Overview of the Role of Radiotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer – A Mainstay of Treatment or a Modality in Decline? *Clinical Oncology*, 34(11). <https://doi.org/10.1016/j.clon.2022.08.024>
- Mohana, K. N., Prasanna Kumar, B. N., & Mallesha, L. (2013). Synthesis and biological activity of some pyrimidine derivatives. *Drug Invention Today*, 5(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.08.004>

- Molodtsov, A., & Turk, M. J. (2018). Tissue resident CD8 Memory T cell responses in cancer and autoimmunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Number NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02810>
- Montauti, E., Oh, D. Y., & Fong, L. (2024). CD4+ T cells in antitumor immunity. In *Trends in Cancer* (Vol. 10, Number 10). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2024.07.009>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Myler, H., Pedras-Vasconcelos, J., Phillips, K., Hottenstein, C. S., Chamberlain, P., Devanaryan, V., Gleason, C., Goodman, J., Manning, M. S., Purushothama, S., Richards, S., Shen, H., Zoghbi, J., Amaravadi, L., Barger, T., Bowen, S., Bowsher, R. R., Clements-Egan, A., Geng, D., ... Ware, M. (2022). Anti-drug Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization. *AAPS Journal*, 24(1). <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00649-y>
- Nandi, G. C., & Jesin, I. (2018). Direct Synthesis of N-Acyl Sulfonimidamides and N-Sulfonimidoyl Amidines from Sulfonimidoyl Azides. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 360(13). <https://doi.org/10.1002/adsc.201800215>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In *Journal of Natural Products* (Vol. 83, Number 3). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- OECD/European Commission. (2025). EU Country Cancer Profile: Croatia 2025. In *EU Country Cancer Profiles*. OECD Publishing.
- Ohguro, H., Watanabe, M., Sato, T., Nishikiori, N., Umetsu, A., Higashide, M., Yano, T., Suzuki, H., Miyazaki, A., Takada, K., Uhara, H., Furuhashi, M., & Hikage, F. (2024). Application of Single Cell Type-Derived Spheroids Generated by Using a Hanging Drop Culture Technique in Various In Vitro Disease Models: A Narrow Review. In *Cells* (Vol. 13, Number 18). <https://doi.org/10.3390/cells13181549>
- Okada, S., Vaeteewoottacharn, K., & Kariya, R. (2019). Application of highly immunocompromised mice for the establishment of patient-derived xenograft (PDX) models. In *Cells* (Vol. 8, Number 8). <https://doi.org/10.3390/cells8080889>
- Orimo, A., & Weinberg, R. A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 6, Number 4). <https://doi.org/10.4161/cbt.6.4.4255>
- Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. In *Nature* (Vol. 217, Number 5126). <https://doi.org/10.1038/217370a0>
- Pantelouris, E. M., & Hair, J. (1970). Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 24(3). <https://doi.org/10.1242/dev.24.3.615>

- Park, B., Abdel-Azeem, A., Al-Sanea, M., Yoo, K., Tae, J., & Lee, S. (2013). Staurosporine Analogues from Microbial and Synthetic Sources and Their Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, 20(31). <https://doi.org/10.2174/09298673113209990176>
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010 9:3, 9(3), 203–214. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
- Pavlinac, I. B., Persoons, L., Beč, A., Vrban, L., Daelemans, D., Vianello, R., & Hranjec, M. (2025). Synthesis of novel imino-coumarin and acrylonitrile 2-benzazole hybrids as potent anticancer agents targeting tubulin. *Bioorganic Chemistry*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107991>
- Perin, N., Cindrić, M., Zlatar, I., Persoons, L., Daelemans, D., Radovanović, V., Banjanac, M., Brajša, K., & Hranjec, M. (2022). Biological evaluation of novel bicyclic heteroaromatic benzazole derived acrylonitriles: synthesis, antiproliferative and antibacterial activity. *Medicinal Chemistry Research*, 31(8). <https://doi.org/10.1007/s00044-022-02915-w>
- Piroozkhah, M., Gholinezhad, Y., Piroozkhah, M., Shams, E., & Nazemalhosseini-Mojarad, E. (2023). The molecular mechanism of actions and clinical utilities of tumor infiltrating lymphocytes in gastrointestinal cancers: a comprehensive review and future prospects toward personalized medicine. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1298891>
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. In *Cell* (Vol. 141, Number 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Racané, L., Cindrić, M., Zlatar, I., Kezele, T., Milić, A., Brajša, K., & Hranjec, M. (2021). Preclinical in vitro screening of newly synthesised amidino substituted benzimidazoles and benzothiazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1850711>
- Racané, L., Rep, V., Kraljević Pavelić, S., Grbčić, P., Zonjić, I., Radić Stojković, M., Taylor, M. C., Kelly, J. M., & Raić-Malić, S. (2021). Synthesis, antiproliferative and antitrypanosomal activities, and DNA binding of novel 6-amidino-2-arylbenzothiazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1959572>
- Racané, L., Stojković, R., Tralić-Kulenović, V., Cerić, H., Crossed D Signaković, M., Ester, K., Krpan, A. M., & Stojković, M. R. (2014). Interactions with polynucleotides and antitumor activity of amidino and imidazolyl substituted 2-phenylbenzothiazole mesylates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.072>

- Racané, L., Zlatar, I., Perin, N., Cindrić, M., Radovanović, V., Banjanac, M., Shanmugam, S., Stojković, M. R., Brajša, K., & Hranjec, M. (2021). Biological activity of newly synthesized benzimidazole and benzothiazole 2,5-disubstituted furane derivatives. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164935>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 182, Number 3). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Shri, M., Agrawal, H., Rani, P., Singh, D., & Onteru, S. K. (2017). Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01355-6>
- Siegel, R. L., Kratzer, T. B., Giaquinto, A. N., Sung, H., & Jemal, A. (2025). Cancer statistics, 2025. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 75(1). <https://doi.org/10.3322/caac.21871>
- Siegfried, J. M., Gubish, C. T., Rothstein, M. E., Henry, C., & Stabile, L. P. (2012). Combining the multitargeted tyrosine kinase inhibitor vandetanib with the antiestrogen fulvestrant enhances its antitumor effect in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(3). <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824177ea>
- Simoens, S., & Huys, I. (2021). R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.760762>
- Sleire, L., Førde-Tislevoll, H. E., Netland, I. A., Leiss, L., Skeie, B. S., & Enger, P. Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. In *Pharmacological Research* (Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.013>
- Ślarczyńska, K., Gunia-Krzyzak, A., Koczurkiewicz, P., Wójcik-Pszczółka, K., Zelaszczyk, D., Popiół, J., & Pękała, E. (2019). Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities. In *Acta Pharmaceutica* (Vol. 69, Number 3). <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0024>
- Smazynski, J., & Webb, J. R. (2018). Resident memory-like tumor-infiltrating lymphocytes (TILRM): Latest players in the immuno-oncology repertoire. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Number JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01741>
- Song, L., Smith, M. A., Doshi, P., Sasser, K., Fulp, W., Altiock, S., & Haura, E. B. (2014). Antitumor efficacy of the anti-interleukin-6 (IL-6) antibody siltuximab in mouse xenograft models of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(7). <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000193>
- Srikrishna, D., Godugu, C., & Dubey, P. K. (2016). A Review on Pharmacological Properties of Coumarins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(2). <https://doi.org/10.2174/1389557516666160801094919>

- Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. In *Life Sciences* (Vol. 278). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., & Carotti, A. (2018). Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. In *Molecules* (Vol. 23, Number 2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020250>
- Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 12, Number 7). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- Tai, S., & Fantegrossi, W. E. (2014). Synthetic Cannabinoids: Pharmacology, Behavioral Effects, and Abuse Potential. In *Current Addiction Reports* (Vol. 1, Number 2). <https://doi.org/10.1007/s40429-014-0014-y>
- Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. In *Journal of Experimental Pharmacology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>
- Testa, B., Crivori, P., Reist, M., & Carrupt, P. A. (2000). The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. In *Perspectives in Drug Discovery and Design* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1023/A:1008741731244>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. In *Wspolczesna Onkologia* (Vol. 25, Number 1). <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7). <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- Tianyang Wang, Ming Liu, Benji Peng, Xinyuan Song, Charles Zhang, Xintian Sun, Qian Niu, Junyu Liu, Silin Chen, Keyu Chen, Ming Li, Pohsun Feng, Ziqian Bi, Yunze Wang, Yichao Zhang, Cheng Fei, Lawrence K. Q. Yan, Ziyuan Qin, Riyang Bao, & Zekun Jiang. (2026). From Bench-to-Bedside: A Review of Clinical Trials in Drug Discovery and Development. *BIOI*, 7(1). <https://doi.org/DOI:10.15212/bioi-2025-0198>
- Toledo, L. M., Lydon, N. B., & Elbaum, D. (2022). The Structure-Based Design of ATP-Site Directed Protein Kinase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 6(9). <https://doi.org/10.2174/092986730609220401150028>
- Travis, W. D., Fouad, G. V. S., Al-Dayel, H., Bubendorf, L., Chung, J.-H., & Rekhtman, N. (2021). WHO Classification of Tumours (online) Thoracic tumours (5th ed.) / Tumours of the lung / Small diagnostic samples. In *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours [Internet]* (Vol. 5).

- Travis William D. (2021). *Thoracic Tumours* (5th ed., Vol. 5). International Agency for Research of Cancer.
- Urzi, O., Gasparro, R., Costanzo, E., De Luca, A., Giavaresi, G., Fontana, S., & Alessandro, R. (2023). Three-Dimensional Cell Cultures: The Bridge between In Vitro and In Vivo Models. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Number 15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512046>
- van Rijt, A., Stefanek, E., & Valente, K. (2023). Preclinical Testing Techniques: Paving the Way for New Oncology Screening Approaches. In *Cancers* (Vol. 15, Number 18). <https://doi.org/10.3390/cancers15184466>
- Vicini, P., Geronikaki, A., Incerti, M., Busonera, B., Poni, G., Cabras, C. A., & La Colla, P. (2003). Synthesis and biological evaluation of benzo[d]isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11(22). [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00493-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00493-0)
- Vincent, F., Nueda, A., Lee, J., Schenone, M., Prunotto, M., & Mercola, M. (2022). Phenotypic drug discovery: recent successes, lessons learned and new directions. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 21, Number 12). <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00472-w>
- Volpe, D. A. (2011). Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 3, Number 16). <https://doi.org/10.4155/fmc.11.149>
- Wada, K., Goto, M., Lee, K. H., & Yamashita, H. (2023). Antiproliferative Effect of N-Heterocyclo-Coumarin Derivatives against Multidrug-Resistant Cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 71(1). <https://doi.org/10.1248/cpb.c22-00585>
- Wadman, M. (2023). FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science*, 379(6628). <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>
- Wagner, J. A., Rosario, M., Romee, R., Berrien-Elliott, M. M., Schneider, S. E., Leong, J. W., Sullivan, R. P., Jewell, B. A., Becker-Hapak, M., Schappe, T., Abdel-Latif, S., Ireland, A. R., Jaishankar, D., King, J. A., Vij, R., Clement, D., Goodridge, J., Malmberg, K. J., Wong, H. C., & Fehniger, T. A. (2017). CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *Journal of Clinical Investigation*, 127(11). <https://doi.org/10.1172/JCI90387>
- Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F. X. C., Mu, J., Li, J., Yao, H., & Chen, K. (2023). Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. In *Cancer Medicine* (Vol. 12, Number 10). <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>
- Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., Pairaudeau, G., Pennie, W. D., Pickett, S. D., Wang, J., Wallace, O., & Weir, A. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies.

- In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 14, Number 7).  
<https://doi.org/10.1038/nrd4609>
- Waskiewicz, M. J. (2012). Regulatory guidelines for the development of a biotechnology drug product. In *Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic*.  
<https://doi.org/10.1533/9781908818102.115>
- Wei, S. C., Duffy, C. R., & Allison, J. P. (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. In *Cancer Discovery* (Vol. 8, Number 9).  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Number 8). <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- Wlodkowic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 559.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5_2)
- Wolf, N. K., Kissiov, D. U., & Raulet, D. H. (2023). Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 23, Number 2). <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00732-1>
- Xie, J., Xu, K., Cai, Z., Chen, M., Jiang, Y., Ye, J., Lin, X., Lv, T., & Zhan, P. (2024). Efficacy and safety of first-line PD-L1/PD-1 inhibitors in limited-stage small cell lung cancer: a multicenter propensity score matched retrospective study. *Translational Lung Cancer Research*, 13(3). <https://doi.org/10.21037/tlcr-24-24>
- Xu, C., Li, X., Liu, P., Li, M., & Luo, F. (2019). Patient-derived xenograft mouse models: A high fidelity tool for individualized medicine (review). In *Oncology Letters* (Vol. 17, Number 1). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9583>
- Xu, X., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. In *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Number 7).  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.009>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zhang, Y., Ji, S., Miao, G., Du, S., Wang, H., Yang, X., Li, A., Lu, Y., Wang, X., & Zhao, X. (2024). The current role of dendritic cells in the progression and treatment of colorectal cancer. In *Cancer biology & medicine* (Vol. 21, Number 9). <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0188>

Zhong, T., Sun, S., Zhao, M., Zhang, B., & Xiong, H. (2025). The mechanisms and clinical significance of CD8+ T cell exhaustion in anti-tumor immunity. In *Cancer biology & medicine* (Vol. 22, Number 5). <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0628>

Zhou, J., Xu, Y., Liu, J., Feng, L., Yu, J., & Chen, D. (2024). Global burden of lung cancer in 2022 and projections to 2050: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Cancer Epidemiology*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2024.102693>

Zlatar, I., Jelić, D., Kelava, V., Cindrić, M., Jarak, I., Koštrun, S., Karminski-Zamola, G., Marković, V. G., Hranjec, M., & Brajša, K. (2017). Comparison of antitumor activity of some benzothiophene and thienothiophene carboxanilides and quinolones in 2D and 3D cell culture system. *Croatica Chemica Acta*, 90(3). <https://doi.org/10.5562/cca3139>

## 10. POPIS KRATICA

ABB	– pufer za vezanje aneksina (engl. <i>annexin binding buffer</i> )
AR	– stopa osipanja (od engl. <i>attrition rate</i> )
CD	– (engl. <i>Cluster of differentiation</i> )
DNA	– deoksiribonuleinska kiselina (engl. <i>Deoxiribonucleic Acid</i> )
DMSO	– dimetil sulfoksid
DPBS Phosphate Buffer Solution)	– Dulbeccova fosfatna puferirana otopina soli (engl. <i>Dulbecco's</i>
EDTA	–
EMA	– Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
FBS	– fetalni goveđi serum (engl. <i>Foetal Bovine Serum</i> )
FDA <i>Administration</i> )	– Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug</i>
FKIT	– Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije
GPCRs <i>receptors</i> )	– receptori suspregnuti proteinom G (engl. <i>G –protein-coupled</i>
HTS	– probir molekula (eng. <i>high throughput screening</i> )
IARC <i>Research on Cancer</i> )	– Agencije za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for</i>
NDA	– uputa za izdavanje novog lijeka (engl. <i>New Drug Application</i> )
NKE	– novi kemijski entiteti
NSCLC	– karcinom pluća ne-malih stanica (engl. <i>non-small cell lung cancer</i> )
QC	– kontrola kvalitete (engl. <i>quality control</i> )
R&D	– istraživanje i razvoj (engl. <i>research and development</i> )
RPMI 1640 medij	– (engl. <i>R P M I</i> )
SCLC	– karcinom pluća malih stanica (engl. <i>small cell lung cancer</i> )
Z'	– Z-faktor
S:B	– odnos pozitivne i negativne kontrole (engl. <i>signal to background</i> )

## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Omjer broja NKE s kojima se ulazi u preklinička istraživanja i broja molekula koje prođu sve faze kliničkih ispitivanja (preuzeto iz Waring M et al., 2015) .....	6
Slika 2. Stopa osipanja ili odljeva lijekova (attrition rate) od faze FTH (od engl. first time in human) do registracije lijeka za pojedine terapijske skupine (preuzeto iz Kola I et al., 2004) .....	7
Slika 3. Mikrookoliš tumora koji raste u trodimenzionalnim uvjetima. Uz tumorske stanice, u tumoru i ko njega nalazimo epitelne stanice, makrofage, fibroblaste, endotelne stanice, limfocite i pericite (preuzeto iz Xu et al. 2014.).....	9
Slika 4. Proces formiranja sfere u 3D Biomatrix visećim pločicama. Slike preuzete iz Perfecta3D® Hanging Drop Plates Protocols ( <a href="https://3dbiomatrix.com/">https://3dbiomatrix.com/</a> ).....	10
Slika 5. Zone rasta sferoidnih stanica; PZ – proliferacijska zona, QZ – mirujuća ili hipoksična zona, NZ – nekrotična zona (preuzeto iz Brajša et al. 2016.).....	10
Slika 6. Modeli mišjih ksenografta (preuzeto i prilagođeno iz Francia et al. 2010.).....	11
Slika 7. Model A549 mišjih ksenografta razvijen u Istraživačkom institutu PLIVA. Preuzeto iz Ševeljević –Jaran D. and Hrvačić B: Reduction and refinement in a xenograft tumor efficacy study FELASA/Scand-LAS Finland, June 2010. ....	12
Slika 8. Shematski prikaz nastajanja maligne neoplazije (kancerogeneza).....	13
Slika 9. Shematski prikaz odnosa procesa proliferacije i apoptoze u tkivu. Proliferacija i apoptoza komplementarni su i kontrolirani fiziološki procesi. U narušavanju homeostaze dolazi do patoloških promjena u tkivima (hiperplazije ili atrofije). ....	14
Slika 10. Polinomska krivulja reda dva za određivanje broja A549 stanica u 3D sferi u odnosu na broj stanica u 2D staničnoj kulturi .....	41
Slika 11. Krivulje rasta staničnih linija u 2D staničnoj kulturi ovisne o početnoj koncentraciji stanica po jažici tijekom 5 dana. Odabrani broj stanica je za sve stanične linije 10 000 po jažici. ....	51
Slika 12. Krivulje rasta staničnih linija u 3D staničnoj kulturi ovisne o početnoj koncentraciji stanica po jažici tijekom 5 dana. Odabrani broj stanica za sve stanične linije je 5 000 stanica po jažici.....	52
Slika 13. Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju A549 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici.....	53
Slika 14. Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju HCC-827 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje standardnih je 5000 stanica po jažici. ....	54
Slika 15. Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju NCI-H358 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici. Na slici je vidljivo stagniranje rasta sfere 4. i 5. dana što se podudara sa dobivenom krivuljom rasta. ....	55
Slika 16. Prikaz formiranja 3D sfera za staničnu liniju MRC-5 tijekom 12 dana u 3 različite gustoće stanica praćeno optičkim mikroskopom (povećanje 5x, Zeiss). Odabrana početna koncentracija stanica za testiranje spojeva je 5000 stanica po jažici. MRC-5 stanična linija je	

linija humanih plućnih fibroblasta i nje podložna sferičnom rastu u hanging drop kulturi, te su sfere manje izražene u usporedbi sa drugim staničnim linijama.....	56
Slika 17. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva u 2D i 3D uvjetima rasta stanica A549 stanične linije. Stanična linija A549 je rezistentnija (Siegfried JM <i>et al</i> , 2012) na vandetanib zbog niske izražajnosti receptora 2 faktora rasta vaskularnog endotela (VEGFR2). .....	58
Slika 18. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama HCC827 stanične linije .....	60
Slika 19. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama NCI-H358 stanične linije .....	62
Slika 20. Test vijabilnosti kontrolnih spojeva na 2D i 3D staničnim kulturama MRC-5 stanične linije .....	64
Slika 21. Bojenje aneksinom V za mjerenje apoptoze. Stanice A549 tretirane su aktivnim spojevima (6a, 5c, 5d, 5e, 5g i 5h) ili standardnim spojevima (doksorubicin i staurosporin) pri određenoj vrijednosti IC50 tijekom 36 sati kako bi se inducirala apoptoza u 2D staničnoj kulturi (V – vijabilne stanice, A – apoptotičke, LA – kasno apoptotičke, N – nekrotične). (pruzeto iz Racané <i>et al</i> , 2021.a).....	73
Slika 22. CR-2 je derivat furana, MW 442.92 g/mol. LM-1a je derivat amidina, MW 312.8 g/mol. Oba spoja su liofilizirana i držana u mraku na sobnoj temperaturi (Racané <i>et al</i> , 2021a, Racané <i>et al</i> , 2021b).....	78
Slika 23. Plan pokusa inokulacije A549 stanica uzgojenih u 2D i 3D uvjetima.....	79
Slika 24. a) Krivulja rasta tumora nastalih iz inokuluma 2D i 3D staničnih kultura (Volumen tumora računat prema formuli: Volumen tumora = dužina tumora * (širina tumora) <sup>2</sup> / 2). b) Težina netretiranih tumora na dan žrtvovanja (39. dan pokusa). Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	81
Slika 25. Patohistološka usporedba tumora u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D (a) i 3D (b) uvjetima kod netretiranih životinja. Histološki prikaz netretiranih stanica u mišu obojen hematoksilin-eozinom (H&E). Tumorske stanice su okrugle, s obilnom bazofilnom citoplazmom te hiperkromatskim, okruglim do ovalnim jezgrama. Prisutna fibro-vaskularna stroma te multifokalna područja nekroze. Mitotska aktivnost je niska (1–2 mitoze/HPF). Povećanje 5x (Zen, Zeiss).....	82
Slika 26. Usporedba netretiranih sa životinjama tretiranim s NKE. a) Krivulja rasta mišjih ksenografta tokom vremena nastalih iz inokuluma 2D staničnih kultura; b) Težine tumora na dan (39. dan) rezudbe. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test) .....	83
Slika 27. Usporedba netretiranih sa životinjama tretiranim s NKE. a) Krivulja rasta mišjih ksenografta tokom vremena nastalih iz inokuluma 3D staničnih kultura; b) Veličina tumora na dan razudbe. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	84

Slika 28. LC-MS/MS bioanaliza <i>in vivo</i> uzoraka koncentracije supstance LM-1a u plazmi i tumoru tretiranih miševa terminalnog dana pokusa (39. dan) .....	85
Slika 29. Protokol za određivanje stanica u tumorskom tkivu protočnom citometrijom.....	86
Slika 30. a) Ukupni broj stanica izoliranih iz mišjih ksenografta b) Ukupni broj vijabilnih stanica izoliranih iz mišjih ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	87
Slika 31. (a) Učestalost vijabilnih populacija iz mišjih ksenografta i (b) ukupan broj živih leukocita (CD45 <sup>+</sup> ), epitelnih (EpCAM <sup>+</sup> ) i ostalih stanica (CD45 <sup>-</sup> EpCAM <sup>-</sup> ), u tkivu mišjih ksenografta netretiranih i tretiranih životinja dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D uvjetima. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test) .....	88
Slika 32. Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) B i T limfocita u tumorskom tkivu netretiranih i tretiranih životinja kojima je injiciran 2D i 3D inokulum Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	89
Slika 33. Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) CD4 i CD8 T limfocita u tumorskom tkivu netretiranih i tretiranih životinja kojima je injiciran 2D i 3D inokulum. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test) ..	90
Slika 34. Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) monocita i makrofoga u 2D i 3D tumorskom tkivu kod netretiranih i tretiranih životinja Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	91
Slika 35. Usporedba frekvencije (a) i ukupnih brojeva (b) DC i DC nastalih iz koštane srži u 2D i 3D tumorskom tkivu kod netretiranih i tretiranih životinja. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	92
Slika 36. Ekspresija Aneksina V u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku stanica u mišjem modelu ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * $p < 0,050$ (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	94
Slika 37. Programirana smrt stanica. Ekspresija Aneksina V u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku stanica u mišjem modelu ksenografta. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija	

predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. * p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney U test).....	94
Slika 38. a) Ekspresija Ki-67 mjerena protočnom citometrijom u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja u ukupnom uzorku vijabilnih stanica. b) Proliferacijski indeks mjeran ekspresijom Ki-67 IHC metodom u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja. (Proliferacijski index = (Ki67 pozitivne / Ki67 pozitivne+negativne) x 100). Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. p > 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney) .....	95
Slika 39. Ekspresija Ki-67 u tkivu A549 mišjih ksenografta netretiranih i tretiranih životinja dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D uvjetima u analiziranim subpopulacijama. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. *p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann-Whitney) .....	96
Slika 40. Ekspresija Ki-67 u A549 mišjim ksenograftima dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D (a) i 3D (b) uvjetima kod netretiranih životinja u ukupnom uzorku vijabilnih stanica u uzorku ksenografta obojen na IHC Ki67. Tumorske stanice s izraženim proliferativnim jezgrama. Povećanje 5x (Zen, Zeiss).....	97
Slika 41. Proupalni (a) i protuupalni (b) citokini u plazmi kod A549 mišjih ksenografta dobivenih staničnim inokulumom uzgojenim u 2D i 3D uvjetima kod netretiranih i tretiranih životinja. Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. *p < 0,050 (vs netretirana skupina; t-test, Mann- Whitney U test).....	98

## 12. POPIS TABLICA

Tablica 1. Stanične linije korištene za testiranje NKE.....	29
Tablica 2. Kontrolni kemijski spojevi korišteni za validaciju metode 2D i 3D staničnih kultura <i>in vitro</i> za testiranje novih kemijskih entiteta .....	31
Tablica 3. Kemijske serije i broj testiranih novih kemijskih entiteta.....	31
Tablica 4. Popis biljega analiziranih u tumorskom tkivu sa pripadajućim primarnim protutijelima.....	45
Tablica 5. Popis biljega analiziranih za proliferacijski status stanica u tumorskom tkivu .....	46
Tablica 6. Popis biljega analiziranih za apoptotski status stanica u tumorskom tkivu .....	47
Tablica 7. IC <sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na A549 staničnoj kulturi u 2D I 3D uvjetima .....	59
Tablica 8. IC <sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na HCC827 staničnoj kulturi u 2D i 3D uvjetima .....	61
Tablica 9. IC <sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na NCI-H358 staničnoj kulturi u 2D I 3D uvjetima .....	63
Tablica 10. IC <sub>50</sub> vrijednosti kontrolnih spojeva (uM) u testu viabilnosti stanica (MTS) na NCI-H358 staničnoj kulturi u 2D i 3D uvjetima.....	65
Tablica 11. Vrijednosti parametara kontrole testnih pločica za pojedine stanične linije tretirane standardnim spojevima u 2D i 3 D uvjetima .....	66
Tablica 12. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti u 2D i 3D uvjetima na staničnim kulturama za NKE amidinske serije i standardne spojeve (*kasnije u tekstu Lm-1a).....	67
Tablica 13. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE amidinske serije i standardne spojeve.....	68
Tablica 14. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE furanske serije i standardne spojeve (*kasnije u tekstu CR-2).....	70
Tablica 15. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE furanske serije i standardne spojeve .....	71
Tablica 16. Odabrani spojevi za farmakokinetičko profiliranje <i>in vitro</i> prema njihovim aktivnostima na testu citotoksičnosti u 2D i 3D uvjetima na staničnim kulturama humanog karcinoma pluća .....	73
Tablica 17. Prikaz rezultata za <i>in vitro</i> ADME svojstva aktivnih spojeva iz amidinske serije .....	75
Tablica 18. Prikaz rezultata za <i>in vitro</i> ADME svojstva neaktivnih spojeva iz amidinske serije .....	76
Tablica 19. Prikaz rezultata za <i>in vitro</i> ADME svojstva spojeva iz furanske serije.....	77
Tablica 20. Grupe životinja u pokusu s tretmanom, postupcima i uzorkovanjem.....	80
Tablica 21. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE akrilonitrilne serije i standardne spojeve .....	134
Tablica 22. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE akrilonitrilne serije i standardne spojeve .....	135

Tablica 23. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE kumarinske serije i standardne spojeve .....	136
Tablica 24. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE kumarinske serije i standardne spojeve.....	137
Tablica 25. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE serije citozinskih derivata i standardne spojeve.....	138
Tablica 26. IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE serije citozinskih derivata i standardne spojeve.....	139

### 13. PRIVITAK 1

Rezultati za NKE iz serije akrilonitrila, kumarina i cisteinskih derivata

**Tablica 21.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE akrilonitrilne serije i standardne spojeve

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
PC-1	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-2	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-3	>50	>100	>50	>100	10.00±0.33	>100
PC-4	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-5	45.08±3.30	55.84±6.63	17.12±0.30	>100	19.03±0.11	36.59±6.24
PC-6	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-8	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-12	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-13	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-14	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-15	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-16	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-17	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-18	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-19	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-20	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-21	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	1.25±0.04	11.67±6.71	0.64±0.07	2.56±1.22	0.13±0.01	1.07±0.2
Cisplatina	13.37±0.26	21.96±0.22	11.56±0.21	40.91±2.1	11.50±0.35	45.69±1.93
Vandetanib	>25	>50	0.16±0.01	n/a	0.13±0.01	n/a
Staurosporin	0.12±0.002	0.02±0.01	0.17±0.02	0.02±0.002	0.05±0.004	0.007±0.001

**Tablica 22.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE akrilonitrilne serije i standardne spojeve

Test proliferacije IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
PC-1	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-2	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-3	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-4	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-5	>50	32.80±14.62	24.18±5.66	>100	24.73±5.48	>100
PC-6	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-8	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-12	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-13	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-14	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-15	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-16	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-17	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-18	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-19	>50	>100	>50	>100	>50	>100
PC-20	>50	18.62±4.47	>50	>100	>50	>100
PC-21	>50	11.05±6.96	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	0.24±0.04	1.72±2.02	1.25±0.1	1.47±0.52	2.86±0.01	0.18±0.002
Cisplatina	15.45±0.16	10.73±11.36	41.52±2.1	45.3±0.2	137	48.32±0
Staurosporin	0.27±0.06	0.003±0.002	0.03±0.002	0.02±0.007	0.07±0.008	0.02±0.007

**Tablica 23.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE kumarinske serije i standardne spojeve

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
AI-1	>50	>100	>50	>100	15.55±1.87	>100
AI-2	>50	>100	1.34±0.13	>100	1.02±0.17	>100
AI-3	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-4	27.41±3.90	30.45±18.82	3.04±1.19	14.31±3.61	1.62±0.11	>100
AI-5	>50	>100	>50	>100	2.47±0.32	>100
AI-6	>50	>100	14.71±2.67	>100	>50	>100
AI-7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-8	>50	>100	>50	>100	11.87±0.64	>100
AI-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-11	>50	>100	0.55±0.05	>100	1.08±0.10	>100
AI-12	29.42±9.31	>100	37.16±2.66	>100	28.28±1.27	>100
AI-13	>50	70.22±18.91	4.81±0.16	74.22±4.44	11.95±0.78	>100
AI-14	>50	>100	0.51±0.01	>100	1.07±0.31	>100
AI-15	>50	>100	0.64±0.07	>100	>50	>100
AI-16	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-17	>50	16.29±0.07	>50	>100	>50	31.95±2.94
Doksorubicin	1.76±0.08	4.14±0.05	0.49±0.06	0.89±0.53	0.53±0.001	1.02±0.2
Cisplatina	17.85±5.49	12.70±1.05	5.72±0.14	47.07±2.65	7.63±0.21	31.06±0.39
Vandetanib	>25	>50	0.32±0.06	0.11±0.03	1.51±0.12	0.57±0.2
Staurosporin	0.25±0.06	0.09±0.01	0.12±0.01	0.09±0.03	0.27±0.1	0.05±0.03

**Tablica 24.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE kumarinske serije i standardne spojeve

Test proliferacije IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
AI-1	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-2	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-3	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-4	13.68±4.04	40.98±5.95	26.29±0.99	>100	11.07±2.74	40.52±18.34
AI-5	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-6	>50	>100	43.15±2.18	>100	24.35±11.02	>100
AI-7	16.23±0.14	>100	>50	>100	8.23±1.07	>100
AI-8	>50	>100	>50	>100	6.06±0.88	>100
AI-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-12	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-13	17.11±0.43	58.28±5.78	6.24±0.16	>100	13.38±1.03	>100
AI-14	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-15	>50	>100	>50	>100	>50	>100
AI-16	>50	>100	>50	>100	29.57±0.88	>100
AI-17	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	0.07±0.01	0.33±0.07	1.14±0.09	0.33±0.07	0.08±0.004	2.27±0.91
Cisplatina	13.91±1.49	7.76±2.35	17.13±0.09	8.94±6.68	1.41±0.41	24.84±4.65
Vandetanib	>50	>50	1.44±0.56	<0.02	4.86±1.43	3.26±3.9
Staurosporin	0.09±0.01	0.01±0.003	0.07±0.04	0.02±0.02	0.01±0.001	0.03±0.01

**Tablica 25.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test citotoksičnosti na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE serije citozinskih derivata i standardne spojeve

Test citotoksičnosti IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
MOR-1	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-2	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-3	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-4	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-5	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-6	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-8	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-12	32±17.05	>100	7.33±0.23	>100	>50	>100
MOR-13	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	2.61±0.03	5.72±1.18	0.48±0.01	0.6±0.1	0.3±0.12	0.69±0.09
Cisplatina	56.99±17.53	7.58±0.28	34.07±0.33	19.25±3.16	20.99±0.84	32.1±1.68
Vandetanib	>25	>50	0.35±0.001	0.96±1.04	0.17±0.01	0.30±0.01
Staurosporin	0.12±0.001	0.014±0.002	0.24±0.08	0.05±0.01	0.05±0.01	0.02±0.001

**Tablica 26.** IC<sub>50</sub> vrijednosti (μM) za test proliferacije na 2D i 3D staničnim kulturama za NKE serije citozinskih derivata i standardne spojeve

Test proliferacije IC <sub>50</sub> vrijednosti (μM)						
Stanična linija / Spojevi	IC <sub>50</sub> (μM)±SD; N=2					
	A549		HCC827		NCI-H358	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
MOR-1	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-2	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-3	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-4	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-5	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-6	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-7	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-8	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-9	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-11	>50	>100	>50	>100	>50	>100
MOR-12	47.81±1.24	33.39±2.37	>50	>100	>50	>100
MOR-13	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Doksorubicin	0.08±0.01	0.10±0.05	0.76±0.3	0.35±0.1	0.09±0.03	4.02±1.82
Cisplatina	30.69±1.78	6.39±3.94	31.30±2.21	25.74±8.95	28.49±2.85	34.52±8.2
Vandetanib	>25	>50	1.93±1.08	0.06±0.06	0.33±0.00	0.26±0.24
Staurosporin	0.15±0.05	0.005±0.006	0.02±0.01	0.05±0.003	0.02±0.00	0.03±0.002

## 14. ŽIVOTOPIS

**Ivo Zlatar**

### OBRAZOVANJE

2025. - trenutno Doktorand, Doktorski sveučilišni studij „Medicinska kemija“, Fakultet za biotehnologiju i razvoj lijekova, Sveučilište u Rijeci

2016. – 2024. Doktorski studij Biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2004. – 2011. Diplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### RADNO ISKUSTVO

2025. – danas Selvita d.o.o., viši znanstvenik II

2022. – 2025. Selvita d.o.o., viši znanstvenik I

2021. – 2022. Selvita d.o.o., viši znanstvenik

2018. – 2020. Fidelta d.o.o., znanstvenik

2014. – 2018. Fidelta d.o.o., mlađi znanstvenik

2013. – 2014. Institut Ruder Bošković, volonter

2011. – 2012. Galapagos istraživački centar d.o.o., mlađi znanstvenik

### ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

Prosinac 2023. – Korisnička obuka za rad na BD FACSymphony™ S6 sorteru, Zagreb, Hrvatska

Veljača 2021. – Korisnička obuka za rad na ZE5 protočnom citometru, Zagreb, Hrvatska

Studeni 2018. – ExCyte Mastery Class, Expert Cytometry tečaj za protočnu citometriju, <https://expertcytometry.com/>

Lipanj 2017. – Korisnička obuka za rad na Attune NxT protočnom citometru, Zagreb, Hrvatska

Rujan 2014. – FlowCyte Flow Cytometry Course - Comprehensive Principles and Applications, Zagreb, Hrvatska

Lipanj 2014. – Lifelong Learning Programme: Leonardo da Vinci – mobility project, Medicinski fakultet, Sveučilište u Beču, Beč, Austrija

Prosinac 2012. – Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, Level C, FELASA, Zagreb, Hrvatska

Lipanj 2011. – WinPrep Basic & Advanced, JPM (Perkin Elmer) korisnička obuka, Zagreb, Hrvatska

#### KONFERENCIJE I RADIONICE

Ožujak 2023. – Radionica korisnika Attune NxT protočnog citometra, Amsterdam, Nizozemska

Rujan 2022. – Konferencija ESCCA 2002, Belfast, Sjeverna Irska, UK

2019 – 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Šibenik, Hrvatska. Poster: *Antiproliferative activity of amidino substituted benzimidazoles and benzothiazoles explored by 2D and 3D cell culture system.*

Rujan 2018. – CytoMore and More – 7th Modena Advanced Course in Cytometry, Modena, Italija

Siječanj 2018. – Radionica – Timski rad i suradnja, Creativa, Zagreb, Hrvatska

Prosinac 2017. – Radionica – Uvod u uslužno poslovanje, Creativa, Zagreb, Hrvatska

2017. – 25th United European Gastroenterology Week, Barcelona, Španjolska. Poster: *Isolation and characterization of lamina propria mononuclear cells from human colonic mucosa.*

2016. – 17th Tetrahedron Symposium, Barcelona, Španjolska. Poster: *Antitumor activity of novel amino substituted pentacyclic benzimidazole derivatives tested in 2D and 3D cell culture system.*

2016. – EMBO/EMBL Symposium: Tumour microenvironment and signalling. Heidelberg, Njemačka. Poster: *Comparison of antitumor activity of some benzothiophene, thienothiophene, carboxanilides and quinolones in 2D and 3D cell culture system.*

Rujan 2011. – Radionica – ATCC cell culture seminar, Ljubljana, Slovenija