

Antiproliferativni učinak derivata benzimidazola na stanice koje rastu u 2D i 3D kulturi

Bartulica, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:305883>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Elena Bartulica

**ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK
DERIVATA BENZIMIDAZOLA NA
STANICE KOJE RASTU U 2D I 3D
KULTURI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Elena Bartulica

**ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK
DERIVATA BENZIMIDAZOLA NA
STANICE KOJE RASTU U 2D I 3D
KULTURI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Teuta Opačak-Bernardi

Rad ima 46 listova, 1 tablicu i 17 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kultura stanica.....	1
1.1.2. Stanične linije kao model u istraživanju malignih tumora.....	2
1.1.3. Uvjeti rasta tumorskih stanica <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	3
1.1.4. Dvodimenzionalna kultura stanica.....	4
1.1.5. Trodimenzionalna kultura stanica.....	5
1.1.6. Tehnike uzgoja 3D kulture.....	7
1.2. Stanični ciklus.....	9
1.3. Benzimidazol	11
1.3.1. Derivati benzimidazola i njihova antitumorska aktivnost	12
2. HIPOTEZA	15
3. CILJEVI	16
4. MATERIJALI I METODE	17
4.1. Materijali	17
4.1.1. Ispitivani spojevi.....	17
4.1.2. Kemikalije.....	17
4.1.3. Stanične linije.....	18
4.2. Metode	18
4.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	18
4.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica u kulturi	19
4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	20
4.2.4. Određivanje promjena u staničnom ciklusu protočnom citometrijom.....	21
4.2.5. Statistička analiza podataka	22
5. REZULTATI	23
5.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi	23
5.1.1. Usporedba antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi..	27
5.2. Analiza promjena u staničnom ciklusu.....	29
5.2.1. Utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus MDA-MB-231 stanica.....	30
5.2.2. Utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus MCF-7 stanica	32
6. RASPRAVA	35

7. ZAKLJUČAK.....	39
8. SAŽETAK.....	40
9. SUMMARY.....	41
10. LITERATURA	42
11. ŽIVOTOPIS.....	46

POPIS KRATICA

DMEM (engl. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*) Dulbeccov minimalni esencijalni medij

DMSO dimetil sulfoksid

DNK (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) deoksiribonukleinska kiselina

ECM (engl. *extracellular matrix*) izvanstanični prostor

FBS (engl. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum

FF (engl. *forced floating*) metoda prisilnog plutanja

M mol/dm³

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)

NZ (engl. *necrotic zone*) nekrotična zona

PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) fosfatni pufer

PI propidij jodid

PZ (engl. *proliferation zone*) zona proliferacije

RNA (engl. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina

RPM (engl. *revolutions per minute*) okretaji u minuti

RT (engl. *room temperature*) sobna temperatura

QZ (engl. *quiescent or hypoxic zone*) neaktivna ili hipoksična zona

1. UVOD

Rak je jedna od najzastupljenijih i najsmrtonosnijih bolesti modernog doba. To je skupina bolesti koja se očituje nekontroliranom proliferacijom stanica. Rast normalnih stanica pažljivo je reguliran s ciljem zadovoljenja potreba cijelog organizma. Nasuprot tomu, stanice raka rastu na neregularno te u konačnici metastaziraju i interferiraju s funkcijom normalnih tkiva i organa (1).

Maligna oboljenja značajan su javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi su najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. U Hrvatskoj je 2014. godine od raka umrlo 13939 osoba, od čega je 7911 muškaraca i 6028 žena. Najčešće sijelo raka u muškaraca jesu pluća (19%), a u žena dojka (26%). U ovom radu istraživanje se provodilo upravo na staničnim linijama raka dojke.

Stopa smrtnosti od raka dojke u Hrvatskoj među višima je u Europi. Na temelju podataka Registra za rak i Zavoda za javno zdravstvo više od 2500 žena oboli od te vrste raka. Osim nasljednih oštećenja, uzrok nastanka raka mogu biti i različiti okolišni čimbenici, životni stil i biološki učinci (2).

Pri samom liječenju raka, djelovanje kemoterapije često je ograničeno zbog neželjenih toksičnih učinaka uzrokovanih uništavanjem zdravih stanica učinkovitom dozom lijeka. Kako bi se osigurao bolji odgovor na terapiju, dolazi do veće potrebe za pronalaskom antitumorskih lijekova koji će selektivno inhibirati rast tumorskih stanica (3). Kao pristupačan i lako upotrebljiv biološki model u istraživanjima biologije raka i potencijalnih učinaka antitumorskih lijekova, pokazale su se već desetljećima tumorske stanične linije, čija raznolikost omogućava personalizirani pristup liječenju (4).

1.1. Kultura stanica

Kulturom stanica smatramo umjetno uzgajanje stanica izvan njihovog prirodnog okružja, u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Prva kultura stanica opisana je još 1907., kada je Ross Harrison izolirao i kultivirao živčano vlakno iz žabljeg embrija. Najranije stanične kulture sastojale su se od stanica naraslih iz fragmenata tkiva koji su se nasadili na ugrušak plazme. Takav sustav bio je vrlo neprikladan za eksperimentalnu analizu. 1912. Carrel je

napravio pomak uvođenjem sterilnih uvjeta kako bi kulture duže trajale i spriječila se njihova kontaminacija. Kasnih 40-ih godina 20. stoljeća, glavni napredak predstavljaju stanične linije nastale od izoliranih stanica koje su mogle prihvatiti se za stjenku posudice za kulturu i dalje rasti. Međutim, te su se stanice još uvijek uzgajale u nedefiniranom mediju sastavljenom od različitih kombinacija seruma i ekstrakata embrija. Eagle je 1955. opisao prvi točno definirani medij koji omogućuje rast stanica u kulturi. Uz soli i glukozu, medij treba sadržavati i različite aminokiseline i vitamine koje stanice ne mogu same sintetizirati. Također je potreban i serum kao izvor polipeptidnih čimbenika rasta, potrebnih za stimulaciju stanične diobe. Kao eksperimentalna metoda, stanična kultura prihvaćena je 1952. kada je Dulbecco uspio iz tkiva izolirati stanice pomoću tripsina (1, 5).

U istraživanjima tumora, stanične linije koriste se od 1951. kada je George Gey, u bolnici Johns Hopkins u Baltimoreu, prvi puta uspio održati stanice tumora u kulturi (6). Prva stanična linija dobila je ime HeLa, po Henrietti Lacks, ženi iz čijeg je karcinoma vrata grlića maternice izolirana (7). Do danas je ostala jedna od najkorištenijih i najvažnijih staničnih linija.

1.1.2. Stanične linije kao model u istraživanju malignih tumora

Tumori različitih tipova stanica, odnosno tkiva, do neke mjere slični su, tj. svi pokazuju određene karakteristike koje omogućavaju klonalnu ekspanziju, angiogenezu i metastaziranje (8). Postoje tri glavna modela koji se koriste u istraživanju tumora: primarne kulture tumorskog tkiva, stanične linije te životinjski modeli. Primarne kulture tumora iz pojedinca najčešće se uzimaju kako bi se testiralo djelovanje pojedinih lijekova te kako bi se iz njih dobila potencijalna stanična linija. Većina staničnih linija koje se koriste u istraživanju tumora zapravo su stanice koje su toliko promijenjene da mogu preživjeti i izvan organizma ako im se osiguraju određeni uvjeti (9). Raznolikost tumora zahtijeva i raznolikost staničnih linija koje se koriste u istraživanjima, pa danas postoji više od 1000 staničnih linija malignih tumora. Sve stanične linije tumora nastale su od primarne kulture tumora višestrukim diobama stanica. Stanične linije mogu se dobiti i od somatskih ne-tumorogenih stanica koje su prošle neke postupke imortalizacije kao što su npr. aktivacija nekog onkogenog ili telomeraze (10).

Tumorsko tkivo sastoji se od više tipova tumorskih stanica te se *in vivo* nalaze u mikrookolišu s fibroblastima povezanim s endotelnim stanicama, stanicama imunološkog sustava te citokinima, kemokinima i čimbenicima rasta koje te stanice izlučuju, a koji utječu na ekspresiju gena tumorskih stanica (9). Prilikom korištenja staničnih linija u istraživanju tumora bitno je osigurati odgovarajući mikrookoliš.

1.1.3. Uvjeti rasta tumorskih stanica *in vivo* i *in vitro*

Premještanjem tumorskog tkiva na hranjivu podlogu mijenjaju se i okolišni uvjeti za staničnu liniju. Kao tumori *in vivo*, tako i stanične linije *in vitro* prilagođavaju svoj fenotip uz pomoć genetičkih i epigenetičkih mehanizama u odnosu na uvjete kojima su izložene (11). Prilagodbom tumorskih staničnih linija u kulturi dolazi do veće razlike u ekspresiji gena između staničnih linija i tumora koji predstavljaju nego između tumora i normalnog tkiva (12). Stephens i sur. uočili su da kod staničnih linija karcinoma dojke dolazi do mutacija koje znatno pojačavaju aktivnost kinaza u usporedbi s njihovom aktivnošću kod samog tumora *in vivo* (13).

Uvjeti u kojima rastu stanice tumora u kulturi razlikuju se od onih *in vivo*. U Tablici 1. prikazane su glavne razlike između rasta stanica *in vivo* i *in vitro* (14). Optimiziranjem uvjeta u kojoj rastu stanice tumora u kulturi, moguće ih je učiniti sličnijima uvjetima *in vivo*, kako bi se rezultati dobiveni na staničnim linijama vjernije mogli preslikati na tumore. Istraživanja su pokazala da uzgoj staničnih linija karcinoma dojke u fiziološkim uvjetima kao što su medij bez seruma, specijalne podloge s matriksom (izvanstaničnom tvari koja čini biokemijsku i strukturnu potporu stanica) i niskom koncentracijom kisika, rezultira većom sličnosti tih linija karcinomu dojke *in vivo* (15, 16).

Tablica 1. Glavne razlike između *in vivo* i *in vitro* sustava (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 14.)

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Cirkulirajuće promjene/oscilacije	Nedostatak oscilacija
Dinamične promjene tlaka plinova, temperature i pH	Konstantna temperatura i pH, visok i konstantan tlak kisika
Krv, dinamični mikrookoliš s niskom i izmjenjivom koncentracijom glukoze, aminokiselina, lipida i hormona/citokina	Medij za uzgajanje, statički mikrookoliš i visoke koncentracije aminokiselina, lipida, glukoze i hormona/citokina
Nema fetalnog goveđeg seruma	Dodatak fetalnog goveđeg seruma
Nema heterolognih antigena/proteina	Povišeni heterološki antigeni/proteini

1.1.4. Dvodimenzionalna kultura stanica

1885. Wilhelm Roux je demonstrirao dvodimenzionalnu (2D) metodu pomoću staklenih ploča i tople fiziološke otopine. Od tada je došlo do znatnog napretka u izvedbi 2D kulture i njena upotreba pomogla je razjasniti osnove biologije stanice. U tradicionalnoj 2D kulturi stanice obično rastu u jednom sloju na ravnoj podlozi u polistirenskim plastičnim bočicama za uzgoj stanica (Slika 1.A). Bočice za kulturu prethodno su presvučene kolagenom, fibronektinom, matrigelom ili mješavinom različitih komponenti da bi se simulirao optimalni izvanstanični prostor (engl. *extracellular matrix*, ECM) za uzgoj adherentnih stanica. Tako postavljena kultura omogućava da sve stanice dobiju jednaku količinu hranjivih tvari i čimbenika rasta iz medija tijekom uzgoja. Monosloj se uglavnom sastoji od proliferirajućih stanica, jer su nekrotične stanice obično odvojene od podloge i lako se uklone tijekom promjene medija. Premda se 2D stanična kultura pokazala vrijednom metodom za stanične studije, sve više se prepoznaju njezina ograničenja. 2D staničnoj kulturi nedostaje raznolikosti u odnosu na *in vivo* strukturu zbog ravne podloge. Abnormalna morfologija stanica u 2D kulturi utječe na mnoge stanične procese uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu te ekspresiju gena i proteina. Budući da su gotovo sve stanice u *in vivo* okolišu okružene drugim stanicama i izvanstaničnim prostorom, 2D stanična kultura ne oponaša dovoljno dobro prirodno okruženje stanica (17, 18). Kao rezultat, testovi u 2D monoslojnoj kulturi, a posebno oni koji se odnose na mjerenje učinka lijekova, često doživljavaju neuspjeh, što je povezano s neprirodnim mikrookolišem stanica uslijed kojeg je stanični odgovor na lijek promijenjen (19). Stoga je neophodno razvijati i uspostavljati *in*

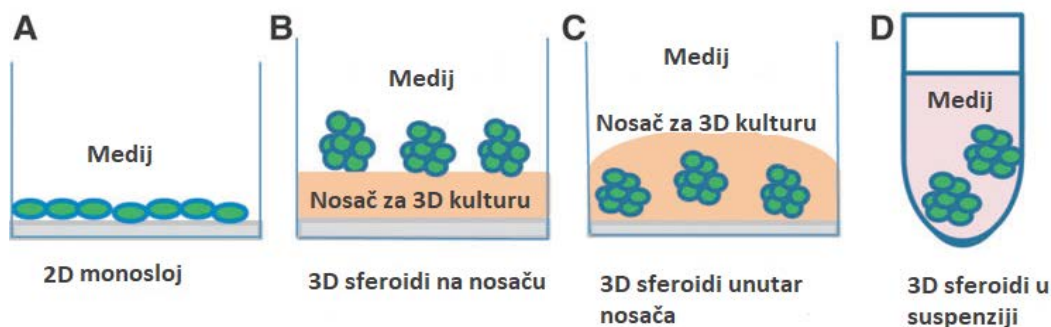
vitro stanične sustave koji mogu realističnije oponašati okružje stanica *in vivo* i samim time osigurati bolje rezultate u *in vivo* testovima (18).

1.1.5. Trodimenzionalna kultura stanica

Sve veći broj dokaza u zadnje vrijeme pokazuje da trodimenzionalni (3D) stanični sustav, za razliku od 2D staničnog sustava, preciznije predstavlja stvarni mikrokoliš stanica u tkivima. Istraživanja su, također, otkrila da se stanice u 3D kulturi morfološki i fiziološki razlikuju od onih u 2D okolišu. Ključna značajka koja dovodi do razlika u staničnim odgovorima upravo je ta dodatna dimenzija 3D kulture, jer ne samo što utječe na prostorni smještaj receptora na staničnoj površini koji ulaze u interakciju s okolnim stanicama, nego i uzrokuje fizička ograničenja stanica. Ti prostorni i fizički aspekti u 3D kulturama djeluju na prijenos signala izvana prema unutrašnjosti stanice i u konačnici utječu na ekspresiju gena i stanično ponašanje (18).

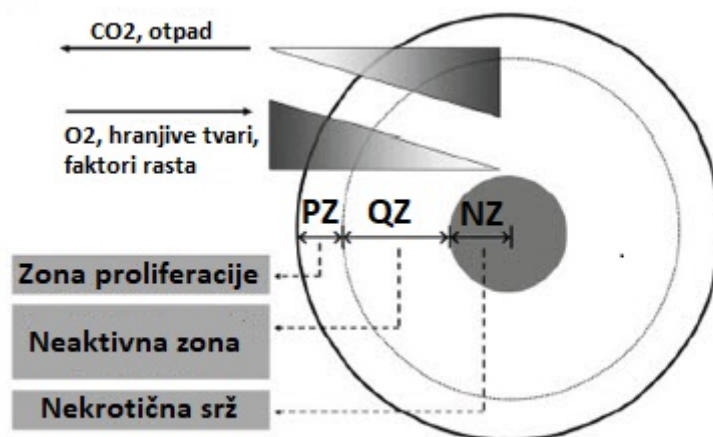
U posljednjih nekoliko godina, ogroman napor uložen je u razvoj raznih 3D staničnih sustava, kao i u usvajanje 3D kulture stanica u otkriću lijekova, staničnoj biologiji raka, studiji matičnih stanica, projektiranju funkcionalnih tkiva i drugim staničnim analizama. Za proučavanje staničnih odgovora u okružjima koja nalikuju *in vivo* okolišu, izvrsno služe *in vitro* testovi na 3D staničnim linijama (20).

Stanice u 3D kulturi rastu kao nakupine, odnosno sferoidi u tri dimenzije uz pomoć nosača (Slika 1.B, C) ili bez nosača (Slika 1.D). 3D kultura može nastati nasijavanjem stanica na acelularnom nosaču ili raspršivanjem stanica u tekućoj suspenziji nakon čega slijedi učvršćivanje ili polimerizacija (18).



Slika 1. Shematski prikaz tradicionalne 2D stanične kulture (A) i tri uobičajena 3D stanična sustava: sferoidi na nosaču (B), stanice unutar nosača (C) ili stanični sferoidi bez nosača u suspenziji (D) (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 18.)

Unutar sferoida mogu se naći stanice u različitim fazama rasta, uključujući proliferaciju, mirovanje, apoptozu, hipoksiju ili nekrozu. Vanjski sloj sferoida (engl. *proliferation zone*, PZ), koji je najviše izložen mediju, većinom se sastoji od živih, proliferirajućih stanica jer medij osigurava optimalnu opskrbu hranjivim tvarima i čimbenicima rasta. Unutarnje stanice (engl. *quiescent or hypoxic zone*, QZ) primaju manje kisika i hranjivih tvari iz medija, pa su obično u stanju mirovanja ili hipoksije, što često dovodi do stvaranja nekrotične srži (engl. *necrotic zone*, NZ) (Slika 2.). Takva je stanična raznolikost vrlo slična *in vivo* tumorima.

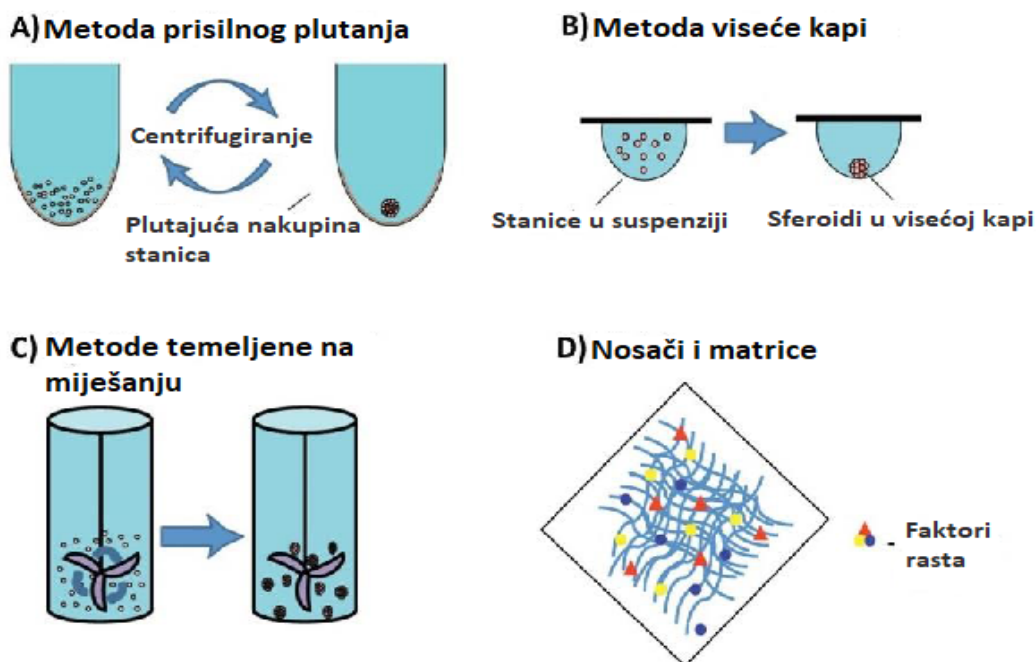


Slika 2. Shematski prikaz zona stanične proliferacije u 3D sferoidima i raspodjele kisika, CO₂ i hranjivih tvari (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 21.)

Struktura i morfološki izgled 3D sferoida ovise o staničnoj liniji i variraju od okruglih i masivnih oblika do izduženih oblika te grozdastih nakupina stanica sa slabom staničnom adhezijom. Istraživanja su pokazala da stanična morfologija nije povezana s migracijskim ili proliferativnim kapacitetom staničnih linija, nego ovisi o metodi 3D kulture koja se koristi (22).

1.1.6. Tehnike uzgoja 3D kulture

Trenutno postoji širok spektar tehnika uzgoja 3D sferoida nasađivanjem ili na nosač ili bez njega. Relativno jednostavna metoda za kultiviranje 3D sferoida bez nosača tekući je premaz, također poznat kao i metoda prisilnog plutanja (engl. *forced floating*, FF), u kojoj su mikrotitarske ploče s 96 jažica prije nasijavanja stanica obložene poly-Hemom (poli-2-hidroksietil metakrilat) koji sprječava vezivanje stanica za podlogu. Nakon dodavanja stanica i centrifugiranja dolazi do formiranja sferoida čija veličina ovisi o broju stanica (Slika 3.A). Tehnika je financijski povoljna i nastali sferoidi lako su dostupni za daljnje analize. Drugi je način dobivanja sferoida bez nosača metoda viseće kapi, gdje se male količine suspenzije stanica pipetiraju na poklopac Petrijeve zdjelice kojim se potom zaklopi zdjelica u koju smo dodali PBS za održavanje vlažnosti. Stanice se formiraju u viseće kapi i nakon inkubacije na 37°C u vrhu kapi nastaju sferoidi (Slika 3.B). Postoje i tehnike utemeljene na miješanju stanične suspenzije u pokretnim bocama ili rotacijskim sustavima koji održavanjem stanica u stalnom pokretu onemogućavaju njihovo prianjanje na stjenke i dovode do interakcija među stanicama (Slika 3.C). Prednosti modela bez nosača jesu potpuna prirodna organizacija stanica putem migracija i interakcija te izostanak mogućih interferencija s materijalom nosača. Ipak, tehnike utemeljene na nosačima neophodne su za poticanje određenog preživljenja staničnih linija i pružaju mogućnost dodavanja prirodnog izvora čimbenika rasta, hormona i drugih molekula ovisno o materijalu nosača koji se koristi (Slika 3.D). Trenutno su dostupni razni nosači, čiji odabir ovisi o vrsti stanica koje se koriste i cilju studije. Najčešće korištene podloge jesu prirodne i biorazgradive tvari kao što su kolagen, laminin ili fibronektin koji se obrađuju tako da tvore hidrogelove koji zatim oponašaju prirodni ECM i pružaju fizičku i strukturnu potporu. Budući da su ti hidrogelovi izvedeni iz prirodnih izvora, promiču brojne stanične funkcije kao što su vitalnost stanica, proliferacija i diferencijacija (22).



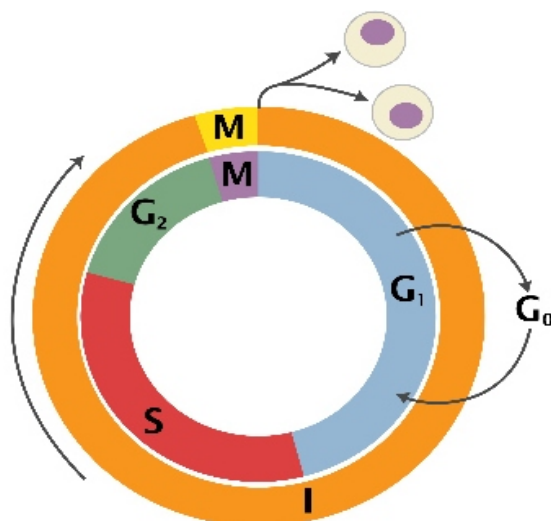
Slika 3. Najčešće korištene tehnike nastanka 3D kulture: **A)** metoda prisilnog plutanja, **B)** metoda viseće kapi, **C)** tehnike temeljene na miješanju i **D)** tehnike temeljene na nosačima (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 23.)

Iako 3D stanični sustavi pružaju model koji bolje oponaša interakcije stanica – stanica i interakcije stanica – ECM u usporedbi s tradicionalnim 2D monoslojem, trenutnim 3D kulturama još uvijek nedostaju složeni sustavi za oksigenaciju, prijenos hranjivih tvari i uklanjanje otpada koje imaju *in vivo* tkiva. Stanice uzgojene u 3D kulturi obavljaju te funkcije samo difuzijom. Za male sferoide takav sustav nije problem, ali za veće sferoide taj model još uvijek predstavlja izazove. Takav difuzijski način uzrokuje da se stanice na različitim dubinama od površine sferoida nalaze u različitim stanjima opskrbe hranjivim tvarima i, dakle, u različitim fazama staničnog ciklusa. U usporedbi s 2D kulturom u kojoj su jednake količine kisika i hranjivih tvari dostupne svim stanicama, ograničeno područje oksigenacije i opskrbe hranjivim tvarima u 3D sferoidima zapravo oponaša mikrookoliš *in vivo* samo do određene mjere (18).

1.2. Stanični ciklus

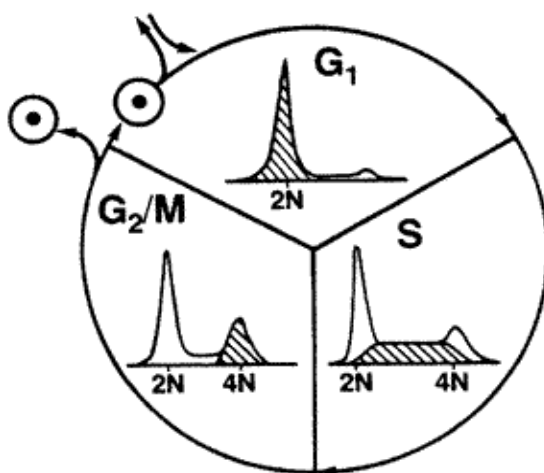
Zbog pogrešaka u regulaciji staničnog ciklusa često dolazi do abnormalne proliferacije tumorskih stanica. Tipičan stanični ciklus traje približno 24 sata. Promatranja staničnog ciklusa uz pomoć mikroskopa ukazuju na postojanje dviju osnovnih faza: mitoze i interfaze. Mitoza (dioba stanične jezgre) je razdoblje staničnog ciklusa u kojem dolazi do odvajanja sestrinskih kromatida kromosoma u stanice-kćeri i obično završava podjelom citoplazme odnosno cjelokupnom diobom stanice (citokineza). Međutim, mitozu i citokinezu traju samo jedan sat, a preostalo vrijeme, oko 95% staničnog ciklusa, stanica provede u razdoblju između dviju mitozu – interfazi. Tijekom interfaze kromosomi su dekondezirani i raspoređeni po cijeloj jezgri, koja zbog toga izgleda morfološki jednolično. Na molekularnoj razini interfaza je razdoblje u kojem se odvijaju i stanični rast i replikacija DNK kako bi se stanica pripremila za ponovnu diobu.

Diobeni ciklus većine eukariotskih stanica u sintezi DNK podijeljen je u četiri zasebne faze: M, G₁, S, G₂ (Slika 4.). M-faza ciklusa odgovara mitozu, nakon koje u pravilu slijedi citokineza. Zatim slijedi G₁-faza (engl. *gap 1*), koja predstavlja interval između mitoze i početka replikacije DNK. Tijekom G₁-faze stanica je metabolički aktivna i neprestano raste, ali bez replikacije DNK. Na fazu G₁ nadovezuje se S-faza (sinteza) tijekom koje se replicira (sintetizira) DNK. Dovođenjem sinteze DNK započinje G₂-faza (engl. *gap 2*) u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. Stanice koje se dijele samo po potrebi, npr. kako bi se nadomjestile one stanice koje su izgubljene zbog ozljede ili stanične smrti, izlaze iz G₁-faze i ulaze u fazu mirovanja, nazvanu G₀ u kojoj ostaju metabolički aktivne, ali ne proliferiraju sve dok ih na to ne potaknu odgovarajući izvanstanični signali.



Slika 4. Faze staničnog ciklusa

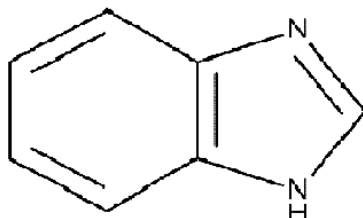
Da bismo analizirali stanični ciklus potrebno je utvrditi stanice u različitim fazama staničnog ciklusa. Premda se stanice za vrijeme mitoze mogu raspoznati uz pomoć mikroskopa, za raspoznavanje ostalih faza staničnog ciklusa potrebne su biokemijske analize. U većini slučajeva stanice različitih faza staničnog ciklusa razlikuju se prema količini DNK (Slika 5.). Stanice u G_1 -fazi diploidne su, pa je njihova količina DNK označena kao $2n$. Tijekom S-faze procesom replikacije povećava se ukupna količina DNK od $2n$ na $4n$, tako da stanice u S-fazi imaju količinu DNK koja se kreće od $2n$ do $4n$. Ukupna količina DNK u G_2 i M-fazi ostaje $4n$, a nakon citokineze ponovno se smanjuje na $2n$ (1).



Slika 5. Količina DNK u stanici

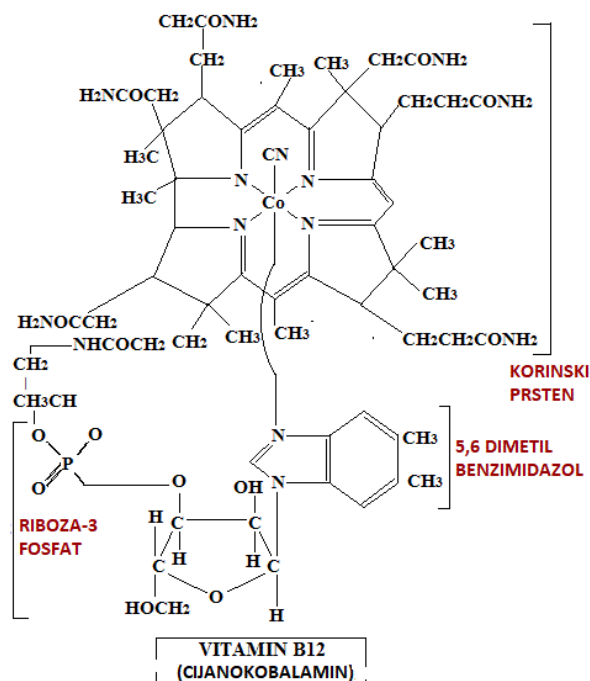
1.3. Benzimidazol

Benzimidazol pripada skupini benzazola, odnosno heterocikličkih organskih spojeva aromatskog karaktera sastavljenih od peteročlanog prstena s dva dušikova atoma koji čine imidazolni prsten kondenziran na aromatsku benzensku jezgru (Slika 6.) (24).



Slika 6. Struktura benzimidazola

Heterociklički spojevi danas su najbrojnija skupina organskih supstanci te su prisutni u gotovo svim strukturama mnogobrojnih lijekova koji se nalaze u različitim fazama kliničke upotrebe. Benzimidazol je prvi puta sintetizirao Hoebreckera 1872., a interes za njegovim proučavanjem potječe još iz 40-ih godina prošlog stoljeća, kada je potvrđeno da je benzimidazolska struktura prisutna u vitaminu B12 i njegovim derivatima (Slika 7.). Već otprije poznato je da mnogi terapijski agensi posjeduju tu farmakofornu skupinu te pokazuju vrlo širok spektar bioloških aktivnosti kao antiparazitici, antikonvulzivi, analgetici, antihistaminici, antihipertenzivi, antiviroci i anti-HIV agensi, antifungicidi, protuupalni lijekovi, inhibitori protonske pumpe, antioksidansi i antikoagulansi. U današnje su vrijeme zasigurno najvažniji antitumorski učinci, jer uvelike raste stopa smrtnosti oboljelih od tumorskih bolesti (25).



Slika 7. Struktura vitamina B12 (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 26.)

1.3.1. Derivati benzimidazola i njihova antitumorska aktivnost

Antitumorski potencijal benzimidazolske jezgre prepoznat je još 1944. godine, nagađanjima D. W. Woolleya da se benzimidazol može ponašati poput purina. Pet godina kasnije, N. G. Brink uočio je 5,6-dimetil benzimidazol, raspadni produkt vitamina B12 i otkrio da neki njegovi derivati imaju aktivnost sličnu onoj vitamina B12, potaknuvši tako aktivna istraživanja i sinteze mnogobrojnih supstituiranih derivata benzimidazola (27, 28, 29).

Godine 1990., sintetizirani su različiti derivati benzimidazola sa supstituiranim fluorom, klorom, propilenom i tetrahidrokinolinom, što je rezultiralo povećanjem stabilnosti spoja i poboljšanjem biološke aktivnosti. Struktura benzimidazola slična je strukturi purinskih baza nukleotida (adenina i gvanina). Upravo ta sličnost omogućava benzimidazolu interakciju s biomolekulama poput DNK, RNK i proteinima. To interakcijsko svojstvo koristi se u kemoterapiji (30). Brojni objavljeni antitumorski agensi (poznati i kao antiproliferativni agensi i antineoplastici) za liječenje mnogih vrsta tumora djeluju različitim mehanizmima. Međutim, glavni nedostatak tih spojeva je citotoksičnost prema normalnim stanicama uslijed smanjene selektivnosti za abnormalne stanice, zbog čega je već godinama prisutna kontinuirana potraga za agensima sa zadovoljavajućim antitumorskim djelovanjem i

selektivnošću. Meta je većine takvih supstanci molekula DNK, pa se tako nastoje razviti lijekovi koji su selektivni s obzirom na mjesto vezanja na dvostruku uzvojnici DNK (engl. *sequence-selective DNA binding compounds*). Takvi lijekovi sprječavaju replikaciju DNK i transkripciju gena, posljedica čega je usporenje ili potpuno zaustavljanje rasta tumorskih stanica bez oštećenja zdravih. U većini slučajeva postoji vrlo dobra korelacija između antitumorskog djelovanja i interakcije supstancije s DNK (25).

Najčešće korišteni agensi koji djeluju na molekulu DNK su: interkalatori, alkilirajući agensi ili oni koji se vežu u utore DNK. Interkalativni način vezivanja danas je jedan od najvažnijih u djelovanju antitumorskih lijekova. Interkalatori inhibiraju replikaciju molekule DNK umetanjem između parova dušikovih baza. Radi poboljšanja antitumorskih svojstava, benzimidazol se spaja s drugim heterocikličkim molekulama, pa tako nastaju visokokonjugirani planarni spojevi s većom biološkom aktivnošću. Visoki intenzitet fluorescencije konjugiranih derivata benzimidazola i njihova mogućnost interakcija s biomolekulama omogućavaju upotrebu tih spojeva za detektiranje biološki važnih molekula. Ciklički derivati benzimidazola ispitivani u novije vrijeme, kao što subenzimidazo[1,2-*a*]kinolin, benzimidazo[1,2-*c*]kinazolin i benzimidazo[2,1-*b*]izokinolin, neki su od važnijih derivata jer posjeduju planarnu strukturu koja im omogućuje interkalaciju između parova baza dvostruke uzvojnice DNK. Također, imaju važnu ulogu u razvoju citostatika (30).

Nakon što je skupina istraživača priredila cikličke derivate benzimidazo[3,2-*a*]kinolin-hidroklorida, njihovim biološkim ispitivanjem je pokazano da ti derivati imaju određenu antitumorsku aktivnost na staničnim linijama humanog limfoma, kronične mijeloične leukemije, karcinoma debelog crijeva, karcinoma grlića maternice te karcinoma kože. Daljnjim istraživanjem te su se supstance ipak pokazale kao slabi interkalatori. No, P. E. Vivas-Mejiasa suradnicima otkrio je da je mehanizam djelovanja tih derivata inhibicija topoizomerase II, enzima koji ima važnu ulogu tijekom transkripcije i translacije molekule DNK, te pri stvaranju kromosoma i odvajanju sestrinskih kromatida (25). M. Hranjec i G. Karminski-Zamola provele su niz istraživanja o djelovanju derivata benzimidazo[1,2-*a*]kinolina kao potencijalnih antitumorskih agensa i interkalatora s vrlo dobrim rezultatima, što je otvorilo mogućnost daljnjeg istraživanja tih spojeva (30, 31).

Zbog složenog lanca događaja koji uzrokuju tumore, te kako bi se osigurao bolji odgovor na terapiju, razvijaju se novi spojevi koji kombiniraju više farmakološki aktivnih tvari povezanih u jednu hibridnu molekulu. Takvi spojevi su 7-klorokinolin i

fenilbenzimidazol-amidin. 7-klorokinolin je dio terapije protiv malarije, te je postao od interesa kao lijek protiv raka zbog činjenice da paraziti i stanice raka dijele karakteristike koje se odnose na metaboličke zahtjeve povezane s njihovom velikom stopom proliferacije. Dok se antitumorska aktivnost 7-klorokinolina veže s interkaliranjem, za aromatske amidine ta je aktivnost povezana s inhibicijom enzima ovisnih o DNK. Učinak novo sintetiziranih spojeva testiran je na rast normalnih i tumorski staničnih linija različitog porijekla i rezultati su pokazali ovisnost o staničnoj liniji i primijenjenoj dozi. Antiproliferativni učinci mogu biti poboljšani s proširenjem centralnog poveznika molekula. To proširenje povećava fleksibilnost i prilagodljivost molekularne konformacije, uzrokujući varijacije u načinu vezanja DNK (3).

2. HIPOTEZA

Derivati benzimidazola usporavaju stanični rast tumora dojke te dovode do usporavanja i zaustavljanja staničnog ciklusa. Protutumorski učinak izraženiji je na stanicama koje rastu u 2D kulturi.

3. CILJEVI

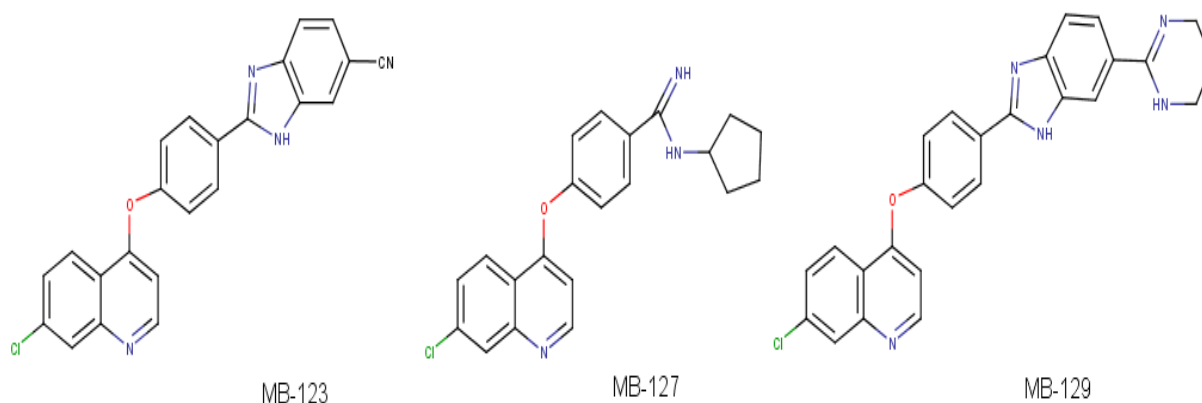
1. Odrediti razlikuje li se antiproliferativni potencijal testiranih spojeva na rast stanica u uvjetima 2D i 3D kulture *in vitro*.
2. Utvrditi povezanost strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta, te definirati supstancu koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica.
3. Odrediti promjene u staničnom ciklusu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivani spojevi

Derivati benzimidazola pripravljeni su na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu (Slika 8.). Za potrebe *in vitro* istraživanja, spojevi su otopljeni u DMSO-u kao 1×10^{-2} mol/L koncentrirane otopine i pohranjeni na -20 °C do uporabe. Neposredno prije ispitivanja pripremljene su radne otopine razrjeđivanjem *stock* otopine novosintetiziranih spojeva (1×10^{-2} mol/L) u mediju. Definirana finalna koncentracija spojeva bila je 10^{-3} i 10^{-4} M.



Slika 8. Strukturne formule novosintetiziranih derivata benzimidazola

4.1.2. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela korištene su kemikalije i reagensi raznih proizvođača:

- DMEM s visokim udjelom glukoze (4,5 g/L) s L-glutaminom, kompletiran s 10% FBS od Capricorn Scientific GmbH (Slough, Velika Britanija)
- DMSO (engl. *methyl sulfoxide*) 99,8% od Acros organics (New Jersey, SAD)
- propidij jodid od eBioscience (Massachusetts, SAD)

- 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) od BioChemica, AppliChem (Darmstadt, Njemačka)
- fosfatni pufer (PBS)
- tripsansko plavilo 0,4% uz 0,8 % NaCl od Lonza (Basel, Švicarska)
- tripsin/EDTA (tripsin 0,25%, 1mM EDTA-Na₄ u HBSS-u) s Ca, Mg i phenolredom (sterilni) od Panbiotech GmbH (Aidenbach, Njemačka)

4.1.3. Stanične linije

Antiproliferativni učinak novosintetiziranih derivata benzimidazola ispitan je na komercijalno dostupnim humanim staničnim linijama u 2D i 3D staničnoj kulturi. Korištene su adherentne stanične linije adenokarcinoma dojke:

- MDA-MB-231 (ATCC[®] HTB-26[™])
- MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™])

4.2. Metode

4.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Da bi se spriječila kontaminacija staničnih kultura, postupak uzgoja stanica potrebno je provoditi u laboratoriju koji ima osigurane kabinete za sterilan rad uz laminarni protok zraka. Sav pribor koji unosimo u takav kabinet također mora biti sterilan.

Adherentne stanice nasađivane su u bočice za kulturu stanica površine rasta 25 cm² i 75 cm² (BD, Falcon, Njemačka) te su rasle u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife[™], JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), pri temperaturi od 37 °C i 5% CO₂ uz visoku vlažnosti zraka.

Za održavanje adherentnih staničnih linija MDA-MB-231 i MCF-7 koristi se DMEM medij uz dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilina/streptomocina. Svakodnevno se provjerava konfluentnost stanica pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Nakon toga se iz bočica izvlači medij i stanice se ispiru PBS-om. Stanice se odvajaju od podloge uz pomoć proteolitičkog enzima tripsina.

Nakon 6 minuta inkubacije tripsin se inaktivira dodatkom svježeg medija i sakupljaju se stanice.

4.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica u kulturi

Za određivanje vijabilnosti stanica koristi se test s tripan plavilom tako da se stanice prvo resuspendiraju, te se onda uzme 50 μL stanične suspenzije i 100 μL boje. Staničnu suspenziju s bojom nanosimo na Bürker-Türkovu komoricu i pod invertnim mikroskopom brojimo žive stanice (Slika 9.). Mrtve stanice imaju oštećenu membranu pa su se obojile u plavo i njih ne brojimo, a žive stanice ostale su neobojene.

Izračun živih stanica pomoću formule:

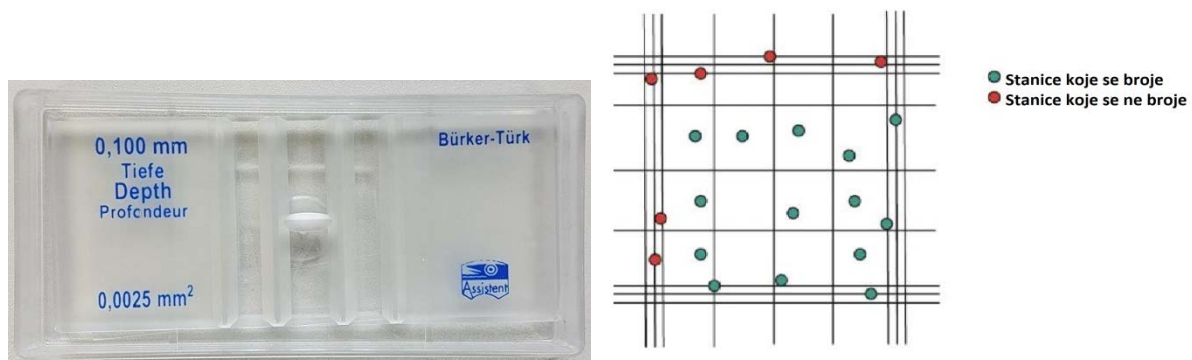
$$N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ stanica/cm}^3,$$

gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja.



Slika 9. Bürker-Türkova komorica i shematski prikaz stanica pod mikroskopom

4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

Citotoksični učinak spojeva na rast tumorskih stanica i proliferacija stanica u *in vitro* uvjetima može se odrediti MTT analizom. MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri aktivnost grupe enzima dehidrogenaza u živim stanicama. Enzim dehidrogenaza nalazi se u mitohondriju živih stanica i cijepa tetrazolni prsten. Dolazi do pretvorbe žutog MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u crveno-ljubičasti formazan precipitat, te se stvaraju kristali formazana (32). Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica i mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm na automatskom čitaču mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

Postupak u 2D staničnoj kulturi:

Adherentne stanične linije (MDA-MB-231 i MCF-7) nasađene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 2×10^4 st/mL i u volumenu od 200 μ L u svakoj jažici (180 μ L stanične suspenzije + 20 μ L spoja). Istovremeno su nasađene i kontrolne stanice bez tretmana. Kako bi se prihvatile za podlogu, stanice su inkubirane 24 h i nakon toga tretirane s 20 μ L derivata benzimidazola (MB-123, MB-127, MB-129) u različitim radnim koncentracijama (1×10^{-3} i 1×10^{-4} M) kako bismo dobili konačne koncentracije od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Nakon inkubacije 72 h, sa stanica je uklonjen medij i dodano je 40 μ L MTT-a u svaku jažicu. Stanice se dalje inkubiraju 4 h u CO₂ inkubatoru. Zatim je dodano 160 μ L DMSO-a, čija je uloga da otopi nastale kristale formazana. Mikrotitarske pločice stavljene su 15 min na laganu trešnju na tresilicu (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia) i zatim očitane na čitaču.

Postupak u 3D staničnoj kulturi:

Adherentne stanične linije (MDA-MB-231 i MCF-7) nasađene su na mikrotitarske pločice sa slabo prianjajućim konusnim dnom u koncentraciji od 1×10^4 st/mL i u volumenu od 200 μ L u svakoj jažici (180 μ L stanične suspenzije + 20 μ L spoja). Pločice su zatim centrifugirane na 1100 okretaja 10 min na 25 °C. Nasađene stanice inkubirane su 72 h kako bi se formirali sferoidi. Nakon 24 h promijenjen je medij i stanice su tretirane s 20 μ L derivata benzimidazola (MB-123, MB-127, MB-129) u različitim radnim koncentracijama (1×10^{-3} i 1×10^{-4} M) kako bismo dobili konačne koncentracije od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Nakon inkubacije 72 h, sa stanica je uklonjen medij i dodano je 40 μ L 10xMTT-a. Stanice se dalje inkubiraju 4

h u CO₂ inkubatoru. Zatim je dodano 160 µL DMSO-a u kojem su, uz laganu trešnju na tresilici kroz 15 min, otopljeni nastali formazanski kristali. Rezultati su očitani na čitaču.

Preživljenje tretiranih stanica je izračunato kao postotak u odnosu na kontrolu.

Izračun preživljenja stanica pomoću formule:

$$\% \text{ preživljenja} = (A_{\text{TEST}} - A_{\text{BLANCK}} / A_{\text{KONTROLA}} - A_{\text{BLANCK}}) \times 100$$

4.2.4. Određivanje promjena u staničnom ciklusu protočnom citometrijom

Promjene u staničnom ciklusu mogu se pratiti mjerenjem sadržaja DNK u stanici nakon bojanja fluorescentnim propidijevim jodidom (PI) koji ima sposobnost vezivanja na molekulu DNK. Protočnim citometrom mjeri se intenzitet fluorescencije koja je izravno proporcionalna količini DNK u stanici i time određuje udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Prikazom na histogramu mogu se uočiti stanice u različitim fazama i količina DNK, kao što je već prikazano na Slici 5.

Postupak:

Na ploče sa 6 jažica s ravnim dnom nasadene su stanice MDA-MB-231 s netretiranim kontrolama i isto tako i MCF-7 stanice, u koncentraciji od 3×10^5 st/mL i ukupnog volumena od 3 mL po jažici. Ploče su stavljene preko noći u CO₂ inkubator i idućeg dana tretirane ispitivanim derivatima (MB-123, MB-127 i MB-129) u konačnoj koncentraciji 1×10^{-5} M i zatim opet ostavljene na 24 h u CO₂ inkubator. Nakon tripsinizacije stanice su prikupljene, isprane u PBS-u i resuspendirane u 200 µL PBS-a. Dodano im je 3 mL hladnog etanola za fiksaciju. Zatim su zamrznute na -20 °C do dana analize. Na dan analize, stanice su centrifugirane (Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 1000 rpm 6 min i odbačen je supernatant. Isprane su u 1 mL PBS-a i opet centrifugirane. Skupljene su u 350 µL PBS-a u epruvete za protočnu citometriju. U svaku je još dodano 30 µL 10 mg/mL RN-aze 5 min, kako bi se razgradila preostala RNA. Na kraju se dodaje 150 µL PI i epruvete se ostavljaju 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi analiza na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka).

4.2.5. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka obavila se pomoću statističkog programa STATISTICA v13.0 za Windows operativne sustave. Rezultati stanične proliferacije dobiveni MTT testom obavljani su u triplikatu. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka određena je Kolmogorov – Smirnovljevim testom. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Rezultati protočne citometrije analizirani su pomoću FlowJo paketa (v10).

5. REZULTATI

5.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi

MTT testom ispitan je antiproliferativni učinak derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 u koncentracijama od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M na staničnim linijama MDA-MB-231 i MCF-7 u 2D i 3D kulturi. Rezultati prikazuju postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

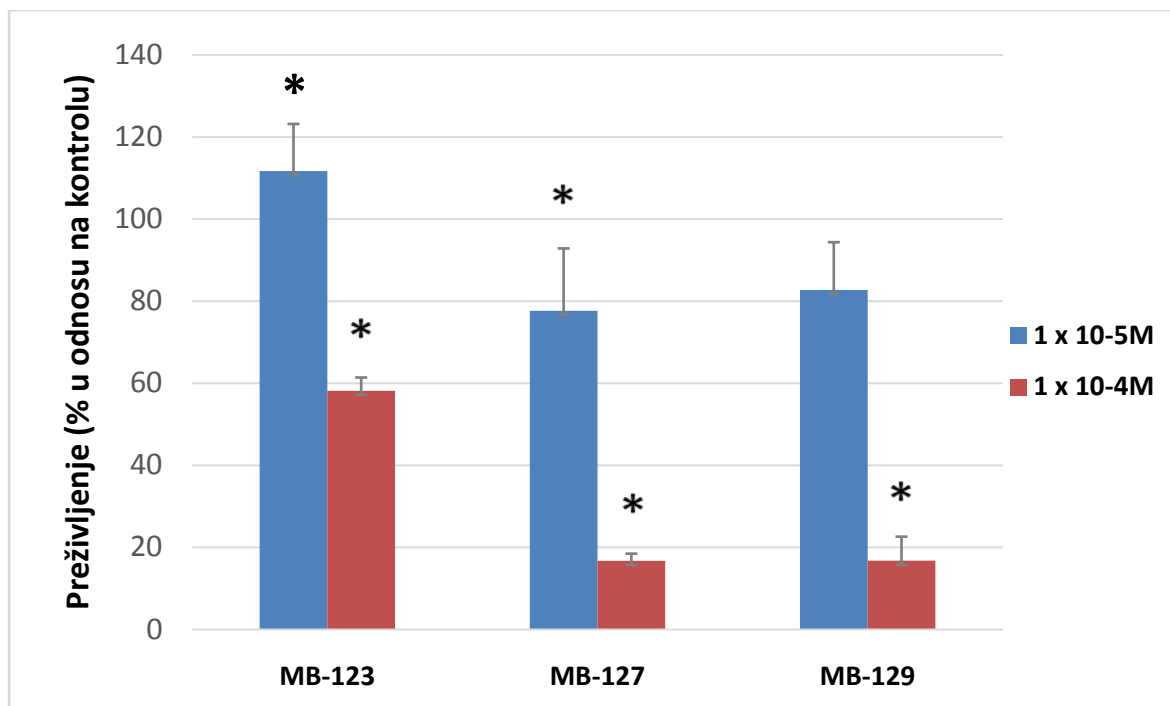
Na MDA-MB-231 staničnoj liniji u 2D kulturi najbolji inhibicijski učinak pokazuju derivati MB-127 i MB-129, koji inhibiraju rast stanica za više od 80% pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Statistički značajnu inhibiciju od oko 40% ostvario je i derivat MB-123 pri istoj koncentraciji. Pri nižoj koncentraciji (1×10^{-5} M) derivati MB-127 i MB-129 imaju približno 20%-tni učinak na inhibiciju staničnog rasta, dok derivat MB-123 pokazuje najveći postotak preživljenja stanica od oko 111% , odnosno ima lošiji antiproliferativni učinak od druga dva derivata pri istoj koncentraciji (Slika 10. A).

U 3D kulturi MDA-MB-231 stanica spoj MB-123 pokazuje najbolje inhibicijske učinke na njihov rast u objema ispitivanim koncentracijama, od oko 25 – 35%. Derivati MB-127 i MB-129 pri koncentraciji od 1×10^{-5} M nemaju statistički značajnu inhibiciju rasta jer pokazuju velik postotak preživljenja stanica. Pri većoj koncentraciji od 1×10^{-4} M ti derivati ostvaruju minimalnu inhibiciju staničnog rasta od 20 – 25% (Slika 10. B).

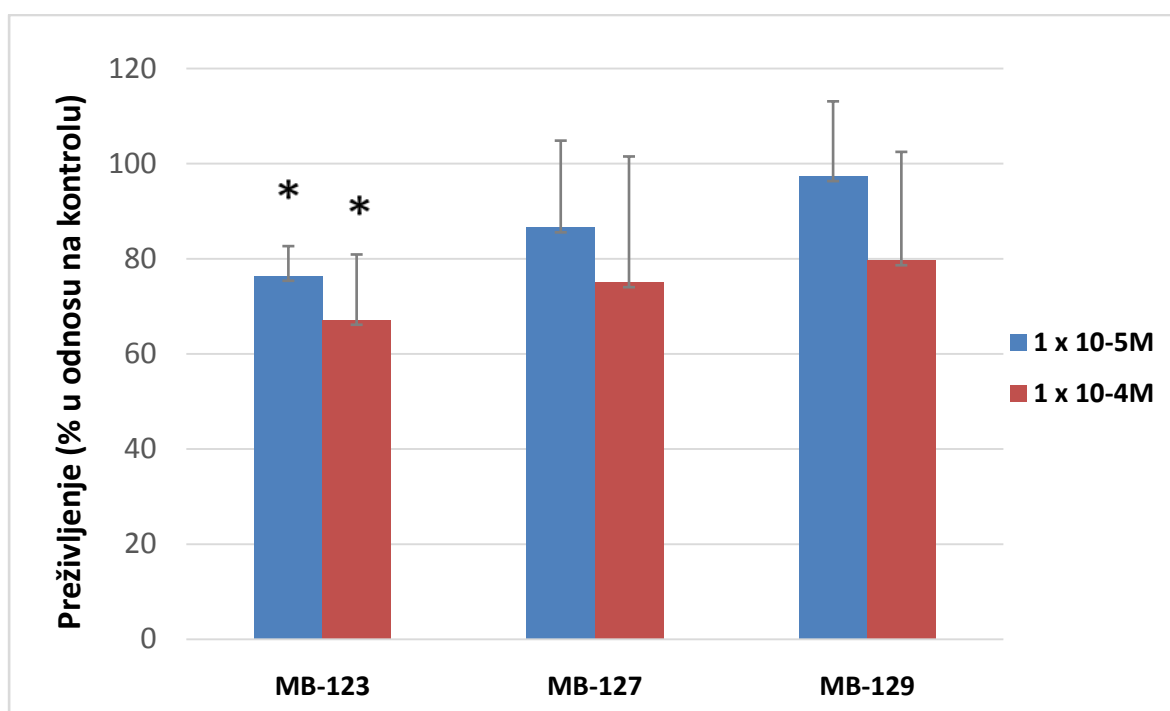
Na slici 11. A prikazano je preživljenje MCF-7 stanične linije u 2D kulturi, te se može uočiti da sva tri spoja statistički značajno inhibiraju rast stanica pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Najbolji učinak na inhibiciju rasta MCF-7 stanica pri toj koncentraciji, od oko 90%, ima derivat MB-129. Slijedi ga derivat MB-127 s inhibicijskim djelovanjem od oko 85% i MB-123 sa 70%-tnim učinkom na inhibiciju staničnog rasta. Pri manjoj koncentraciji (1×10^{-5} M) spoj MB-123 pokazuje preživljenje stanica od oko 80%, spoj MB-127 oko 85% i spoj MB-129 oko 75%.

Iz Slike 11. B vidljivo je da na staničnu liniju MCF-7 u 3D kulturi najbolji inhibicijski učinak ima spoj MB-129 u objema ispitivanim koncentracijama. Sva tri derivata pri

koncentraciji od 1×10^{-4} M ostvaruju statistički značajnu inhibiciju na rast stanica od oko 50%. Pri koncentraciji od 1×10^{-5} M derivati MB-123 i MB-127 statistički značajno ne inhibiraju stanični rast zbog većeg postotka preživljenja stanica od oko 75%.

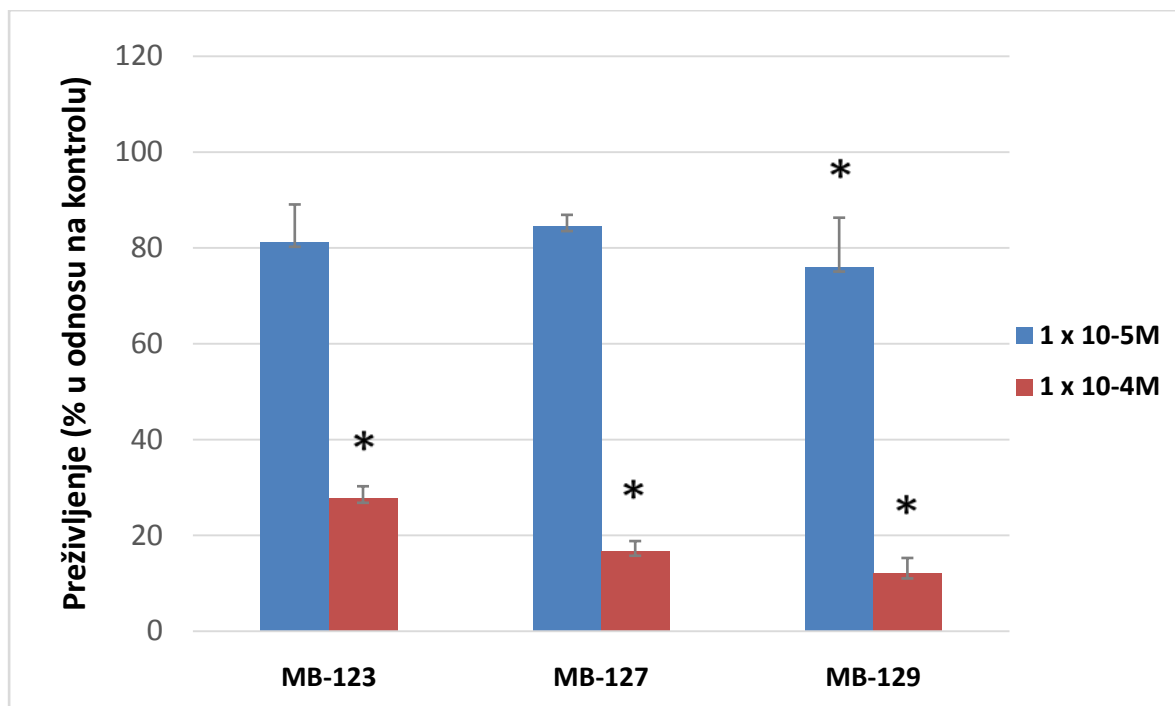


10. A

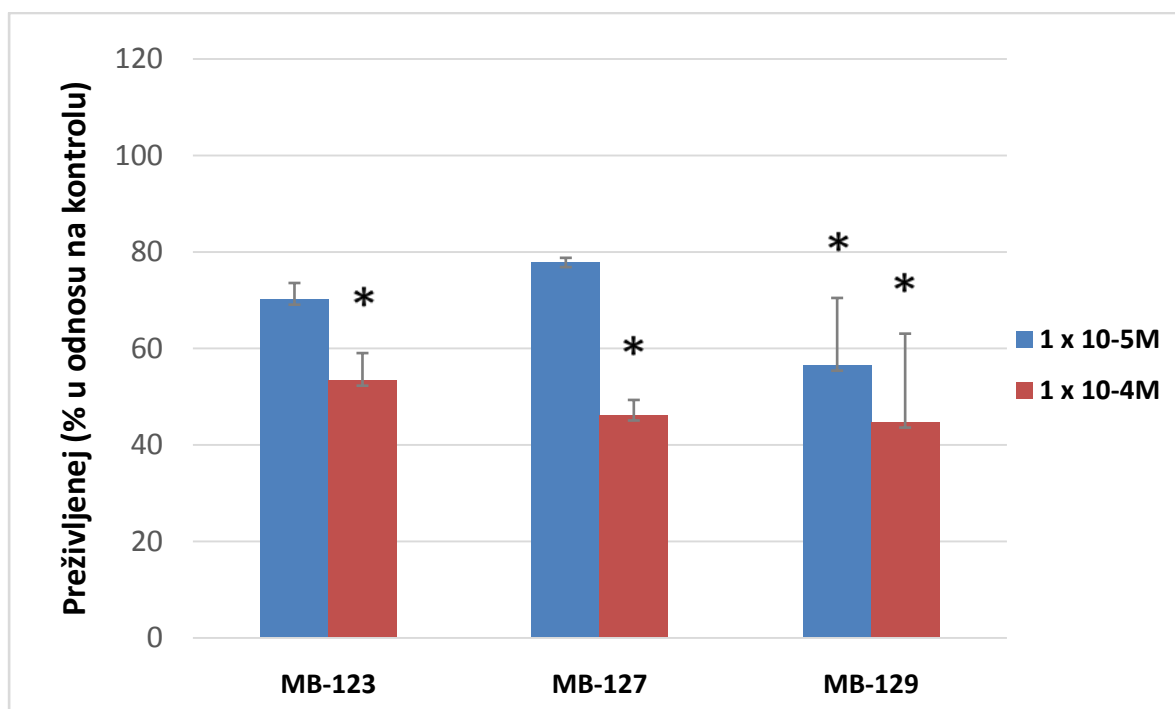


10. B

Slika 10. Grafički prikaz antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 na staničnu liniju MDA-MB-231 u 2D (A) i 3D (B) kulturi. Stanice su tretirane derivatima 72 h pri koncentracijama od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Citotoksični učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice



11. A



11. B

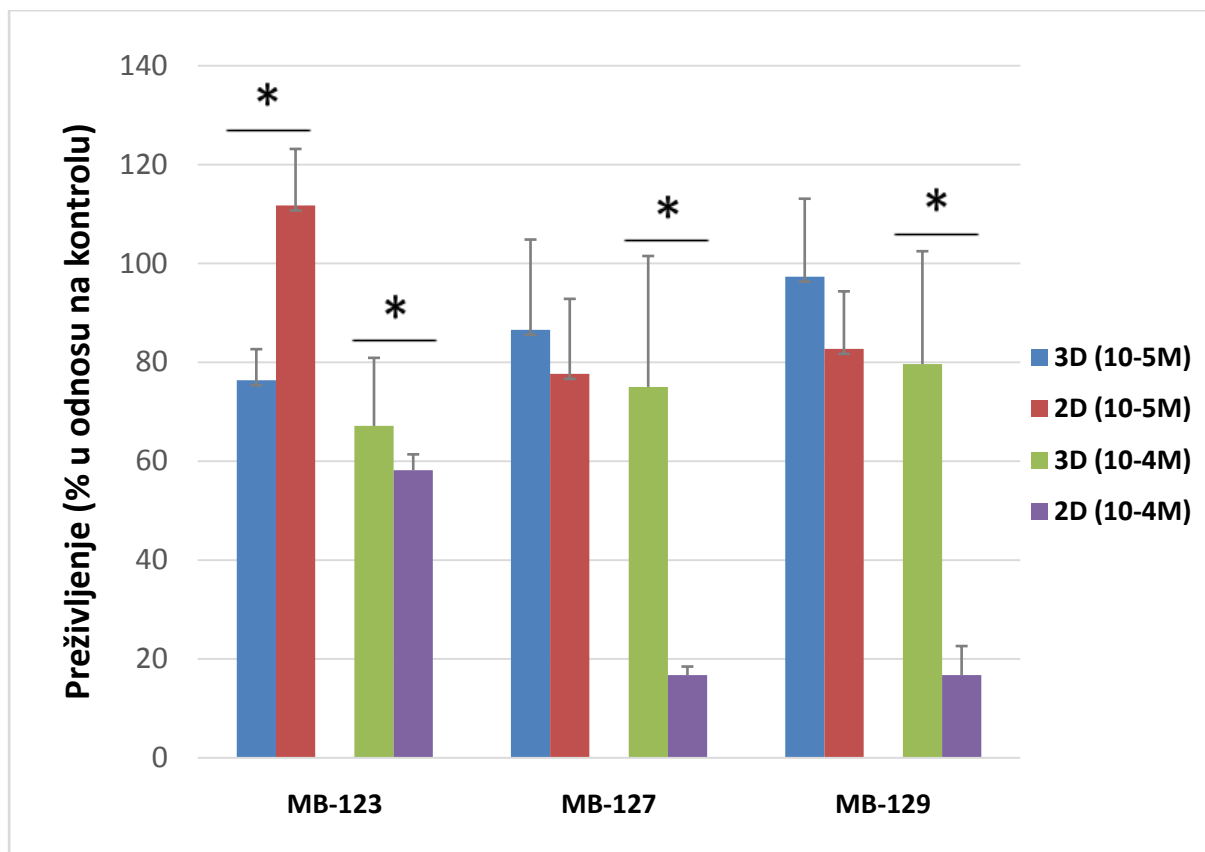
Slika 11. Grafički prikaz antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 na staničnu liniju MCF-7 u 2D (A) i 3D (B) kulturi. Stanice su tretirane derivatima 72 h pri koncentracijama od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Citotoksični učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice

5.1.1. Usporedba antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi

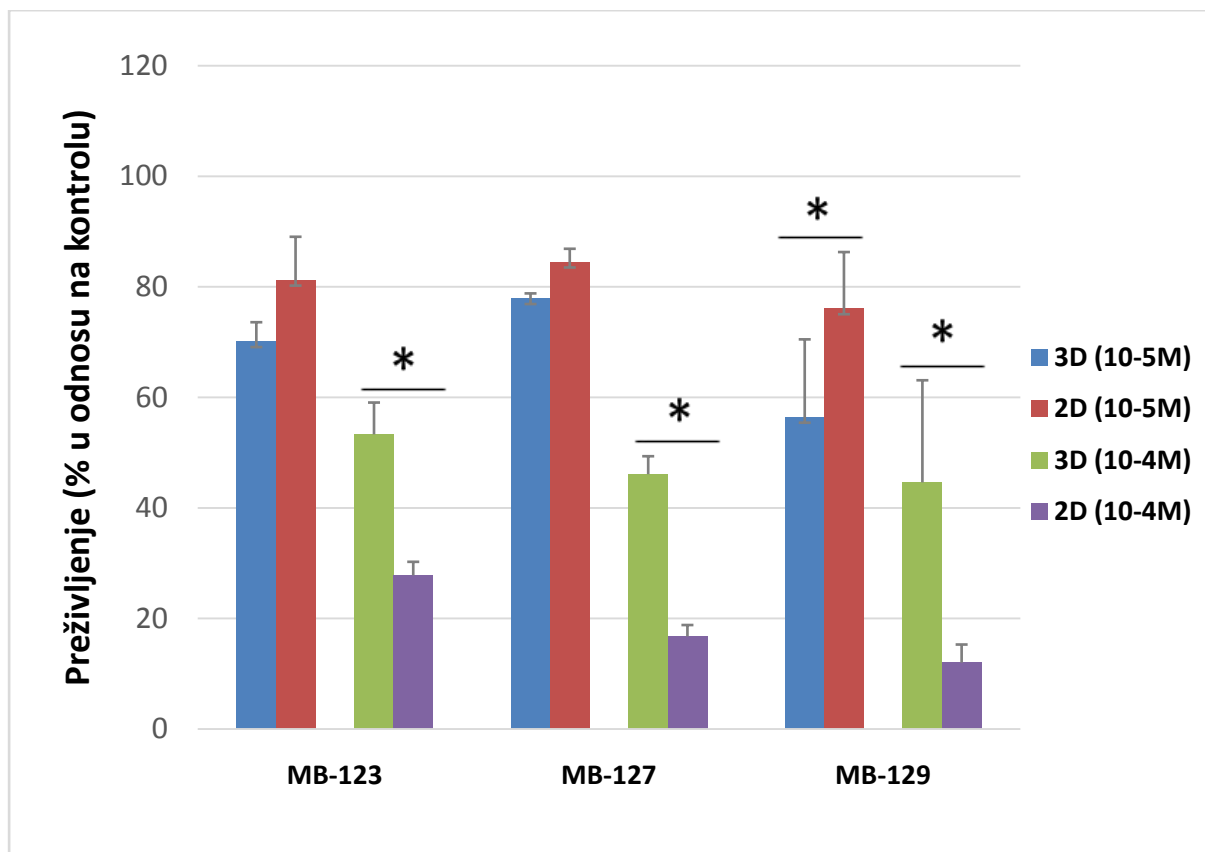
Na slikama 12. i 13. prikazana je usporedba rezultata dobivenih za 2D i 3D staničnu kulturu nakon 72 h izloženosti djelovanju derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 pri koncentracijama od 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M.

Usporedbom rezultata tumorske stanične linije MDA-MB-231 uočene su razlike u inhibiciji rasta između 2D i 3D kulture koje ovise o koncentraciji pojedinog derivata. Spoj MB-123 pokazuje veći inhibicijski učinak za oko 35% na rast stanica u 3D kulturi od 2D pri koncentraciji od 1×10^{-5} M. Povećanjem koncentracije na 1×10^{-4} M spoj ima izraženiji inhibicijski učinak na 2D kulturu, koji je za 10% veći nego u 3D kulturi. Spoj MB-127 pri koncentraciji od 1×10^{-5} M pokazuje za 10% veće preživljenje stanica u 3D kulturi od 2D kulture. Pri koncentraciji od 1×10^{-4} M isti spoj ne dovodi do promjene u inhibiciji staničnog rasta 3D kulture, dok u 2D kulturi postiže inhibiciju rasta od 85%. Spoj MB-129 djeluje jednako kao i prethodno opisani derivat (Slika 12.).

Kod MCF-7 tumorskih stanica primijećeno je da sva tri ispitivana derivata pri koncentraciji od 1×10^{-5} M imaju bolji inhibicijski učinak na rast stanica u 3D kulturi od 2D kulture, što je najviše izraženo kod djelovanja derivata MB-129, koji pokazuje za 20% veći inhibicijski učinak na stanični rast 3D kulture od 2D. Usporedbom postotka preživljenja stanica u 2D i 3D kulturi pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, uočeno je da sva tri derivata uzrokuju za 30% veće preživljenje stanica u 3D kulturi, odnosno derivati pokazuju značajno bolji inhibicijski učinak na rast stanica u 2D kulturi (Slika 13.).



Slika 12. Grafički prikaz usporedbe antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 na staničnu liniju MDA-MB-231 u 2D i 3D kulturi. Stanice su tretirane derivatima 72 h pri koncentracijama od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Citotoksični učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice



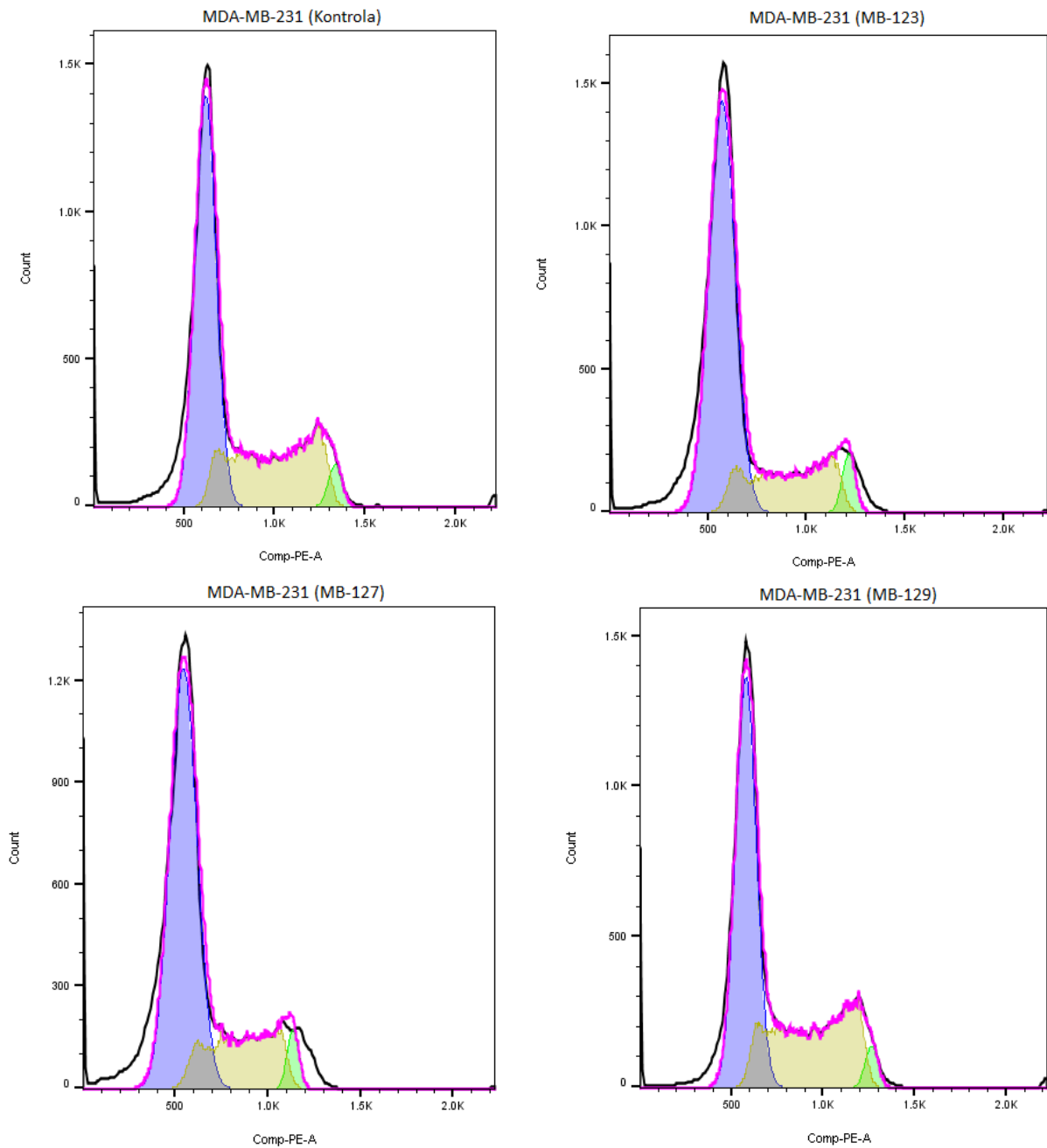
Slika 13. Grafički prikaz usporedbe antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 na staničnu liniju MCF-7 u 2D i 3D kulturi. Stanice su tretirane derivatima 72 h pri koncentracijama od 1×10^{-4} i 1×10^{-5} M. Citotoksični učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice

5.2. Analiza promjena u staničnom ciklusu

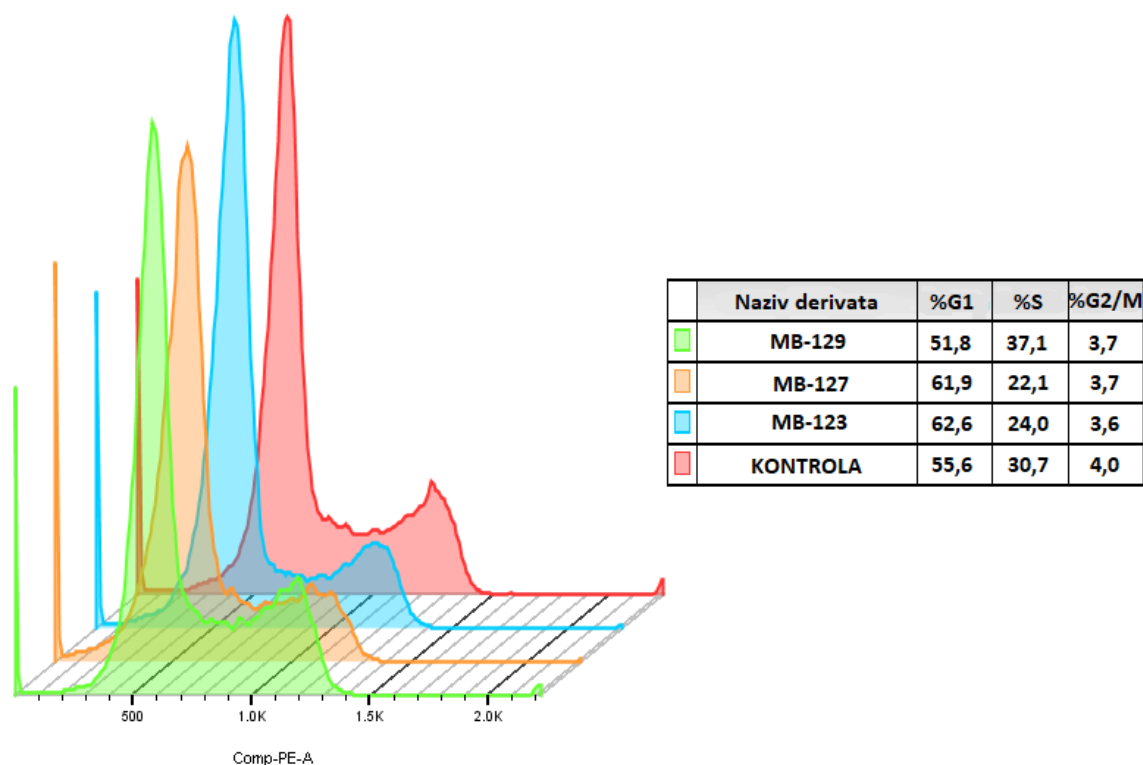
Promjene u staničnom ciklusu ispitivane su na objema staničnim linijama: MDA-MB-231 i MCF-7, nakon izlaganja derivatima benzimidazola (MB-123, MB-127 i MB-129) u koncentraciji od 1×10^{-5} M. Protočnim citometrom izmjerena je intenzitet fluorescencije nakon obojenja stanica PI bojom koja se veže za molekulu DNK. Udio stanica u određenoj fazi nakon izlaganja derivatima benzimidazola prikazan je histogramom.

5.2.1. Utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus MDA-MB-231 stanica

Na Slikama 14. i 15. prikazi su analize staničnog ciklusa MDA-MB-231 stanične linije, nakon izlaganja derivatima benzimidazola, pomoću FlowJo programskog paketa. Kontrolne, netretirane MDA-MB-231 stanice su najvećim udjelom (55,6%) u G_1 -fazi, zatim u S-fazi s 30,7% stanica i najmanje u G_2/M -fazi (4,0%). Nakon izlaganja stanica djelovanju derivata MB-123, primijećen je porast broja stanica u G_1 -fazi (62,6%), a smanjenje u S-fazi (24,0%), dok G_2/M -faza pokazuje minimalne razlike u udjelu stanica. Derivat MB-127 pokazuje najveći učinak na S-fazu staničnog ciklusa, gdje dovodi do smanjenja broja stanica (22,1%) u odnosu na kontrolne. U fazi G_1 dovodi do slabijeg porasta broja stanica, a u G_2/M -fazi ne utječe značajno na promjenu raspodjele stanica. Derivat MB-129 ima suprotan učinak, odnosno uzrokuje blago smanjenje udjela stanica u G_1 -fazi i veći porast broja stanica u S-fazi (37,1%). Kod sva 3 derivata uočena je neznatna promjena raspodjele stanica u fazi G_2/M , odnosno sva tri spoja dovode do istog minimalnog smanjenja broja stanica (3,7%) u toj fazi ciklusa.



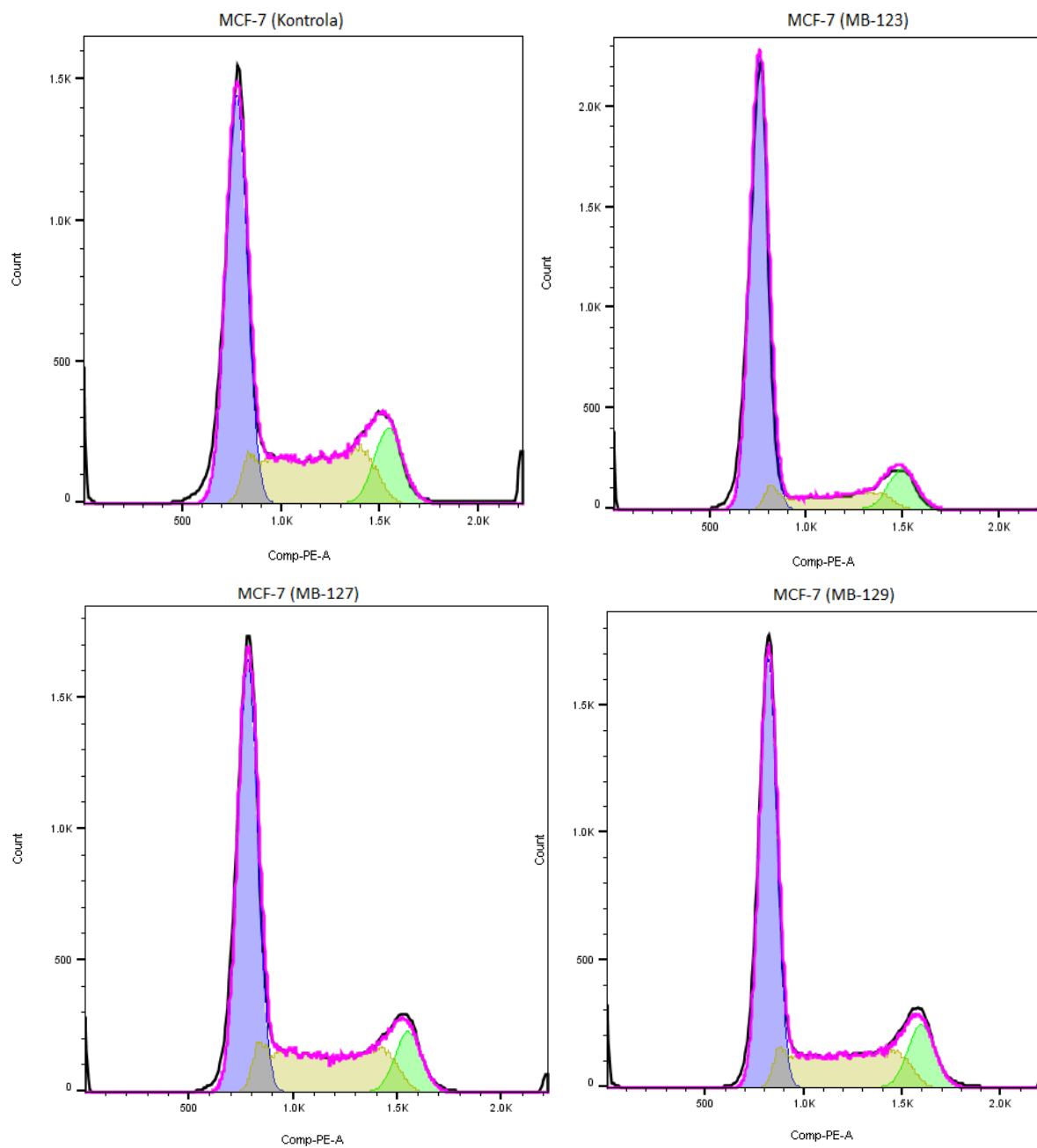
Slika 14. Analiza staničnog ciklusa MDA-MB-231 stanica protočnim citometrom. Ispitivana stanična linija je izložena djelovanju derivata MB-123, MB-127 i MB-129 u koncentraciji 1×10^{-5} M. Histogrami prikazuju raspodjelu stanica u G₁, S i G₂/M faze ciklusa



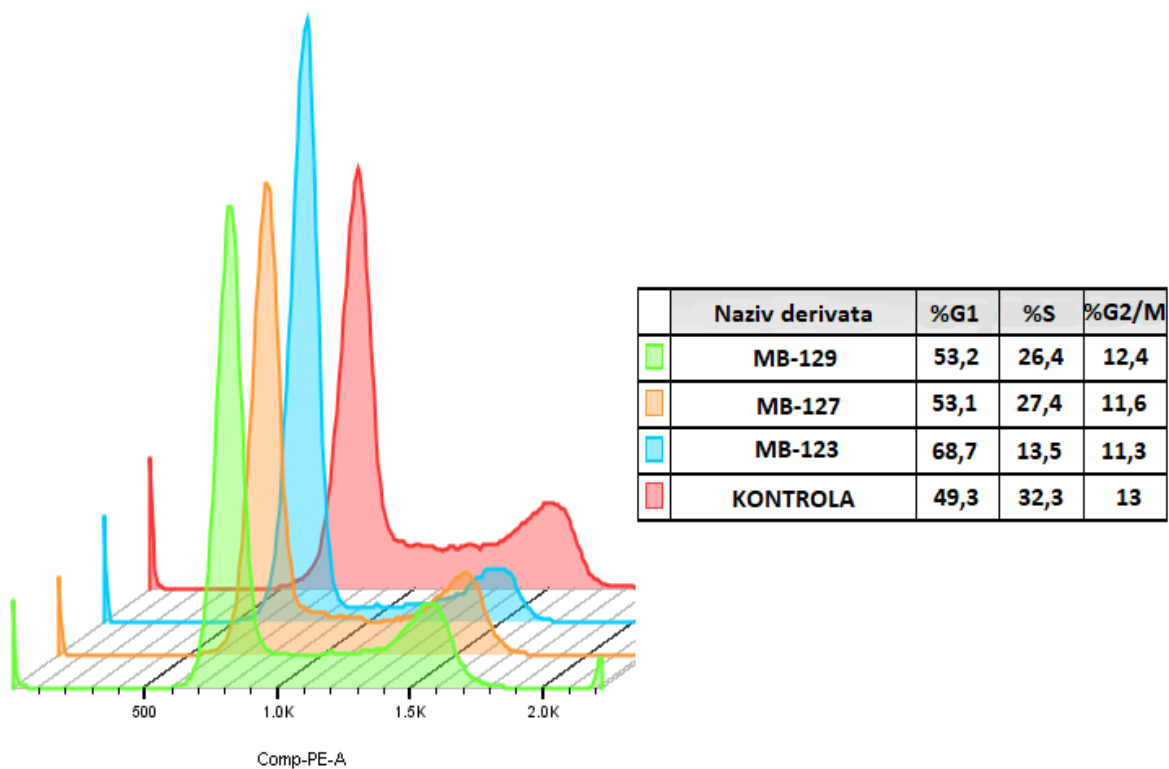
Slika 15. Histogramski prikaz usporedbe udjela MDA-MB-231 stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa

5.2.2. Utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus MCF-7 stanica

Nakon što je metodom protočne citometrije obavljena analiza staničnog ciklusa MCF-7 linije, rezultati učinka derivata benzimidazola su prikazani pomoću histograma (Slike 16. i 17.), dobivenih FlowJo programom. Kontrolne MCF-7 stanice raspoređene su između tri faze ciklusa, s udjelom od 49,3% stanica u fazi G_1 , 32,3% u S-fazi i 13% u fazi G_2/M . Djelovanje derivata MB-123 najviše je izraženo u porastu broja stanica u G_1 -fazi (68,7%), pa zatim smanjenju udjela stanica u S-fazi (13,5%). Učinak je u fazi G_2/M minimalan. Derivati MB-127 i MB-129 pokazuju sličan učinak koji značajno ne utječe na promjenu raspodjele stanica u pojedinim fazama u usporedbi s kontrolom, a odnosi se na blagi porast stanica u fazi G_1 te slabo smanjenje u fazama S i G_2/M .



Slika 16. Analiza staničnog ciklusa MCF-7 stanica protočnim citometrom. Ispitivana stanična linija izložena je djelovanju derivata MB-123, MB-127 i MB-129 u koncentraciji 1×10^{-5} M. Histogrami prikazuju raspodjelu stanica na G_1 , S i G_2/M faze ciklusa



Slika 17. Histogramski prikaz usporedbe udjela MCF-7 stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa

6. RASPRAVA

Karcinom dojke najčešći je karcinom u žena te predstavlja i najčešći uzrok smrti od raka među ženama diljem svijeta (33). S obzirom na povećanu pojavu oboljenja od karcinoma dojke raste potreba za otkrivanjem novih spojeva s citostatskim djelovanjem, čija je zadaća selektivno ubijanje ili inhibicija rasta tumorskih stanica bez utjecaja na zdrava tkiva (34). Budući da je klasična kemoterapija, koja koristi male molekule ili bioaktivne prirodne proizvode, i dalje glavno sredstvo liječenja tumora, posljednjih godina zabilježen je ogroman rast u pronalasku novih heterocikličkih spojeva s antitumorskim djelovanjem. Kako je meta većine supstanci s antitumorskim djelovanjem molekula DNK, nastoje se razviti lijekovi koji su selektivni s obzirom na mjesto vezanja na dvostruku uzvojnici DNK. Benzimidazolna jezgra i njezini derivati, zbog svoje biološke aktivnosti te sličnosti s purinskim bazama, ključne su jedinice mnogih heterocikličkih antitumorskih lijekova. Upravo ta strukturna sličnost omogućava benzimidazolu vezanje na molekulu DNK i upotrebu kao farmakološki aktivnu supstancu (25). U novije vrijeme razvijaju se spojevi kinolinskih i amidinskih derivata benzimidazola sintetiziranih u jednu hibridnu molekulu, koji posjeduju mehanizme interkaliranja u DNK i inhibicije topoizomerase II. Takvi derivati upotrijebljeni su i u ovom radu, u svrhu daljnjeg istraživanja njihove protutumorske aktivnosti.

U radu smo istraživali utjecaj novih derivata benzimidazola na stanične linije adenokarcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Korišteni su spojevi MB-123, MB-127 i MB-129, kojima smo tretirali stanice u 2D i 3D kulturi. Iz rezultata se može uočiti da je najveći učinak imao derivat MB-129 na obje stanične linije u 2D kulturi pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Isti derivat ostvario je dobar učinak i na 3D kulturu MCF-7 stanica pri istoj koncentraciji. Također je uočeno da je inhibicija rasta općenito izraženija pri većim koncentracijama spojeva i u 2D i u 3D kulturi za obje stanične linije. I druga istraživanja provedena na istim staničnim linijama, koja su proučavala utjecaj N-supstituiranih derivata benzimidazola pokazala su da se citotoksični učinak pojačava s povećanjem koncentracije (35). Iz rezultata se još može uočiti da pri većoj koncentraciji od 1×10^{-4} M, 2D kultura pokazuje bolje rezultate na tretman ispitivanim spojevima od 3D stanične kulture, tj. prisutno je značajnije smanjenje staničnog rasta. Pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M, spojevi MB-123 na MDA-MB-231 staničnoj liniji i MB-129 na MCF-7 stanicama ostvaruju bolje učinke u 3D kulturi.

Kao što smo već rekli, tumori u prirodnom okruženju rastu u trodimenzionalnom okolišu unutar kojega raspored stanica utječe na njihove međusobne interakcije. Samim time 3D stanična kultura bolje oponaša *in vivo* uvjete rasta od klasičnog 2D monosloja. Međutim, zbog specifičnog rasta 3D kulture kao nakupine stanica, tj. sferoida, Edmondson i sur. primijetili su da se stanice nalaze na različitim dubinama i kao takve ne primaju jednako hranjivih tvari, te da veći sferoidi teže obavljaju funkcije izmjene plinova (18). Isto tako moguće je da djelovanje nekog spoja neće biti jednako na svim stanicama u sferoidima, nego će na one površinske djelovati jače od dubinskih. Takav problem u 2D kulturi ne postoji, jer su stanice zbog načina uzgoja na ravnoj površini sve jednako izložene djelovanju pojedinog derivata. Pojedina istraživanja na nekim drugim staničnim linijama su potvrdila kako u 3D kulturi stanice rastu sporije nego u 2D, a moguća objašnjenja bila su povezana i s morfologijom sferoida, a na rast je imao utjecaj i nosač koji se koristio, odnosno materijal od kojeg je izrađen (36, 37).

Na proliferaciju stanica može utjecati i vrsta stanične linije te struktura spojeva. Horning i sur. istraživali su utjecaj antibiotika doksorubicina, DNK interklalirajućeg antitumorskog agensa, na MCF-7 staničnu liniju. Dobiveni rezultati pokazali su sporiju difuziju i neujednačenu distribuciju lijeka u stanicama koje su rasle u 3D kulturi od onih u 2D kulturi i shodno time antiproliferativni učinak spoja je, slično kao i u našim rezultatima za derivate MB-127 i MB-129 pri većoj koncentraciji, bio izraženiji na MCF-7 stanicama u 2D kulturi (38). Međutim, Imamura i sur. također su ispitivali djelovanje doksorubicina na obje stanične linije: MCF-7 i MDA-MB-231 u 2D i 3D kulturi. Njihovo istraživanje pokazalo je da te stanične linije u 3D kulturi formiraju labavije nakupine sferoida na koje lijek ima bolji utjecaj te sličniji onome u 2D kulturi (39). I u našem ispitivanju na MCF-7 stanicama, svi spojevi pri nižoj koncentraciji pokazali su bolji učinak u 3D kulturi, što potiče na daljnja istraživanja te stanične linije. U istraživanju Breslin i O'Driscoll na stanicama raka dojke, MDA-MB-231 stanična linija imala je slabu sposobnost stvaranja 3D sferoida, odnosno stvarale su se samo slabo vezane, ravne nakupine (23). Takva svojstva MDA-MB-231 stanica mogu ukazati na to da će lijekovi ostvariti dobar učinak ne samo u 2D nego i u 3D kulturi, kao što je slučaj s ispitivanim derivatom MB-123, koji pokazuje bolje antiproliferativno djelovanje na 3D stanice od 2D.

Istraživanja Thimmegowde na trisupstituiranim derivatima benzimidazola pokazala su inhibicijski učinak na MDA-MB-231 stanicama. Učinak spojeva ovisio je o poziciji supstituiranih grupa, tj. položaju na koji su se na benzimidazol vezale nove skupine, a na

proliferaciju stanica utjecala je i prisutnost benzimidazolne jezgre u derivatu (40). Starčević sa suradnicima ispitala je antitumorski učinak skupine heterocikličkih benzimidazolnih derivata, koji sadrže amidinske supstituente na položaju C-5 benzimidazolnog prstena, uvodeći različite heterocikličke jezgre na položaj C-2, kao što je piridin, N-metil-pirol ili imidazol. Zanimljivo je da su svi spojevi sa supstitucijskom funkcionalnom grupom na položajima 2 i 5 benzimidazolnog prstena pokazali značajnu selektivnost upravo prema MCF-7 staničnoj liniji raka dojke (41). Još jedno istraživanje s novosintetiziranim derivatima benzimidazola se bavilo usporedbom protutumorske aktivnosti na staničnim linijama raka dojke u 2D i 3D kulturi i povezanošću te aktivnosti sa strukturom spojeva. Utvrđeno je da aktivnost ispitivanih spojeva ovisi o prirodi funkcionalne skupine na benzimidazolnom ili fenilnom prstenu, pa se aktivnost poboljšava sintezom cikličkih spojeva s planarnom konformacijom. Uvođenje dodatnog dušikovog atoma u strukturu spojeva pokazuje povećanu antitumorsku aktivnost prema svim staničnim linijama i u 2D i u 3D kulturi (42). S obzirom na to da su ispitivani derivati benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 strukturno slični spojevi, te su pokazali antiproliferativnu aktivnost u oba stanična modela, to ih čini dobrim kandidatima za daljnja ispitivanja.

Proliferaciju stanica možemo pratiti promjenama u staničnom ciklusu, a nekontrolirana proliferacija obilježje je tumorskih stanica. U istraživanju Reddyja i sur., tretman spojevima pirazola koji sadrže benzimidazolnu jezgru na MCF-7 staničnu liniju pokazao je porast stanica u G₁-fazi staničnog ciklusa, a smanjenje u fazama S i G₂/M. To odgovara našim rezultatima, u kojima je spoj MB-123, nakon tretiranja stanica, također uzrokovao njihovo nakupljanje u G₁-fazi. Hibridni spojevi pirazol-benzimidazola utječu i na razinu ekspresije tumorskih supresorskih gena kao što ciklini i ciklin ovisne kinaze. Ti enzimi direktno utječu na stanični ciklus, a derivati benzimidazola djeluju kao njihovi inhibitori, što dovodi do zastoja staničnog ciklusa i inhibicije staničnog rasta (43). Rezultati istraživanja o utjecaju derivata benzimidazola na stanični ciklus tumorske linije adenokarcinoma pluća pokazali su da derivati uzrokuju zaustavljanje replikacije u S-fazi, gdje dovode do nakupljanja stanica, s posljedičnim padom stanica u fazi G₂/M. Time je stanicama omogućen učinkovit prijelaz u programiranu staničnu smrt – apoptozu. Uz to je primijećeno inhibitorno djelovanje i na aktivnost enzima topoizomeraze, što potiče oštećenje genetskog materijala tumorskih stanica (44). Spoj MB-129 u našim rezultatima pokazao je analogan učinak na stanični ciklus ispitivane MDA-MB-231 stanične linije adenokarcinoma dojke.

Benzimidazol i njegovi derivati, kao potencijalni protutumorski agensi, pokazuju očite antiproliferativne učinke na rast tumorskih stanica raka dojke, te bi njihovu djelotvornost trebalo ispitati na što više različitih staničnih linija tumora u svrhu dobivanja specifičnijih informacija o mehanizmima njihova djelovanja na inhibiciju staničnog rasta. Istraživanja bi trebala staviti težište na *in vitro* razvitak 3D staničnih sustava jer oni predstavljaju budućnost u predviđanju *in vivo* učinkovitosti citostatskih terapeutika (45).

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- novosintetizirani derivati benzimidazola ostvaruju različit antiproliferativni učinak na ispitivane stanične linije u 2D i 3D staničnoj kulturi
- svi derivati pokazuju bolje citotoksično djelovanje na rast MDA-MB-231 i MCF-7 stanica u 2D kulturi, a inhibicija rasta izraženija je pri većim koncentracijama ispitivanih spojeva
- najveća protutumorska aktivnost sa statističkom značajnošću uočena je kod derivata MB-129 u 2D kulturi na obje stanične linije pri koncentraciji od 1×10^{-4} M
- spoj MB-123 dovodi do nakupljanja MCF-7 stanica u G₁-fazi staničnog ciklusa, što zaustavlja daljnji prolaz stanica kroz ciklus.

8. SAŽETAK

Uvod: Karcinom dojke predstavlja vodeći uzrok smrtnosti od raka kod žena diljem svijeta. Kontinuirano se provode istraživanja na novim modelima, poput 3D staničnih sustava, sa svrhom razvijanja učinkovitijih antitumorskih lijekova. Neki od njih su i benzimidazoli, čija je jezgra dio mnogih terapijskih agensa, a mehanizam djelovanja usmjeren je izravno na tumorske stanice, pa pogoduju daljnjim istraživanjima kao potencijalni citostatici.

Ciljevi: Ispitati razlikuje li se antiproliferativni potencijal derivata benzimidazola na staničnim linijama karcinoma dojke u 2D i 3D staničnoj kulturi. Odrediti promjene u staničnom ciklusu.

Materijali i metode: Inhibitorni učinak derivata benzimidazola na rast MDA-MB-231 i MCF-7 tumorskih stanica dojke određen je MTT testom u 2D i 3D kulturi. Promjene u staničnom ciklusu ispitivanih staničnih linija praćene su protočnim citometrom.

Rezultati: Uočene su razlike između antiproliferativnog učinka derivata benzimidazola na stanice koje rastu u 2D kulturi u odnosu na 3D kulturu. Najbolju inhibiciju na rast stanica ostvario je derivat MB-129 na obje stanične linije pri koncentraciji 1×10^{-4} M. Zabilježene su promjene u udjelu stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa; na MCF-7 stanicama derivat MB-123 je uzrokovao njihovo nakupljanje u G_1 -fazi, a na staničnu liniju MDA-MB-231 najznačajnije je djelovao spoj MB-129 koji dovodi do povećanja broja stanica u S fazi.

Zaključak: Derivati benzimidazola pokazuju antiproliferativne učinke na rast stanica karcinoma dojke, ovisno o primijenjenoj koncentraciji i uvjetima kulture. Statistički najznačajniji učinak je imao derivat MB-129. Izloženost tumorskih stanica ispitivanim derivatima je dovela do promjena u staničnom ciklusu.

Ključne riječi: antiproliferativni učinak; derivati benzimidazola; karcinom dojke; stanični ciklus; tehnike stanične kulture

9. SUMMARY

Antiproliferative effects of benzimidazole derivates on 2D and 3D cell cultures

Introduction: Breast cancer is the leading cause of cancer death in women all around the world. The research on new models, such as 3D cell systems, is ongoing, with the aim of developing effective anticancer drugs. One of them is benzimidazole, the core of which is a part of many therapeutic agents, and the mechanism of action directly focuses on tumor cells, thus favoring further research as potential cytostatic.

Objectives: To investigate whether the antiproliferative potential of benzimidazole derivatives on the breast cancer cell lines differs in 2D and 3D cell cultures. To determine changes in the cell cycle.

Materials and methods: The inhibitory effect of benzimidazole derivatives on MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cell growth rates was determined by MTT test in 2D and 3D cultures. Changes in the cell cycle of the examined cell lines were monitored by flow cytometry.

Results: Differences between the antiproliferative effects of benzimidazole derivatives on the cell growth in 2D culture compared to 3D culture were observed. The best growth inhibition of the cell growth resulted in the MB-129 derivative on both cell lines at 1×10^{-4} M concentration. Cell-specific changes in individual phases of the cell cycle were recorded; on MCF-7 cells, the MB-123 derivative caused their accumulation in the G₁-phase, and the MDA-MB-231 cell line was the most important compound MB-129 leading to accumulation of cells in the S-phase of the cycle.

Conclusion: Benzimidazole derivatives exhibit antiproliferative effects on the breast cancer cell growth, depending on the concentration applied and culturing conditions. MB-129 derivative had statistically most significant effect. Exposure of the cells to the investigated derivatives has led to changes in the cell cycle.

Keywords: antiproliferative effect; benzimidazole derivatives; breast cancer; cell cycle; cell culture techniques

10. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.
3. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, Glavaš-Obrovac L. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;137:196-210.
4. Abhisek M, Lopa M, Shulin L. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* 2013;31(6):347–354.
5. Glavaš-Obrovac Lj. Kultura stanica. Interna skripta za studente doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo. Osijek: Medicinski fakultet Osijek Sveučilište „J.J.Strossmayer“; 2008.
6. Benford DJ. The use of animal cells as replacements for whole animals in the toxicity testing of chemicals and pharmaceuticals. U: Spier RE, Griffiths JB, urednici. *Animal Cell Technology.* London: Academic Press; 1992. str 97-121.
7. Beskow LM. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* 2016;17(1):395–417.
8. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
9. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007;101(4):805-815.
10. Harada H, Nakagawa H, Oyama K, Takaoka M, Andl CD, Jacobmeier B, i sur. Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Mol Cancer Res: MCR.* 2003;1(10):729–38.
11. Olivotto M, Sbarba P. Environmental restrictions within tumor ecosystems select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008;7(2):176-187.
12. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer.* 2006;5(1):55.

13. Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, Hunter C, i sur. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet.* 2005;37(6):590–592.
14. Matarese G, La Cava A, Horvath TL. In vivo veritas, in vitro artificia. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):439-442.
15. Shay JW, Wright WE. Tissue Culture as a Hostile Environment: Identifying Conditions for Breast Cancer Progression Studies. *Cancer Cell.* 2007;12(2):100–101.
16. Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE, i sur. Transformation of Different Human Breast Epithelial Cell Types Leads to Distinct Tumor Phenotypes. *Cancer Cell.* 2007;12(2):160–170.
17. Abhisek M, Lopa M, Shulin Li. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* 2013;31(6):347–354.
18. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-18.
19. Kola I. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:227–230.
20. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon F. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J Cell Physiol.* 2014;230(1):16-26.
21. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008;3:1172–1184.
22. Kuen J. Influence of 3D tumor cell/fibroblast co-culture on monocyte differentiation and tumor progression in pancreatic cancer. Faculty of Biology, Julius-Maximilians University Würzburg; 2017.
23. Breslin S, O'Driscoll L, The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget.* 2016;7(29):45745-756.
24. Balasubramanian N, Deepika S, Pradeep K. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety. *Med Chem Res.* 2012;270-273.
25. Hranjec M, Karminski-Zamola G. Ciklički derivati benzimidazola i njihovo antitumorsko djelovanje. *Kem Ind.* 2008;57:299-306.
26. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Vitamin B12. *Encyclopædia Britannica.* Encyclopædia Britannica, inc. August 2018. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/vitamin-B12>. Datum pristupa: 28.08.2018.

27. Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Benzimidazole: A medicinally important heterocyclic moiety. *Med Chem Res.* 2012;21:269-283.
28. Woolley DW. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J Biol Chem.* 1944;152:225.
29. Brink NG, Folkers K. Vitamin B12. VI. 5,6-dimethylbenzimidazole, a degradation product of vitamin B12. *J Am Chem Soc.* 1949;71(8):2951.
30. Hranjec M, Kralj M, Piantanida I, Sedić M, Šuman L, Pavelić K, i sur. Novel Cyano- and Amidino-Substituted Derivatives of Styryl-2-Benzimidazoles and Benzimidazo[1,2-*a*]quinolines. Synthesis, Photochemical Synthesis, DNA Binding, and Antitumor Evaluation. *J Med Chem.* 2007;5696-5697.
31. Hranjec M, Pavlović G, Marijanović M, Kralj M, Karminski-Zamola G. Benzimidazole derivatives related to 2,3-acrylonitriles, benzimidazo[1,2-*a*]quinolines and fluorenes: Synthesis, antitumor evaluation in vitro and crystal structure determination. *Eur J Med Chem.* 2010;45:2405–2417.
32. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, i sur. Cell Viability Assays. 2013. U: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, i sur., urednici. *Assay Guidance Manual [Internet].* Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
33. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17(2):152-163.
34. Walia R, Hedaitullah M, Naaz SF, Iqbal K, Lamba HS. Benzimidazole derivatives – an overview. *Eur J Pharmacol.* 2011;565-567.
35. Sukhramani PS, Desai SA, Suthar MP. In-vitro cytotoxicity evaluation of novel N-substituted bis-benzimidazole derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Annals of Biol Res.* 2011;2(1):51-59.
36. Hongisto V, Jernstrom S, Fey V, Mpindi JP, Kleivi Sahlberg K, Kallioniemi O, i sur. High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e77232.
37. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:583–92.
38. Horning JL, Sahoo SK, Vijayaraghavalu S, Dimitrijevic S, Vasir JK, Jain TK. 3-D Tumor Model for In Vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *Mol Pharm.* 2008;5(5):849–862.

39. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, i sur. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1837-1843.
40. Thimmegowda NR, Nanjunda Swamy S, Kumar CS, Kumar YC, Chandrappa S, Yip GW, i sur. Synthesis, characterization and evaluation of benzimidazole derivative and its precursors as inhibitors of MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(1):432-5.
41. Starčević K, Kralj M, Ester K, Sabol I, Grce M, Pavelić K, i sur. Synthesis, antiviral and antitumor activity of 2-substituted-5-amidino-benzimidazoles. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(13):4419-26.
42. Brajša K, Vujasinović I, Jelić D, Trzun M, Zlatar I, Karminski- Zamola G, i sur. 2D and 3D in vitro antitumor activity of amidino substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a] quinoline derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2015;27:1-7.
43. Reddy TS, Kulhari H, Reddy VG, Bansal V, Karmal A, Shukla R. Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenyl-1H-pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. *Eur J Med Chem.* 2015;101:790-805.
44. Błaszczak-Świątkiewicz K, Sikora J, Szymański J, Danilewicz M, Mikiciuk-Olasik E. Biological evaluation of the toxicity and the cell cycle interruption by some benzimidazole derivatives. *Tumor Biol.* 2016;37:11135–45.
45. Gurski L, Petrelli N, Jia X, Farach-Carson M: Three-dimensional matrices for anti-cancer drug testing and development. *Oncol Issues.* 2010;25:20–25.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Elena Bartulica

Datum i mjesto rođenja: 30.04.1993., Livno, Bosna i Hercegovina

Adresa stanovanja: Šibenska 65, Split

E-mail: bartulicaelena@gmail.com

OBRAZOVANJE

2008. – 2012. – Opća gimnazija Livno, Livno

2012. – 2015. – Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Preddiplomski
sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2016. – 2018. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet,
Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

RADNO ISKUSTVO

prosinac 2015. – prosinac 2016. – Opća bolnica Šibensko kninske županije, Stručno
osposobljavanje za prvostupnicu medicinsko laboratorijske dijagnostike

lipanj 2018. – kolovoz 2018. – Sveučilišna prvostupnica medicinsko laboratorijske
dijagnostike u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Stella Tomić, Split

od kolovoza 2018. – Sveučilišna prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike na
Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split

OSTALO

Vozačka dozvola B kategorije