

Biološki učinci heptametinskih cijaninskih boja

Jadrijević-Mladar, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:239601>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Jadrijević-Mladar

**Biološki učinci heptametinskih
cijaninskih boja**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Petra Jadrijević-Mladar

**Biological effects of heptamethine
cyanine dyes**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Anamarije Brozović, te komentorice prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Anamariji Brozović na iskazanoj prilici, povjerenju i sveukupnom vodstvu kroz izradu ovog rada. Hvala Vam na svim stručnim i prijateljskim savjetima, podršci i svom prenesom znanju. Primjer ste kakav bi svaki mentor trebao biti.

Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, koji su uvijek bili spremni pomoći i odgovoriti na svako moje pitanje, a sve kroz prijateljsku atmosferu. Posebno hvala dr. sc. Jurici Baranašiću na posvećenom vremenu, strpljenju, prenesenom znanju i odgovorima na sva moja pitanja i nedoumice.

Veliko hvala i mojoj komentorki prof. dr. sc. Nadi Oršolić na korisnim savjetima i komentarima koji su pridonijeli poboljšanju ovog rada.

Posebno hvala i mojoj obitelji, roditeljima, bratu, prijateljicama i dečku na bezuvjetnoj podršci, ohrabrenjima, razumijevanju i brojnim savjetima koji su mi pomogli kroz ovo iskustvo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biološki učinci heptametinskih cijaninskih boja

Petra Jadrijević-Mladar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Heptametinske boje iz skupine cijaninskih boja imaju fluorescentna svojstva i fluoresciraju u bliskom IR-području. Zbog niske fototoksičnosti imaju potencijalnu primjenu u dijagnostičke svrhe. Zahvaljujući svojoj fotosenzibilnosti mogu se koristiti i u sklopu fotodinamične terapije pri liječenju pojedinih tipova tumora. Prilikom izrade ovog diplomskog rada ispitivana su biološka svojstva triju cijaninskih boja (Cy7): SB-35, SB-53 i SB-55, novosintetiziranih derivata fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom. Učinak boja Cy7 na metabolizam stanice, kao mjere vijabilnosti, njihova akumulacija u stanici i fototoksičnost ispitana je korištenjem stanica raka grlića maternice (HeLa), adenokarcinoma alveola (A549), melanoma (RPMI-7951) i normalnih fibroblasta. Moguća selektivnost spojeva s obzirom na otpornost stanica na lijekove ispitana je na dodatne četiri linije stanica: stanice seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja (roditeljska MES-OV i linija MES-OV CBP otporna na karboplatinu) i stanice adenokarcinoma jajnika (roditeljska SK-OV-3 i linija SK-OV-3 CBP otporna na karboplatinu). Korištenjem testa 3-(4,5-metiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid utvrđeno je da slaba citotoksičnost Cy7 boja, ali i selektivnost s obzirom na otpornost stanica na lijekove i njihovo podrijetlo, ukazuju na njihovu moguću upotrebu u dijagnostici, dok istovremeno povećanje citotoksičnosti fotoaktivacijom ukazuje na njihovo moguće korištenje u terapiji. Razlike u akumulaciji Cy7 boja s obzirom na vrstu stanica najvjerojatnije su uzrokovane različitim ekspresijama transportera OATP analiziran metodom *Western blot*. Preliminarni rezultati, dobiveni korištenjem testa sa sulforadaminom B, ukazuju na moguće djelovanje boja Cy7 na sintezu proteina.

Ključne riječi: heptametinske cijaninske boje, tumor, fotodinamična terapija, dijagnostika (46 stranica, 15 slika, 6 tablica, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Anamaria Brozović, znanstvena savjetnica

Komentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić; Izv. prof. dr. sc. Romana Gračan; Prof. dr. sc. Maja Matulić

Zamjena: Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Rad prihvaćen: 04.07.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Biological effects of heptamethine cyanine dyes

Petra Jadrijević-Mladar

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Heptamethine dyes from the group of cyanine dyes have fluorescent properties and work in the near-infrared region. Due to their low phototoxicity, they have a potential application for diagnostic purposes. Thanks to their photosensitivity, they can also be used as part of photodynamic therapy in the treatment of certain types of tumors. During the preparation of this thesis, the biological properties of three Cy7 dyes were investigated: SB-35, SB-53 and SB-55, newly synthesized phenanthridine derivatives with amino acid substituents (glycine, lysine) and a guanidinocarbonylpyrrole unit. The effect of Cy7 dyes on cell metabolism, as a measure of viability, their accumulation in the cell and phototoxicity was tested using cervical cancer cells (HeLa), alveolar adenocarcinoma (A549), melanoma (RPMI-7951) and normal fibroblasts. The possible selectivity of the compounds, considering cell drug resistance, was tested on four additional cell lines: high-grade serous ovarian cancer cells (parental MES-OV and carboplatin-resistant MES-OV CBP) and ovarian adenocarcinoma cells (parental SK-OV-3 and carboplatin resistant line SK-OV-3 CBP). Using the 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test, it was determined that the weak cytotoxicity of Cy7 dyes, but also the selectivity considering the resistance of cells to drugs and their origin, indicate their possible use in diagnostics, while the simultaneous increase in cytotoxicity by photoactivation indicates their possible use in therapy. Differences in the accumulation of Cy7 dyes considering the type of cells are most likely caused by different expressions of the OATP transporter which was analyzed by the Western blot method. Preliminary results, obtained using the sulforadamine S assay, indicate a possible effect of Cy7 dyes on protein synthesis.

Keywords: heptamethine cyanine dyes, tumor, photodynamic therapy, diagnostics
(46 pages, 15 figures, 6 tables, 42 references, original in Croatian)

The thesis is deposited in the Central Biological Library.

Mentor: Dr. Anamaria Brozović, Senior Research Associate

Co-mentor: Dr. Nada Oršolić, Full Professor

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Full Prof.; Dr. Romana Gračan, Assoc. Prof.; Dr. Maja Matulić, Prof.

Replacement: Dr. Domagoj Đikić, Prof.

Thesis accepted: 04.07.2024.

Korištene kratice

BCA - bicinkoninična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*)

Bcl-2 - B-stanični limfom 2 (eng. *B-cell lymphoma 2*)

BSA - albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumin*)

CT - kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

CTLA-4 - protein povezan sa citotoksičnim T-limfocitima 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*)

ctRNA – cirkulirajuća tumorska RNA (engl. *circulated tumor RNA*)

Cy7 – heptametinske cijaninske boje (engl. *heptamethine cyanine dyes*)

DMEM – Dulbeccova modifikacija Eaglova medija (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO - dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)

FCS - fetalni goveđi serum (engl. *fetal calf serum*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*)

FISH - fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)

GSH, γ -glu-cys-gly - glutation, reducirani oblik (engl. *glutathione*)

HIF - faktor hipoksije (eng. *hypoxia-inducible factor*)

IAP - protein inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis*)

IC₅₀ - koncentracija spoja pri kojoj se promatrani biološki efekt smanji za pola (engl. *50% Inhibitory Concentration*)

ICG - indocijanin zelena (engl. *indocyanine green*)

IHC - imunohistokemijski testovi (engl. *immunohistochemistry*)

IR - infracrveno (engl. *infrared*)

MR – magnetska rezonanca

MTT - 3-(4,5-metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. *(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*)

ncRNA - nekodirajuća RNA (engl. *non-coding RNA*)

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

NIR - blisko infracrveno područje (engl. *near-IR region*)

OATP - polipeptid za prijenos organskih aniona (engl. *organic anion transporting polypeptide*)

OATP2B1 - polipeptid za prijenos organskih aniona 2B1 (engl. *organic anion transporting polypeptide 2B1*)

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

PD-1 - protein programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death protein*)

PD-L1 – ligand proteina programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death protein ligand*)

PDT - fotodinamična terapija (engl. *photodynamic therapy*)

PET - pozitronska emisijska tomografija (engl. *positron emission tomography*)

PS - fotosenzitivne molekule (engl. *photosensitizers*)

qRT-PCR - lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SD - standardna devijacija (engl. *standard deviation*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SLC - nosač otopljene tvari (engl. *solute carrier*)

SRB - sulforodamin B (engl. *sulforhodamin B*)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

WR – radni reagens (engl. *working reagens*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Opće značajke tumora	1
1.2. Dijagnostika i terapije tumora	4
1.2.1. <i>Dijagnostika</i>	<i>4</i>
1.2.2. <i>Terapije</i>	<i>6</i>
1.3. Cijaninske boje	9
1.3.1. <i>Heptametinske boje.....</i>	<i>10</i>
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. <i>Linije stanica</i>	<i>13</i>
3.1.2. <i>Kemikalije</i>	<i>13</i>
3.2. Metode	17
3.2.1. <i>Uzgoj stanica u kulturi</i>	<i>17</i>
3.2.2. <i>Određivanje djelovanja spojeva od interesa na preživljenje stanica</i>	<i>17</i>
3.2.3. <i>Vizualizacija akumulacije spojeva u stanicima</i>	<i>19</i>
3.2.4. <i>Određivanje djelovanja spojeva od interesa s i bez osvjetljavanja na preživljenje stanica</i>	<i>20</i>
3.2.5. <i>Analiza ekspresije proteina.....</i>	<i>20</i>
3.2.6. <i>Statistička analiza.....</i>	<i>23</i>
4. REZULTATI	24
4.1. Djelovanje novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja (Cy7) na preživljenje stanica	24
4.1.1. <i>Djelovanje novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja na roditeljske MES-OV i SK-OV-3 te na karboplatinu otpornih MES-OV CBP i SK-OV-3 CBP linija stanica</i>	<i>28</i>
4.2. Akumulacija novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja (Cy7) u stanice	32
4.3. Analiza staničnog preživljenja nakon djelovanja metodom određivanja stanične gustoće	34
5. RASPRAVA	36
6. ZAKLJUČCI	40
7. LITERATURA.....	41

1. UVOD

1.1. Opće značajke tumora

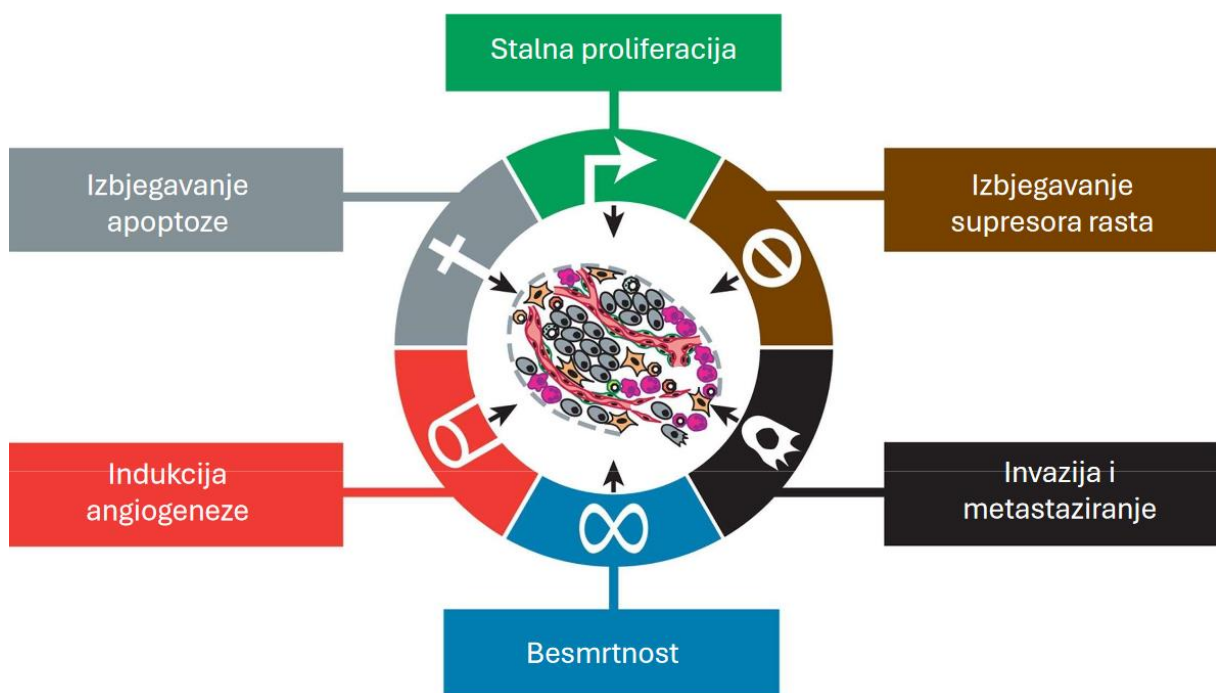
Tumor ili neoplazma je nakupina promijenjenih, atipičnih stanica nekoga tkiva koje imaju sposobnost nekontroliranog rasta te mogu steći sposobnost invazije i metastaziranja u okolna tkiva i organe (Encyclopedia Britannica, 2024). Metastaziranje je proces širenja stanica primarnog tumora u druge dijelove organizma putem krvi (hematogeno) ili putem limfe (limfogeno) (Gerstberger i sur. 2023). Tumore dijelimo na benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne). Benigni tumori su lokalizirani u određenom području organizma gdje tvore čahuru koja se sastoji od homotipičnih stanica s nekontroliranom diobom. Rastu sporo te nemaju sposobnost metastaziranja što ih razlikuje od malignih tumora. Obično ne predstavljaju veći problem, ali zbog svoje veličine i lokacije mogu komprimirati okolna tkiva i organe, te uzrokovati bol i druge komplikacije. Najčešće se u potpunosti mogu ukloniti kirurškim putem. Glavna karakteristika malignih tumora je sposobnost invazije i metastaziranja u okolna tkiva i organe. Obično su nepravilnog oblika, bez određenih granica. Sastoje se od brzo proliferirajućih heterogenih stanica. Dijele se na karcinome (tumori nastali iz epitelnih stanica, 85%), sarkome (tumori nastali iz mezodermalnih stanica) te leukemije i limfome (maligne bolesti krvotvornih organa) (Patel, 2020).

Većina tumora rezultat su mutacija u somatskim stanicama. Mutacije u genima nastaju uslijed unutarstaničnih pogrešaka tijekom replikacije i diobe stanica što rezultira izmijenjenim proteinima. Također, na nastanak mutacija utječu i vanjski čimbenici kao što su zračenje (ionizacijsko i ultraljubičasto zračenje), kemijski karcinogeni te onkogeni virusi. Isto tako, spontane mutacije u slijedu DNA mogu posredovati u nastanku tumora. Da bi došlo do pojave tumora, odnosno da normalna stanica prijeđe u tumorsku, potreban je veći broj mutacija (Stratton i sur. 2009).

Geni koji su uključeni u kancerogenezu pripadaju skupinama onkogeni, tumor supresora i gena odgovornih za popravak DNA. Onkogeni predstavljaju mutirani oblik staničnih protoonkogeni, tj. gena koji su odgovorni za regulaciju normalnog staničnog rasta i diferencijacije. Proto-onkogeni postaju onkogeni nastankom točkastih mutacija, uslijed kromosomske transformacije te amplifikacijom gena. Navedeno dovodi do promjena u proteinima koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa, u rastu stanica te unutarstaničnoj

signalizaciji. Odnosno, dolazi do povećane ekspresije gena ili povećane aktivnosti samog produkta gena. Na taj način potiče se proliferacija stanica i inhibira apoptoza, tj. smrt stanice. Mutacije u proto-onkogenima su dominantne, što znači da je mutacija samo jednog alela gena dovoljna za aktivaciju onkogeni. Tumor supresorski geni djeluju upravo suprotno, inhibiraju stanično dijeljenje i omogućuju apoptozu. Mutacije u tumor supresorima su recesivne, što znači da se mutacija mora dogoditi kod oba alela gena kako bi tumor supresori bili inaktivirani. Njihova inaktivacija doprinosi nekontroliranoj diobi stanica te njenom izbjegavanju apoptoze (Lee i sur. 2010). Geni odgovorni za popravak i uklanjanje oštećene DNA imaju važnu ulogu u održavanju stabilnog genoma stanice. Ukoliko dođe do mutacija u tim genima narušava se stabilnost genoma što može dovesti do nastanka tumora (Cooper i sur. 2009).

Prema Hanahan i Weinberg 2011, tumore karakterizira šest svojstava koji ima omogućavaju rast i metastaziranje (Slika 1).



Slika 1. Karakteristike tumora (preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg, 2011).

Najvažnija karakteristika tumorskih stanica je održavanje stalne proliferacije. Normalne stanice kontroliraju proizvodnju i otpuštanje faktora rasta i drugih signala koji su odgovorni za

proliferaciju stanica te napredovanje kroz stanični ciklus. Na taj način osigurava se homeostaza potrebna za normalno funkcioniranje organizma. Za razliku od normalnih, kod tumorskih dolazi do deregulacije signalnih puteva aktivacijom onkogeno što doprinosi nekontroliranoj proliferaciji. Tumorske stanice različitim mehanizmima inaktiviraju supresore rasta, kao što je p53 (tumor supresor koji je inaktiviran u 50% tumora), što im omogućuje ulazak u stanični ciklus i daljnje napredovanje. Apoptoza je jedan od glavnih mehanizama kojim stanica sprječava pojavu tumora. Međutim, kod tumora je ovaj proces često promijenjen. Inaktivacija pro-apoptotskih te povećana ekspresija anti-apoptotskih proteina, kao što je skupina proteina Bcl-2, dovodi do inhibicije ključnih koraka u apoptotskom putu kod tumorskih stanica. Tumorske stanice aktiviraju signalne puteve, posredovane enzimom tirozin-kinazom, uključene u njihovo preživljavanje što može rezultirati povećanom ekspresijom proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis-IAP*). Prethodno spomenute mutacije u tumor supresorskim genima doprinose izbjegavanju apoptoze. Ovi mehanizmi najčešće djeluju zajedno kako bi tumorima osigurali bolje preživljavanje. Normalne stanice imaju ograničen broj dioba nakon čega ulaze u stanje zvano senescencija, odnosno stanično starenje, nakon čega dolazi do apoptoze. Nakon svake diobe normalne stanice skraćuju se telomere (sekvence na krajevima kromosoma). Skraćivanje na 3-5 kilo baza se prepoznaje kao oštećenje DNA koje je od strane stanice prepoznato kao okidač za počinjanje procesa senescencije te postupno apoptoze. Upravo zbog toga tumorske stanice imaju konstitutivno aktivan enzim telomerazu koji produžuje telomere što im omogućuje neograničeno dijeljenje, odnosno besmrtnost. Za rast i razvoj, tumorskom tkivu su potrebne hranjive tvari i kisik koje dobiva procesom difuzije. S vremenom, tumorska masa hiperproliferira i postaje prevelika pri čemu opskrba hranjivim tvarima i kisikom više nije moguća difuzijom. Zbog nedostatka kisika javlja se hipoksija, aktivira se transkripcijski faktor HIF (engl. *hypoxia inducible factor*) koji potiče ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). VEGF se veže na svoj receptor na stijenci endotelnih stanica, koje grade krvne žile, čime se aktivira unutarstanična kaskada reakcija koja pokreće proces angiogeneze. Angiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila iz već postojećih što omogućuje bolju prokrvljenost tumora te na taj način adekvatnu opskrbu hranjivim tvarima i kisikom. Proces invazije i metastaziranja stanicama primarnog tumora omogućuje širenje u okolna tkiva i organe. To je složeni proces koji uključuje nekoliko koraka. Prvi korak je promjena staničnog fenotipa, odnosno dolazi do procesa epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) te lučenje matriks metaloproteinaza koje cijepaju vanstanični matriks i omogućuju prolazak tumorskih stanica kroz bazalnu membranu. Nakon toga slijedi ulazak stanica u krvnu žilu (intravazacija), prolazak te izlazak iz žile (ekstravazacija). Po izlasku iz

žile, stanice stvaraju mikrometastaze koje se moraju prilagoditi novom okolišu kako bi došlo do kolonizacije i formiranja makrometastaza (Hanahan i Weinberg, 2011).

1.2. Dijagnostika i terapije tumora

1.2.1. Dijagnostika

U dijagnostici tumora koriste se brojne invazivne i neinvazivne metode kako bi se utvrdilo stanje bolesti, pratio njen tijek te odredila adekvatna terapija. Postupak uključuje niz specijaliziranih metoda za otkrivanje, određivanje i karakterizaciju tumora. Klinički pregled je ključan kako bi se odredila povijest bolesti bolesnika te obiteljska anamneza. Uključuje fizikalni pregled, palpaciju nekarakterističnih masa i kvržica na koži, pregled limfnih čvorova i slično. Određuje se kompletna krvna slika te prisutnost tumorskih biljega (npr. karcinom antigen 125, CA-125 za praćenje raka jajnika), specifičnih proteina koje luče tumorske stanice ili organizam kao odgovor na prisustvo tumora. Najčešće radiološke tehnike koje se koriste su rendgenske snimke, kompjuterizirana tomografija (CT), pozitronska emisijska tomografija (PET) i magnetska rezonanca (MR).

CT s visokom razlučivosti omogućuje detekciju lokacije, veličinu i oblik tumora na principu djelovanja X-ionizirajućih zraka. Isto tako, CT-om se mogu detektirati krvne žile koje hrane tumor te se može koristiti kao pomoć prilikom biopsije tkiva, odnosno uzimanja djelića tkiva za patohistološku analizu (National Cancer Institute 2024).

PET se koristi za procjenu proširenosti tumora pomoću glukoze obilježene radioaktivnim fluorom (18-fluorodeoksiglukoza, FDG). Hidroksilna skupina glukoze zamijenjena je fluorom, što onemogućuje daljnje reakcije u metabolizmu glukoze. Glukoza se fosforilira djelovanjem enzima heksokinaze, a kako većina tkiva ne može ukloniti dodatnu fosfatnu skupinu, FDG ostaje u stanicama. Nakupljanje radioaktivne glukoze daje nam uvid u metaboličku aktivnost tkiva. Povećana aktivnost enzima heksokinaze u mitohondrijima kod malignih tumora omogućuje postavljanje dijagnoze (Lameka i sur. 2016).

Molekularna dijagnostika otkriva i mjeri prisutnost genomskog materijala ili proteina (farmakogenetskih biljega) povezanih sa specifičnim zdravstvenim stanjem kako bi se stvorio temelj za razumijevanje mehanizama bolesti i omogućila adekvatna terapija. U molekularnoj dijagnostici tumora najčešće se koriste lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction – qRT-PCR*), fluorescentna *in situ*

hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization – FISH*), sekvenciranje DNA i RNA, i imunohistokemijski testovi (engl. *immunohistochemistry – IHC*).

qRT-PCR temelji se na umnožavanju i kvantifikaciji specifičnih genskih sekvenci kod tumorskih stanica kako bi se odredila razina njihove ekspresije u odnosu na referentnu vrijednost (npr. razina ekspresije *BRCA1* i *BRCA2* kod tumora jajnika i dojke). Kod qRT-PCR-a produkti reakcije su obilježeni fluorescencijskom bojom. Boja *SYBR Green* se ugrađuje u nastalu dvolančanu DNA prilikom čega dolazi do fluorescencije koja omogućuje određivanje količine PCR produkta. Također, produkti PCR-a mogu se obilježiti hidrolizirajućim probama (*TaqMan*) koje fluoresciraju nakon razgradnje čime se detektira signal (Ma i sur. 2020).

FISH je metoda koja omogućuje specifično otkrivanje kromosomskih aberacija (numeričkih i strukturnih). Temelji se na vezanju jednolančane DNA-probe označene fluorokromom koja je komplementarna genu od interesa. Za dodatno bojanje genomske DNA koristi se boja DAPI s plavom fluouescencijom (358 nm) koja kontrastira kromosome i pomaže pri lokalizaciji zelenih, žutih ili crvenih hibridizacijskih signala na kromosomima. Može se koristiti npr. u određivanju ekspresije gena *HER2*, kod raka dojke, koji se nalazi na 17. kromosomu u blizini centromere. Koriste se probe različitih boja, jedna za gen *HER2*, a druga za centromerni slijed na 17. kromosomu. Za vizualizaciju se koristi fluorescencijski mikroskop (Aznab i sur. 2022).

IHC je metoda koja se koristi kod postavljanja dijagnoze tumora, određivanja je li neoplazma benigna ili maligna, stadij tumora, porijeklo metastaza te uspješnost terapije u tumorima dojke, prostate i limfoma. Koriste se poliklonska i monoklonska antitijela za detekciju specifičnih tumorskih biljega u prerezima tkiva koji su prethodno uzeti biopsijom, fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin, ili citološkim razmazima. Primjerice, određuje se prisutnost biljega Ki-67 kojeg imaju sve tumorske stanice (Magaki i sur. 2019).

DNA i RNA sekvenciranje izrazito je važno prilikom dijagnostike tumora. Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing-NGS*) važno je u prevenciji i liječenju zloćudnih bolesti. Svrha sekvenciranja je otkrivanje nasljednih promjena u genomskoj DNA, odnosno detektiraju se određene genetske varijante koje predisponiraju za razvoj različitih genetskih bolesti, pa tako i tumora. Uzima se uzorak krvi ili bris bukalne sluznice, odakle se izolira DNA. Zatim se određuju geni koje želimo sekvencirati, umnoži ciljane sekvence DNA, nakon čega slijedi reakcija sekvenciranja te analiza podataka. Isto tako, sekvenciranje se može koristiti za određivanje stečenih promjena u tumorskoj DNA, gdje se

uzorak za analizu uzima iz tumorskog tkiva. Molekularno profiliranje tumora omogućuje prilagođavanje i poboljšanje terapije s ciljem boljeg ishoda liječenja. RNA sekvenciranje predstavlja noviju metodu u molekularnoj dijagnostici za analizu vrste i količine transkripata koji se mogu nalaziti u stanici kod nekog patofiziološkog stanja (mRNA, ncRNA, , ctRNA), detekciju novih genskih varijanti, fuzija gena i slično (Qin 2019).

1.2.2. Terapije

Za korištenje adekvatne terapije prilikom liječenja tumora potrebno je poznavati mehanizme koje tumorske stanice koriste u preživljavanju i metastaziranju. Tumori se sastoje od heterogene skupine stanica koje s vremenom nakupljaju mutacije te djelovanje iste terapije kod različitih bolesnika nije jednako. Primarni tumor se najčešće dijagnosticira tek kada dosegne promjer veličine 1 cm, a tada ima već 10^9 promijenjenih stanica. Kirurško odstranjivanje najbolja je opcija ukoliko se tumor otkrije u ranom stadiju. Međutim, to uvijek nije moguće zbog veličine, stadija i lokacije tumora. Tada se poseže za različitim tipovima terapija (kemoterapija, radioterapija, hormonska terapija, imunoterapija, fotodinamična terapija), ovisno o tipu tumora (Cooper 2009).

1.2.2.1. Kemoterapija

Kemoterapija je terapija kod koje se primjenom različitih lijekova ubijaju tumorske stanice ili se pak usporava njihov rast (National Cancer Institute 2022). Koristi se i kao neoadjuvatna terapija prije operacije ili radioterapije, kako bi se smanjila veličina tumora. Najčešće korišteni kemoterapeutici su: citotoksični antibiotici (npr. doksorubicin, epirubicin), antimetaboliti (npr. fluoropirimidin, metotreksat), antimikrotubularni agensi (npr. vinkristin, paklitaksel), inhibitori topoizomerase I (npr. irinotekan, kamptotekan), te alkilirajući agensi (npr. cisplatina) (Lou i sur. 2016).

1.2.2.2. Radioterapija

Kod radioterapije korištenjem visokih doza ionizirajućeg zračenja dolazi do usporavanja rasta tumorskih stanica oštećenjem DNA ili pak do ubijanja samih stanica. Izvor zračenja može biti vanjski ili unutar tijela (brahiterapija). Brahiterapija je oblik radioterapije kojom se radioaktivni izvor uvodi u tumor ili neposrednu blizinu tumora. Radioterapija se može koristiti i kao neoadjuvatna terapija prije operacije kako bi se smanjila veličina tumora za lakše kirurško odstranjivanje (National Cancer Institute 2019).

1.2.2.3. *Hormonska terapija*

Hormonska terapija se koristi kod tumora dojke, jajnika, endometrija maternice, štitne žlijezde i prostate čiji rast ovisi o djelovanju hormona. Djeluje na način da se onemogućava djelovanje žlijezde koja proizvodi hormone koji potiču rast tog tumora ili se primjenjuje hormon antagonističkog djelovanja. Primjerice, za liječenje tumora dojke pozitivnog na estrogen (ER+) npr. postoje četiri tipa hormonske terapije: selektivni modulatori estrogenskih receptora (vežu se na receptor estrogena i onemogućavaju njegovo djelovanje), inhibitori aromataza (smanjuju razinu estrogena), selektivni regulator estrogenskih receptora (blokiraju i uništavaju receptore) te potiskivanje funkcije jajnika kako bi se smanjila proizvodnja estrogena koji bi se vezao na svoje receptore na stanicama dojke te potakao proliferaciju stanica. Najčešće korišteni lijek u liječenju ovog tipa raka dojke je tamoksifen (Drăgănescu i sur. 2017).

1.2.2.4. *Imunoterapija*

Imunoterapija je metoda koja djeluje na jačanje imunološkog sustava organizma u borbi protiv tumora. Postoji nekoliko vrsta imunoterapije koje djeluju na različite načine. Monoklonska antitijela specifično se vežu na antigene tumorskih stanica, primjerice trastuzumab koji se veže na receptor HER2 kod tumora dojke pri čemu sprječava rast tumorskim stanica inaktivacijom receptora. Drugi način primjene imunoterapije je djelovanje na inhibitore imunskih kontrolnih točaka, na protein programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death protein-PD-1*) te protein povezan sa citotoksičnim T-limfocitima 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 - CTLA-4*). To su važne kostimulatorne molekule koje reguliraju imunološki odgovor domaćina kako ne bi došlo do razvoja autoimunih bolesti. Tumorske stanice koriste njihove mehanizme djelovanja kao jedan od načina bijega nadzoru imunološkog sustava domaćina, eksprimiranjem liganda PD-L1 koji se veže na protein PD-1 na membrani T-limfocita (CD8+ T-limfocit) te ligande B7-1/B7-2 na koje se veže CTLA-4. Na taj način blokiraju njihovo citotoksično djelovanje. Od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration-FDA*), odobreno je nekoliko lijekova koji djeluju kao inhibitori imunskih kontrolnih točaka kao što su avelumab, atzeolizumab, nivolumab, ipilimumab i drugi. Problem uspješnosti i ovog tipa terapije je pojava otpornost stanica tumora na korištene lijekove (Wang i sur. 2018).

1.2.2.5. Fotodinamična terapija

Fotodinamična terapija (engl. *photodynamic therapy-PDT*) metoda je liječenja koja se može primijeniti kod različitih bolesti te ima ulogu pri liječenju tumora. Temelji se na korištenju organskih boja ili nanočestica osjetljivih na svjetlo, (engl. *photosensitizers-PS*). Sastoji se od dvije faze. Prva faza uključuje akumulaciju određenih PS-a u ciljanim stanicama, dok se druga faza odnosi na njihovu fotoaktivaciju. Prilikom osvjetljavanja svjetlošću određene valne duljine PS-ovi stvaraju reaktivne vrste kisika, (engl. *reactive oxygen species-ROS*) (superoksidni anion $O_2^{\cdot-}$, vodikov peroksid H_2O_2 , hidroksilni radikal $\cdot OH$) koje su citotoksične. Upotrebom lasera ili nekog drugog izvora svjetlosti dolazi do ekscitacije PS-a prilikom čega se postiže njihov citotoksični učinak. Mehanizam se temelji na reakciji pobuđenih PS-a s molekularnim kisikom. PS-a ima dva elektrona suprotne orijentacije. Jedan elektron u niskoenergetskom ili osnovnom stanju (S_0), prelazi u visokoenergetsko ili singletno stanje (S_1) bez promjene orijentacije. U tom stanju zadrži se kratko i ubrzo prelazi u osnovno stanje prilikom čega dolazi do emisije energije u obliku fluorescentnog zračenja. Isto tako može prijeći u tripletno stanje (dugovječni oblik). Ovisno o efikasnosti nastanka ROS-a, kao rezultata primjene PDT-a, može se promijeniti djelovanje staničnih antioksidansa, proteina toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins*) te antitumorski odgovor imunoloških stanica. Stanice uz pomoć različitih enzima (superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza) pretvaraju ROS u netoksične spojeve te na taj način sprječavaju njihov citotoksični utjecaj. U odnosu na normalne, tumorske stanice stvaraju više ROS-a što znači da aktivnost antioksidativnih enzima treba biti veća. Upravo se primjenom PDT-a inhibira djelovanje antioksidativnim enzima, najčešće glutaciona. Glutacion (GSH, γ -glutamil-cisteinilglicin) je tripeptid s tiolnom skupinom (-SH) na aktivnom mjestu. U stanici se najčešće nalazi u reduciranom obliku (GSH). Predstavlja jedan od zaštitnih mehanizama stanica od ROS-a te sudjeluje u metabolizmu različitih ksenobiotika (Vašková i sur. 2023). Inhibicijom aktivnosti glutaciona povećava se citotoksični utjecaj PS-a. Smatra se da na taj način PS-ovi direktno ubijaju tumorske stanice (Gunaydin i sur. 2021).

PDT pokazuje manje nuspojave te manju toksičnost u odnosu na kemoterapiju i radioterapiju koje se najčešće primjenjuju u liječenju tumora. Međutim, zbog ograničene dubine prodiranja svjetlosti u tkivo, PDT se može koristiti samo za prekancerogene lezije i površinske tumore, dok za velike i duboko smještene tumore nije učinkovita. S obzirom na činjenicu da je primjena PDT-a u potpunosti ovisna o prisutnosti kisika, hipoksija koja se javlja kod tumorskih tkiva ometa njenu efikasnost. Nekoliko tipova PS-a može se koristiti u dijagnostičke svrhe. Da bi se koristili u dijagnostičke svrhe, PS-ovi moraju imati nisku toksičnost za normalne stanice, visoku selektivnost za tumorske stanice, utjecati na proizvodnju što više ROS-a u mikrookolišu

tumora, te se akumulirati u mitohondrijima ili lizosomima. Isto tako, PS bi trebali pokazivati fotostabilnost kako bi se izbjeglo fotoizbjeljivanje, odnosno proces kojim organska boja ili neki drugi fluorofor trajno gubi sposobnost fluoresciranja. Fluorescentna svojstva koja PS pokazuju omogućuju njihovu detekciju te razlikovanje tumorskog tkiva od zdravog (Lange i sur. 2021).

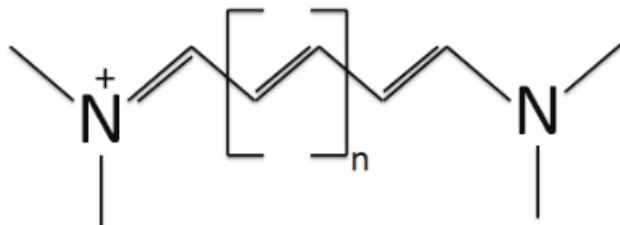
Kombiniranjem PS-a u dijagnostičke svrhe te kao dio PDT-a poboljšava se učinak drugih terapija. Primjerice, korištenje PDT-a u kombinaciji s kemoterapijom, radioterapijom ili imunoterapijom može dati bolje rezultate liječenja nego pojedinačne terapije. Neka istraživanja su pokazale da se uvođenjem PDT-a u kombinaciji s kemoterapijom potencijalno može smanjiti otpornost tumora na lijekove što rezultira uspješnijim liječenjem (Shi i sur. 2017).

Najveći broj odobrenih PS-a od strane FDA pripada skupini porfirina koji apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina, odnosno više energije. Međutim, dijagnostički i klinički značajno područje elektromagnetskog spektra je infracrveno (engl. *infrared-IR*) te blisko infracrveno područje (engl. *near-IR region-NIR*) gdje porfirini ne djeluju. Tu ulogu preuzimaju drugi PS-a, kao što su ftalocijanini i cijaninske boje, koji imaju fluorescentna svojstva i djeluju u području spektra NIR (Gunaydin i sur. 2021).

1.3. Cijaninske boje

Cijaninske boje se široko primjenjuju u biomedicinskim istraživanjima zbog svojih fotokemijskih svojstava povezanih s kemijskom strukturom. Kromofor, odnosno nezasićena atomska skupina koja je odgovorna za obojenje cijaninskih boja, polimetinski je lanac s konjugiranim vezama $-C=C-$ koje povezuju terminalni heterociklički spojevi (tiazoli, oksazoli) te neparni broj C atoma (Slika 2). Duljina lanca odgovara njihovim spektralnim svojstvima, odnosno rasponu apsorpcije i emisije. Ovisno o duljini polimetinskog lanca, cijaninske boje su podijeljene na: monometinske cijanine (s polimetinskim lancem koji se sastoji od samo jedne metilenske skupine, $-CH=$), trimetinske cijanine (karbocijanini, s polimetinskim lancem koji se sastoji od tri metilenske skupine, $-CH=CH-CH=$), pentametinske cijanine (dikarbocijanini, s polimetinskim lancem od pet metilenskih skupina, $-CH=CH-CH=CH-CH=$), heptametinske cijanini (ili trikarbocijanini, s polimetinskim lancem od sedam

metilenskih skupina, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$). Djeluju u širokom području elektromagnetskog spektra, od UV područja do NIR-a (Pronkin i sur. 2022).



Slika 2. Opća strukturna formula cijaninskih boja ($n = 0, 1, 2, 3$)

Indocijanin zelena (engl. *indocyanine green-ICG*) jedina je cijaninska boja odobrena od strane FDA-a. Pripada skupini karbocijanina. Pokazuje nisku toksičnost i fluorescentna svojstva (Lange i sur. 2021). Boja se koristi u dijagnostičke svrhe već duži niz godina za određivanje funkcije jetre, kardiovaskularnih promjena i slično (Lange i sur. 2021). ICG ima veliki afinitet za proteine plazme što omogućuje njeno uklanjanje žučnim kanalima. Isto tako, ICG se koristi u sklopu PDT-a. U kombinaciji s NIR-a zračenjem pokazao se kao učinkovit fototermalni agens što je dovelo do suzbijanja rasta tumora (Lange i sur. 2021). Međutim, ICG ima nekoliko nedostataka: niska fotostabilnost, što dovodi do fotoizbjeljivanja, te nespecifičnost u odnosu na vrstu stanica (Lange i sur. 2021). S ciljem pronalaženja novih spojeva koji bi nadvladali gore navedene nedostatke, istraživanje je usmjereno na heptametinske cijaninske boje.

1.3.1. Heptametinske boje

Heptametinske boje (engl. *heptamethine cyanine dyes-Cy7*) su kemijski spojevi koji pripadaju skupini cijaninskih boja. Imaju fluorescentna svojstva i djeluju u bliskom IR-području, s valnim duljinama emisije između 650 i 740 nm. Njihova fototoksičnost je izrazito niska pa imaju potencijal primjene u dijagnostičke svrhe u sklopu PDT-a pri liječenju tumora. Moguća primjena u dijagnostici temelji se na njihovoj akumulaciji u tumorskim stanicama što bi moglo naći primjenu u oslikavanju i lokalizaciji tumora. Isto tako, pokazuju visoku selektivnost za tumorske stanice, odnosno njihova akumulacija u tumorskim veća je nego u zdravim stanicama. Prijenos u tumorske stanice posredovan je aktivacijom polipeptida za prijenos organskih aniona (engl. *organic anion transporting polypeptide-OATP*), kodiranih genima SLC (engl. *solute carrier*). Aktivnosti OATP-a doprinosi hipoksični mikrookoliš tumora

jer je ekspresija OATP-a regulirana hipoinducibilnim faktorom 1α (engl. *hypoxinducible factor 1-alpha-HIF1 α*). Poznato je da se heptametinske boje prvenstveno agregiraju u mitohondrijima te lizosomima što potiče proces apoptoze, a ne nekroze, čime se smanjuje nekontrolirana imunološka reakcija. Cy7 pokazuju veliki potencijal kao PS-a kod PDT-a, kao mogući dijagnostički biljezi te kao prijenosnici nanočestica s lijekovima (Gorka i sur. 2014). Nedostatci Cy7 odnose se na veliku hidrofobnost, što dovodi do njihove agregacije u tjelesnim tekućinama, te na njihovu sklonost fotoizbjeljivanju, odnosno proces kojim organska boja ili neki drugi fluorofor trajno gubi sposobnost fluoresciranja, što utječe na smanjenu proizvodnju ROS-a (Lange i sur. 2021).

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korištena su tri spoja: SB-35, SB-53 i SB-55. Riječ je o novosintetiziranim derivatima fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom. Spojevi su pripremljeni u Laboratoriju za biomolekularne interakcije na Institutu Ruđer Bošković u grupi dr. sc. Marijane Radić Stojković.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je ispitivanje biološkog učinka novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja korištenjem različitih, ljudskih linija stanica tumora i normalnih ljudskih fibroblasta. Ispitivanjem djelovanja novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja na preživljenje stanica te određivanjem mjesta njihove akumulacije u stanici utvrditi će se mogu li navedeni spojevi imati potencijalno antitumorsko djelovanje ili naći svoju primjenu u dijagnostici.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Linije stanica

U sklopu ovog diplomskog rada koristila sam sljedeće ljudske, adherentne linije stanica tumora: stanice raka vrata maternice (HeLa), stanice adenokarcinoma alveola (A549), stanice melanoma (RPMI-7951), stanice seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja (roditeljska linija MES-OV i linija MES-OV CBP otporna na karboplatinu) i stanice adenokarcinoma jajnika (roditeljska SK-OV-3 linija stanica i linija stanica SK-OV-3 CBP otporna na karboplatinu). Također, koristila sam i normalne, ljudske fibroblaste.

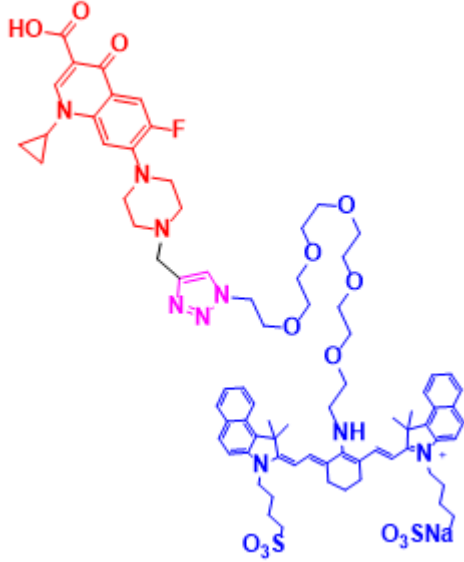
3.1.2. Kemikalije

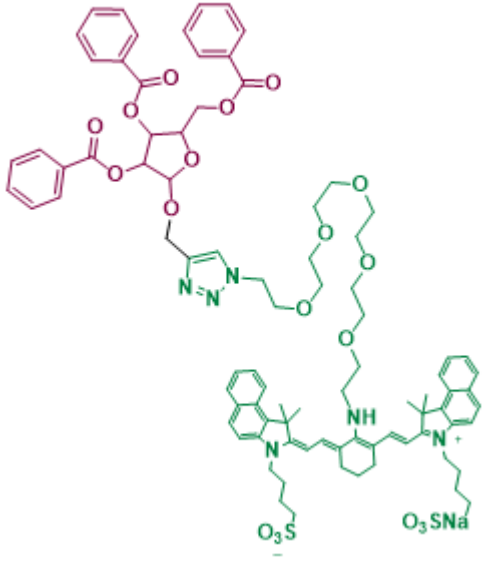
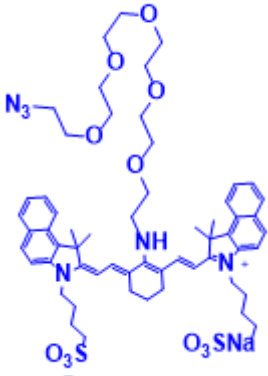
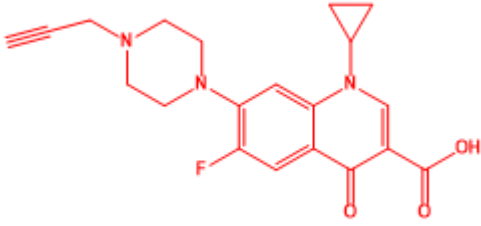
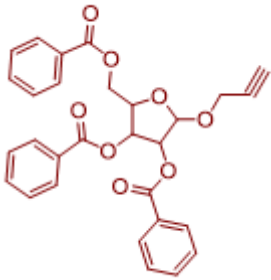
Tablica 1. Kemikalije korištene u ovom radu

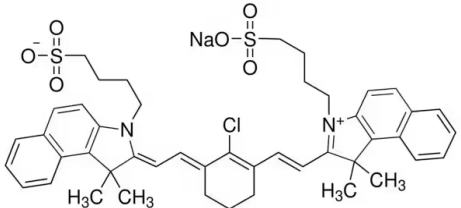
NAZIV	PROIZVOĐAČ
3-(4,5 dimetiltiazol-2 il)-2,5 difeniltetrazolij bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Gram Mol, Zagreb, Hrvatska
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD
Fetalni goveđi serum (fetal calf serum, FCS)	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD
Komplet BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
McCoy 5A medij obogaćen L-glutaminom, s antibiotikom	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
N,N,N,N – tetrametiletilenediamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Natrij-dodecil sulfat, SDS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	

Proteinski marker Precision Plus All Blue Standards	BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD
Sulforhodamin B (SRB) otopljen u 1% octenoj kiselini	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Trikloroocetna kiselina (trichloroacetic acid, TCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Tripsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, Roedermark, Njemačka
Tween-20® (C ₅₆ H ₁₁₄ O ₂₆)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Western Lightening ® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer ®, SAD

Tablica 2. Kemijski spojevi korišteni za tretiranje linija stanica u ovom radu

Ime	Spoj	Kemijska formula	Molekularna masa
SB-55		C ₇₈ H ₉₅ FN ₉ NaO ₁₄ S ₂	1488,77517

SB-53		$C_{87}H_{99}N_6NaO_{19}S_2$	1619,88177
SB-35		$C_{58}H_{75}N_6NaO_{11}S_2$	1119,37877
SB-54 derivat ciprofloksacina		$C_{20}H_{20}FN_3O_3$	369,40
DR-40 derivat šćera		$C_{29}H_{24}O_8$	500,50

Ir-820		$C_{46}H_{50}ClN_2NaO_6S_2$	849,47
---------------	---	-----------------------------	--------

Slike preuzete od dr. sc. Marijane Radić Stojković

Ovdje ispitivani spojevi su novosintetizirani derivati fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom. Spojevi su pripremljeni u Laboratoriju za biomolekularne interakcije na Institutu Ruđer Bošković u grupi dr. sc. Marijane Radić Stojković.

Tablica 3. Uređaji i pomagala korišteni u ovom radu

NAZIV	PROIZVOĐAČ
Centrifuga (Heraeus Functionale Labofuge 400)	Thermo Fischer Scientific, SAD
Homogenizator	Cole Palmer, Vernon Hills, SAD
Inkubator (Heraeus cell 150)	Thermo Fischer Scientific, SAD
Invitrogen™ Countess™ 3 Automated Cell Counter	Thermo Fischer Scientific, SAD
Invertni mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Njemačka
Kadica za elektroforezu (Mini-PROTEAN® Tetra System)	BioRad, Hercules, SAD
Konfokalni laserski pretražni mikroskop	Leica Microsystems
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 μm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Petrijeve zdjelice (100 mm x 15 mm) za uzgoj adherentnih stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Petrijeve zdjelice (90mm x 15mm) s 4 komorice za uzgoj adherentnih stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Plastične epruvete (15 i 50 mL)	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
T-25 i T-75 bočice za uzgoj stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
PowerPac™ Basic (izvor napona)	Bio-Rad, SAD
Spektrofotometar (Stat Fax - 2100)	Awareness Technology Inc., SAD

Termoblok (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Uređaj za prijenos proteina na membranu (TransBlot Turbo)	BioRad, Hercules, SAD
Uređaj Uvitec Alliance Q9 mini	St John's Innovation Centre, Cowley Rd, Cambridge CB4 0WS Engleska, U.K.

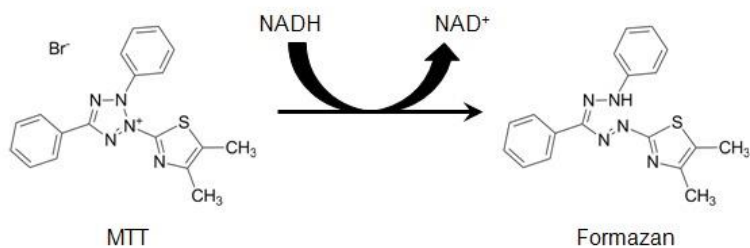
3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Sve u radu korištene linije stanica uzgajala sam u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C u atmosferi određene vlažnosti te mješavini zraka i 5% CO₂. Linije stanica HeLa, A549, RPMI-7951 i fibroblasti rasle su u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal calf serum-FCS*) uz dodatak antibiotika (penicilin-streptomycin; PS). Linije stanica MES-OV, MES-OV CBP, SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP uzgajala sam u hranjivom mediju McCoy (engl. *McCoy's 5A media*) s 10% FCS-om. Sve sam stanice rasađivala dva puta tjedno. Tijekom rasađivanja uklonila bih hranjivi medij u kojem su stanice rasle, tripsinizirala stanice dodatkom tripsina i inkubacijom od 5 minuta pri 37 °C kako bi se adherente stanice odvojile od podloge i jedna od druge. Zatim sam ponovno dodala hranjivi medij kako bih serumom iz medija inhibirala aktivnost tripsina. Dio suspenzije stanica bih odvojila za eksperimente, a manji dio bi uz dodatak svježeg hranjivog medija, vratila u inkubator.

3.2.2. Određivanje djelovanja spojeva od interesa na preživljenje stanica

Djelovanje heptametinskih cijaninskih boja na metabolizam stanica, kao mjeru njihova preživljenja ili proliferacije, odredila sam uz pomoć testa MTT. test MTT se temelji na redukciji žute tetrazolijske boje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) u netopivi, ljubičasti formazan uz pomoć enzima mitohondrijske reduktaze (Slika 3). Reakcija redukcije ukazuje na metaboličku aktivnost stanice. Intenzitet obojenja je proporcionalan vijabilnosti stanica.



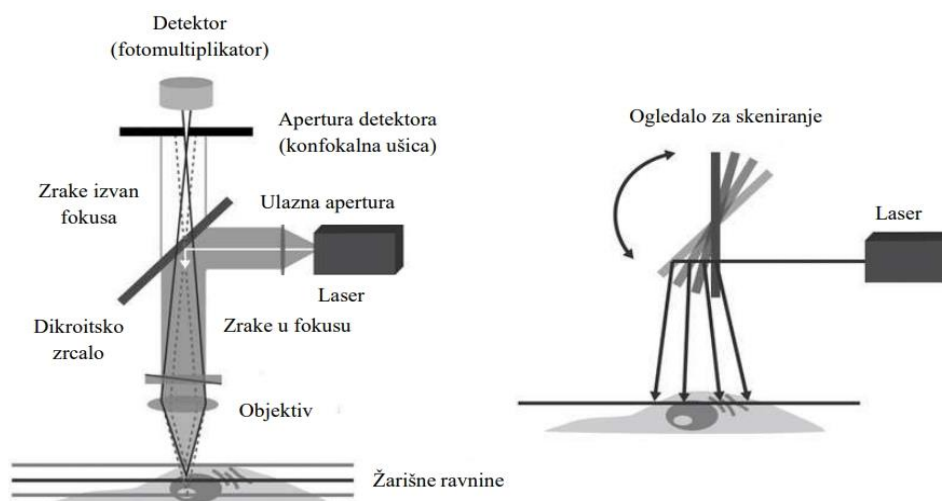
Slika 3. Redukcija MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u formazan (preuzeto iz Riss i sur., 2013) je reakcija koja se koristila pri određivanju mjere preživljenja stanica analiziranih u ovom radu.

Stanice sam nasadila u bunariće mikrotitarske pločice s 96 bunarića ($3,5 \times 10^3$ stanica u 180 μL medija DMEM po bunariću). Nakon 24 h stanice sam tretirala s prethodno pripremljenim otopinama spojeva različitih koncentracija (2,5; 5, 10; 20; 40 μL) u kvadrilikatima. Nakon 72 h inkubacije stanica sa spojevima, uklonila sam medij te dodala 40 μL 0.5 mg/mL otopine MTT. Stanice sam inkubirala 3 h pri 37 °C kako bi se stvorili kristali formazana koje sam zatim otopila u 170 μL dimetil sulfoksida (engl. *dimethyl sulfoxide-DMSO*) po bunariću. Intenzitet obojenja, odnosno apsorbanciju boje izmjerila sam pomoću spektrofotometra sa čitačem za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 600 nm.

Dodatna metoda koju sam koristila za mjerenje preživljenja stanica je bio test SRB (engl. *sulforhodamin B*). Metoda se temelji na sposobnosti vezanja proteinske boje SRB (elektrostatski i pH ovisno) na bazične aminokiselinske ostatke stanica fiksiranih u trikloroctenoj kiselini. Nakon 72 h inkubacije sa spojevima od interesa pažljivo sam uklonila medij te fiksirala stanice dodavši 100 μL 10% otopinom trikloroctene kiseline u svaki bunarić. Pločice sam inkubirala preko noći pri +4 °C nakon čega sam ih isprala s deioniziranom vodom te stavila na sušenje pri sobnoj temperaturi. Stanice sam zatim obojila dodavši 50 μL 0,4% otopine SRB-a u 1% octenoj kiselini. Nakon 30 minuta stanice sam isprala s deioniziranom vodom i 1% octenom kiselinom. Nakon sušenja na zraku, sljedeći dan sam u svaki bunarić dodala 150 μL 10 mM Tris baze kako bih otopila kompleks protein-boja. Intenzitet obojenja, odnosno apsorbanciju boje izmjerila sam pomoću spektrofotometra sa čitačem za mikrotitarske pločice na 570 nm.

3.2.3. Vizualizacija akumulacije spojeva u stanici

Za vizualizaciju akumulacije spojeva u stanici koristila sam svjetlosni i konfokalni mikroskop. Akumulacija spojeva je vidljiva svjetlosnim mikroskopom jer imaju valne duljine emisije između 650 i 740 nm što odgovara području vidljivog spektra (380-760 nm). Kako je već poznato da su heptametinske cijaninske boje fluorokromi, odnosno da imaju sposobnost fluorescencije korišten je konfokalni mikroskop. Glavni element konfokalnog mikroskopa je laser kojim se uzorak osvjetljava točka po točka u određenoj žarišnoj ravnini prilikom čega se pobuđuje fluorescencija karakterističnih spojeva kojima je uzorak tretiran ili nekih dijelova samog uzorka koji ima to svojstvo. Uzorak emitira svjetlost koju dikroitsko zrcalo usmjerava i fokusira na aperturu (konfokalna ušica) koja se nalazi ispred detektora svjetlosti. Ona propušta samo one zrake svjetlosti koje dolaze iz točaka koje se nalaze u žarišnoj ravnini. Na taj način se eliminira svjetlost koja dolazi iz dijelova uzorka izvan žarišne ravnine te se povećava optička rezolucija i kontrast (Slika 4) (Elliot, 2020).



Slika 4. Shema konfokalnog mikroskopa (preuzeto i prilagođeno od Elliot, 2020).

Za analizu akumulacije spojeva svjetlosnim mikroskopom stanice sam nasadila u bunariće mikrotitarske pločice s 96 bunarića ($3,5 \times 10^3$ stanica u $180 \mu\text{L}$ medija DMEM po bunariću). Nakon 24 h stanice sam tretirala sa spojevima koncentracije $40 \mu\text{M}$. Nakon 72 h inkubacije promatrala sam intenzitet boje u stanicama objektivom povećanja $10\times/0,25 \text{ NA}$.

Za analizu akumulacije spojeva konfokalnim mikroskopom stanice sam nasadila u Petrijevu zdjelicu promjera $90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ s 4 komorice. Nasadila sam $2,5 \times 10^4$ stanica u 500

μL medija po komorici. Sljedeći dan stanice sam tretirala s prethodno pripremljenim otopinama spojeva koncentracije 5×10^{-6} M. Akumulacija boje promatrana je u različitim vremenskim točkama ovisno o eksperimentu. Crvena fluorescencija dobivena je laserom s diodnom pumpom od 561 nm s rasponom emisije od 570–700 nm. Stanice su promatrane s objektivom povećanja $10 \times / 0,45$ NA.

3.2.4. *Određivanje djelovanja spojeva od interesa s i bez osvjetljavanja na preživljenje stanica*

Sljedeći dio eksperimenta bio je provjeriti promjenu citotoksičnosti spojeva nakon izlaganja tretiranih stanica lampama s hladnom svjetlošću (8×8 W; 8000 lux; 30 i 60 sekundi). Stanice sam nasadila u bunariće mikrotitarske pločice s 96 bunarića ($3,5 \times 10^3$ stanica u $180 \mu\text{L}$ medija DMEM po bunariću). Nakon 24 h tretirala sam ih s otopinama spoja SB-35 različitih koncentracija (2,5; 5; 10; 20; $40 \mu\text{M}$) dodavajući $20 \mu\text{L}$ svake otopine po bunariću. Kako bih ispitala učinak svake koncentracije spoja, stanice sam tretirala u kvadriplikatima. Jednu pločicu s tretiranim stanicama sam ostavila u inkubatoru dok sam drugu osvjetljavala navedenim lampama te ih zatim vratila u inkubator. Nakon 72 h inkubacije, preživljenje stanica sam mjerila korištenjem MTT testa.

3.2.5. *Analiza ekspresije proteina*

3.2.5.1. *Izolacija proteina iz stanica*

Prethodno sakupljene stanice u obliku suhog taloga resuspendirala sam u $200 \mu\text{L}$ PBS-a. Stanice sam sonicirala pomoću sonikatora 3 x po 5 sekundi kako bi zbog puknuća membrana došlo do oslobađanja proteina iz stanica. Uzorke sam centrifugirala kako bih odvojila talog s ostacima stanice i supernatant s ukupnim proteinima stanica. Nakon centrifugiranja supernatant sam odvojila mikropipetom te izmjerila koncentraciju proteina. Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima koristila sam komplet *Pierce BCA Protein Assay Kit* s bicinoniničnom kiselinom (engl. *bicinchoninic acid-BCA*) koja je odgovorna za formiranje obojenja u reakciji s aminokiselinama cistein, cistin, triptofan, tirozin u uzorcima proteina. Ova metoda uključuje klasičnu biuret reakciju redukcije dvovalentnog kationa bakra u jednovalentni kation (Cu^{2+} u Cu^+) uz nastanak ljubičastog obojenja koje nastaje zbog keliranja dvije molekule BCA s jednim kationom bakra (Cu^+). Koncentracija proteina u uzorcima određuje se u odnosu na koncentracije albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumin-BSA*) izradom baždarne krivulje. Prvo sam pripremila standardne koncentracije BSA (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, $2000 \mu\text{g/mL}$). Zatim sam pripremila potrebni reagens (engl. *working reagents-WR*) u omjeru 50:1 u odnosu na količinu uzoraka ($6200 \mu\text{L}$ reagensa A i $124 \mu\text{L}$ reagensa B). Na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanijela sam po $25 \mu\text{L}$ pripremljenih razrjeđenja BSA te po

25 μL uzorka pomiješanog s 200 μL WR-a. Pločicu sam inkubirala 30 minuta pri 37 °C. Intenzitet obojenja, odnosno apsorbanciju izmjerila sam pomoću spektrofotometra sa čitačem za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 562 nm. Dobivene rezultate obradila sam u programu Excel kako bih izračunala volumen uzoraka i vode kojom je potrebno razrijediti uzorke za nanošenje na poliakrilamidni gel. Uzorke sam pomiješala s bojom za vizualizaciju na gelu koje sam zatim stavila na termoblok 5 minuta pri 96 °C. Na gel sam nanosila 20 μg proteina po jažici.

3.2.5.2. Priprema gela i SDS elektroforeza

Gustoću gela za SDS (natrijev dodecil-sulfat poliakrilamidni gel) elektroforezu odredila sam prema molekularnoj težini proteina od interesa: OATP2B1 77 kDa– 10% 1,5 mm SDS poliakrilamidni gel kojeg sam pripremila prema Tablici 4. Polimerizacija gelova otprilike je trajala 30 minuta. Prije nanošenja na gel u uzorke sam dodala 5 μL 5x koncentrirane boje za vizualizaciju te ih zagrijala 5 minuta pri 96 °C. U međuvremenu sam u kadicu ulila pripremljeni 10x SDS pufer (80 mL SDS-a + 720 mL reH₂O). Proteinski marker (Precision Plus Protein All Blue Standards) te uzorke (25 μL) sam zatim nanijela u jažice poliakrilamidnog gela i pokrenula elektroforezu. Elektroforezu sam provodila na 120 V, 90 minuta.

Tablica 4. Priprema gelova za SDS elektroforezu

	Gornji gel (mL)	Donji gel (mL)
	5%	10%
H ₂ O	2,1	3,3
30% smjesa akrilamid-bisakrilamid	0,5	4,0
1,0 M Tris (pH=6,8)	0,38	2,5
10% SDS	0,03	0,1
10% APS	0,03	0,1
TEMED	0,003	0,004

3.2.5.3. Prijenos proteina na nintroceluloznu membranu

Nakon završetka elektroforeze, transfer proteina s gela na nitroceluloznu membranu sam napravila tijekom 14 min koristeći Towbin pufer za prijenos proteina (200 mL MeOH + 100 mL 10% SDS + 700 mL deH₂O) i aparaturu TransBlot Turbo. Uspješnost transfera sam provjerila bojom Ponceau S. Nakon toga, membranu sam isprala u 1x TBS-T puferu (0,788 g 10 mM Tris-HCl, 4,38 g 150 mM NaCl, 0,5 mL 0,1 % Tween 20 u 500 mL biH₂O).

3.2.5.4. Imunodetekcija proteina

Kako bih spriječila nespecifično vezanje antitijela, membranu sam 1 h inkubirala u 5% nemasnom mlijeku otopljenom u puferu TBS-T. Nakon toga, isprala sam je u 1x TBS-T puferu te je preko noći inkubirala s odgovarajućim primarnim antitijelom (razrjeđenje 1:2000, 5% nemasno mlijeko u puferu TBS-T) pri 4 °C. Nakon inkubacije preko noći s primarnim antitijelom, membranu sam isprala tri puta po deset minuta u puferu TBS-T. Nakon ispiranja, membranu sam inkubirala s odgovarajućim sekundarnim antitijelom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (razrjeđenje 1:5000, 5% nemasno mlijeko u 1x TBS-T) pri sobnoj temperaturi 1 h. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitijelom, membranu sam isprala pet puta po pet minuta u puferu TBS-T. Za detekciju proteina od interesa koristila sam uređaj Uvitec Alliance Q9 mini.

Tablica 5. Korištena antitijela u inkubaciji proteina

	Specifičnost	Proizvođač	Kataloški broj
Primarna antitijela	SLCO2B1 (zečje)	antibodies-online.com	ABIN7170303
	Vinkulin (mišje)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-73614
Sekundarna antitijela	Anti-zečje IgG-HRP	Thermo Fisher Scientific	Pierce21466
	Anti-mišje IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-516102

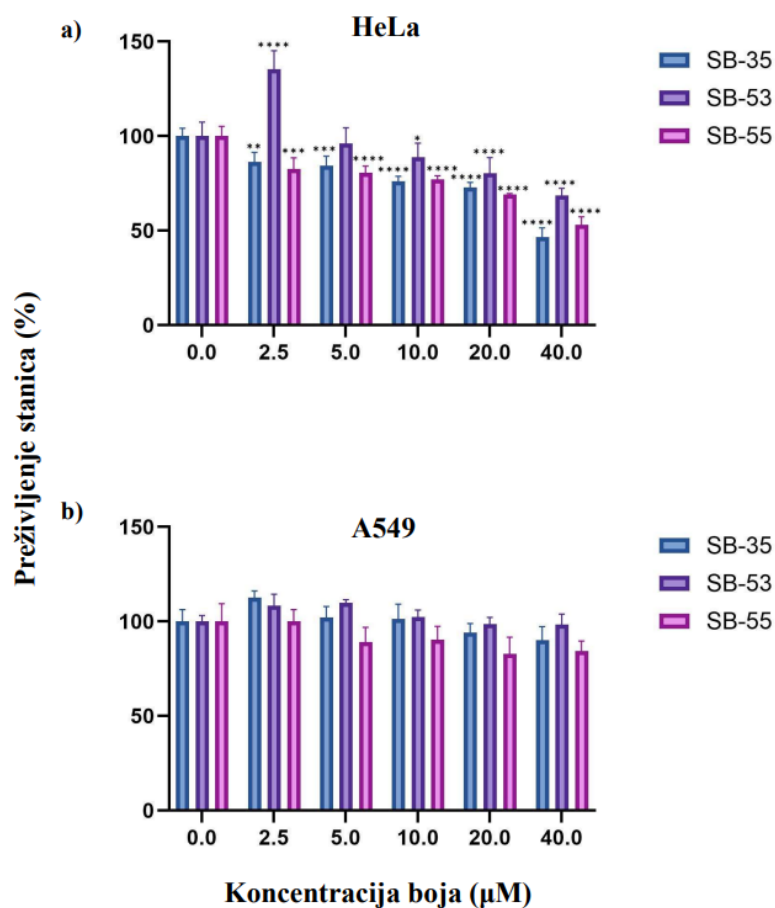
3.2.6. Statistička analiza

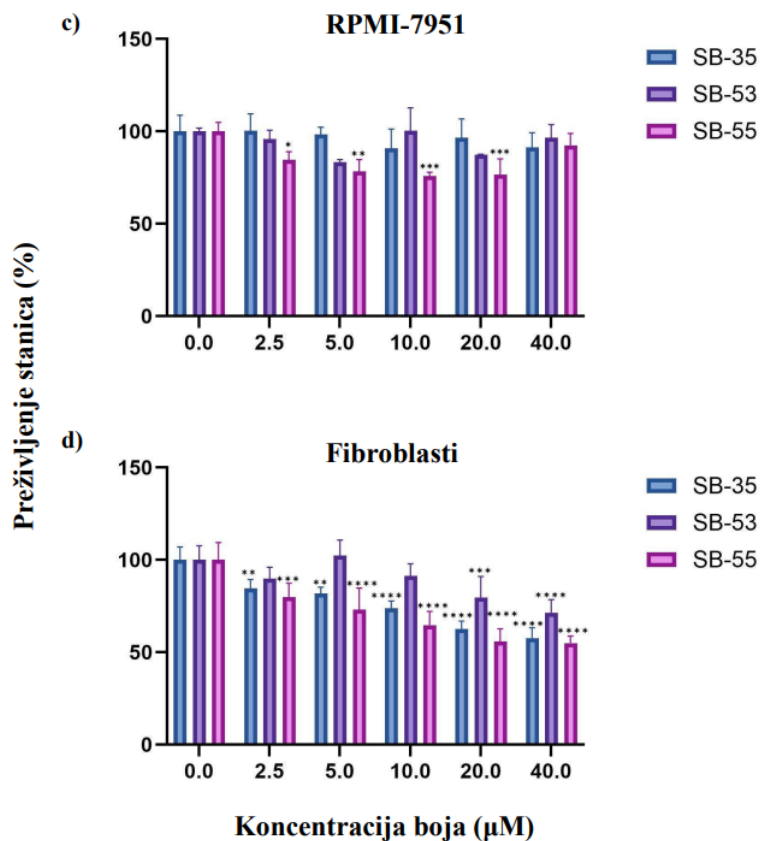
Rezultate analize citotoksičnosti izrazila sam kao srednju vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, \pm vrijednost standardne devijacije. Statističku značajnost (vrijednost p) razlike između preživljenja tretiranih i kontrolnih stanica odredila sam korištenjem testa analize varijanci (ANOVA), u programu GraphPad Prism8 (GraphPad Software, Inc, SAD, verzija 8.2.1). Vrijednost $p < 0,05$ označena je s *, vrijednost $p < 0,01$ označena je s **, vrijednost $p < 0,001$ označena je s ***, te vrijednost $p < 0,0001$ označena je s ****.

4. REZULTATI

4.1. Djelovanje novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja (Cy7) na preživljenje stanica

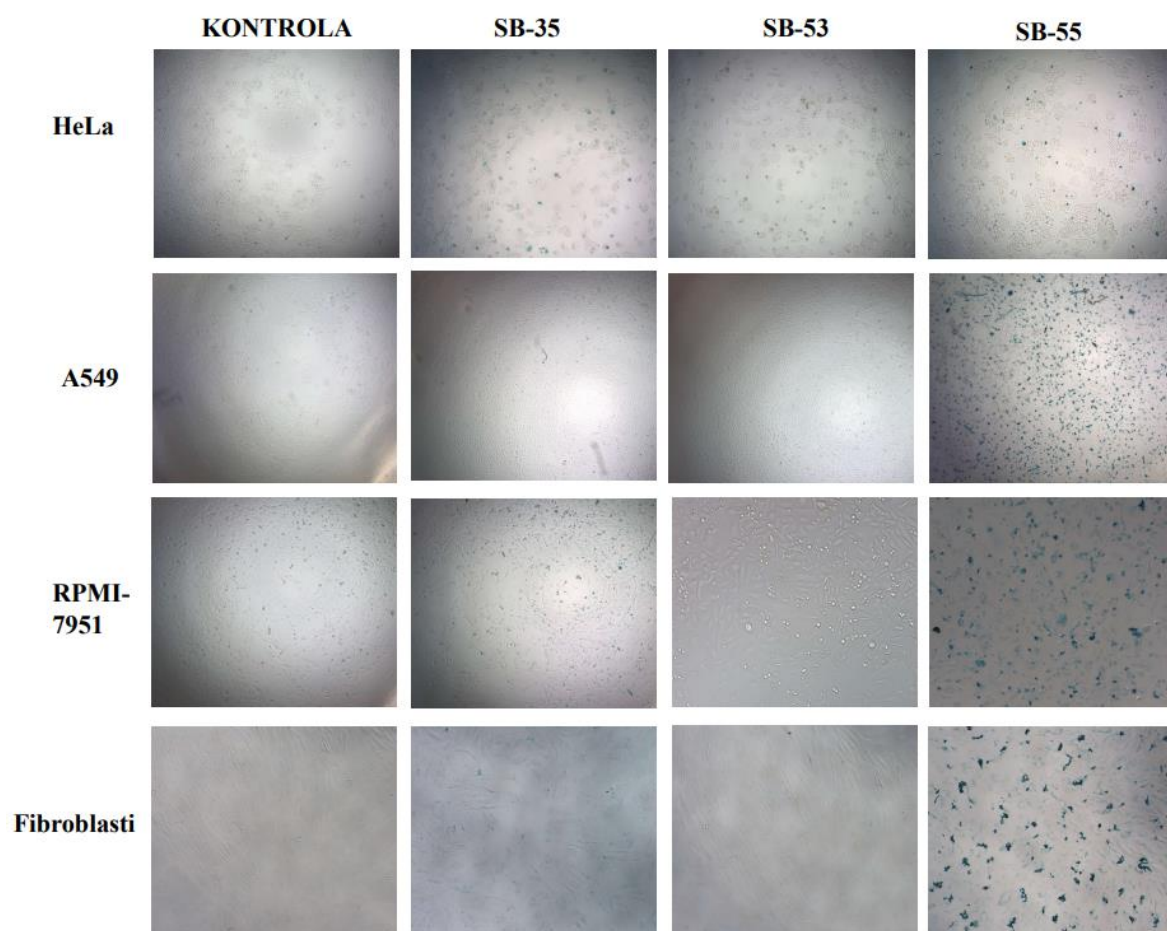
Korištenjem MTT testa i ljudskih, adherentnih linija stanica tumora (HeLa, A549, RPMI) te normalnih ljudskih fibroblasta kao eksperimentalnih modela ispitan je utjecaj novosintetiziranih Cy7 boja (SB-35, SB-53 i SB-55) na metabolizam stanica kao indirektnog pokazatelja njihova preživljenja. Iz rezultata analize nije bilo moguće odrediti IC_{50} vrijednosti ispitanih spojeva (koncentracija spojeva pri kojoj je preživjelo 50% stanica) jer je učinak korištenih koncentracija sva tri ispitana spoja bio iznad 50% (Slika 5).





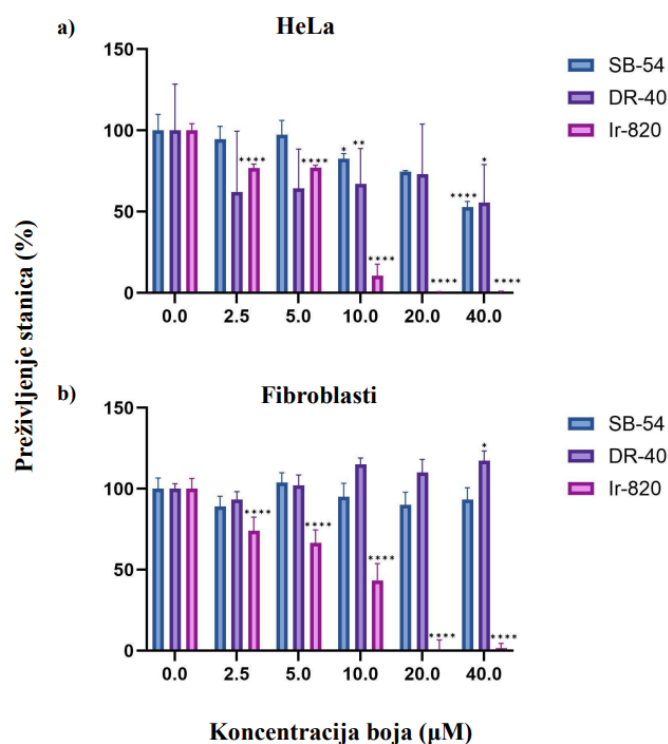
Slika 5. Preživljenje stanica HeLa, A549, RPMI-7951 i fibroblasta tretiranih Cy7 bojama. Stanice su 24 h nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama spojeva SB-35, SB-53 i SB-55 (2;5; 5; 10; 20 i 40 µM). Nakon 72 h preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti boja na linijama stanica HeLa (a), A549 (b), RPMI-7951 (c) i fibroblastima (d) izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, ± vrijednost standardne devijacije. Vrijednost p je dobivena korištenjem ANOVA testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost $p < 0,05$ označenu s *, $p < 0,01$ označenu s **, $p < 0,001$ označenu s ***, te $p < 0,0001$ označenu s ****.

Nadalje, 72 h nakon tretmana stanica HeLa, A549, RPMI-7951 te fibroblasta sa SB-35, SB-53 i SB-55 svjetlosnim mikroskopom je uočeno da SB-55 značajno vidljivije boja sva četiri tipa stanica u odnosu na SB-35 i SB-53 te da je to obojenje značajnije u stanicama A549, RPMI-7951 i fibroblastima u odnosu na HeLa stanice (Slika 6).



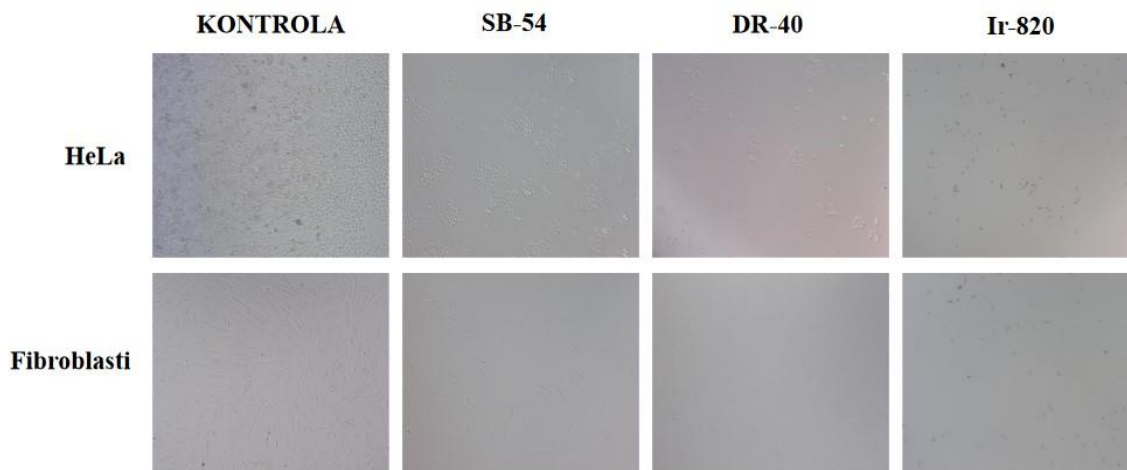
Slika 6. Vizualizacija akumuliranih Cy7 boja, SB-35, SB-53 i SB-55, u ljudskim, adherentnim tumorskim linijama stanica (HeLa, A549 i RPMI-7951), te normalnim fibroblastima. Stanice su tretirane s 40 μ M SB-35, SB-53 i SB-55. Nakon 72 h stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 10 \times /0,25 NA.

Također, ispitan je efekt liganada, koji su korišteni prilikom sinteze spojeva SB-35, SB-53 i SB-55 te komercijalno dostupnog spoja Ir-820 (indocijanin zelena), na preživljenje HeLa stanica i fibroblasta. Iz rezultata MTT testa vidljiv je značajni utjecaj spoja Ir-820 na preživljenje obje linije stanica, dok to nije slučaj za ligande SB-54 (derivat ciprofloksacina) i DR-40 (derivat šećera) (Slika 7). Rezultati prikazani na Slici 5 pokazuju da se toksičan efekt Ir-820 smanji prilikom njegove ugradnje u SB-35, SB-53 i SB-55.



Slika 7. Preživljenje HeLa stanica i fibroblasta tretiranih ligandima Cy7 bojama te komercijalno dostupnom bojom Ir-820. Stanice su 24 h nakon nasadivanja tretirane različitim koncentracijama spojeva SB-54, DR-40 i Ir-820 (2.5, 5, 10, 20 i 40 μM). Nakon 72 h preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti boja na linijama stanica HeLa (a) i fibroblastima (b) izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, ± vrijednost standardne devijacije. Vrijednost p je dobivena korištenjem ANOVA testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost $p < 0,05$ označenu s *, $p < 0,01$ označenu s **, $p < 0,001$ označenu s ***, te $p < 0,0001$ označenu s ****.

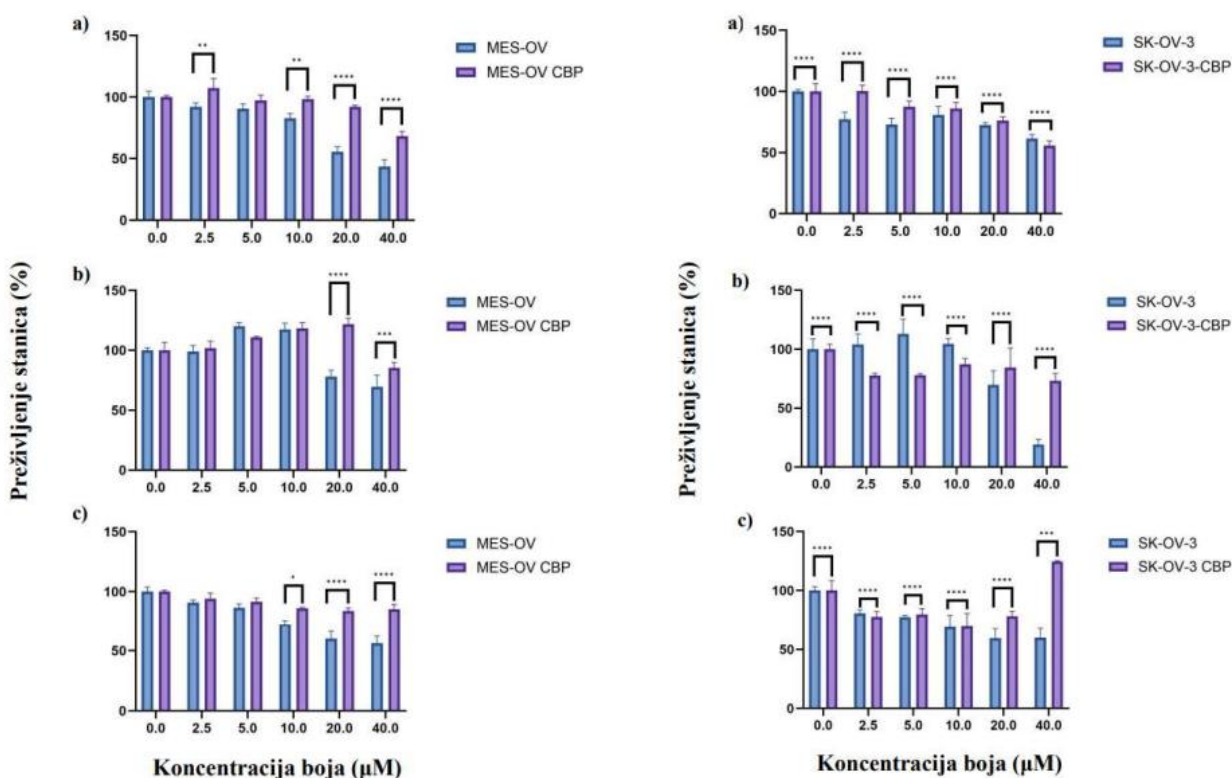
Nadalje, kao što smo i pretpostavili, tretman HeLa stanica i fibroblasta s 40 μM SB-54, DR-40 i Ir-820 nakon 72 h nije obojao stanice. No, u slučaju Ir-820 vidljiv je značajan toksičan efekt na obje vrste stanica (Slika 8) što odgovara rezultatima dobivenima MTT testom (Slika 7).



Slika 8. Vizualizacija HeLa stanica i fibroblasta nakon tretmana SB-54, DR-40 i Ir-820. HeLa stanice i fibroblastima tretiran su s 40 μ M SB-54, DR-40 i Ir-820 tijekom 72 h. Stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 10 \times /0,25 NA.

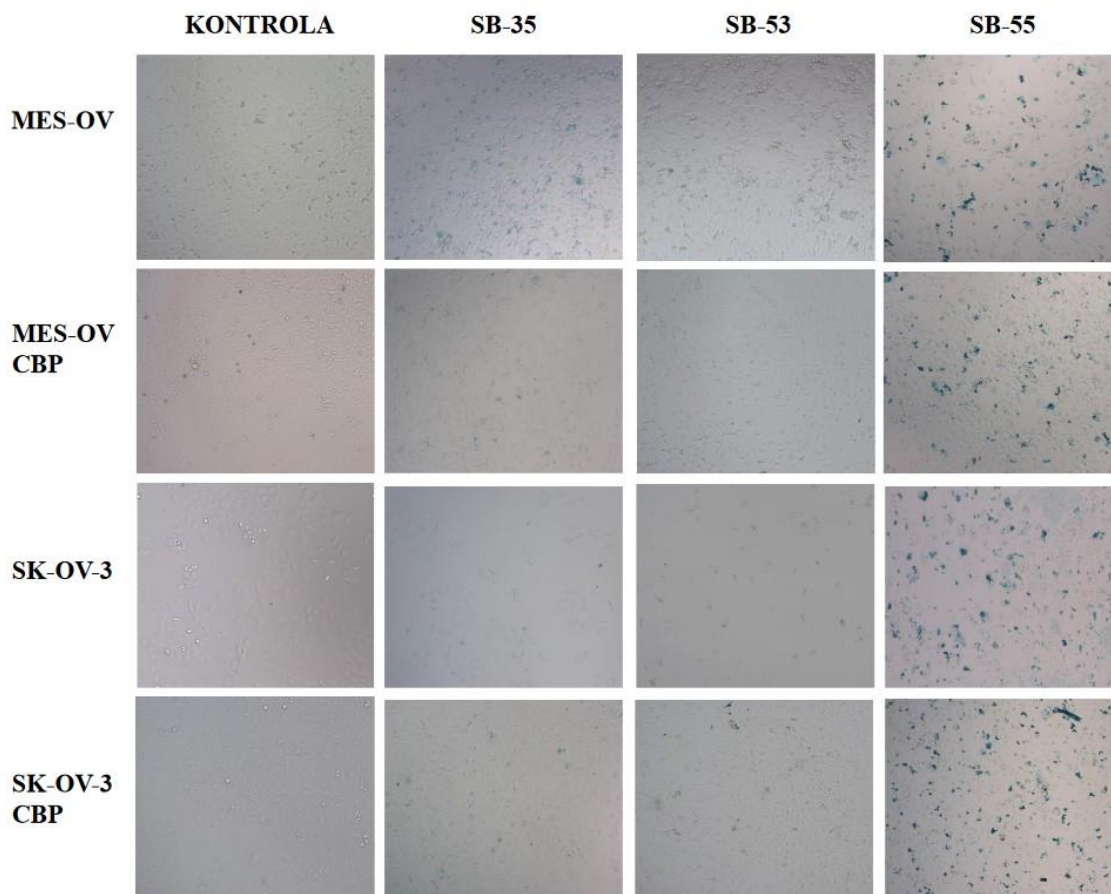
4.1.1. Djelovanje novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja na roditeljske MES-OV i SK-OV-3 te na karboplatinu otpornih MES-OV CBP i SK-OV-3 CBP linija stanica

Korištenjem MTT testa ispitano je djelovanje SB-35, SB-53 i SB-55 na parove stanica raka jajnika, roditeljske linije MES-OV i MES-OV CBP stanice otporne na karboplatinu te roditeljske linije SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP stanice otporne na karboplatinu. Svrha ovih eksperimenata je bila utvrditi moguću razliku u djelovanju navedenih spojeva na roditeljsku *versus* liniju stanica otpornu na CBP. Naime, postoji mogućnosti da roditeljske i stanične linije otporne na CBP različitim intenzitetom akumuliraju cijaninske boje te je njihov učinak na stanice različit, što bi se eventualno moglo koristiti u terapijske ili dijagnostičke svrhe. Iz rezultata MTT testa vidljivo je veće preživljenje linija stanica otpornu na CBP u odnosu na roditeljske (Slika 9). Razlika u preživljenju stanica je posebno značajna nakon tretmana s najvećom koncentracijom spojeva, 40 μ M. Rezultati pokazuju da su roditeljske MES-OV i SK-OV-3 linije stanica osjetljivije na sva tri ispitana spoja u odnosu na MES-OV CBP, odnosno SK-OV-3 CBP stanice (Slika 9).



Slika 9. Preživljenje MES-OV, MES-OV CBP, SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP stanica tretiranih Cy7 bojama. Stanice su 24 h nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama spojeva SB-35 (a), SB-53 (b) i SB-55 (c). Nakon 72 h preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti boja na stanicama MES-OV i SK-OV-3 izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, \pm vrijednost standardne devijacije. Vrijednost p je dobivena korištenjem ANOVA testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost $p < 0,05$ označenu s *, $p < 0,01$ označenu s **, $p < 0,001$ označenu s ***, te $p < 0,0001$ označenu s ****.

Vizualizacija stanica svjetlosnim mikroskopom 72 h nakon tretmana 40 μ M SB-35, SB-53 i SB-55 pokazala je da je obojenost roditeljskih i staničnih linija otpornih na CBP najvidljivija nakon tretmana stanica sa SB-55 te da SK-OV-3 CBP stanice pokazuju nešto bolju obojanost u odnosu na roditeljske SK-OV-3 stanice (Slika 10).



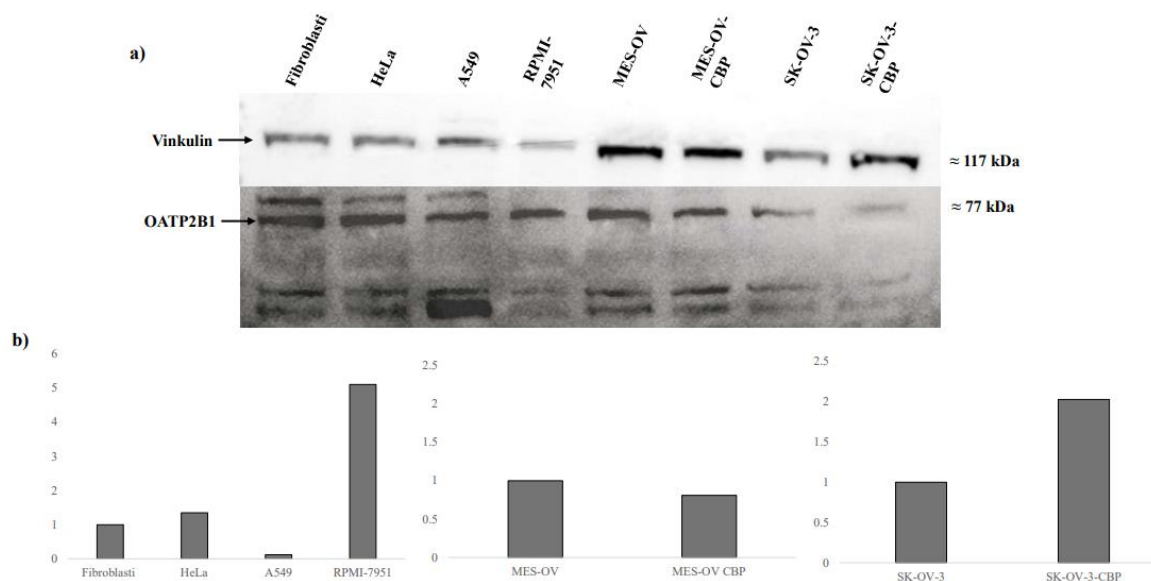
Slika 10. Vizualizacija akumuliranih Cy7 boja, SB-35, SB-53 i SB-55, u ljudskim tumorskim linijama stanica (MES-OV, MES-OV-CBP, SK-OV-3 i SK-OV-3-CBP). Stanice su tretirane s 40 μ M SB-35, SB-53 i SB-55. Nakon 72 h su promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 10 \times /0,25 NA.

U svrhu razumijevanja različitog obojenja roditeljskih i staničnih linija otpornih na CBP vidljivih svjetlosnim mikroskopom (Slika 10) te činjenice da Cy7 boje ulaze u stanicu i aktivno uz pomoć proteina iz obitelji OAT (Lange i sur. 2021) zanimalo nas je imaju li roditeljske MES-OV i SK-OV-3 stanice različitu ekspresiju transportera OATP u odnosu na CBP otporne linije stanica. U tu svrhu korišteni su prethodno dobiveni rezultati RNA seq . Rezultati pokazuju da je ekspresija OATP2B1/SLCO2B1 statistički značajno veća u SK-OV-3 CBP stanicama u odnosu na SK-OV-3 dok je ekspresija OATP1/SLCO4A1 statistički značajno veća u MES-OV CBP u odnosu na MES-OV stanice (Tablica 5).

Tablica 6. Ekspresija OATP transportera na nivou transkriptoma

Ime	Simonim	Kromosom	MES-OV CBP8 vs. MES-OV 2D - Log <i>fold</i> <i>change</i>	MES-OV CBP8 vs. MES-OV 2D - FDR p- vrijednost	SK-OV-3 CBP6 vs. SK-OV-3 2D - Log <i>fold</i> <i>change</i>	SK-OV-3 CBP6 vs. SK-OV-3 2D - FDR p- vrijednost
SLCO2B1	SLCO2B1 KIAA0880 OATP2B1 OATPB SLC21A9	11	-0,26539	0,801214	5,957138	0,010635
SLCO1C1	SLCO1C1 OATP14 OATP1C1 OATPF SLC21A14	12	#N/A	#N/A	-1,774	0,269514
SLCO1B3	SLCO1B3 LST2 OATP1B3 OATP8 SLC21A8	12	2,440918	0,029116	-1,50816	3,12E-17
SLCO1B1	SLCO1B1 LST1 OATP1B1 OATP2 OATPC SLC21A6	12	2,449329	#N/A	-0,65443	0,516904
SLCO1A2	SLCO1A2 OATP OATP1 OATP1A2 SLC21A3	12	2,334832	0,115121	0,482856	0,605459
SLCO4A1	SLCO4A1 OATP1 OATP4A1 OATPE SLC21A12	20	0,938198	8,97E-38	-0,53291	3,49E-14
SLCO2A1	SLCO2A1 OATP2A1 SLC21A2	3	-3,97118	0,00313	#N/A	#N/A
SLCO4C1	SLCO4C1 OATP4C1 OATPX SLC21A20	5	2,026594	3,26E-21	1,68442	0,289577
SLCO6A1	SLCO6A1 OATP6A1 SLC21A19	5	-2,20435	#N/A	#N/A	#N/A
SLCO5A1	SLCO5A1 OATP5A1 SLC21A15	8	-0,53355	#N/A	-1,71887	#N/A
SLCO3A1	SLCO3A1 OATP3A1 OATPD SLC21A11	15	-0,12482	0,9283	-0,50213	0,002798

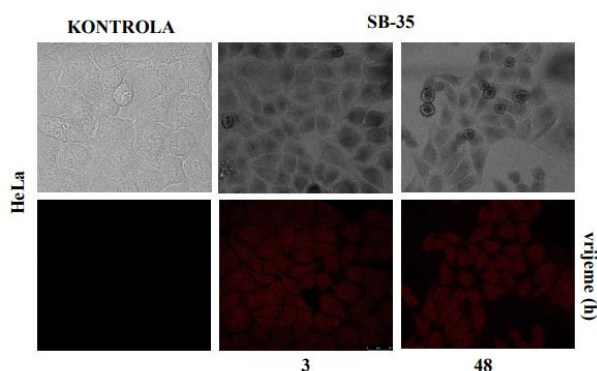
Kako bismo utvrdili da li je ekspresija OATP transportera slična i na razini proteina odlučili smo izmjeriti konstitutivnu ekspresiju OATP2B1 u parovima MES-OV i SK-OV-3 stanicama te ostalim eksperimentalnim modelima. Iz kontrolnih i tretiranih stanica izolirani su proteini, razdvojeni poliakrilamidnom gel elektroforezom, te nakon prenošenja na membranu inkubirani s antitijelima navedenim u Tablici 5. Kako bi se uzorci mogli kvantitativno usporediti, intenziteti proteinskih vrpca su denzitometrijski kvantificirani pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Kao protein za usporedbu količine nanesenih proteina korišten je protein stalne ekspresije, vinkulin. Dobiveni rezultati pokazuju povećanu ekspresiju proteina OATP2B1 kod HeLa, RPMI-7951, MES-OV te MES-OV CBP, u odnosu na normalne fibroblaste. Iako je svjetlosnim mikroskopom uočena značajna akumulacija Cy7 boja u RPMI-7951 u odnosu na HeLa stanice (Slika 6), ekspresija OATP2B1 nije povećana u odnosu na onu izmjerenu za fibroblaste (Slika 11). Ono što je bilo zanimljivo je razlika u ekspresiji OATP2B1 između roditeljskih i staničnih linija otpornih na karboplatinu. Rezultati analize MES-OV vs. MES-OV CBP pokazuju da otporna stanična linija ima manju ekspresiju OATP2B1 u odnosu na roditeljske stanice. Međutim, kod SK-OV-3 vs. SK-OV-3 CBP vidljiva je veća ekspresija proteina kod otporne stanične linije u odnosu na SK-OV-3 stanice (Slika 11). Moguće je da je OATP2B1 nije jedini odgovoran za akumulaciju Cy7 boja u stanicu, odnosno da je ekspresija pojedinih OATP transportera ovisna o tipu stanice, odnosno njenom tkivnom podrijetlu.



Slika 11. Ekspresija proteina OATP2B1 u različitim linijama stanica (a). Prikazani su reprezentativni podaci od tri ponovljena eksperimenta. Kvantifikacija ekspresije OATP2B1 proteina kod različitih staničnih linija dobivena je denzitometrijom proteinskih vrpca (b).

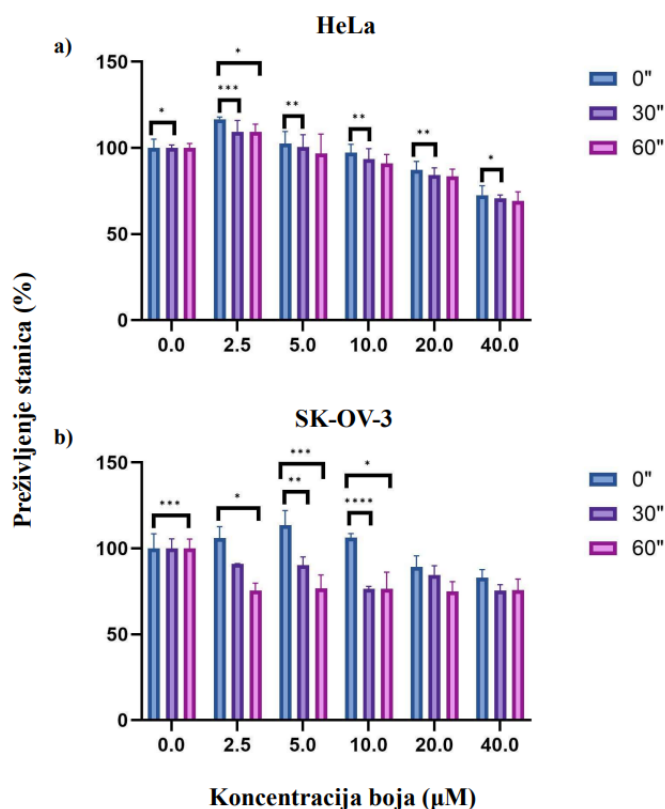
4.2. Akumulacija novosintetiziranih heptametinskih cijaninskih boja (Cy7) u stanice

Kako bi se vidjelo u koji dio stanice ulaze novosintetizirane Cy7 boje, stanice HeLa tretirane su SB-35 spojem tijekom 3 i 48 h. Korištenjem konfokalnog mikroskopa uočeno je da boja fluorescira te da se difuzno raspoređuje po stanicama, odnosno ne primjećuje se njena specifična lokalizacija. Četrdeset osam sati od tretmana bojom uočen je veći broj mrtvih stanica u odnosu na kontrolnu, netretiranu skupinu i na stanice promatrane tri sata nakon tretmana (Slika 12).



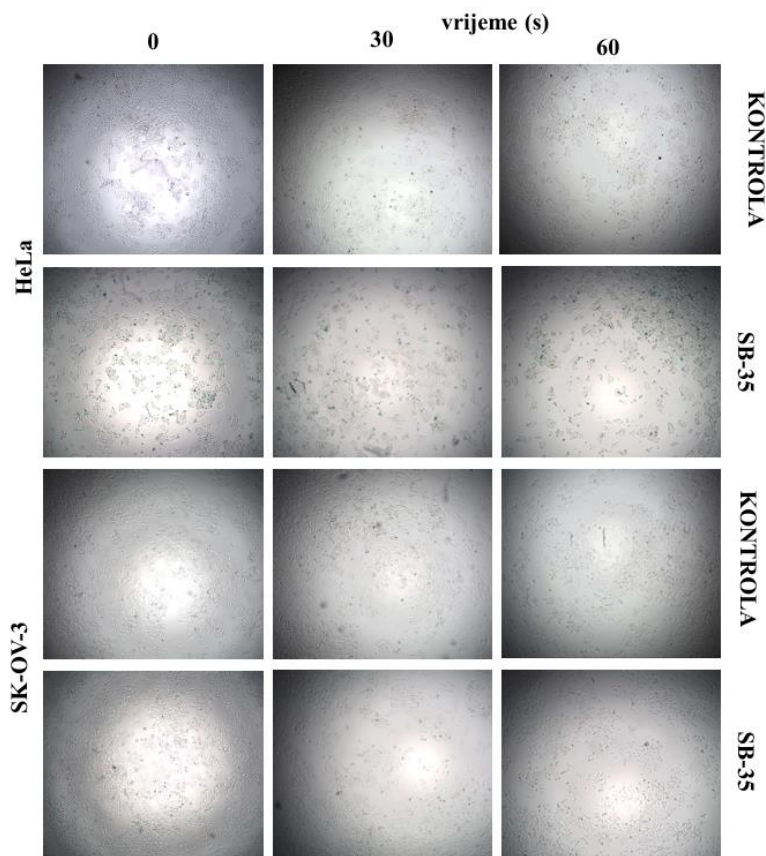
Slika 12. Vizualizacija akumulirane Cy7 boje SB-35 u stanicama HeLa promatrane u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana. Stanice su tretirane spojevima koncentracije 5 μM . Stanice su promatrane konfokalnim mikroskopom pri povećanju od 10 \times /0.45 NA.

Rezultati prikazani na Slici 12 ukazuju na moguće citotoksično djelovanje lasera, sastavnog dijela konfokalnog mikroskopa. Kako bismo utvrdili da li svjetlost određene valne dužine pobuđuje Cy7 boje te tom pobudom boje postaju toksičnije za stanice tumora, HeLa i SK-OV-3 stanice tretirane Cy7 spojevima su izložene lampama s hladnom svjetlošću (8 \times 8 W; 8000 lux; tijekom 30 i 60 sekundi). Dobiveni rezultati pokazuju vidljivu razliku u preživljenju stanica koje su osvijetljene u različitim vremenskim intervalima i stanica koje nisu bile izložene navedenim lampama. Drugim riječima, rezultati upućuju na povećanje citoksičnosti boje SB-35 posredovano fotoaktivacijom (Slika 13).



Slika 13. Preživljenje stanica HeLa i SK-OV-3 tretiranih Cy7 bojom. Stanice su 24 h nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama boje SB-35). Dvije pločice su osvijetljene lampama s hladnom svjetlošću (8 \times 8 W; 8000 lux; 30 i 60 sekundi). Nakon 72 h preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti boja na linijama stanica HeLa (a) i SK-OV-3 (b) izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, \pm vrijednost

standardne devijacije. Vrijednost p je dobivena korištenjem ANOVA testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost $p < 0,05$ označenu s *, $p < 0,01$ označenu s **, $p < 0,001$ označenu s ***, te $p < 0,0001$ označenu s ****.

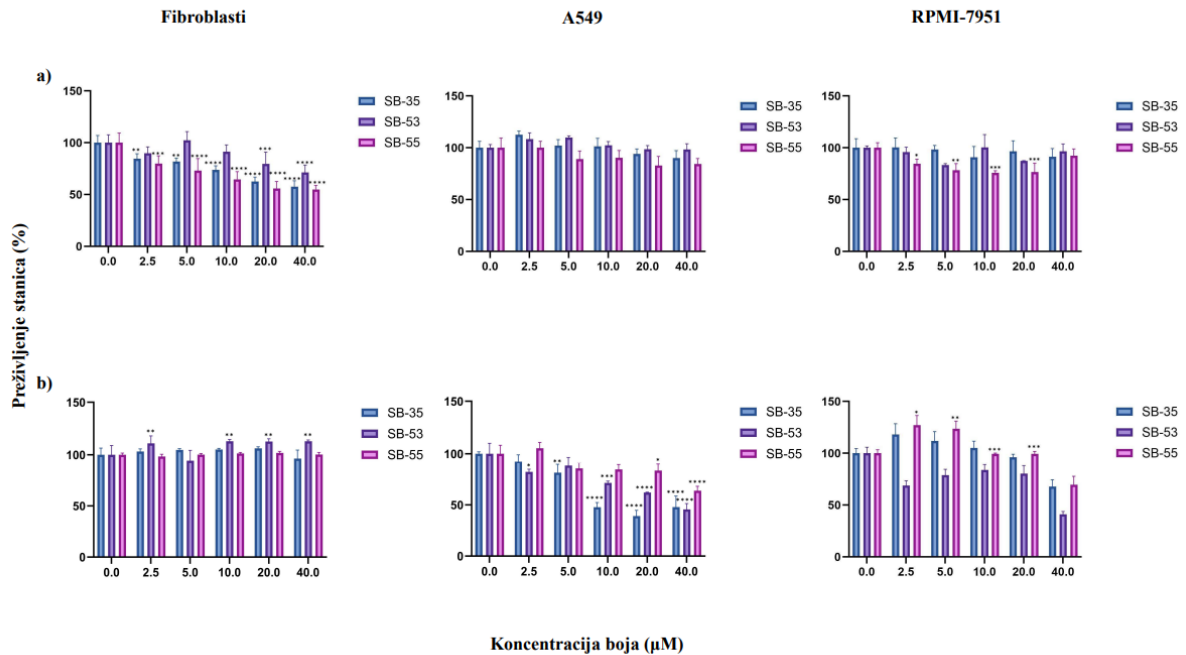


Slika 14. Vizualizacija akumulirane Cy7 boje SB-35 u stanicama HeLa i SK-OV-3 promatrane u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana i osvjetljavanja lampama s hladnom svjetlošću. Promatrane su svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od $10\times/0,25$ NA.

4.3. Analiza staničnog preživljenja nakon djelovanja metodom određivanja stanične gustoće

U svrhu razumijevanja mehanizma djelovanja Cy7 spojeva u stanicama te planiranje budućih istraživanja napravljena su preliminarna mjerenja koja su uključivala usporedbu biološkog efekta istraživanih boja korištenjem MTT testa u usporedbi sa SRB testom. Naime, SRB test se koristi za određivanje stanične gustoće, na temelju mjerenja sadržaja staničnih proteina. Rezultati pokazuju da je u slučaju fibroblasta MTT test osjetljiviji dok u slučaju A549 i RPMI-7951 stanica SRB test, kao mjera preživljena stanica, osjetljiviji. Usprkos različitim

rezultatima MTT i SRB testa vidljivo je da su ispitivani spojevi toksičniji za stanice tumora u odnosu na fibroblaste (Slika 15). Nadalje, preliminarni rezultati ukazuju da je jedan od mogućih mehanizama djelovanja ispitivanih spojeva vezan za sintezu proteina te da je njihov učinak različit u odnosu na učinak istih spojeva na metabolizam stanica.



Slika 15. Preživljenje fibroblasta, A549 i RPMI-7951 stanica tretiranih Cy7 bojama. Stanice su 24 sata nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama spojeva SB-35, SB-53 i SB-55. Nakon 72 sata preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT (a) i SRB (b). Rezultati analize citotoksičnosti boja na linijama stanica izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, ± vrijednost standardne devijacije. Vrijednost p je dobivena korištenjem ANOVA testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost $p < 0,05$ označenu s *, $p < 0,01$ označenu s **, $p < 0,001$ označenu s ***, te $p < 0,0001$ označenu s ****.

5. RASPRAVA

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization-WHO*) tumori su drugi vodeći uzrok smrtnosti na svjetskoj razini, s 9,7 milijuna smrtnih slučajeva u 2022. godini. Korištenje različitih kontrastnih sredstava za oslikavanje i lokalizaciju tumora izrazito je važna metoda za uspješnu dijagnostiku tumora te njihovo kirurško odstranjivanje. U posljednje vrijeme naglasak je na brojnim fluorescentnim bojama koje djeluju u NIR području elektromagnetskog spektra. Najčešće se konjugiraju s molekulama lijekova ili antitijelima te na taj način služe u dijagnostičke svrhe. Razvoj i korištenje NIR fluorescentnih boja uvelike je poboljšalo dijagnostiku jer se omogućava specifična lokalizacija akumulacije te aktivacije različitih boja u stvarnom vremenu (Jo i sur. 2023).

Prilikom izrade ovog diplomskog rada ispitivan je biološki učinak i potencijal antitumorskog djelovanja tri nova derivata fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom, SB-35, SB-53 i SB-55 (Tablica 2).

Učinak novosintetiziranih Cy7 boja na metabolizam stanice, kao mjera vijabilnosti stanice, najprije je ispitana na stanicama HeLa, koje su se pokazale kao dobar eksperimentalni model za probir novih spojeva u prijašnjim istraživanjima (Schwechheimer i sur. 2018; Grienke i sur. 2018; Pernar i sur. 2019). Isto tako, učinak spojeva je ispitan i na normalnim fibroblastima. Dobiveni rezultati pokazuju da ispitane Cy7 boje nisu značajno toksične za stanice te bi kao takve potencijalno mogle biti korištene za vizualizaciju stanica u dijagnostičke svrhe. Posebice stoga što takav tip primjene zahtijeva puno kraće vrijeme inkubacije, od najviše 24 h, u usporedbi s vremenima inkubacije od 72 h tijekom ispitivanja citotoksičnosti *in vitro*. Svjetlosnim mikroskopom je uočena akumulacija boje u stanicama (Slika 6) što upućuje na mogućnost njihova korištenja u dijagnostičke svrhe. No, s obzirom na to da boje ulaze i u normalne stanice nedostatak selektivnosti ih čini nepogodnima za oslikavanje i lokalizaciju tumora (Yang i sur. 2020). Nadalje, djelovanje boja je ispitano na dodatne dvije linije stanica tumora, stanice adenokarcinoma alveola (A549), stanice melanoma (RPMI-7951). Nisu uočene značajne razlike u preživljenju stanica tretiranih Cy7 bojama u odnosu na kontrolnu, netretiranu skupinu (Slika 5).

Najveći problem uspješne kemoterapije je pojava otpornosti stanica tumora na terapiju (Assaraf i sur. 2019). Do danas je poznat veći broj molekularnih mehanizama otpornosti (De Las Riva i sur. 2021) kao što su npr. promjene u membranama stanice i organela. Ciljanje tih specifičnih promjena moglo bi poboljšati terapiju kao i sintetiziranje novih spojeva, potencijalnih antitumorskih spojeva, s drugačijim mehanizmom djelovanja. Kako bismo vidjeli imaju li novosintetizirane Cy7 drugačiji biološki učinak na otporne stanice tumora tretirali smo s SB-35, SB-53 i SB-55 dodatne četiri linije stanica tumora: stanice seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja (roditeljska linija MES-OV i stanična linija otporna na karboplatinu MES-OV CBP) i stanice adenokarcinoma jajnika (roditeljska SK-OV-3 linija stanica i stanična linija otporna na karboplatinu SK-OV-3 CBP). Najveća osjetljivost na djelovanje Cy7 uočena je kod roditeljskih linija stanica raka jajnika (MES-OV i SK-OV-3), dok linije stanica otporne na karboplatinu pokazuju veće preživljenje, odnosno manju osjetljivost (Slika 7). Međutim, akumulacija boja je veća kod SK-OV-3 CBP stanice u odnosu na roditeljske SK-OV-3 stanice (Slika 8). Mogući razlog za to je povećana ekspresija transportera OATP izmjerena na razini RNA i proteina, odnosno transkripcije i translacije (Tablica 5). Dobiveni rezultat (Slika 11) je u suprotnosti od rezultata Kulbacka i sur. (2011) koji su pokazali da stanične linije adenokarcinoma dojke otporne na doksorubicin (MCF7/DOX) pokazuju slabiju akumulaciju boja HM118, FBF-749 te ER-139 u odnosu na roditeljske linije stanica. Nakon zračenja terapija je bila učinkovitija kod otpornih stanica, što sugerira na mogućnost korištenja cijaninskih boja u sklopu PDT kod pojedinih tumorskih linija stanica otpornih na određene kemoterapeutike. Međutim, potrebno je istražiti veći broj parova roditeljskih i na kemoterapeutike otpornih linija stanica različitog podrijetla da bi se donijeli neki zaključci u okviru istraživanja *in vitro*. Razumijevanje mehanizama koji reguliraju ekspresiju proteina OATP2B1 u različitim staničnim linijama, pogotovo kod gore navedenih stanica otpornih na karboplatinu, može biti od ključnog značaja za razvoj novih terapija koje uključuju Cy7 boje. Za to su potrebna daljnja istraživanja kako bi se otkrila točna uloga OATP2B1 proteina u transportu novosintetiziranih Cy7 boja. Rezultati istraživanja Buxhofer-Ausch-a i sur. (2013) ukazuju na tumor-specifičnu ekspresiju obitelji OATP transportera.

Reaktivne vrste kisika (ROS; superoksidni ion, hidroksil radikal, vodikov peroksid) produkti su normalnog metabolizma (mitohondrij je glavni izvor unutarstaničnog ROS-a) i djelovanja ksenobiotika (Bardaweel i sur. 2018). Povišene količine ROS-a uzrokuju oksidativni stres te modifikacije staničnih makromolekula, inhibiraju funkciju proteina te promoviraju apoptozu (Shah i sur. 2021). U literaturi je poznato da se Cy7 prvenstveno agregiraju u mitohondrijima te lizosomima što potiče proces apoptoze (Nie i sur. 2024). Isto tako, poznato

je da utječu na proizvodnju velike količine ROS-a u mikrookolišu tumora također potičući apoptozu (Lange i sur. 2021). Zahvaljujući brojnim prednostima, mogu se koristiti u sklopu PDT-a. Upravo se primjenom PDT-a u kombinaciji s Cy7 kao PS-a inhibira djelovanje glutationa, koji štiti stanice od povećane količine ROS-a, te se na taj način može postići direktno ubijanje tumorskih stanica (Gunaydin i sur. 2021). Na koji način novosintetizirane Cy7 potiču smrt stanice tek je potrebno istražiti. Ispitivane novosintetizirane Cy7 pokazuju potencijal moguće primjene u sklopu PDT-a. Prema rezultatima dobivenih nakon vizualizacije HeLa stanica konfokalnim mikroskopom, koje su bile tretirane bojom SB-35 (40 μM), zamijećen je veliki broj mrtvih stanica, što upućuje na mogućnost povećanja citotoksičnosti ispitivane boje fotoaktivacijom (Slika 12). Vođeni tim rezultatima, HeLa i SK-OV-3 stanice su nakon tretmana osvjetljene lampama s hladnom svjetlošću u različitim vremenskim intervalima. Nakon 72 h bilo je vidljivo manje preživljenje stanica izloženim navedenim lampama u odnosu na stanice tretirane spojevima (Slika 13). Takvi rezultati odgovaraju pretpostavci da se citotoksičnost boja povećava fotoaktivacijom djelovanjem svjetlosti u NIR području elektromagnetskog spektra. Ove eksperimente je neophodno ponoviti i na zdravim, normalnim stanicama kako bi se istražilo da li nakon fotoaktivacije postoji eventualna selektivnost spoja s obzirom na vrstu stanice. U istraživanju na A549 stanicama te stanicama melanoma WM1158 provedenom od strane Broadwater i sur. (2019) pokazano je da je kombinacija smanjene citotoksičnosti i povećane fototoksičnosti PS-a najučinkovitija u sklopu PDT-a. Ispitivani su kompleksi kationa Cy7 s različitim anionima (jodid (I^-); heksafluoroantimonat (SbF_6^-); heksafluorofosfat (PF_6^-); o-karboran (CB^- i drugi). Učinak kompleksa se može usporediti i sa spojevima korištenim u ovom radu.

U svrhu daljnjeg razumijevanja mehanizma djelovanja novosintetiziranih Cy7 spojeva napravljeni su preliminarni eksperimenti. U tu svrhu je korištena dodatna metoda za mjerenje preživljenja stanica SRB test koji se temelji na sposobnosti vezanja proteinske boje SRB (elektrostatski i pH ovisno) na bazične aminokiselinske ostatke stanica fiksiranih u trikloroetanoj kiselini. Drugim riječima, gustoća stanica odgovara količini proteina u njima. Istraživanje van Tonder i sur. (2015) baziralo se na usporedbi MTT testa s različitim testovima citotoksičnosti, uključujući i SRB test. Prema rezultatima istraživanjima, SRB test osjetljiviji je za probir novosintetiziranih spojeva s mogućnošću korištenja u terapijske svrhe u odnosu na MTT. MTT test isključivo se oslanja na metaboličku aktivnost stanice, odnosno redukciji žute tetrazolijske boje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) u netopivi, ljubičasti formazan uz pomoć enzima mitohondrijske reduktaze. Intenzitet obojenja je proporcionalan vijabilnosti stanica. Brzina pretvorbe u formazan ovisi o količini kisika unutar

stanice te broju mitohondrija. Nasuprot tome, SRB testom mjeri se ukupna količina staničnih proteina, ne oslanjajući se na metaboličku aktivnost stanice. Na taj način se eliminira utjecaj različitih bioloških parametara, kao što je povećana brzina metabolizma ili broj staničnih mitohondrija na proces kvantifikacije (van Tonder i sur. 2015). Za usporedbu osjetljivosti MTT i SRB testa ispitana je citotoksičnost novosintetiziranih Cy7 boja na normalnim ljudskim fibroblastima, A549 i RPMI-7951 stanicama (Slika 15). Iz rezultata dobivenim ovim istraživanjem vidljiva je veća osjetljivost SRB testa u odnosu na MTT test kod stanica tumora, ali ne i fibroblasta. Rezultati ukazuju da je moguće koristiti oba testa za mjerenje preživljavanja različitih stanica nakon tretmana Cy7 spojeva te da spojevi imaju vjerojatno utjecaj na sintezu proteina u stanici.

U ovom radu prvi put su ispitani i opisani biološki učinci novosintetiziranih Cy7, koji su pokazali određena svojstva bitna za daljnja istraživanja te potencijalnu primjenu u dijagnostičke svrhe. Kako se njihova citotoksična aktivnost povećava fotoaktivacijom, spojevi pokazuju moguću primjenu u sklopu PDT-a. Daljnja istraživanja treba usmjeriti na otkrivanje točnog mehanizma djelovanja novosintetiziranih Cy7 spojeva te njihovu eventualnu primjenu u dijagnostici otpornih tumora specifičnog podrijetla.

6. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu ispitivana su biološka svojstva triju Cy7 boja: SB-35, SB-53 i SB-55, koje su novosintetizirani derivati fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom. Mjerenjem učinka Cy7 boja na metabolizam stanica raka grlića maternice (HeLa), adenokarcinoma alveola (A549), melanoma (RPMI-7951), stanica seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja (roditeljska MES-OV i na karboplatinu otporna linija MES-OV CBP) i stanice adenokarcinoma jajnika (roditeljska SK-OV-3 i na karboplatinu otporna linija SK-OV-3 CBP te normalnih fibroblasta, analizom njihove akumulacije u stanicama i fototoksičnosti doneseni su sljedeći zaključci:

1. Novosintetizirane Cy7 boje, SB-35, SB-53 i SB-55, ne pokazuju značajan toksičan učinak na normalne ljudske fibroblaste i na ljudske adherentne stanične linije tumora.
2. Bolje preživljenje nakon tretmana Cy7 bojama pokazuju stanične linije raka jajnika MES-OV i SK-OV-3 otporne na karboplatinu u usporedbi s roditeljskim.
3. Ekspresija OATP2B1 transportera ovisna je o tipu stanice, odnosno njenom tkivnom podrijetlu. Rezultati analize MES-OV vs. MES-OV CBP pokazuju da otporna stanična linija ima manju ekspresiju OATP2B1 u odnosu na roditeljske stanice, dok rezultati analize SK-OV-3 vs. SK-OV-3 CBP roditeljska linija stanica pokazuje manju ekspresiju OATP2B1 u odnosu na otporne stanice.
4. Fotoaktivacijom se povećava citotoksičnost boje SB-35.

Slaba citotoksičnost Cy7 boja te selektivnost s obzirom na otpornost stanica na lijekove i njihovo podrijetlo, ukazuju na njihovu moguću upotrebu u dijagnostici dok istovremeno povećanje citotoksičnosti fotoaktivacijom ukazuje na njihovo moguće korištenje u terapiji.

7. LITERATURA

1. Assaraf, Y. G., Brozovic, A., Gonçalves, A. C., Jurkovicova, D., Linē, A., Machuqueiro, M., Saponara, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Xavier, C. P. R., & Vasconcelos, M. H. (2019). The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 46, 100645. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100645>
2. Aznab, M., Izadi, B., Amirian, F., Khazaei, S., Madani, S. H., & Ramezani, M. (2022). Comparison of Immunohistochemical Methods (IHC) and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) in the Detection of HER 2 /Neu Gene in Kurdish Patients with Breast Cancer in Western Iran. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 16(4), 217–223. <https://doi.org/10.18502/ijhoscr.v16i4.10879>
3. Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., ALSalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *The Eurasian journal of medicine*, 50(3), 193–201. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397>
4. Britannica, Rogers, T. Editors of Encyclopaedia (2024, April 12). tumour. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/tumor>
Pristupljeno: 02.05.2024.
5. Broadwater, D., Bates, M., Jayaram, M., Young, M., He, J., Raithel, A. L., Hamann, T. W., Zhang, W., Borhan, B., Lunt, R. R., & Lunt, S. Y. (2019). Modulating cellular cytotoxicity and phototoxicity of fluorescent organic salts through counterion pairing. *Scientific reports*, 9(1), 15288. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51593-z>
6. Buxhofer-Ausch, V., Secky, L., Wlcek, K., Svoboda, M., Kounnis, V., Briasoulis, E., Tzakos, A. G., Jaeger, W., & Thalhammer, T. (2013). Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy. *Journal of drug delivery*, 2013, 863539. <https://doi.org/10.1155/2013/863539>

7. Cooper G. M., Hausman R. E. (2009): *The cell: a molecular approach*, 5th edition, Sinauer Associates, Sunderland.
8. De Las Rivas, J., Brozovic, A., Izraely, S., Casas-Pais, A., Witz, I. P., & Figueroa, A. (2021). Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies. *Archives of toxicology*, 95(7), 2279–2297. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03063-7>
9. Drăgănescu, M., & Carmocan, C. (2017). Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucharest, Romania: 1990)*, 112(4), 413–417. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>
10. Elliott A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current protocols in cytometry*, 92(1), e68. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
11. Gerstberger, S., Jiang, Q., & Ganesh, K. (2023). Metastasis. *Cell*, 186(8), 1564–1579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.003>
12. Gorka, A. P., Nani, R. R., Zhu, J., Mackem, S., & Schnermann, M. J. (2014). A near-IR uncaging strategy based on cyanine photochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 136(40), 14153–14159. <https://doi.org/10.1021/ja5065203>
13. Grienke, U., Radić Brkanac, S., Vujčić, V., Urban, E., Ivanković, S., Stojković, R., Rollinger, J. M., Kralj, J., Brozovic, A., & Radić Stojković, M. (2018). Biological Activity of Flavonoids and Rare Sesquiterpene Lactones Isolated From *Centaurea ragusina* L. *Frontiers in pharmacology*, 9, 972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00972>
14. Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer-A Review of the Current Clinical Status. *Frontiers in chemistry*, 9, 686303. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.686303>
15. Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-669

16. Jo, G., Kim, E. J., & Hyun, H. (2023). Enhanced Tumor Uptake and Retention of Cyanine Dye-Albumin Complex for Tumor-Targeted Imaging and Phototherapy. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 862. <https://doi.org/10.3390/ijms24010862>
17. Kulbacka, J., Pola, A., Mosiadz, D., Choromanska, A., Nowak, P., Kotulska, M., Majkowski, M., Hryniewicz-Jankowska, A., Purzyc, L., & Saczko, J. (2011). Cyanines as efficient photosensitizers in photodynamic reaction: photophysical properties and in vitro photodynamic activity. *Biochemistry. Biokhimiia*, 76(4), 473–479. <https://doi.org/10.1134/s0006297911040110>
18. Lameka, K., Farwell, M. D., & Ichise, M. (2016). Positron Emission Tomography. *Handbook of clinical neurology*, 135, 209–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53485-9.00011-8>
19. Lange, N., Szlasa, W., Saczko, J., & Chwiłkowska, A. (2021). Potential of Cyanine Derived Dyes in Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*, 13(6), 818. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060818>
20. Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>
21. Luo, D., Carter, K. A., Miranda, D., & Lovell, J. F. (2016). Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 4(1), 1600106. <https://doi.org/10.1002/advs.201600106>
22. Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2020). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 20, 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>

23. Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
24. National Cancer Institute. (2019). *Radiation Therapy to Treat Cancer*. (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>)
25. National Cancer Institute. (2022). *Chemotherapy to Treat Cancer*. (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>)
26. National Cancer Institute. (2024). *Computed Tomography (CT) Scans and Cancer*. (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/ct-scans-fact-sheet>)
27. Nie, Q. W., Zhang, X., & Hu, M. H. (2024). Discovery of a mitochondrial G-quadruplex targeted fluorescent ligand via a slight variation on the near-infrared heptamethine cyanine scaffold. *International journal of biological macromolecules*, 269(Pt 2), 132230. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132230>
28. Patel A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA oncology*, 6(9), 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
29. Pernar, M., Kokan, Z., Kralj, J., Glasovac, Z., Tumir, L. M., Piantanida, I., Eljuga, D., Turel, I., Brozovic, A., & Kirin, S. I. (2019). Organometallic ruthenium(II)-arene complexes with triphenylphosphine amino acid bioconjugates: Synthesis, characterization and biological properties. *Bioorganic chemistry*, 87, 432–446. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.048>
30. Pronkin, P. G., & Tatikolov, A. S. (2022). Photonics of Trimethine Cyanine Dyes as Probes for Biomolecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6367. <https://doi.org/10.3390/molecules27196367>
31. Qin D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>

32. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. In S. Markossian Ur. i sur., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
33. Schwechheimer, C., Rönicke, F., Schepers, U., & Wagenknecht, H. A. (2018). A new structure-activity relationship for cyanine dyes to improve photostability and fluorescence properties for live cell imaging. *Chemical science*, 9(31), 6557–6563. <https://doi.org/10.1039/c8sc01574k>
34. Semenova, O., Kobzev, D., Hovor, I., Atrash, M., Nakonechny, F., Kulyk, O., Bazylevich, A., Gellerman, G., & Patsenker, L. (2023). Effect of Solubilizing Group on the Antibacterial Activity of Heptamethine Cyanine Photosensitizers. *Pharmaceutics*, 15(1), 247. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010247>
35. Shah, M. A., & Rogoff, H. A. (2021). Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. *Seminars in oncology*, 48(3), 238–245. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2021.05.002>
36. Shi, J., Su, Y., Liu, W., Chang, J., & Zhang, Z. (2017). A nanoliposome-based photoactivable drug delivery system for enhanced cancer therapy and overcoming treatment resistance. *International journal of nanomedicine*, 12, 8257–8275. <https://doi.org/10.2147/IJN.S143776>
37. Shramova, E. I., Kotlyar, A. B., Lebedenko, E. N., Deyev, S. M., & Proshkina, G. M. (2020). Near-Infrared Activated Cyanine Dyes As Agents for Photothermal Therapy and Diagnosis of Tumors. *Acta naturae*, 12(3), 102–113. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11028>
38. Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
39. van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when

compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47.
<https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>

40. Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L., & Perjési, P. (2023). Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(3), 1447.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031447>
41. Wang, Y., Ma, R., Liu, F., Lee, S. A., & Zhang, L. (2018). Modulation of Gut Microbiota: A Novel Paradigm of Enhancing the Efficacy of Programmed Death-1 and Programmed Death Ligand-1 Blockade Therapy. *Frontiers in immunology*, 9, 374.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00374>
42. Yang, X., Hou, Z., Wang, D., Mou, Y., & Guo, C. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of novel heptamethine cyanine dye-erlotinib conjugates as antitumor agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 30(23), 127557.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127557>

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15.09.2000. godine u Splitu. Nakon završene osnovne škole, 2015. godine upisala sam Gimnaziju Dinka Šimunovića u Sinju. Prijediplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu započela sam 2019. godine. Nakon završenog prijediplomskog studija, 2022. upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije; fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Tijekom studija bila sam demonstratorica na kolegijima Histologija, te Anatomija i histologija u akademskoj godini 2021./2022. Također, sudjelovala sam u pripremi radionica za manifestaciju Festivala znanosti u sklopu Zavoda za kemiju u Splitu 2022. godine. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam u tvrtki Genos 2023./2024. godine gdje sam stekla brojna znanja i vještine vezane za glikobiologiju (izolaciju IgG-a iz krvne plazme, denaturaciju i deglikolizaciju prethodno izoliranih antitijela, pročišćavanje i označavanje slobodnih N-glikana, te pripreme uzoraka za analizu UHPLC-om (engl. *Ultra-high-performance liquid chromatography*) i korištenje samog uređaja. Izradu diplomskog rada započela sam 2024. godine u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković. Tu sam stekla vještine rada u staničnoj kulturi, te sam se usavršila u korištenju različitih metoda molekularne biologije kao što su: testovi preživljenja (MTT i SRB test) te Western blot. Uz materinji hrvatski, koristim se engleskim jezikom i poznajem osnove njemačkog.