

Procjena 3-hidroksi-2-piridinskih oksima kao mogućih protutumorskih lijekova

Jurić, Matea

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:217:364641>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Jurić

**Procjena 3-hidroksi-2-piridinskih oksima kao
mogućih protutumorskih lijekova**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Matea Jurić

**Assessment of 3-hydroxy-2-pyridine oximes
as potential anticancer drugs**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Maje Katalinić, znanstvene savjetnice, te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića i uz neposrednog voditelja dr. sc. Antonija Zandonu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena 3-hidroksi-2-piridinskih oksima kao mogućih protutumorskih lijekova

Matea Jurić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak: Piridinijevi oksimi se pretežno istražuju kao protuotrovi kod trovanja organofosfatima, no prema novim istraživanjima utvrđeno je da aktiviraju apoptozu u različitim vrstama stanica što ih čini zanimljivima i za druge aspekte istraživanja. U ovom radu ispitan je učinak 3-hidroksi-2-piridinskih oksima prema stanicama raka dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) i malignog glioblastoma (U251) u svrhu određivanja njihovog mogućeg protutumorskog potencijala. Testirani oksimi bili su citotoksični za stanice raka dojke i, u manjoj mjeri, za stanice glioblastoma unutar razdoblja izlaganja. Stanična linija MCF-7 bila je najosjetljivija, na koju su sva tri oksima utjecala ovisno o vremenu izloženosti. Iako je integritet membrane stanica održan nakon tretmana, testirani spojevi su utjecali na potencijal mitohondrijske membrane i aktivirali kaspazu 9, odnosno apoptozu posredovanu mitohondrijima. Sveukupno, ovi rezultati sugeriraju da bi istraživani oksimi mogli poslužiti kao obećavajuća polazna točka za razvoj ciljanih terapija, posebno za rak dojke.

Ključne riječi: apoptoza, citotoksičnost, rak dojke, glioblastom
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Rad sadrži: 54 stranice, 10 slika, 5 tablica i 102 literaturna navoda (jezik izvornika: Hrvatski)

Mentor: dr. sc. Maja Katalinić
Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:
prof. dr. sc. Domagoj Đikić
izv. prof. dr. sc. Romana Gračan
prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Rad prihvaćen: 5. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Assessment of 3-hydroxy-2-pyridine oximes as potential anticancer drugs

Matea Jurić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Abstract: Pyridinium oximes are mainly studied as antidotes for organophosphate poisoning, but according to new research it has been shown that they activate apoptosis in different types of cells, which makes them interesting for other aspects of research. In this thesis, the effect of 3-hydroxy-2-pyridine oximes on breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF-7) and malignant glioblastoma (U251) was examined in order to determine their possible anticancer potential. The tested oximes were cytotoxic to breast cancer cells and, to a lesser extent, to glioblastoma cells within the exposure period. The MCF-7 cell line was the most sensitive, being affected by all three oximes depending on the exposure time. Although cell membrane integrity was maintained after the treatment, the tested compounds affected the mitochondrial membrane potential and activated caspase 9, which is mitochondria-mediated apoptosis. Overall, these results suggest that the investigated oximes could serve as a promising starting point for the development of targeted therapies, especially for breast cancer.

Keywords: apoptosis, cytotoxicity, breast cancer, glioblastoma

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Thesis consists of: 54 pages, 10 figures, 5 tables and 102 literature references (original in Croatian)

Mentor: Maja Katalinić, PhD

Co-mentor: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Thesis accepted: September 5, 2024.

Najveće hvala mentorici dr. sc. Maji Katalinić i dr. sc. Antoniju Zandoni na pruženoj prilici, savjetima i povjerenju, a najviše od svega na beskrajnom strpljenju.

Hvala mami i tati što su me uvijek podržavali i vjerovali u mene, od prvog dječjeg mikroskopa do danas.

Sestri, momku i prijateljicama hvala što ste uvijek bili tu.

Ovaj rad je za moju baku i dedu, hvala.

Sadržaj

1 Uvod	1
1.1 Rak kao općezdravstveni problem.....	1
1.1.2 Rak dojke	2
1.1.3 Glioblastom	5
1.2 Izazovi u razvoju novog lijeka	6
1.3 Stanice kao modeli za istraživanje novih lijekova.....	7
1.4 Nove protutumorske molekule	9
2 Cilj istraživanja	12
3 Materijali i metode	13
3.1 Kemikalije, materijali i ostalo	13
3.1.1 Uređaji korišteni za potrebna mjerenja	14
3.1.2 Oksimi.....	14
3.2 Stanične kulture.....	15
3.2.1 Odmrzavanje stanica i uzgoj	15
3.2.2 Presađivanje stanica	16
3.2.3 Brojanje stanica	16
3.3 Stanični testovi <i>in vitro</i>	17
3.3.1 Određivanje citotoksičnosti oksima praćenjem promjene vijabilnosti stanica MTS testom	17
3.3.2 Određivanje integriteta stanične membrane	19
3.3.3 Određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala.....	20
3.3.4 Određivanje aktivnosti specifičnih kaspaza	20
3.4 Analiza rezultata i statistička obrada.....	21
4 Rezultati	22
4.1 Citotoksični učinak oksima na stanice	22
4.2 Integritet membrane stanica nakon izloženosti oksimima.....	26
4.3 Promjene membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$)	28
4.4 Aktivacija kaspaza.....	29
5 Rasprava	31
6 Zaključak	33
7 Literatura	34
8 Životopis	45

Popis kratica

AChE - acetilkolinesteraza

ADMET – (engl. adsorption, distribution, metabolism, excretion, toxicology) apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost

DMEM - engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - dimetil-sulfoksid

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ER – estrogenski receptor

HER2 - receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

LDH - laktat-dehidrogenaza

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-tetrazolijeva sol

PR - progesteronski receptor

TMRE - etilni ester tetrametilrodaminperlorata

$\Delta\Psi_m$ - mitohondrijski membranski potencijal

1 Uvod

1.1 Rak kao značajan zdravstveni problem

Rak je općeniti pojam koji se koristi za opisivanje širokog spektra bolesti koje karakterizira brzo stvaranje abnormalnih stanica koje nekontrolirano rastu, šire se i uništavaju normalna zdrava tkiva (Pucci i sur. 2019). Rak sve do danas privlači veliki interes znanstvenika, radi velike stope smrtnosti te još nedovoljno poznate patogeneze bolesti. Unatoč ogromnom napretku u mogućnostima liječenja, danas su maligni tumori vodeći uzrok smrti (Biserova i sur. 2021). Broj oboljelih u 2020. doseže otprilike 19,3 milijuna, s 10 milijuna smrtnih slučajeva diljem svijeta (Sung i sur. 2021). Procjene Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) za 2020. pokazuju da su najčešći novi slučajevi bili rak dojke (2,26 milijuna slučajeva), rak pluća (2,21 milijun slučajeva), rak debelog crijeva i rektuma (1,93 milijuna slučajeva), rak prostate (1,41 milijun slučajeva), nemelanomski rak kože (1,20 milijuna slučajeva) i rak želuca (1,09 milijuna slučajeva) (Sung i sur. 2021). S tim da u mnogim dijelovima svijeta pada stopa smrtnosti od drugih smrtonosnih bolesti, kao što je moždani udar i koronarne bolesti srca, rak postaje najsmrtonosnija bolest u svijetu, a prema procjenama WHO-a, rak je vodeći uzrok smrti prije 70. godine u 112 od 183 zemlje (Mansouri i sur. 2021).

Najčešći lijekovi koji se koriste za tretman raka spadaju u skupinu tzv. kemoterapeutika. Kemoterapija za bolesnike s uznapredovalim i metastatskim stadijima, često je i jedina mogućnost liječenja. Većina kemoterapijskih lijekova, kao što su sorafenib, lenvatinib i regorafenib, imaju i protuupalna i antiproliferativna svojstva (De Mattia i sur. 2019) te produljuju očekivani životni vijek pacijenata i odgađaju napredovanje raka. Obzirom da je mehanizam djelovanja ovih lijekova djelovanje na stanice koje rastu i koje se dijele, problem s tim je učinak kemoterapijskih lijekova i na zdrave brzorastuće stanice, kao što su folikuli dlake, oralne stanice i stanice reproduktivnog sustava (Mansouri i sur. 2021). Nuspojave ovih lijekova, kao što su dijareja, anoreksija, visoki krvni tlak, gubitak težine, kožne reakcije i gubitak kose, ograničavaju njihovu upotrebu (Dutta i Mahato 2017). Nuspojave kemoterapije i neučinkovitost u nekim slučajevima, navele su znanstvenike na istraživanja drugih pristupa liječenju.

Novi pristupi liječenju raka kao što je kirurško ciljanje mikrookruženja tumora, ciljana imunoterapija, uključujući staničnu terapiju kimernim antigenskim receptorom (CAR) (Cortés-Selva i sur. 2021), monoklonska antitijela itd. (Villarreal-González i sur. 2023) pokazuju značajan napredak u liječenju različitih vrsta raka. Međutim, i dalje male molekule predstavljaju ključnu ulogu u budućnosti tretmana. Jedna takva klasa malih molekula su moguće i oksimi. Kao vrlo bioaktivne molekule oksimi su bitni osim za liječenje trovanjem organofosfatnim pesticidima i za buduća istraživanja kao potencijalni antitumorski lijekovi (Fotie i sur. 2023).

1.1.2 Rak dojke

Kod žena najčešći uzrok smrti je rak dojke u 104 zemlje svijeta (WHO 2020). Učestalost raka dojke u velikom je porastu diljem svijeta, s porastom od 57,8 % u posljednjih 30 godina, a stopa porasta je 0,5 % godišnje (Shang i Xu 2022). Uzrok karcinogeneze još nije utvrđen, no postoje čimbenici rizika koji pogoduju razvoju raka (Shang i Xu 2022). Najvažniji su spol, starost i stupanj ekonomskog razvoja određene zemlje. Ne manje važni su hormonalni čimbenici, uglavnom povezani s vremenom izloženosti estrogenima, brojem rođene djece, dobi rođenja prvog djeteta i dojenje (Shang i Xu 2022). Značajni čimbenici rizika pripisuju se primjeni hormonske nadomjesne terapije, nepravilnoj prehrani, pretilosti i alkoholizmu (Łukasiewicz i sur. 2021). Povećana stopa otkrivanja raka dojke povezana je i s redovnim pregledima (mamografija) u odnosu na prijašnje godine (Davis i sur. 2018).

Rak dojke može biti neinvazivan i invazivan. Neinvazivan rak dojke opisuje se kao tumor koji se nije proširio dalje od režnjeva ili kanala gdje se nalazi (West i sur. 2017). Primjer vrste neinvazivnog raka dojke je duktalni karcinom *in situ* (Tomlison-Hansen i sur. 2023). Duktalni karcinom *in situ* pojavljuje se kada se atipične stanice razviju unutar mliječnih kanala, ali se nisu proširile u neposredna tkiva ili izvan. Iako se atipične stanice nisu proširile na tkiva izvan režnjeva ili kanala, mogu napredovati i prerasti u invazivni rak dojke (Akram i sur. 2017). Invazivni rak dojke nastaje kada se abnormalne stanice unutar režnjeva ili mliječnih kanala odcijepe u neposrednoj blizini tkiva dojke (Harris i sur. 2016). Stanice raka mogu prijeći kroz dojku u različite dijelove tijela putem imunološkog sustava ili cirkulacije (Ziperstein i sur. 2016). Do migracija može doći rano u razvoju ili kasnije

kada je tumor veći. Metastatski rak dojke najčešće se širi u mozak, kosti, pluća i jetru (Akram i sur. 2017). Metastazirane stanice se mogu dalje širiti i dijeliti te tako proizvoditi nove tumore (Akram i sur. 2017). Područja povećane prijetnje su populacije Australije i Europe gdje 6 % žena oboli od invazivnog raka dojke prije 75. godine života. Prevalencija raka dojke brzo raste s dobi (Prabhakaran i sur. 2017).

Operacija očuvanja dojke (engl. *Breast conserving surgery* - „BCS“) i adjuvantna terapija zračenjem provodi se na 50 % žena s ranim stadijem (I ili II) raka dojke, dok je približno 34 % podvrgnuto mastektomiji, obično bez kemoterapije (Miler i sur. 2022). Nasuprot tome, 65 % žena s rakom dojke u stadiju III podvrgnuto je mastektomiji, a većina također prima i kemoterapiju (Miller i sur. 2022). Neke pacijentice s rakom dojke koje ispunjavaju uvjete za operaciju očuvanja dojke odabiru mastektomiju zbog straha od recidiva, nevoljnosti primanja terapije zračenjem ili zbog straha od nuspojava kemoterapije (Kummerow i sur. 2015). Čimbenici koji utječu na preživljavanje u slučaju raka dojke su stadij tumora, status estrogenog receptora (ER) i status progesteronskog receptora (PR) uz status receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) (Shang i Xu 2022).

Trostruko negativni karcinomi dojke (ER-negativni, PR-negativni i HER2 receptor-negativni) se liječe manje učinkovito od drugih molekularnih podtipova i obično reagiraju samo na citotoksičnu kemoterapiju (Shang i Xu 2022). Trostruko negativan rak dojke je heterogeni poremećaj s posebnim pod-formama, koji se razlikuju po svojim kliničko-patološkim karakteristikama i odgovorima na liječenje (Cao i Niu 2020). Opisuje se nedostatkom receptora progesterona, receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 i ekspresije receptora estrogena (Liedtke i sur. 2008). Ovaj tip je uglavnom destruktivan, najčešće se dijagnosticira kod žena u predmenopauzi i odgovoran je za 10-15 % slučajeva (Stingl i sur. 2005).

Imunosupresivna kombinirana kemoterapija za pacijentice s ranim stadijem i metastatskim rakom dojke postaje uobičajen tretman za trostruko negativan rak dojke (Schmod i sur. 2020). Danas se istražuje niz dodatnih imunoterapija i tretmana ciljanom terapijom, ali zbog heterogenog raspona molekularnih profila prisutnih u trostruko negativnim tumorima te terapije mogu biti uspješne samo za dio pacijentica (Shang i Xu 2022).

Genetski uzrokovano je samo 5-10 % slučajeva raka dojke. Najpoznatije genetske mutacije povezane s ovim rakom uključuju mutacije u genima BRCA1 i BRCA2 (Mehrgou i Akouchekian 2016). Gen BRCA1 smješten na kromosomu 17, supresorski je gen koji kodira nuklearni protein, odgovoran za održavanje stabilnosti genoma (Smolarz i sur. 2022). Zajedno s proizvodima drugih supresorskih gena, gena za transdukciju signala i otkrivanje oštećenja DNK, stvara proteinski kompleks koji se veže na RNK polimerazu II i stupa u interakciju s histon-deacetilazom, čime utječe na procese transkripcije, popravka ili rekombinacije DNK (Smolarz i sur. 2022). Gen BRCA1, zajedno s produktom gena BRCA2, koji je također supresorski gen koji se nalazi na kromosomu 13, posebno je uključen u popravak loma dvostrukog lanca DNK homolognom rekombinacijom (Roy i sur. 2011). Prisutnost mutacija u ovim genima pojavljuje se samo u 3-5 % pacijenata s rakom dojke (Smolarz i sur. 2022). Procjenjuje se da nosioci mutacije BRCA1/BRCA2 imaju 10 puta veći rizik od razvoja raka dojke (Smolarz i sur. 2022).

Sumarno gledajući, tretmani za rak dojke uključuju operaciju, kemoterapiju, radioterapiju, hormonalnu (endokrinu) terapiju, imunoterapiju, lijekove za jačanje kostiju (bisfosfonati) (Trayes i Cokenakes, 2021). Odabir tretmana ovisi o brojnim faktorima, a često se koristi kombinacija više njih (Cancer research UK 2023).

Kemoterapija kao neoadjuvantni tretman prije operacije, ima za cilj smanjenje raka što nekim pacijentima omogućava operaciju očuvanja dojke umjesto mastektomije (Trayes i Cokenakes, 2021). Ova metoda se uglavnom koristi za veliki rak, HER2 pozitivan rak i trostruko negativni rak dojke (Trayes i Cokenakes, 2021). Dok se kemoterapija nakon operacije uglavnom koristi da bi se umanjile šanse za recidiv raka (Cancer research UK, 2023). Tip lijekova koji se koristi su najčešće epirubicin i deksorubicin (Khasraw i sur. 2012). Nadalje, uz ciljane lijekove protiv raka koristi se i imunoterapija kao jedna vrsta tretmana (Trayes i Cokenakes, 2021). Ciljani lijekovi protiv raka funkcioniraju tako da prepoznaju dijelove stanica koje su zadužene za rast i preživljavanje, dok imunoterapija pomaže imuno sustavu tijela da ubija stanice raka (Cancer research UK, 2023). Ova vrsta tretmana može se koristiti samo ako stanice raka dojke imaju određene receptore (Demir i Biray 2022). Na primjer ako pojedini oblici raka imaju eksprimiranu veću količinu proteina HER2 tada se može koristiti neratinib koji se veže za HER2 na stanicama raka i zaustavlja rast (Cancer research UK, 2023). Dok se za tretman raka dojke s pozitivnim

hormonskim receptorima i HER2 negativnim prepisuje inhibitor CDK4/6 abemaciclib koji blokira receptore koji potiču diobu i rast (Zhou i sur. 2023). Najteži za liječenje je trostruko negativni rak dojke te se za njega u imunoterapiji uglavnom koristi pembrolizumab, humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže na receptore programirane stanične smrti-1 (Cancer research UK, 2023).

1.1.3 Glioblastom

Tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS) ne spadaju među najčešće neoplazme (Forjaz i sur. 2021). No iako primarni tumori SŽS-a čine samo 4 % svih novodijagnosticiranih slučajeva raka u Sjedinjenim Američkim Državama (Forjaz i sur. 2021), ovi tumori predstavljaju veliki izazov za zdravstvo zbog svoje loše prognoze i lošeg odgovora na liječenje. Tumori središnjeg živčanog sustava najčešći su uzrok onkološke smrti u dobnoj skupini od 0 do 19 godina i drugi vodeći uzrok onkološke smrti u bolesnika u dobi od 20 do 39 godina (Forjaz i sur. 2021.). Glijalni tumori prevladavaju u ovom spektru te čine gotovo 90 % svih malignih tumora SŽS, a glioblastom predstavlja najčešće dijagnosticiran (69 %) gliom. Prognoza glioblastoma ostaje loša unatoč naprecima u terapiji te predstavlja i dalje neriješen problem u neuroonkologiji. Standardno liječenje glioblastoma uključuje kiruršku resekciju, nakon čega slijedi radioterapija u kombinaciji s kemoterapijom s alkilatirajućim sredstvom, temozolomidom, koji potiče jednolančane i dvolančane lomove DNK (Stupp i sur. 2009; Garnier i sur. 2019). Ovom metodom liječenja pacijent ima srednje vrijeme preživljenja od 14-20 mjeseci (Garnier i sur. 2019; Bozzato i sur. 2020). Manje od 5 % oboljelih preživi 5 godina, s tim da tumor glioblastoma karakterizira izrazita otpornost na trenutno dostupnu terapiju i neizbježan recidiv unutar prve godine liječenja (Garnier i sur. 2019). Otpornost na tretman i recidiv su karakteristike koje se obično povezuju s matičnim stanicama raka, odnosno, populacijom pluripotentnih i samoobnavljajućih stanica raka (Biserova i sur. 2021). Svojoj diobom generiraju stanice kćeri koje prolaze kroz diferencijaciju i obnavljaju funkcionalne stanice. Neograničena proliferacija tako održava tumor, a niska mitotička aktivnost matičnih stanica štiti ih od tretmana koji je usmjeren na stanice koje se aktivno dijele, to omogućuje matičnim stanicama raka da prežive liječenje i dovedu do recidiva (Biserova i sur. 2021).

1.2 Izazovi u razvoju novog lijeka

Otkriće novog lijeka je kompleksan, skup i dugotrajan proces (Sertkaya i sur. 2016). Može proći i do 15 godina od otkrića aktivnog spoja do plasiranja lijeka na tržište, s tim da je pod nadzorom nadležnih agencija i nakon puštanja na tržište (FDA 2018). Prvi korak u razvijanju lijeka je sinteza moguće aktivne molekule. Nakon što se sintetiziraju spojevi, mora se istražiti njihova biološka aktivnost kako bi se prema željenim karakteristikama odabrao dobar kandidat za daljnja istraživanja (Zurdo 2013). Od 10 000 spojeva koji se sintetiziraju samo dio njih prolazi dalje do prekliničkog istraživanja (FDA 2018). Ovaj dio istraživanja kraći je nego druge faze no u ovoj fazi spojevi prolaze toksikološka testiranja koja su neophodna prije kliničke faze i testiranja na ljudima (Matthews i sur. 2016). Preklinička faza obuhvaća *in vitro* i *in vivo* testove (FDA 2018). Provjerom farmakokinetičkih parametara ADMET- apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost utvrđuje se uzrokuje li potencijalni lijek neželjene učinke na organizam (Umscheid i sur. 2011). Obzirom da ova faza uključuje uglavnom i ispitivanje na životinjama, bitno je pridržavati se principa 3R (engl. *reduction, replacement, refinement*) (MacArthur 2018). Prije samog kliničkog istraživanja na živom organizmu, nemoguće je sa sigurnošću utvrditi hoće li potencijalni lijek biti učinkovit i siguran za upotrebu. No, ipak je važno dobro procijeniti potencijalni lijek *in vitro* istraživanjima obzirom da rezultati istraživanja mogu uputiti na mogući rizik za životinje i ljude koji će sudjelovati u kasnijim fazama testiranja. Kao idealan kandidat za klinička istraživanja bio bi spoj koji pokazuje mali ili nikakav utjecaj na metabolizam, mitohondrijsku fiziologiju i vijabilnost stanica (Zandona 2021). Spojeve sa suprotnim učincima potrebno je isključiti iz daljnjih istraživanja imajući na umu da je klinička faza najskuplja i najdugotrajnija. Klinička faza podijeljena je na tri dijela (FDA, 2018). Faza I obuhvaća mali broj ispitanika do 100, kako bi se ispitala farmakokinetika i doza pri kojoj dolazi do mogućih nuspojava, odnosno, toksičnih učinaka (FDA 2018). Također, utvrđuje se najbolji način unosa lijeka, intravenski, intramuskularno ili subkutano (Jin i sur. 2015). Faza II uključuje veći broj ispitanika te ispituje djelovanje potencijalnog lijeka na ciljanu metu odnosno bolest (FDA 2018). Faza III objedinjuje dosadašnja istraživanja na većoj skupini ljudi do 3 000 ispitanika kako bi se potvrdilo djelovanje lijeka i odredili učinci koji možda nisu prije

primijećeni na manjem broju ispitanika (Umscheid i sur. 2011). Također u ovoj fazi uspoređuje se novi lijek s već postojećim te s placebo lijekom (Umscheid i sur. 2011). Nakon što je istraživanje završeno, nadležno tijelo odobrava plasiranje lijeka na tržište gdje se i nakon registracije prate dugoročni utjecaji. Procjenjuje se da jedan proces razvoja lijeka košta oko 2 milijarde dolara vrijednosti u istraživanju i razvoju (Sertkaya i sur. 2016).

1.3 Stanice kao modeli za istraživanje novih lijekova

Imajući na umu 3R koncept, najčešća zamjena testiranju na životinjama danas predstavljaju modeli bazirani na različitim kulturama stanica (Bédard i sur. 2020). No uzgajanje ljudskih stanica postalo je moguće tek sredinom 20. stoljeća zahvaljujući biologu Georgeu Geyu (Masters 2002). Godinama je skupljao stanice pacijenata no nije ih uspio održati živima u laboratoriju, sve dok nije dobio uzorak stanica Henriette Lacks koje su se udvostručile svakih 20 h. Sve do danas "HeLa" stanice koriste se u raznim istraživanjima (Lucey i sur. 2009). Razvojem staničnih linija omogućeno je istraživanje i razumijevanje brojnih bioloških funkcija, rijetkih bolesti, starenja i raznih drugih stanja (Lacoste 2018). Uz stanične kulture, napredovala je i tehnologija te dostupnost staničnih medija i laboratorijske opreme što je olakšalo laboratorijski rad. Razumijevanjem osnovnih funkcija, znanost je napredovala prema istraživanju djelovanja novih molekula na staničnoj i molekularnoj razini. Na primjer, istraživanja toksičnosti spojeva iz skupine oksima na stanicama ukazalo je na povezanost njihove strukture i citotoksičnosti, a uočeno je i da citotoksičnost ovisi o vrsti tretiranih stanica (Zandona 2021). Stoga je iznimno važno pomno odabrati metu istraživanja, sukladno tome odabrati i vrstu stanične kulture te stanične testove (Kitaeva i sur. 2020). Danas ovisno o tome što želimo dobiti istraživanjem možemo koristiti 2D i 3D kulture, organoide, ko-kulture i sferoidne modele (Kitaeva i sur. 2020). 2D kulture ne odražavaju u potpunosti patofiziologiju tumorskih stanica i stvarnu razinu otpornosti na radioterapiju ili kemoterapiju u *in vivo* sustavu (Chen i sur. 2012), međutim puno su jeftinije za održavanje i uzgoj te daju robusne rezultate. Stoga su 2D kulture dobar odabir za početna istraživanja protutumorskih lijekova jer su relativno brza i jeftina te omogućuju lakšu eliminaciju spojeva s neželjenim djelovanjem (Kitaeva i sur.

2020). Istraživanja su pokazala da ekspresija gena i odgovor na liječenje višestaničnog sferoidnog 3D modela bolje odgovara *in vivo* istraživanju u usporedbi sa 2D kulturama (Riedl i sur. 2017). Prema istraživanju Imamura i sur. (2015) stanice raka dojke uzgajane kao sferoidni modeli pokazale su bolju rezistenciju na doksorubicin u usporedbi s 2D kulturom stanica, a time predstavljaju i bolji model za istraživanje novih lijekova. Osim staničnih kultura odabir testova koji će se provesti je vrlo bitan ovisno o informacijama koje želimo dobiti. Testovi na stanicama su najčešće bazirani na upotrebi različitih reagensa koji se metaboliziraju unutar ili izvan stanice pomoću specifičnih enzima, čiji se produkt detektira na osnovi njegovog specifičnog svojstva npr. absorbancije, fluorescencije ili luminiscencije (Zandona 2021). Tako npr. kombinacija praćenja mitohondrijskog stresa, metabolizma, vijabilnosti stanica i aktivacije apoptoze može rezultirati dobrom procjenom kandidata za daljnji razvoj protutumorskih lijekova (Prado i sur. 2015). Idealan protutumorski lijek bio bi specifičan za jednu vrstu tumorskih stanica, toksičan samo za tumorske stanice, ali bez ikakvog utjecaja na vijabilnost drugih stanica u tijelu (Singh i sur. 2016). Idealni spojevi ne bi smjeli poremetiti metabolizam niti izazvati mitohondrijski stres. Također idealan protutumorski lijek trebao bi imati sposobnost izazivanja programirane stanične smrti ili apoptoze u ciljnim stanicama, a obzirom da bi se na taj način regulirala onkogeneza i invazivnost raka.

Najčešće korišteni stanični modeli raka dojke i glioblastoma za testiranje novih protutumorskih lijekova su linije MDA-MB-231, MCF-7 i glioblastom U251. MDA-MB-231 model je invazivnog kasnog stadija raka dojke (Welsh 2013). Ova linija je epitelni adenokarcinom, ER i PR negativna s mutacijom p53 (Welsh 2013). Budući da ova linija nema faktor rasta receptora HER2 dobar je model i za trostruko negativni rak dojke (Welsh 2013). Stanična linija MCF-7 je vrlo bitna u istraživanju ER pozitivnog raka dojke, predstavlja luminalni A tip raka dojke koji najčešći molekularni podtip (Welsh 2013). U odnosu na MDA-MB-23, linija MCF-7 je neinvazivna, smatra se da ima niski potencijal za metastaze (Comşa i sur. 2015). Stanice U251 pokazuju astrocitna svojstva, koja su karakteristična za njihovo podrijetlo iz astrocita, predominantnog tipa stanica uključenog u glioblastom (Schulz i sur. 2022). Stanična linija U251 posjeduje mutacije i promjene tipične za astrocitome visokog stupnja, uključujući mutacije u genu TP53 i gubitak heterozigotnosti u kromosomu 10, koji obuhvaća gen PTEN (Schulz i sur. 2022). Ove

stanice su također poznate po svojim robusnim *in vitro* stopama rasta i sposobnosti stvaranja tumora kad se transplantiraju u imunokompromitirane miševе, što ih čini vrijednim modelom za *in vivo* studije rasta tumora, invazije i odgovora na terapiju (Schulz i sur. 2022).

1.4 Nove protutumorske molekule

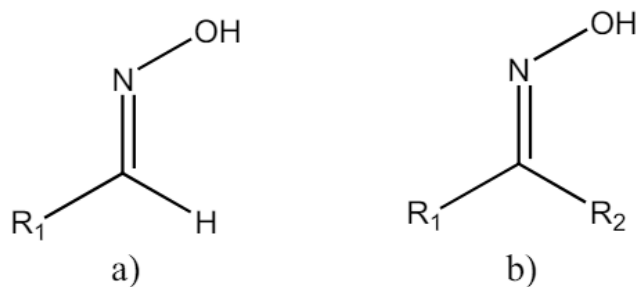
Potruga za protutumorskim lijekovima već 50 godina vođena je činjenicom da se tumorske stanice repliciraju brže od normalnih stanica i da je DNK najvažnija molekula u staničnoj diobi (Olgen i sur. 2018). Kao rezultat toga, DNK je česta terapijska meta protutumorskih lijekova, a većina lijekova koji se trenutno koriste uzrokuje oštećenje DNK i prekidaju diobu stanica, što kao posljedicu ima smrt stanice (Bailón-Moscoso i sur. 2014). Posljednjih 30 godina pojavila se nova era protutumorskih lijekova, pomjera se od upotrebe citotoksičnih lijekova i nespecifične kemoterapije do liječenja ciljanim molekularnim terapijama (Widmer i sur. 2020). Kao primjer toga je tamoksifen, koji selektivno djeluje na estrogenske receptore, i smatra se prvim ciljanim lijekom protiv raka (Widmer i sur. 2020). Djelovanje tamoksifena bazira se na kompetitivnoj blokadi receptora estrogena stanica karcinoma, tako se potiskuju estrogenom-posredovani signali i rast tumorskih stanica (Goetz i sur. 2018). No ovaj lijek neće imati jednak utjecaj na sve pacijente, obzirom da je za pretvorbu u njegov aktivni metabolit potreban enzim CYP2D6 koji je vrlo polimorfan i prije tretmana potrebno je načiniti genetički test kod pacijenata (Goetz i sur. 2018).

Osim ciljane molekularne terapije povećano zanimanje je i za prirodne spojeve koji se mogu naći u biljkama (Newman i Cragg 2003). Fitokemikalije koje se ističu u istraživanju protutumorskih lijekova su flavonoidi, polifenolni biljni sekundarni metaboliti koji posjeduju strukturu fenilbenzopirona (C6-C3-C6) (Liu i sur. 2010). Prema varijacijama u njihovom heterocikličkom C prstenu, flavonoidi se uglavnom mogu kategorizirati u više skupina, a neki od njih su flavoni, flavonoli, antocijanidini i izoflavoni (Liu i sur. 2010). Ovi prirodni spojevi mogu se pronaći u voću i povrću, a imaju široki spektar farmakološkog djelovanja (Kosmider i Osiecka 2004) kao što je i protutumorsko djelovanje (Garavello i sur. 2007). Apigenin (flavon) kao kandidat za lijek protiv raka,

inhibira rast stanica i inducira apoptozu u stanicama raka bez utjecaja na normalne stanice (Liu 2004), a također u kombinaciji s drugim terapijskim lijekovima može povećati njihov učinak protiv raka kao što to slučaj s doksorubicinom (Liu i sur. 2010). Fiziologija djelovanja nije još detaljno objašnjena stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se razumjela njegova učinkovitost.

Nadalje, spojevi iz skupine oksima istraživani su desetljećima zbog njihove značajne uloge u reaktivaciji acetilkolinesteraze (AChE, inače enzim neophodan za prijenos živčanih impulsa) inhibirane organofosforim pesticidima i živčanim bojnim otrovima i njihove upotrebe kao terapeutika za niz bolesti (Musilek i sur. 2011). Oksimi imaju širok raspon bioloških aktivnosti kao što su protuupalna, antibakterijska, antigljivična, antioksidativna i protutumorska svojstva (Kozłowska i sur. 2017; Zhmurenko i sur. 2020). Prema dosadašnjim istraživanjima pokazalo se da je djelovanje nekih oksima usporedivo sa standardnim protuupalnim lijekovima kao što su indometacin, diklofenak i deksametazon (Antoniadou-Vyza i sur. 1998; Chaubal i sur. 2006).

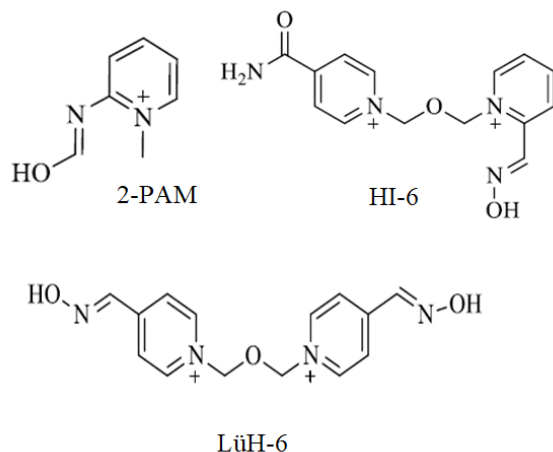
Inače, oksimi su spojevi koji pripadaju skupini imina, mogu se klasificirati u aldoksime i ketoksime. Aldoksini imaju jednu alkilnu skupinu, a ketoksimi imaju dvije bočne alkilne skupine (Clayden i sur. 2000). Opća formula oksima je $R_1R_2C=NOH$, gdje je R_1 bočni organski lanac, a R_2 može biti vodik (aldoksim; **slika 1a**) ili neka druga organska skupina (ketoksim; **slika 1b**) (Clayden i sur. 2000).



Slika 1. Kemijska formula a) aldoksim; i b) ketoksim

Oksimi koji se danas koriste u medicinske svrhe kao protuotrovi kod tretmana trovanja organofosforim spojevima (pesticidi, živčani bojni otrovi) su piridinijeve strukture (Dhuguru i sur., 2022). **Slika 2** prikazuje kemijsku strukturu piridinijevih oksima poput

paralidoksima (2-PAM), asoksima (HI-6) i obidoksima (LüH-6) koji se koriste kao protuotrovi u pojedinim državama. Ovi spojevi imaju sposobnost reaktivacije fosfilirane AChE uz zanemarivu toksičnost (Jończyk i sur. 2021). Prepreka u korištenju ovih medicinski odobrenih oksima je što ne prolaze krvno-moždanu barijeru, i ne mogu djelovati u središnjem živčanom sustavu te se uglavnom zbog prisutnog pozitivnog naboja u strukturi brzo metaboliziraju i eliminiraju iz sustava putem mokraće (Cassel i sur. 1997).



Slika 2. Kemijska struktura piridinijevih oksima koji se koriste kao protuotrovi u tretmanu trovanja organofosfornim spojevima. Preuzeto i prilagođeno od: Zandona 2021.

Naime, prolazak spoja kroz krvno-moždanu barijeru poželjna je karakteristika protutumorskih lijekova jer bi mogli imati utjecaj na metastaze u mozgu. Takva svojstva pokušavaju se dobiti na nekoliko načina: zamjenom piridinijeva prstena imidazolijevim ili kinuklidinijevim (Katalinić i sur. 2016), strukturama koji nemaju kvaterni dušikov atom unutar piridinskog prstena (Zorbaz i sur. 2018), glikozilacijom oksima (Garcia i sur. 2010) i slično. Iako se primarno oksimi i dalje istražuju kao protuotrovi kod trovanja organofosforima, novija istraživanja pokazala su da oksimi kompleksnije kemijske strukture imaju citotoksičan učinak na različite stanice te pokreću apoptozu unutarnjim putem, što otvara mogućnosti za nova istraživanja oksima kao protutumorskih lijekova (Zorbaz i sur. 2020; Zandona i sur. 2023).

2 Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati citotoksični učinak tri odabrana 3-hidroksi-2-piridinska oksima na stanicama raka dojke (linija MDA-MB-231 i MCF-7), na stanicama raka prostate (PC-3) te na stanicama raka glioblastoma (linija U251) sa svrhom određivanja njihove moguće primjene u protutumorskoj terapiji.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

1. Ispitivanje utjecaja odabranih oksima na promjenu vijabilnosti MDA-MB-231, MCF-7, PC-3 i U251 stanica praćenjem aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze, MTS test.
2. Ispitivanje utjecaja oksima na integritet stanične membrane, metodom baziranom na kvantifikaciji aktivnosti unutarstaničnog enzima laktat dehidrogenaze u izvanstaničnom prostoru.
3. Određivanje promjena u funkciji mitohondrija praćenjem promjene mitohondrijskog potencijala stanica pod utjecajem odabranih oksima
4. Ispitivanje aktivacije specifičnih kaspaza praćenjem promjene njihove aktivnosti pod utjecajem odabranih oksima.

3 Materijali i metode

3.1 Kemikalije, materijali i ostalo

Fosfatni pufer (PBS, pH 7,4) - pripremila sam kao deset puta više koncentriranu otopinu otapanjem NaCl, KCl, Na₂HPO₄ i KH₂PO₄ u destiliranoj vodi. pH sam podesila na 7,4 otopinom HCl (1 mol dm⁻³). Pufer je autoklaviran (121 °C, 20 min) i čuvan u sterilnim uvjetima do korištenja. Prije korištenja pripremila sam otopinu 1x PBS-a razrjeđenjem sterilnom destiliranom vodom.

Dimetil-sulfoksid (99 % (v/v) DMSO, Kemika, Zagreb) - koristila sam za pripremu početnih otopina oksima. Konačni postotak DMSO-a u pokusima bio je od 0,001 do 0,8 % (v/v) i utjecaj na stanice je zanemariv.

Otopina boje tripan plavo (Sigma-Aldrich, Njemačka) - koristila sam u koncentraciji 0,4 % za diferencijalno bojenje kod određivanja broja živih i mrtvih stanica.

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Njemačka) - koristila sam u koncentraciji 0,18 % kao detergent za permeabilizaciju stanične membrane, odnosno kao pozitivnu kontrolu u testovima ispitivanja integriteta stanične membrane.

Staurosporin (SS; otopina 1 mmol dm⁻³ u DMSO, Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) - koristila sam kao pozitivnu kontrolu pri testiranju citotoksičnosti, apoptoze i aktivacije specifičnih kaspaza. Izvorna otopina koncentracije 1 mmol dm⁻³ u DMSO čuvana je na 4 °C.

Za određivanje učinka testiranih spojeva koristila sam i komercijalno dostupne kitove:

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, SAD) - za određivanje vijabilnosti stanica (MTS test).

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit (Promega, SAD) - za određivanje integriteta stanične membrane.

Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II) (Cell Signaling Technology Europe, Nizozemska) - za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) stanica.

Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) - za određivanje aktivacije specifičnih enzima kaspaza.

3.1.1 Uređaji korišteni za potrebna mjerenja

Spektrofotometrijska i fluorimetrijska mjerenja provela sam na čitaču mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska).

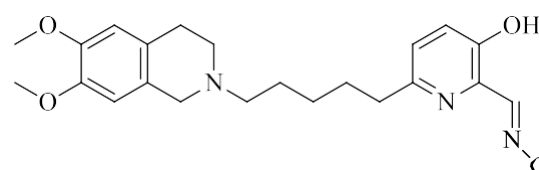
Za određivanje broja živih i mrtvih stanica u suspenziji koristila sam TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, SAD).

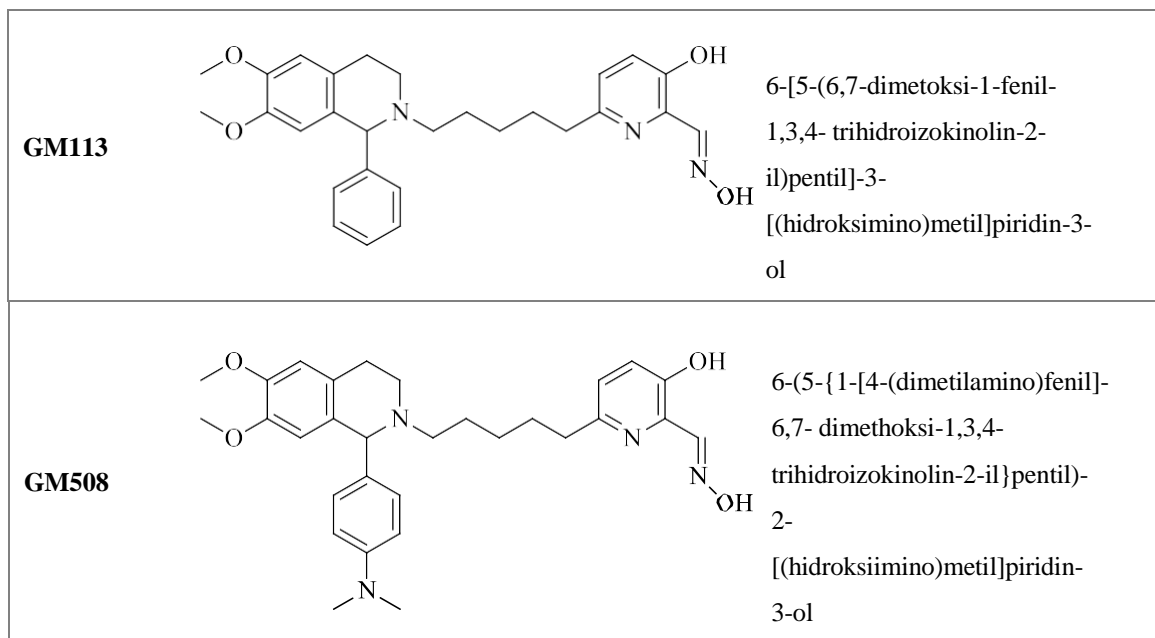
Za određivanje pH vrijednosti pufera, koristila sam pH-metar SevenEasy pH s InLab® 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

3.1.2 Oksimi

3-hidroksi-2-piridinski oksimi sintetizirani su na Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA (UMR 6014), Rouen, Francuska, pod vodstvom prof. dr. sc. Ludovica Jeana i prof. dr. sc. Pierre-Yvesa Renarda. Njihova IUPAC kemijska imena i strukture prikazane su u **tablici 1**. Pripremljene ishodne otopine oksima GM415, GM113 i GM508 (100 mmol dm⁻³) pripravljene su u DMSO i čuvane na 4 °C do korištenja. Dodatna razrjeđenja pripremila sam prije pokusa u mediju za uzgoj stanica. Oksime sam testirala u rasponu koncentracija 1,56 – 200 μmol dm⁻³.

Tablica 1. Kemijske strukture i IUPAC imena ispitivanih 3-hidroksi-2-piridinskih oksima kao potencijalni protutumorski lijekovi. Preuzeto i prilagođeno od: Zandona 2021.

Oksimi	Struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
GM415		6-[5-(6,7-dimetoksi-1,3,4-trihidroizokinolin-2-il)pentil]-2-[(hidroksimino)metil]piridin-3-ol



3.2 Stanične kulture

Za istraživanje sam koristila certificirane stanične kulture: stanice raka dojke MCF-7 (ECACC 86012803, European Collection of Authenticated Cell Cultures, Engleska), stanice raka dojke MDA-MB-231 (ECACC 92020424, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), stanice glioblastoma U251 (ECACC 09063001, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska). Zbog problema s uzgojem i održavanjem u kulturi, stanice PC-3 nisu korištene prilikom izrade ovog diplomskog rada.

3.2.1 Odmrzavanje stanica i uzgoj

Stanice se čuvaju u spremniku s tekućim dušikom. Prije početka pokusa potrebno je odmrznuti vijalice sa stanicama, u vodenoj kupelji na 37 °C. U kupelji sam zagrijala i odgovarajući medij za uzgoj stanica DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle F12, Sigma-Aldrich, Njemačka) do optimalne temperature za rast stanica (37 °C). U posudu za uzgoj stanica dodala sam oko 7 mL medija te sam pipetirala cijeli sadržaj vijalice sa stanicama u posudu. Nakon par sati stanice su se zaljepile, a idući dan promijenila sam medij jer se DMSO koji utječe na vijabilnost nalazi u mediju u kojem su stanice bile zaleđene.

Stanice sam uzgajala kao adherentnu kulturu u posudama za uzgoj pri kontroliranim uvjetima u inkubatoru za uzgoj (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) u DMEM F12 mediju uz dodatak 1 % otopine antibiotika penicilin-streptomycin (Pen-Strep, Sigma-Aldrich, Njemačka), uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka).

3.2.2 Presađivanje stanica

Sve postupke uzgoja stanica i presađivanja radila sam u sterilnim uvjetima, u laminaru s okomitim protokom zraka. Prije rada rukavice i pribor sam dezinficirala 70 %-tnim etanolom, a sve staklene i plastične pipete i nastavke za mikropipete sam sterilizirala autoklaviranjem prije rada. Izgled i morfologiju stanica sam redovno pratila svjetlosnim mikroskopom i otprilike svaka tri dana, kad bi dosegle oko 80 % konfluentnosti, presađivala sam u novi medij i/ili nasađivala na mikrotitarske pločice za provedbu pokusa. Za odvajanje stanica od podloge koristila sam 0,25 % -tnu otopinu tripsina (Sigma-Aldrich, Njemačka). U laminaru sa sterilnom staklenom pipetom aspirirala sam medij te ostatke medija isprala sam fosfatnim puferom (PBS) (Sigma-Aldrich, SAD). Medij se mora u potpunosti ukloniti jer serum iz medija inhibira djelovanje tripsina. Stanice tretirane tripsinom sam vratila u inkubator na 1-3 min te potom kad su se stanice odlijepile od podloge u posudu za uzgoj dodala sam 10 mL medija sa serumom te resuspendirala da bi dobila suspenziju stanica. Djelovanje tripsina ovdje je neutralizirano prisutnim serumom.

3.2.3 Brojanje stanica

Prije provedbe pokusa potrebno je odrediti broj stanica kako bih izračunala broj stanica i pripremila odgovarajuće razrjeđenje potrebno za pokus. Za diferencijalno bojenje i određivanje omjera živih/mrtvih stanica koristila sam otopinu boje tripan plavo. Ova boja ne ulazi u žive stanice zbog negativnog naboja membrane, nego ulazi samo u mrtve stanice jer one imaju oštećenu membranu te boji jezgru ili citoplazmu. Bojanje sam provela po protokolu uređaja za brojanje stanica TC20™. U mikropruveti pomiješala sam 20 µL otopine boje i 20 µL suspenzije stanica, nakon resuspendiranja smjese, 10 µL sam otpipetirala u komoricu pločice za brojanje (Cell Counting Slides, BioRad, SAD). Uređaj automatski broji stanice i rezultat brojanja prikazuje kao ukupan broj stanica po mililitru te

broj živih stanica i postotak živih stanica u uzorku. Izračunala sam potreban volumen suspenzije, željena koncentracija za pokus je bila 1×10^5 st/mL živih.

Za nasađivanje stanica koristila sam mikrotitarske pločice (96-well pločice). U svaku jažicu pipetirala sam 100 μ L suspenzije stanica željene koncentracije.

3.3 Stanični testovi *in vitro*

3.3.1 *Određivanje citotoksičnosti oksima praćenjem promjene vijabilnosti stanica MTS testom*

Pločica s nasađenim stanicama vraćena je u inkubator kako bi se stanice ponovno zalijepile za podlogu. Nakon što je pločica s nasađenim stanicama provela 16-24 h u inkubatoru uklonila sam medij, stanice su ostale zalijepljene na dnu. Na zasebnim pločicama pripremila sam otopine testiranih spojeva u staničnom mediju (bez ikakvih dodataka) u koncentracijama raspona 1,56 – 200 μ mol dm^{-3} na način da sam u prvi stupac pipetirala 260 μ L medija i 0,52 μ L spoja ishodne otopine 100 mmol dm^{-3} , a u ostale stupce pipetirala sam 130 μ L medija te sam radila dvostruko serijsko razrjeđenje. U jedan stupac pipetirala sam čisti medij koji je bio negativna kontrola. U **tablici 2.** je prikaz jedne pločice s nasađenim stanicama nakon tretiranja spojevima. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam staurosporin (ishodna otopina 1 mmol dm^{-3}) u finalnoj koncentraciji 4 μ mol dm^{-3} .

Tablica 2. Primjer plana pipetiranja na pločici za MTS test; testirani spojevi (GM113, GM508, GM415), pozitivna kontrola (PK, triton), negativna kontrola (K, čist i medij).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		GM113 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	K		
C		GM508 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	K		
D		GM415 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	K		
E		GM113 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	K		
F		GM508 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	K		
G		GM415 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	100	50	25	12.5	6.25	3,13	1,56	PK		
H												

Određivanje citotoksičnosti provodila sam pomoću MTS testa. MTS je tetrazolijeva sol žute boje, odnosno reagens koji se koristi za određivanje vijabilnosti stanica. Temelji se na sposobnosti metabolički aktivnih stanica to jest živih stanica da reduciraju MTS reagens u obojani formazanski produkt (aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaza). Ovaj test stoga omogućuje određivanje utjecaja oksima na stanice analizom njihove metaboličke aktivnosti. Porast koncentracije formazanskog produkta pratila sam spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 490 nm.

Ovaj test sam radila u različitim vremenskim tretmanima 1 h, 4 h, 24 h. Nakon što je prošlo vrijeme tretmana, medij sam uklonila sa stanica te sam stanice isprala 2 puta s PBS-om. Koristila sam reagens CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, SAD). Nakon ispiranja dodala sam 100 μL medija (bez dodataka) i 20 μL

reagensa u svaku jažicu uključujući i zadnji red bez stanica i tretmana kako bi izmjerila pozadinsku apsorbanciju. Pločice sam vratila u inkubator na 30 minuta do 2 sata ovisno o brzini razvijanja boje (brzina proporcionalna broju živih i metabolički aktivnih stanica). Iz dobivenih mjerenja apsorbancija odredila sam postotak vijabilnih/mrtvih stanica u odnosu na kontrolu koristeći formulu:

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Aps (uzorak)} - \text{Aps (pozadina)}}{\text{Aps (kontrola netretirana)} - \text{Aps (pozadina)}} \right) \cdot 100\%$$

Grafički sam za svaki spoj odredila koncentraciju spoja kod koje je citotoksični utjecaj 50 % odnosno IC₅₀ (graf ovisnosti % citotoksičnosti o koncentraciji spoja).

3.3.2 Određivanje integriteta stanične membrane

Enzim laktat dehidrogenaza (LDH) se koristi za procjenu integriteta stanične membrane, to jest, otkrivanja ili praćenja oštećenja tkiva i stanica (O'Brien i sur. 2000). Naime, kada je stanična membrana oštećena (npr. prilikom stanične smrti uzrokovane nekrozom) dolazi do ispuštanja enzima LDH u međustanični prostor i medij. Ovim testom mjerimo aktivnost ispuštene LDH iz oštećene stanice posredno, koristeći posebni supstrat resazurin koji se reducira u resorufin potaknut konverzijom NADH-om u staničnom mediju djelovanjem LDH. Intenzitet nastalog resorufin odredila sam fluorimetrijski pri valnoj duljini ekstinkcije od 560 nm i emisije 590 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Koncentracije spojeva koje sam koristila za ovaj test određene su prethodnim MTS testom. Stanice sam izložila spojevima koji su uzrokovali smrt stanica u 4 h, raspon koncentracija bio je 25 μmol dm⁻³ - 200 μmol dm⁻³. Za ovaj test koristila sam neprozirne mikrotitarske pločice s prozirnim dnom. Stanice sam nasadila na pločice kao i za prethodni test 24 h prije pokusa. Sljedeći dan sam aspirirala medij te dodala otopine spojeva u čistom mediju, u volumenu od 100 μL po jažici. Tretman je trajao 3,5 h pri kontroliranim uvjetima u inkubatoru. Nakon toga pločice sam izvadila na sobnu temperaturu 30 minuta. Za pozitivnu kontrolu sam koristila 9 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Njemačka), koji sam u jažicu „pozitivna kontrola“ dodala u volumenu od 2 μL 5 minuta prije dodatka reagensa. Kao negativnu kontrolu koristila sam čisti medij. U sve jažice uključujući pozitivnu i negativnu kontrolu dodala sam 100 μL CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit (Promega, SAD) reagensa. Pločicu sam protresla 30 sekundi na tresilici mikrotitarskih pločica (Eppendorf, Njemačka), prije mjerenja pločica je 10 min inkubirana na sobnoj

temperaturi u mraku. Čitač mikrotitarskih pločica izmjerio je signal te je rezultat prikazan kao postotak aktivnosti LDH u mediju u odnosu na pozitivnu kontrolu to jest maksimalnu aktivnost LDH kad je sva ispuštena iz stanice.

3.3.3 Određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala

Promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi$) procijenjena je pomoću boje tetrametilrodamin etil ester perklorata (TMRE). Ova metoda radi na principu da se permeabilna boja TMRE akumulira u neoštećenim mitohondrijima. Ako nakon izlaganja oksimima dolazi do promjene membranskog potencijala TMRE se neće akumulirati u stanicama i dolazi do smanjenja fluorescencije.

Dan prije eksperimenta nasadila sam stanice na crne mikrotitarske pločice u koncentraciji 1×10^5 st/mL. Nakon 24 h aspirirala sam medij te sam stanice tretirala odabranim spojevima volumenom od 100 μ L po jažici. Tretirane stanice vratila sam u inkubator na 4 sata. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam spoj X ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$), zatim sam pločicu vratila u inkubator na 15 minuta prije dodatka reagensa. Prema protokolu, dodala sam 10 μ L reagensa TMRE ($2 \mu\text{mol dm}^{-3}$) u svaku jažicu. Nakon 20 min u inkubatoru, boju sam isprala tri puta sa 100 μ L PBS-a te sam nakon zadnjeg ispiranja u svaku jažicu dodala novih 100 μ L PBS-a. Promjenu akumulacije TMRE unutar mitohondrija odredila sam na osnovi njegovog fluorescentnog signala pri valnoj duljini ekstinkcije od 550 nm i emisije od 580 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Dobiveni rezultati prikazani su kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice.

3.3.4 Određivanje aktivnosti specifičnih kaspaza

Inicijacija apoptoze procijenjena je određivanjem aktivnosti specifičnih enzima kaspaza uključenih u ovaj proces. Programirana stanična smrt, to jest apoptoza, je prirodni mehanizam kojim se otklanjaju stanice iz organizma (Lawen 2003). Enzimi kaspaze koji su uključeni u apoptozu su cistein-aspartat-ovisne c proteaze (Galuzzi i sur. 2018). Kaspaze imaju dvije uloge u procesu apoptoze: inicijatorsku ulogu (kaspaza 8 i 9) i egzekutorsku ulogu (kaspaza 3). Kaspaza 9 ima ulogu u unutarnjem mitohondrij-ovisnom apoptotičkom putu, a kaspaza 8 ima ulogu u vanjskom receptor-ovisnom apoptotičkom putu koji kasnije aktivira egzekutorsku kaspazu 3. Aktivnost specifičnih enzima kaspaza nakon izlaganja

oksimima, određena je upotrebom komercijalno dostupnog kita Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo). U kitu su dostupni fluorogeni supstrati za mjerenje aktivnosti kaspaza: DEVD-ProRed™ za kaspazu 3, IETD-R110 za kaspazu 8 i LEHD-AMC za kaspazu 9, ako su enzimi aktivirani otpustit će se odgovarajući fluorofor: ProRed™ za crvenu fluorescenciju, R110 za zelenu fluorescenciju i AMC za plavu fluorescenciju.

Dan prije pokusa stanice u koncentraciji od $2,22 \times 10^5$ st/mL nasadila sam na bijelu mikrotitarsku pločicu. U unaprijed određene jažice pipetirala sam 90 μ L suspenzije medija i stanica. Sljedeći dan u jažice sam na to dodala 10 μ L testiranih spojeva iz deset puta koncentriranije otopine u PBS-u od one koja je odabrana za tretman. Tretirane stanice su inkubirane sa spojevima 4 h. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam staurosporin finalne koncentracije 3 μ mol dm^{-3} . Nakon što je prošlo vrijeme tretmana dodala sam 100 μ L reagensa spomenutog kita. Na čitaču mikrotitarskih pločica mjerena je promjena fluorescencije pri valnim duljinama ekstinkcije i emisije od 535 nm i 490 nm (kaspaza 3), 490 nm i 525 nm (kaspaza 8) te 370 nm i 450 nm (kaspaza 9). Rezultat je prikazan kao omjer izmjerenih vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane stanice

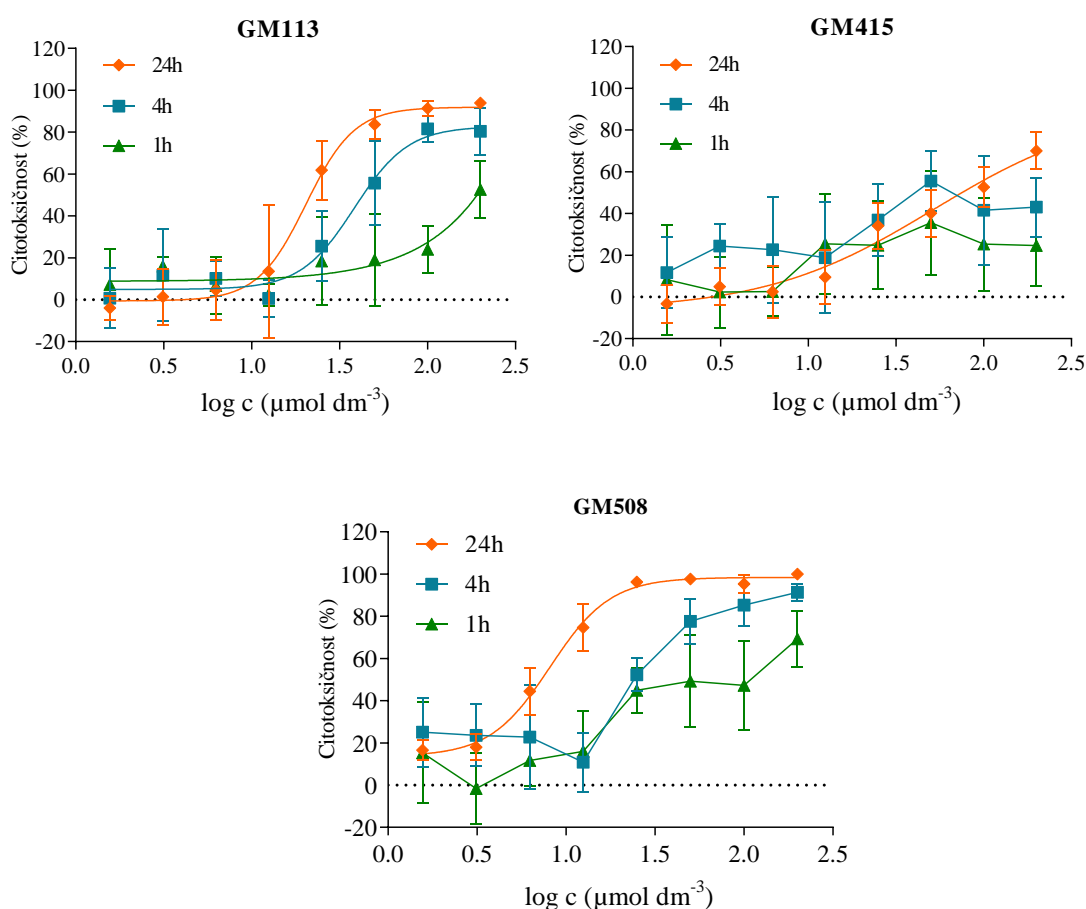
3.4 Analiza rezultata i statistička obrada

Svaki pokus ponovljen je najmanje dva ili tri puta, a svaka koncentracija testirana je u najmanje duplikatu. Rezultate sam prikazala pomoću srednje vrijednosti i standardne pogreške (SE). Za izračun i crtanje grafove koristila sam Microsoft Excel i GraphPad Prism program. Za usporedbu razlika između određenih grupa koristila sam One-way ANOVA i Dunnet test višestrukog uspoređivanja. Statističku značajnost prikazala sam na sljedeći način: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

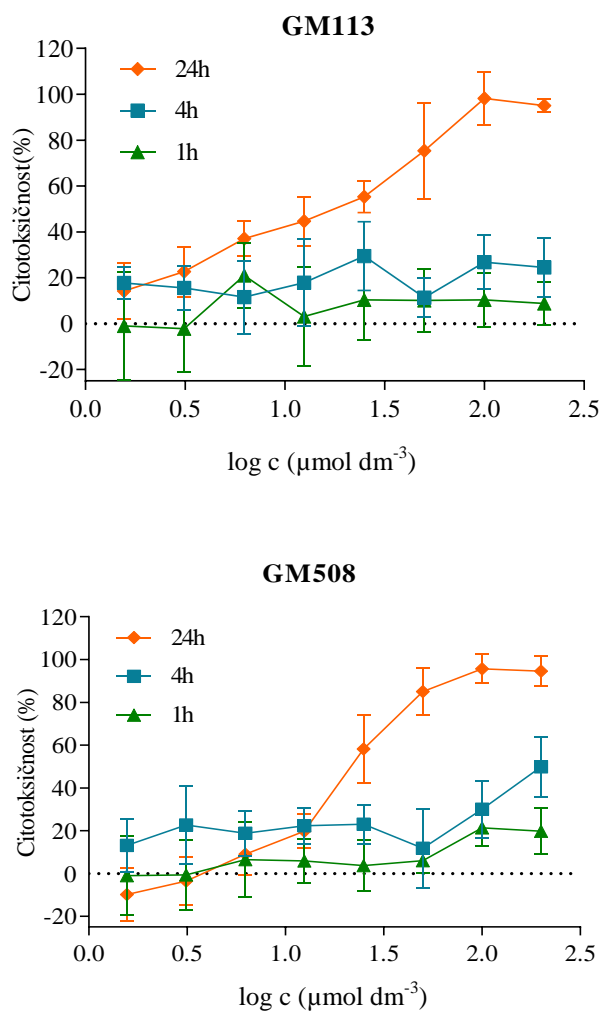
4 Rezultati

4.1 Citotoksični učinak oksima na stanice

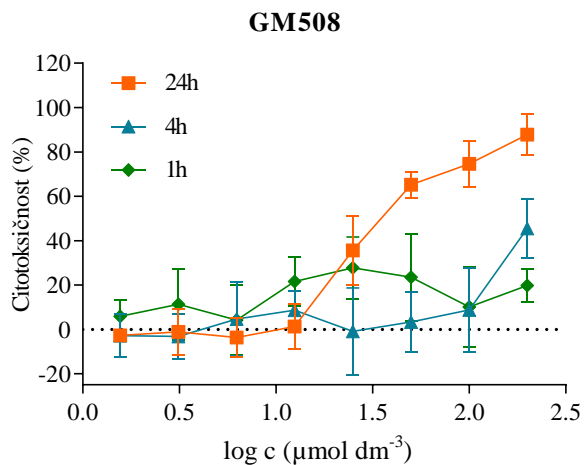
Citotoksični učinak spojeva GM415, GM113, GM508 na stanice određen je mjerenjem inhibicije metaboličke aktivnosti stanica MTS metodom. Rezultati na staničnoj liniji MCF-7 prikazani su na **slici 3.**, na staničnoj liniji MDA-MB-231 na **slici 4.** te na U251 na **slici 5.** Grafički prikaz rezultata za svaki spoj prikazuje tri krivulje s različitim vremenom izloženosti stanica (24 h, 4 h, 1 h).



Slika 3. Prikaz ovisnosti koncentracije spojeva GM415, GM113 i GM508 i njihove citotoksičnosti nakon 24 h, 4 h i 1 h izloženosti stanične linije raka dojke MCF-7. Parametri su određeni iz najmanje dva pokusa i prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku.



Slika 4. Prikaz ovisnosti koncentracije spojeva GM113 i GM508 i njihove citotoksičnosti nakon 24 h, 4 h i 1 h izloženosti stanične linije raka dojke MDA-MB-231. Parametri su određeni iz najmanje dva pokusa i prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku.



Slika 5. Prikaz ovisnosti koncentracije spoja GM508 i citotoksičnost nakon 24 h, 4 h i 1 h izloženosti stanične linije glioblastoma U251. Parametri su određeni iz najmanje dva pokusa i prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku.

Vrijednost IC_{50} ispitivanih oksima, to jest koncentracija ispitivanih spojeva pri kojoj se inhibira vijabilnost 50 % stanica, određene su iz krivulja ovisnosti koncentracije spoja i citotoksičnosti, a prikazani su sumirano u **tablicama 3-5**, za svako vremensko razdoblje tretmana.

Tablica 3. Vrijednost $IC_{50} \pm SE$ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) ispitivanih oksima nakon izloženosti stanica raka dojke (linije MDA-MB-231 i MCF-7) i stanica raka glioblastoma (linija U-251) od 1 h.

Oksim	MCF-7	MDA-MB-231	U251
GM415	≥ 200	-	-
GM113	≥ 100	≥ 200	-
GM508	≥ 100	≥ 200	≥ 200

Tablica 4. Vrijednost $IC_{50} \pm SE$ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) ispitivanih oksima nakon izloženosti stanica raka dojke (linije MDA-MB-231 i MCF-7) i stanica raka glioblastoma (linija U-251) od 4 h.

Oksim	MCF-7	MDA-MB-231	U251
GM415	≥ 200	-	-
GM113	43 ± 15	≥ 200	-
GM508	23 ± 2	≥ 100	≥ 200

Tablica 5. Vrijednost $IC_{50} \pm SE$ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) ispitivanih oksima nakon izloženosti stanica raka dojke (linije MDA-MB-231 i MCF-7) i stanica raka glioblastoma (linija U-251) od 24 h.

Oksim	MCF-7	MDA-MB-231	U251
GM415	74 ± 1	≥ 100	≥ 200
GM113	21 ± 1	22 ± 0.4	≥ 200
GM508	7 ± 1	21 ± 4	36 ± 1

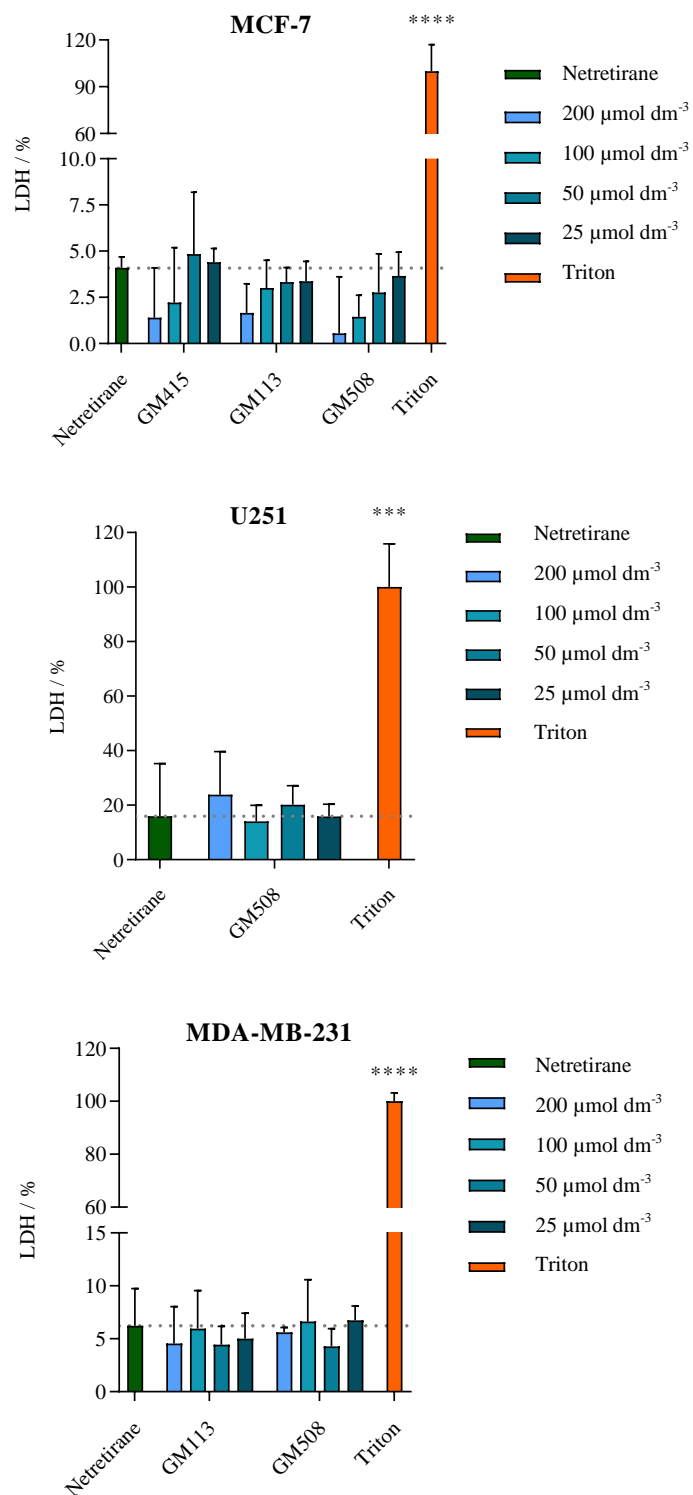
Najtoksičniji spoj nakon 24 h na staničnoj liniji MCF-7 bio je GM508 s $7 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a najmanje toksičan GM415 s $74 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Na staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon 24 h najtoksičniji je bio GM508 s $21 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a najmanje toksičan je GM415 s $\geq 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Kod stanične linije U251 u tretmanu od 24 h najtoksičniji je bio GM508 s $36 \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok su spojevi GM113 i GM415 najmanje toksični s $\geq 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Obzirom na dobivene rezultate za daljnje testove vremenske ovisnosti toksičnosti na liniji U251 izabran je samo spoj GM508.

Nakon tretmana od 4 h vidljiva je vremenski ovisna toksičnost i trend najtoksičnijeg spoja. GM508 bio je najtoksičniji na svim staničnim linijama, kod MCF-7 u vrijednosti od $23 \mu\text{mol dm}^{-3}$, najmanje toksičan je GM415 s $\geq 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na staničnoj liniji MCF-7, te GM113 s $\geq 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ kod MDA-MB-231.

Nakon izloženosti stanica spojevima u trajanju od samo 1 h kao što je očekivano, primjećuje se niža toksičnost, gdje sve vrijednosti iznose $\geq 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$, osim GM113 i GM508 gdje IC_{50} iznosi $\geq 100 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

4.2 Integritet membrane stanica nakon izloženosti oksimima

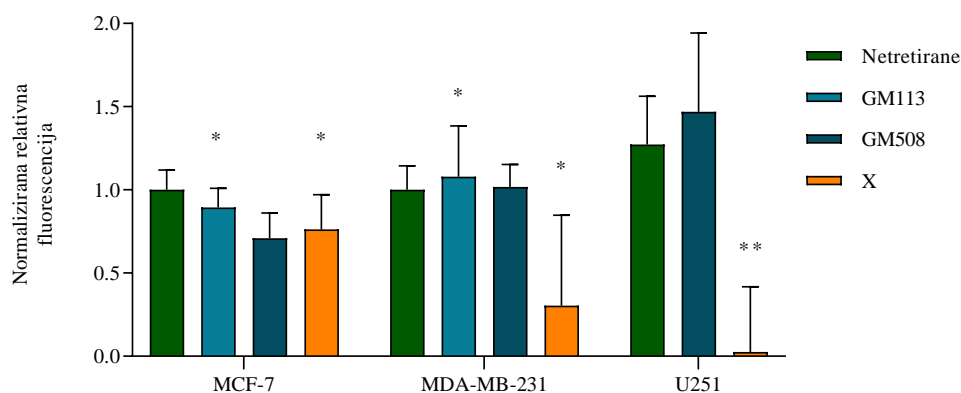
Za ovaj test odabrani su spojevi koji su pokazali citotoksičnost u prethodnom MTS testu. Spojevi su testirani u širem rasponu koncentracija. Ovim testom praćena je aktivnost laktat dehidrogenaze ispuštene iz stanica u medij nakon tretmana spojevima u trajanju od 4 h. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 6**. Može se primijetiti kako niti jedan spoj nije statistički značajno utjecao na integritet membrane u odnosu na netretirane stanice.



Slika 6. Postotak ispuštene laktat dehidrogenaze (LDH) u medij nakon tretmana odabranim oksimima u trajanju od 4 h na staničnim linijama MCF-7, MDA-MB-231, U251. Triton X-100 (0,18 %) korišten je kao pozitivna kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (\pm SE) iz najmanje dva pokusa.

4.3 Promjene membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$)

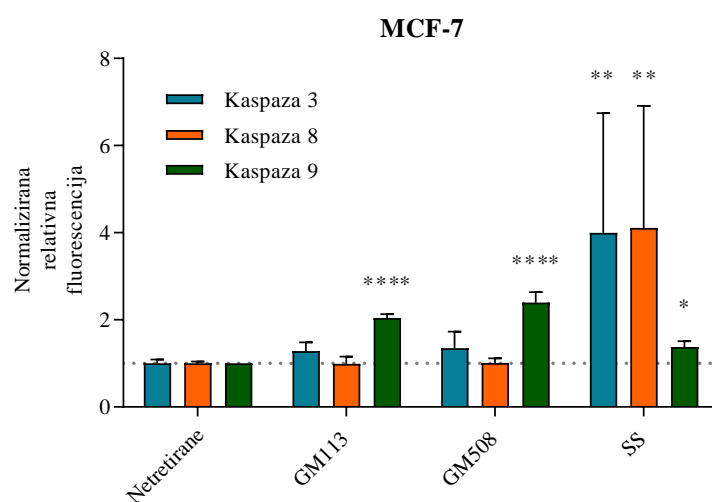
Promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) je vrlo bitna u biološkim procesima. Mitohondriji proizvode većinu stanične energije u obliku adenzin trifosfata (ATP) procesom oksidativne fosforilacije (Zodova i sur. 2018). Promjena potencijala može ukazivati na različite biološke procese i stanja te povećanjem ili smanjenjem mitohondrijskog potencijala može doći do poremećaja u homeostazi stanice (Zodova i sur. 2018). Utjecaj odabranih oksima na mitohondrijski membranski potencijal stanica pratila sam nakon tretmana od 4 h. Koncentracije su odabrane kao one koje uzrokuju maksimalno 20-25 % smanjene vijabilnosti stanica ($\sim IC_{20-25}$). Oksim GM415 nije odabran za testiranje jer se nije pokazao toksičnim u testiranom koncentracijskom i vremenskom rasponu. Dobiveni rezultati su prikazani na **slici 7**. U odnosu na netretirane stanice, spojevi GM113 i GM508 pokazali su statistički značajni utjecaj na mitohondrijski potencijal.



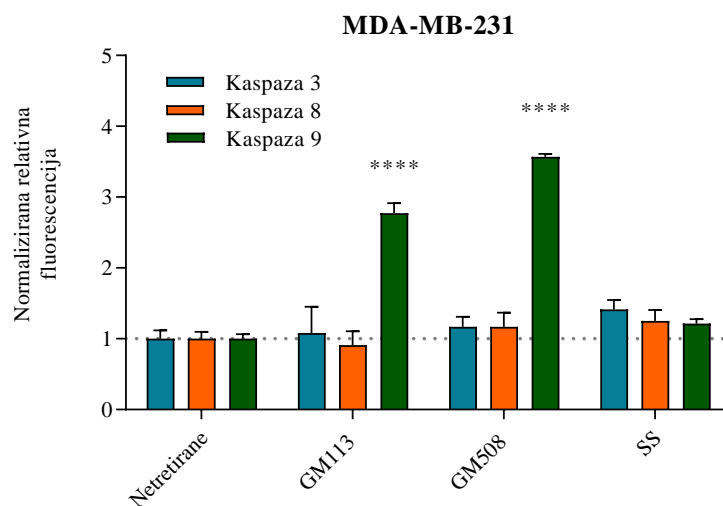
Slika 7. Promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) pod utjecajem oksima u tretmanu od 4 h izražena kao normalizirana fluorescencija u odnosu na netretirane stanice (\pm SE); Stanična linija MCF-7: GM508 ($12,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i GM113 ($25 \mu\text{mol dm}^{-3}$), MDA-MB-231: GM508 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i GM113 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$), stanična linija U251: GM508 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Spoj X ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$) korišten je kao pozitivna kontrola. Parametri su evaluirani iz najmanje dva pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4 Aktivacija kaspaza

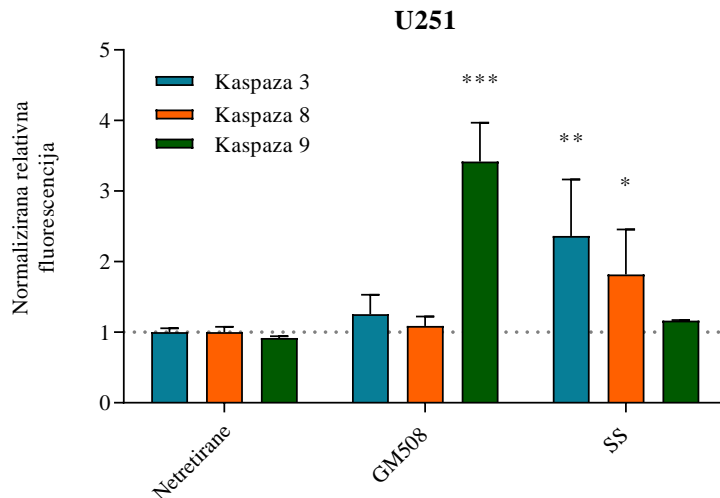
Kaspaze su enzimi koji imaju ključnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze, a aktivacija tri specifične kaspaze praćena je u ovom radu kako bi se potvrdilo pokretanje stanične smrti ovim mehanizmom. Dobiveni rezultati su sumirani na **slikama 8-10**. Prema rezultatima može se vidjeti da spojevi GM113 i GM508 aktiviraju kaspazu 9 u svim testiranim staničnim linijama, što upućuje da se u stanicama pokreće unutarnji/mitohondrijski put apoptoze.



Slika 8 Aktivnost specifičnih kaspaza 3, 8 i 9 nakon 4-h tretmana MCF-7 stanica oksimima: GM113 ($25 \mu\text{mol dm}^{-3}$), GM508 ($12,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i SS (Staurosporin; pozitivna kontrola, $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost (\pm SE). Parametri su evaluirani iz najmanje dva pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.



Slika 9. Aktivnost specifičnih kaspaza 3,8 i 9 nakon 4-satnog tretmana MDA-MB-231 stanica oksimima: GM113 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$), GM508 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i SS (Staurosporin; pozitivna kontrola, $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost (\pm SE). Parametri su evaluirani iz najmanje dva pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: **** p < 0,0001.



Slika 10. Aktivnost specifičnih kaspaza nakon 4-satnog tretmana U251 stanica oksimom: GM508 ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i SS (Staurosporin; pozitivna kontrola, $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost (\pm SE). Parametri su evaluirani iz najmanje dva pokusa. Statistička značajnost u odnosu na netretirane stanice: * p < 0,05; ** p < 0,01.; *** p < 0,001.

5 Rasprava

U prikazanoj studiji procijenila sam mogućnost odabranih 3-hidroksi-2-piridinskih oksima da aktiviraju apoptozu u stanicama raka dojke i glioblastomu te kroz to, njihovu potencijalnu primjenu kao protutumorskih lijekova. Naime, poznato je da je apoptoza najpoželjniji tip stanične smrti u istraživanjima raka, a ciljanje kaspaznih puteva predstavlja obećavajuću terapijsku strategiju za rak (Boice i Bouchier-Hayes 2020). Proapoptotska aktivnost ovih spojeva uočena je u prethodnoj studiji na drugim tipovima stanica (Zandona i sur. 2023). Ovdje je praćena citotoksičnost i naknadna aktivacija specifičnih apoptotskih signalnih kaskada u MCF-7 i MDA-MB-231 (dojka) te U251 (maligni glioblastom) staničnim linijama (Wynn i Tang 2022).

Citotoksični učinak 3-hidroksi-2-piridinskih oksima GM415, GM113 i GM508 ispitan je *in vitro* i procijenjen je na temelju inhibicije vijabilnosti ispitivanih stanica. Stanična linija MCF-7 bila je najosjetljivija. Najveći vremenski ovisan citotoksični učinak primijećen je za spoj GM508, koji je bio otprilike 3 do 5 puta toksičniji za stanice MCF-7 nego za stanice MDA-MB-231 ili U251. U usporedbi s prethodnim rezultatima, GM508 je bio do 21 puta toksičniji za stanice raka dojke MCF-7 nego stanice neuroblastoma (Zandona i sur. 2023). Osjetljivost stanica MCF-7 može se pripisati njihovoj prirodi kao stanica pozitivnih na estrogenski receptor (ER), za razliku od ER-negativnih MDA-MB-231 stanica (Comşa i sur. 2015). Nadalje, poznato je da oksimi kao skupina spojeva moduliraju funkcije ER, a neki pokazuju snažnu ER α -selektivnu aktivnost liganda zbog svoje strukturne sličnosti sa spojevima sličnim estrogenu (Renaud i sur. 2003; Gangapuram 2014; Ouellet i sur. 2015; Eyunni i sur. 2017).

Daljnjom evaluacijom spojeva koji su pokazali citotoksične učinke nije otkrivena značajna disrupcija membrane, što je naznačeno nedostatkom aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u staničnom mediju s povećanjem koncentracije testiranih spojeva (do 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Ovaj rezultat je u skladu s prethodnim studijama na ovim oksimima provedenim detaljno na drugim tipovima stanica (Zandona i sur. 2023). Međutim, manji učinak (25 %) opažen u U251 stanicama tretiranim s GM508 treba dalje istražiti kako bi se isključila mogućnost pro-nekrotične aktivnosti testiranih spojeva. Ipak, očuvan integritet, do visoke koncentracije (200 μM) testiranih spojeva sugerira da oni u MCF-7 i MDA-MB-231

stanicama nisu uzrokovali pucanje membrane ili nekrotičnu staničnu smrt (Nel i sur. 2018), što je jedna od početnih točaka u stvaranju protutumorskih lijekova.

Nadalje, svi testirani oksimi utjecali su na potencijal membrane mitohondrija i aktivirali kaspazu 9, što implicira aktivaciju intrinzičnog apoptotskog signalnog puta preko mitohondrija (Nel i sur. 2018). Međutim, unutar proučavanog vremenskog okvira od 4 sata, kaspaza 3 nije bila aktivirana kako bi se potvrdio proces apoptoze. S druge strane, aktivacija kaspaze 9 u svim testiranim tipovima stanica sugerira i druge mehanizme osim interakcija oksima i ER-receptora, koje doprinose opaženoj citotoksičnosti u MCF-7 stanicama. Naime, slični učinci su zabilježeni za spojeve poput 27-hidroksikolesterola (Rashidi Alavijeh i sur. 2023) i steroida kao što su helebrigenin i arenobufagin (Zhang i sur. 2021), koji su pokazali citotoksičnost u ER-negativnim/pozitivnim stanicama raka dojke. Sumarno gledajući, rezultati istraživanja ukazuju da su istraživani spojevi mogu poslužiti kao početnica za razvoj protutumorskih lijekova. S obzirom na to da ovi ispitani spojevi mogu prijeći krvno-moždanu barijeru (Zandona i sur. 2023), imaju i sposobnost djelovanja protiv metastaza u mozgu, što je također korisno za buduća istraživanja.

6 Zaključak

Ispitivani 3-hidroksi-2-piridinski oksimi pokazali su citotoksični učinak na tretiranim staničnim linijama raka dojke i glioblastoma u vremenski i koncentracijski ovisnom rasponu.

Ispitivani spojevi nisu utjecali na integritet stanične membrane.

Spojevi GM113 i GM508 utjecali su na mitohondrijski membranski potencijal što ukazuje na oštećenje mitohondrija, te narušavanje homeostaze stanica raka.

Aktivirali su kaspazu 9 što upućuje na pokretanje procesa apoptoze unutstaničnim putem povezanim s mitohondrijima.

Posebno se ističe spoj GM508 koji je pokazao najveći potencijal djelovanja na MCF-7 liniju tj. stanice raka dojke već u niskom mikromolarnom koncentracijskom području.

Ovaj rezultat obećavajući je za daljnja istraživanja djelovanja 3-hidroksi-2-piridinskog oksima GM508 kao mogućeg protutumorskog lijeka posebice u tretmanu raka dojke, stoga opravdava daljnju provedbu *in vitro* testova pretkliničkih istraživanja kako bi se moglo sagledati i uzeti u obzir sve potrebno za razvoj novog lijeka.

7 Literatura

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 33.

Antoniadou-Vyza, E., Avramidis, N., Kourounakis, A., & Hadjipetrou, L. (1998). Anti-inflammatory properties of new adamantane derivatives: Design, synthesis, and biological evaluation. *Archiv der Pharmazie*, 331(2), 72–78.

Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumour Biology*, 35(5), 3981–3995.

Bédard, P., Gauvin, S., Ferland, K., Caneparo, C., Pellerin, È., Chabaud, S., & Bolduc, S. (2020). Innovative human three-dimensional tissue-engineered models as an alternative to animal testing. *Bioengineering (Basel)*, 7(3), 115.

Biserova, K., Jakovlevs, A., Uljanovs, R., & Strumfa, I. (2021). Cancer stem cells: Significance in origin, pathogenesis, and treatment of glioblastoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(3), 621.

Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(9), 118688.

Bosak, A. (2006). Organophosphorus compounds: Classification and enzyme reactions. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 57(4), 445–457.

Bozzato, E., Bastiancich, C., & Prétat, V. (2020). Nanomedicine: A useful tool against glioma stem cells. *Cancers*, 13(9), 2213.

Cancer Research UK. (2023). Breast cancer treatment. [Internet], <raspoloživo na: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/treatment> />, [15.06.2024.].

Cao, L., & Niu, Y. (2020). Triple negative breast cancer: Special histological types and emerging therapeutic methods. *Cancer Biology & Medicine*, 17(2), 293–306.

Cassel, G., Karlsson, L., Waara, L., Ang, K. W., & Göransson-Nyberg, A. (1997). Pharmacokinetics and effects of HI 6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: A microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*, 332(1), 43–52.

Chaubal, R., Mujumdar, A. M., Misar, A., Deshpande, V. H., & Deshpande, N. R. (2006). Structure-activity relationship study of androstene steroids with respect to local anti-inflammatory activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(4), 394–398.

Chen, L., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., Chen, B., & Dai, J. (2012). The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*, 33(5), 1437–1444.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. G., & Wothers, P. (2000). *Organic chemistry* (2nd ed.). Oxford University Press.

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.

Cortés-Selva, D., Dasgupta, B., Singh, S., & Grewal, I. S. (2021). Innate and innate-like cells: The future of chimeric antigen receptor (CAR) cell therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(1), 45–59.

Davis, L. B. C., Rosenberg, P. S., Anderson, W. F., & Gierach, G. L. (2018). Black-white breast cancer incidence trends: Effects of ethnicity. *Journal of the National Cancer Institute*, 110(11), 1270–1272.

De Mattia, E., Cecchin, E., Guardascione, M., Foltran, L., Di Raimo, T., Angelini, F., D'Andrea, M., & Toffoli, G. (2019). Pharmacogenetics of the systemic treatment in advanced hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 25(29), 3870–3896.

Demir Cetinkaya, B., & Biray Avcı, C. (2022). Molecular perspective on targeted therapy in breast cancer: A review of current status. *Medical Oncology*, 39(10), 149.

Dhuguru, J., Zviagin, E., & Skouta, R. (2022). FDA-approved oximes and their significance in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals*, *15*(1), 66.

Dutta, R., & Mahato, R. I. (2017). Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *173*, 106–117.

Eyunni, S. V., Gangapuram, M., Mochona, B., & Sur, S. (2017). Synthesis and biological evaluations of ring substituted tetrahydroisoquinolines (THIQs) as anti-breast cancer agents. *Journal of Cancer Science & Therapy*, *9*(1).

Forjaz, G., Sloan, B. J. S., Kruchko, C., Siegel, R., Negoita, S., Ostrom, Q. T., Dickie, L., Ruhl, J., Van Dyke, A., & Patil, N. (2021). An updated histology recode for the analysis of primary malignant and nonmalignant brain and other central nervous system tumors in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Neuro-Oncology Advances*, *3*, 175.

Fotie, J., Matherne, C. M., Mather, J. B., Wroblewski, J. E., Johnson, K., Boudreaux, L. G., & Perez, A. A. (2023). The fundamental role of oxime and oxime ether moieties in improving the physicochemical and anticancer properties of structurally diverse scaffolds. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(23), 16854.

Galluzzi, L., Vitale, I., i sur. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death & Differentiation. *Cell Death & Differentiation*, *25*(3), 486–541.

Gangapuram, M. (2014). Synthesis and pharmacological evolution of tetrahydroisoquinolines as anti-breast cancer agents. *Journal of Cancer Science & Therapy*, *6*(6).

Garavello, W., Rossi, M., McLaughlin, J. K., Bosetti, C., Negri, E., Lagiou, P., i sur. (2007). Flavonoids and laryngeal cancer risk in Italy. *Annals of Oncology*, *18*(7), 1104–1109.

Garcia, G. E., Campbell, A. J., Olson, J., Moorad-Doctor, D., & Morthole, V. I. (2010). Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chemico-Biological Interactions*, *187*(1-3), 199–206.

Garnier, D., Renoult, O., Alves-Guerra, M. C., Paris, F., & Pecqueur, C. (2019). Glioblastoma stem-like cells: Metabolic strategy to kill a challenging target. *Frontiers in Oncology*, *9*, 118.

Goetz, M. P., Sangkuhl, K., Guchelaar, H. J., Schwab, M., Province, M., Whirl-Carrillo, M., Symmans, W. F., McLeod, H. L., Ratain, M. J., Zembutsu, H., Gaedigk, A., van Schaik, R. H., Ingle, J. N., Caudle, K. E., & Klein, T. E. (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and tamoxifen therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *103*(5), 770–777.

Harris, L. N., Ismaila, N., McShane, L. M., Andre, F., Collyar, D. E., Gonzalez-Angulo, A. M., Hammond, E. H., Kuderer, N. M., Liu, M. C., Menzel, R. G., Van Poznak, C., Bast, R. C., Hayes, D. F., & American Society of Clinical Oncology. (2016). Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(10), 1134–1150.

Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., & Minami, H. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, *33*(4), 1837–1843.

Jin, J. F., Zhu, L. L., Chen, M., Xu, H. M., Wang, H. F., Feng, X. Q., Zhu, X. P., & Zhou, Q. (2015). The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Preference and Adherence*, *9*, 923–942.

Jończyk, J., Kukułowicz, J., Łątka, K., Malawska, B., Jung, Y. S., Musilek, K., & Bajda, M. (2021). Molecular modeling studies on the multistep reactivation process of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, *11*(2), 169.

Katalinić, M., Maček Hrvat, N., Baumann, K., Morasi Piperčić, S., Makarić, S., Tomić, S., Jović, O., Hrenar, T., Miličević, A., Jelić, D., Žunec, S., Primožič, I., & Kovarik, Z. (2016). A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *310*, 195–204.

- Katalinić, M., Šinko, G., Maček Hrvat, N., Zorbaz, T., Bosak, A., & Kovarik, Z. (2018). Oxime-assisted reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase analyzed by active site mutations. *Toxicology*, 406–407, 104–113.
- Khasraw, M., Bell, R., & Dang, C. (2012). Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast*, 21(2), 142–149.
- Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell culture based in vitro test systems for anticancer drug screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 322.
- Kosmider, B., & Osiecka, R. (2004). Flavonoid compounds: A review of anticancer properties and interactions with cis-diamminedichloroplatinum(ii). *Drug Development Research*, 63(3), 200–211.
- Kozłowska, J., Potaniec, B., Zarowska, B., & Anioł, M. (2017). Synthesis and biological activity of novel O-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. *Molecules*, 22(9), 1485.
- Kummerow, K. L., Du, L., Penson, D. F., Shyr, Y., & Hooks, M. A. (2015). Nationwide trends in mastectomy for early-stage breast cancer. *JAMA Surgery*, 150(1), 9–16.
- Lacoste, J. (2018). Research in rare disease: From genomics to proteomics. *Assay and Drug Development Technologies*, 16(1), 12–14.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis—An introduction. *BioEssays*, 25(9), 888–896.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–1281.
- Liu, H. L., Jiang, W. B., & Xie, M. X. (2010). Flavonoids: Recent advances as anticancer drugs. *Recent Patents on Anticancer Drug Discovery*, 5(2), 152–164.

Liu, Y. (2004). Safe natural pharmaceutical composition for treating cancer. *United States Patent No. 20040072790*.

Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 133*(9), 1463–1467.

Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—Epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies: An updated review. *Cancers, 13*(17), 4287.

MacArthur Clark, J. (2018). The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition, 120*(s1), S1–S7.

Mansouri, V., Beheshtizadeh, N., Gharibshahian, M., Sabouri, L., Varzandeh, M., & Rezaei, N. (2021). Recent advances in regenerative medicine strategies for cancer treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 141*, 111875.

Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer, 2*(4), 315–319.

Matthews, H., Hanison, J., & Nirmalan, N. (2016). "Omics"-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes, 4*(1), 1–12.

Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran, 30*, 369.

Miller, K. D., Nogueira, L., Devasia, T., Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Jemal, A., Kramer, J., & Siegel, R. L. (2022). Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 72*(5), 409–436.

Musilek, K., Dolezal, M., Gunn-Moore, F., & Kuca, K. (2011). Design, evaluation and structure-activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Medicinal Research Reviews, 31*(4), 548–575.

Nel, M., Joubert, A. M., Dohle, W., Potter, B. V., & Theron, A. E. (2018). Modes of cell death induced by tetrahydroisoquinoline-based analogs in MDA-MB-231 breast and A549 lung cancer cell lines. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 1881–1904.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022–1037.

O'Brien, T., Babcock, G., Cornelius, J., Dingeldein, M., Talaska, G., Warshawsky, D., & Mitchell, K. (2000). A comparison of apoptosis and necrosis induced by hepatotoxins in HepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(3), 280–290.

Olgen, S. (2018). Overview on anticancer drug design and development. *Current Medicinal Chemistry*, 25(15), 1704–1719.

Ouellet, C., Ouellet, É., & Poirier, D. (2015). In vitro evaluation of a tetrahydroisoquinoline derivative as a steroid sulfatase inhibitor and a selective estrogen receptor modulator. *Investigational New Drugs*, 33(1), 95–103.

Prabhakaran, S., Rizk, V. T., Ma, Z., Cheng, C. H., Berglund, A. E., Coppola, D., Khalil, F., Mulé, J. J., & Soliman, H. H. (2017). Evaluation of invasive breast cancer samples using a 12-chemokine gene expression score: Correlation with clinical outcomes. *Breast Cancer Research*, 19(1), 71.

Prado, A., Petroianu, G. A., Lorke, D. E., & Chambers, J. W. (2015). A trivalent approach for determining in vitro toxicology: Examination of oxime K027. *Journal of Applied Toxicology*, 35(2), 219–227.

Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961.

Rashidi Alavijeh, M., Etesami, H., & Dehghan, A. (2023). The cytotoxicity of 27-hydroxycholesterol in MCF-7 and MDA-MB-231. *Advanced Biomedical Research*, 12, 246.

Renaud, J., Bischoff, S. F., Buhl, T., i sur. (2003). Estrogen receptor modulators: Identification and structure–activity relationships of potent ER α -selective tetrahydroisoquinoline ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(14), 2945–2957.

Riedl, A., Schlederer, M., Pudelko, K., Stadler, M., Walter, S., Unterleuthner, D., Unger, C., Kramer, N., Hengstschläger, M., Kenner, L., Pfeiffer, D., Krupitza, G., & Dolznig, H. (2017). Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *Journal of Cell Science*, 130(1), 203–218.

Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 68–78.

Schepetkin, I. A., Plotnikov, M. B., Khlebnikov, A. I., Plotnikova, T. M., & Quinn, M. T. (2021). Oximes: Novel therapeutics with anticancer and anti-inflammatory potential. *Biomolecules*, 11(6), 777.

Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., & O'Shaughnessy, J. (2020). Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(9), 810–821.

Schulz, J. A., Rodgers, L. T., Kryscio, R. J., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2022). Characterization and comparison of human glioblastoma models. *BMC Cancer*, 22(1), 844.

Sertkaya, A., Wong, H. H., Jessup, A., & Beleche, T. (2016). Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States. *Clinical Trials*, 13(2), 117–126.

Shang, C., & Xu, D. (2022). Epidemiology of breast cancer. *Oncologie*, 24(4), 649–663.

Siddique, Y. H., Beg, T., & Afzal, M. (2008). Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicology in Vitro*, 22(3), 625–631.

Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S. S., & Kumar, A. (2016). Lead phytochemicals for anticancer drug development. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1667.

Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast cancer: Epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (Review of literature). *Cancers*, 14(10), 2569.

Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J. T., & Eaves, C. J. (2005). Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(1), 49–59.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., i sur. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.

Tomlinson-Hansen, S. E., Khan, M., & Cassaro, S. (2023). Breast ductal carcinoma in situ. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572101/>

Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast cancer treatment. *American Family Physician*, 104(2), 171–178.

U.S. Food and Drug Administration. (2018). Step 3: Clinical research. FDA. [Internet], <raspoloživo na: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research/>>, [15.06.2024.].

U.S. Food and Drug Administration. (2018). Step 5: FDA post-market drug safety monitoring. FDA. [Internet], <raspoloživo na: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-5-fda-post-market-drug-safety-monitoring/>>, [15.06.2024.].

Umscheid, C. A., Margolis, D. J., & Grossman, C. E. (2011). Key concepts of clinical trials: A narrative review. *Postgraduate Medicine*, 123(5), 194-204.

Villarreal-González, R. V., González-Díaz, S., Vidal-Gutiérrez, O., i sur. (2023). Hypersensitivity reactions to anticancer chemotherapy and monoclonal antibodies: Safety and efficacy of desensitization. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*.

Welsh, J. (2013). Chapter 40—Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In P. M. Conn (Ed.), *Animal models for the study of human disease* (pp. 997–1018). Academic Press.

West, A., Wullkopf, L., Christensen, A., Leijnse, N., Tarp, J. M., Mathiesen, J., i sur. (2017). Division induced dynamics in non-invasive and invasive breast cancer. *Biophysical Journal*, 112(3), 123-125.

Widmer, N., Bardin, C., Chatelut, E., Paci, A., Beijnen, J., Levêque, D., i sur. (2014). Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two—targeted therapies. *European Journal of Cancer*, 50(12), 2020–2036.

Worek, F., Thiermann, H., & Wille, T. (2016). Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions*, 259(Pt B), 93-98.

World Health Organization. (2020). GLOBOCAN: Cancer today. International Agency for Research on Cancer. [Internet], <raspoloživo na: <http://gco.iarc.fr/today/home> />, [07. lipnja.2024.]

Wynn, C. S., & Tang, S. C. (2022). Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: Many choices and future directions. *Cancer Metastasis Reviews*, 41(2), 193–209.

Zandona, A. (2021). Odnos strukture i citotoksičnosti oksimskih reaktivatora fosforilirane acetilkolinesteraze [Doctoral dissertation, Sveučilište u Zagrebu]. Prirodoslovno-matematički fakultet.

Zandona, A., Madunić, J., Miš, K., Maraković, N., Dubois-Geoffroy, P., Cavaco, M., i sur. (2023). Biological response and cell death signaling pathways modulated by tetrahydroisoquinoline-based aldoximes in human cells. *Toxicology*, 494, 153588.

Zandona, A., Maraković, N., Mišetić, P., Madunić, J., Miš, K., Padovan, J., i sur. (2021). Activation of (un)regulated cell death as a new perspective for bispyridinium and imidazolium oximes. *Archives of Toxicology*, 95(8), 2737-2754.

Zhang, Y., Yuan, B., Bian, B., i sur. (2021). Cytotoxic effects of hellebrigenin and arenobufagin against human breast cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 679221.

Zhmurenko, L. A., Litvinova, S. A., Kutepova, I. S., Nerobkova, L. N., i sur. (2020). Synthesis of dibenzofuranone-oxime derivatives with anticonvulsant, antihypoxic, and anti-ischemic activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53(12), 997–1004.

Zhou, F. H., Downton, T., Freeland, A., Hurwitz, J., Caldon, C. E., & Lim, E. (2023). CDK4/6 inhibitor resistance in estrogen receptor-positive breast cancer: A 2023 perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1148792.

Ziperstein, M. J., Guzman, A., & Kaufman, L. J. (2016). Evaluating breast cancer cell morphology as a predictor of invasive capacity. *Biophysical Journal*, 110(3), 621-625.

Zorbaz, T., Braiki, A., Maraković, N., Renou, J., de la Mora, E., Maček Hrvat, N., i sur. (2018). Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration. *Chemistry: A European Journal*, 24(38), 9675-9691.

Zorbaz, T., Mišetić, P., Probst, N., Žunec, S., Zandona, A., Mendaš, G., i sur. (2020). Pharmacokinetic evaluation of brain-penetrating morpholine-3-hydroxy-2-pyridine oxime as an antidote for nerve agent poisoning. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(7), 1072–1084.

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., i sur. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50-59.

Zurdo, J. (2013). Developability assessment as an early de-risking tool for biopharmaceutical development. *Pharmaceutical Bioprocess*, 1(1), 29–50.

8 Životopis

Rođena sam u Mostaru gdje završavam i osnovnu školu. Godine 2017. završavam srednju medicinsku školu, smjer zubni tehničar i iste godine upisujem preddiplomski studij biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih znanosti. Za vrijeme preddiplomskog studija sudjelovala sam na znanstveno-istraživačkom kampu u Pecki, 2019. Iste godine sudjelovala sam u organiziranju dana biologije u Mostaru. U sklopu Erasmus mobilnosti semestar studija provela sam na Sveučilištu u Valenciji. Titulu prvostupnice biologije stječem 2021. godine kad upisujem i diplomski studij eksperimentalne biologije na Sveučilištu u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija sudjelovala sam na simpoziju studenata biologije 2022 i 2023. Stručnu praksu obavila sam na Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti u Zagrebu u području forenzičke antropologije. Tijekom zadnje studijske godine položila sam tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim A kategorija.

Služim se engleskim jezikom. Za vrijeme diplomskog studija radila sam 2 godine u trgovini Müller.

U slobodno vrijeme volim šetati, putovati i družiti se s dragim ljudima.