

# Citotoksični učinak imidazolijevih spojeva na stanice raka prostate

---

**Kureljak, Dunja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:217:580464>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dunja Kureljak

**Citotoksični učinak imidazolijevih spojeva na  
stanice raka prostate**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Dunja Kureljak

**Cytotoxic effect of imidazolium compounds  
on prostate cancer cells**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za molekulsku toksikologiju i Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularni mehanizmi toksičnosti protuotrova i potencijalnih lijekova“ (HrZZ-UIP-2017-05-7260, voditeljica dr. sc. Maja Katalinić) na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Ivane Vrhovac Madunić i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Ivani Vrhovac Madunić na upoznavanju sa svijetom znanosti, velikoj pomoći i usmjeravanju.*

*Zahvaljujem suvoditeljici, izv. prof. dr. sc. Ani Galov na svim savjetima.*

*Zahvaljujem dr. sc. Josipu Maduniću i Antoniju Zandoni na spremnosti da mi pomognu u svakom trenutku.*

*Hvala mojim dragim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i koji su mi studiranje učinili najljepšim razdobljem života.*

*Hvala Nikoli na zajedničkom životu punom sreće.*

*Najveća hvala mojoj obitelji, a osobito roditeljima i sestri Petri na bezuvjetnoj ljubavi i podršci.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Citotoksični učinak imidazolijevih spojeva na stanice raka prostate

Dunja Kureljak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rak prostate jedan je od najučestalijih vrsta raka te je i dalje teško izlječiv. Stoga se razvijaju i istražuju novi spojevi koji pokazuju dobra antitumorska svojstva. Imidazolijevi spojevi su heterocikličke aromatske strukture s brojnim farmakološkim učincima među kojima je i antitumorsko, a postižu ga kroz različite načine djelovanja i stanične mete. U ovom radu ispitan je citotoksični učinak novosintetiziranih imidazolijevih spojeva, hidroksiimino-metil imidazolijevih bromida IV, VI, VII i X testovima *in vitro* na stanice raka prostate PC-3. Inhibitorski učinak na vijabilnost stanica ispitan je praćenjem aktivnosti mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze u metabolički aktivnim stanicama. Zatim je ispitano narušavaju li ispitivani spojevi integritet stanične membrane mjerenjem aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH). Konačno, metodom protočne citometrije istraženo je induciraju li ispitivani spojevi programiranu staničnu smrt, apoptozu. Spojevi VII i X pokazali su najveći inhibitorski učinak na vijabilnost stanica te značajno otpuštanje LDH u medij, što ukazuje na indukciju nekroze. S druge strane, niti jedan od spojeva nije inducirao apoptozu, stoga bi ispitivani spojevi trebali biti modificirani kako bi bili pogodni za daljnja za daljnja ispitivanja kao potencijalni antitumorski lijekovi.

(57 stranica, 14 slika, 4 tablice, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: vijabilnost stanica, antitumorski agensi, nekroza, apoptoza

Voditelj: dr. sc. Ivana Vrhovac Madunić, znanstveni suradnik  
Suvoditelj: dr. sc. Ana Galov, izvanredni profesor

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021. godine

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Cytotoxic effect of imidazolium compounds on prostate cancer cells

Dunja Kureljak

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prostate cancer is one of the most common types of cancer and is still difficult to cure. Therefore, new compounds that show good anticancer properties are being developed and studied. Imidazolium compounds are heterocyclic aromatic structures with numerous pharmacological effects, including anticancer, which is achieved through different modes of action and cellular targets. In this work the cytotoxic effect of newly synthesized imidazole compounds, hydroxyimino-methyl imidazolium bromide IV, VI, VII and X on PC-3 prostate cancer cells was examined *in vitro*. The inhibitory effect on cell viability was examined by measuring mitochondrial succinate dehydrogenase activity in metabolically active cells. The loss of cell membrane integrity is then examined by measuring the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Finally, flow cytometry was performed to investigate whether the tested compounds induce programmed cell death, apoptosis. Compounds VII and X showed the greatest inhibitory effect on cell viability and significant release of LDH into the medium, indicating induction of necrosis. On the other hand, none of the compounds induced apoptosis, therefore the tested compounds should be modified to be suitable for further testing as potential antitumor drugs.

(57 pages, 14 figures, 4 tables, 96 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: cell viability, anticancer agents, necrosis, apoptosis

Supervisor: Ivana Vrhovac Madunić, Research Associate

Co-supervisor: Ana Galov, Associate Professor

Reviewers: Assoc. Prof. Ana Galov

Prof. Biljana Balen

Prof. Mirta Tkalec

Thesis accepted: September 15, 2021

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Rak prostate.....	1
1.2. Imidazolijevi spojevi .....	7
1.2.1. Imidazolijevi spojevi kao antitumorski agensi.....	8
1.3. Stanična smrt.....	14
1.4. Ispitivanje citotoksičnosti metodama <i>in vitro</i> .....	16
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1. Kemikalije, materijali i ostalo .....	21
3.1.1. Kemikalije, otopine i reagensi.....	21
3.1.2. Imidazolijevi spojevi.....	21
3.1.3. Uređaji korišteni za pokusna mjerenja.....	23
3.2. Stanična kultura.....	23
3.2.1. Presađivanje stanica.....	24
3.2.2. Brojanje stanica.....	25
3.3. Stanični testovi <i>in vitro</i> .....	25
3.3.1. Određivanje citotoksičnosti praćenjem promjene vijabilnosti stanica.....	25
3.3.2. Određivanje integriteta stanične membrane.....	28
3.3.3. Određivanje indukcije apoptoze.....	30
3.4. Statistička obrada podataka .....	31
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
4.1. Citotoksičnost ispitivanih spojeva.....	32
4.2. Integritet stanične membrane nakon izloženosti ispitivanim spojevima .....	35
4.3. Indukcija procesa stanične smrti apoptoze ispitivanim spojevima.....	36
4.4. Promjena morfologije stanica nakon izlaganja ispitivanim spojevima .....	38
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>40</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>44</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>45</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>57</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Rak prostate

Prostata je žljezdani organ smješten u zdjelici, neposredno ispod mokraćnog mjehura, kroz koji prolazi gornji dio mokraćne cijevi. Morfološki se može podijeliti na vanjski dio koji obuhvaća 30 % ukupne veličine prostate, sastavljen od vezivno-mišićnog tkiva dodatno prekrivenog vezivnom membranom, tzv. kapsulom, i unutarnji dio. Taj dio čine žlijezde i izvodni kanalići koji sačinjavaju ostalih 70 % prostate, a izgrađeni su od epitelnog tkiva te endotelne vaskulature i imunoloških stanica. Epitel je visokoorganiziran u sloj sekretornih luminalnih stanica koje čine više od polovice epitela i okružuju lumen prostate te bazalni sloj kojega sačinjavaju podskupine stanica: matične (oko 1 %), tranzitne amplificirajuće, bazalne i neuroendokrine (oko 1 %) stanice (Packer i sur., 2016). Volumen prostate nije stalan, već se povećava tijekom djetinjstva i adolescencije dok ne dosegne veličinu kestena i težinu od oko 20 grama. Ova veličina zadržava se do otprilike 45. godine starosti kada prostata ponovo počinje rasti pa može uzrokovati poteškoće u mokrenju zbog sužavanja lumena mokraćne cijevi (Sortelo i sur., 2015). Kao dio muškog reproduktivnog sustava prostata ima brojne funkcije poput endokrine – metabolizira testosteron u 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron (DHT) koji se veže na androgeni receptor (AR) i pokreće stanični odgovor te egzokrine funkcije – izlučuje sekret bogat brojnim enzimima, lipidima, metalnim kationima i aminima koji osigurava optimalne uvjete (pH 6,6) i normalnu funkciju muških spolnih stanica. Ovaj sekret dio je sjemene tekućine, dok njen ostatak proizvode sjemene vrećice. Razvoj, diferencijaciju i rad prostate reguliraju steroidni hormoni androgeni, estrogini i progesteron te peptidni hormoni poput prolaktina, inzulina i hormona rasta (Kumar i sur., 1995).

Rak prostate je nakon raka pluća najučestaliji rak u muškaraca s 1,4 milijuna novih slučajeva te peti vodeći uzrok smrti muškaraca diljem svijeta u 2020. godini. Stopa učestalosti tri je puta viša u razvijenim zemljama, od zemalja u razvoju vjerojatno zbog starenja populacije i razlika u dijagnostičkoj praksi. Antigen specifičan za prostatu (engl. *prostate specific antigen*, PSA) tumorski je marker kojeg izlučuju luminalne stanice, te koji se koristi za otkrivanje i praćenje liječenja raka prostate. Uvođenjem testiranja na PSA kasnih 80-ih godina prošlog stojeća naglo je porasla stopa učestalosti dijagnosticiranog raka prostate u SAD-u, Kanadi i Australiji. Ta je

učestalost kroz nekoliko godina ponovo pala zbog promjena u preporukama za probir asimptomatskih muškaraca. U drugim je pak zemljama došlo do porasta dijagnosticiranja zbog poboljšanja zdravstvenih sustava i povećane svjesnosti o potrebi testiranja na PSA. U zemljama Centralne i Istočne Europe, Azije i Afrike stopa smrtnosti i dalje raste zbog ograničenog pristupa PSA testiranju i efektivnom liječenju (Sung i sur., 2021). Najviša incidencija raka prostate prisutna je u muškaraca starijih od 70 godina pa se ovaj tip raka smatra bolešću starije populacije (Packer i sur., 2016). Budući da prosječni životni vijek raste, procijenjeno je kako će do 2050. godine učestalost dijagnoze raka prostate porasti za čak 2,5 puta (Karan i sur., 2009).

Čimbenici rizika povezani s rakom prostate ograničeni su na dob, povijest malignih bolesti u obitelji i određene genske mutacije poput gena BRCA1 i BRCA2 (u raku dojke i jajnika) te nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (Sung i sur., 2021). Rasna pripadnost također može pridonijeti povećanom riziku pa tako u SAD-u osobe afričkog podrijetla imaju gotovo dvostruko veću vjerojatnost pojave raka prostate od bijelaca zbog određenih polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koji se još istražuju (<https://www.wcrf.org/dietandcancer/prostate-cancer/>). S druge strane, osobe azijskog podrijetla pokazuju manju sklonost upali prostate od Europljana koji žive u Americi. Postoje i drugi čimbenici za koje se sumnja da mogu pogodovati razvoju raka prostate poput okolišnih čimbenika i načina života što uključuje pušenje, prekomjerna tjelesna težina i prehrambene navike poput povećane konzumacije crvenog mesa. Pretpostavlja se da je nastanak raka u ovom posljednjem slučaju uzrokovana heterocikličkim aminima (HCA) što je pokazano kod štakora kojima je u prehranu dodan takav HCA spoj koji je uzrokovao povećanu učestalost mutacija i uzrokovao pojavu nekoliko vrsta raka uključujući rak prostate. Također, pokazano je da povećan unos višestruko nezasićenih masnih kiselina može dovesti do povećanog rizika od slabije diferenciranih oblika raka prostate. Do toga vjerojatno dolazi jer se linolna kiselina, koja se najčešće unosi, u organizmu metabolizira u arahidonsku kiselinu koja je prekursorska molekula za proupalne agense te na taj način posreduje upali (Sfanos i sur., 2012).

Patogeni organizmi koji inficiraju prostatu mogu također uzrokovati upalni odgovor, stoga koreliraju s povišenom incidencijom raka prostate tijekom kasnije životne dobi. Većina patogena je spolno prenosiva uključujući organizme *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* i *Trichomonas vaginalis*, a svoj doprinos imaju i virusi poput humanog papiloma virusa (HPV),

virusa Herpes simplex tip 1 i 2 i Citomegalovirusa (Packer i sur., 2016). *Escherichia coli* (*E. coli*) jedan je od najčešće prisutnih mikroorganizama kod pacijenata s bakterijskim prostatitisom, a može se naći i kod pacijenata s benignom prostatičnom hiperplazijom te rakom prostate. To ne čudi budući da različiti sojevi *E. coli* proizvode brojne čimbenike virulencije poput citotoksičnog nekrotizirajućeg faktora 1 (CNF1) koji uzrokuje oštećenje tkiva i citotoksina kolibaktina koji inducira dvolančane lomove DNA što može doprinjeti nastanku raka (Sfanos i sur., 2012).

Upalna etiologija raka prostate intenzivno se istražuje jer je upala prostate najčešći poremećaj ovog organa, a upalna stanja odgovorna su za kasniju pojavnost od oko 20% svih tipova raka u ljudi. Više događaja može doprinjeti razvoju prostatitisa uključujući već spomenute direktne infekcije i prehrambene čimbenike, hormonalne promjene i urinarni refluks. Naime, u prostati se uobičajeno nalazi mali broj limfocita T i B, makrofaga i mastocita, a infekcija stimulira dodatno nakupljanje imunoloških stanica koje luče citokine, kemokine i faktore rasta. Ukoliko je upala kronična, osim što posreduju odgovor domaćina na infekciju, stvaraju povoljnu mikrookolišnu podlogu za transformaciju stanica. Tada su u tkivu prostate prisutne povećane razine interleukina (IL) IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ) te interferona gama (IFN- $\gamma$ ). Neki će od njih značajno utjecati na ponašanje imunoloških stanica koje će pogodovati razvoju raka (Karan i sur., 2009). Utvrđeno je da matične stanice raka prostate (engl. *cancer stem cell*, CSC) imaju aktivan specifični spektar gena koji uključuje nuklearni faktor *kappa B* (NF- $\kappa$ B), IL-6 i receptor interferona gama (IFNGRI). Signalna je kaskada NF- $\kappa$ B važna u upalnom odgovoru povezanom s brojnim tipovima raka (uključujući i prostate) jer regulira ekspresiju mnogih upalnih citokina, faktora rasta i antiapoptotskih proteina, dok IL-6 doprinosi napredovanju tumora pa se povezuje s lošijom prognozom raka prostate (Packer i sur., 2016). Također, povišene razine inhibirajućeg citokina makrofaga 1 (MIC-1) nađene su u slabije diferenciranom raku prostate jer on utječe na abnormalnu proliferaciju stanica raka čime smanjuje njihovu adheziju. Pretpostavlja se zbog toga da MIC-1 ima ulogu u procesu metastaziranja tumora. Stoga bi se, u kombinaciji s PSA, serumski MIC-1 mogao koristiti kao dijagnostički indikator uznapredovalog stadija raka prostate (Karan i sur., 2009).

Često se biopsijom prostate otkriju i prekancerozna stanja koja povećavaju rizik za kasniju detekciju raka prostate, poput proliferativne upalne atrofije (engl. *proliferative inflammatory atrophy*, PIA) i prostatične intraepitelne neoplazije (engl. *prostatic intraepithelial neoplasia*, PIN).

Oštećenja tkiva prostate uzrokovana upalnim odgovorom, mogu prijeći u PIA-u, kao regenerativni odgovor epitelnih stanica. Ove atrofične regije imaju povišenu razinu glutathion S-transferaze P1 (GSTP1), antioksidacijskog enzima što pokazuje kako su epitelne stanice prostate izložene pojačanom oksidacijskom stresu. Također, u tim regijama povišena je i razina antiapoptotskog proteina Bcl-2 koji je odgovoran za smanjenu razinu apoptoze, dok je ekspresija nekih tumor supresorskih gena smanjena. To ide u prilog teorijama da PIA izravno vodi razvoju raka, ili pak neizravno preko PIN-a (De Marzo i sur., 2003). PIN je sličan raku prostate biokemijski, genetski i fenotipski, ali ne dolazi do proboja bazalne membrane kao kod raka. Prema neizravnoj teoriji razvoja raka prostate koja uključuje stadije PIA i PIN, područja PIA-e koja imaju nefunkcionalni gen GSTP1, ne mogu se učinkovito boriti protiv oksidacijskog stresa. U tom slučaju dolazi do oštećenja genoma što vodi razvoju u PIN te naposljetku u rak prostate. Ovu teoriju potvrđuju saznanja da se u oko 40 % slučajeva područja PIA-e preklapaju s PIN-om i da se oba prekancerozna stanja kao i rak pojavljuju u istoj, perifernoj regiji prostate (De Marzo i sur., 2003; De Marzo i sur., 1999).

Rak prostate, kao i ostale tipove raka, karakterizira monoklonalno podrijetlo što potvrđuju i analize metastazirajućih stanica raka prostate iz različitih dijelova tijela pacijenata koje imaju većinu istih genetskih promjena (Haffner i sur., 2013). Međutim, tumorska žarišta pokazuju heterogenost stanica koja se očituje u mnogim morfološkim i fiziološkim osobinama poput ekspresije površinskih receptora te proliferativnog, angiogenog i metastatskog potencijala (Marusyk i sur., 2010). Postoje dva modela koja opisuju heterogenost novotvorenina: stohastički model klonalne evolucije i model matične stanice raka. Model klonalne evolucije objašnjava kako transformacija stanice započinje mutacijom tumor supresorskog gena ili onkogenom te mitozom takve stanice nastaju klonovi koji dalje šire tumorogeni potencijal. Daljnjim gomilanjem mutacija neke stanice stječu selektivnu prednost u vidu većeg proliferativnog potencijala te će one dominirati nad drugim stanicama u tumoru (Packer i sur., 2016). Puno klonova stanica raka može nastati, povući se i dalje se dijeliti tijekom razvoja bolesti i liječenja zbog promjena mikrookolišnih uvjeta unutar novotorevine. Stupanj klonalne heterogenosti unutar primarnog tumora i između primarnog tumora i udaljenih metastaza može značajno varirati u različitim tipovima tumora. Također, različiti oblici liječenja uključujući terapiju deprivacije androgena mogu posljedično utjecati na klonalnu evoluciju bolesti. Tako je primjerice inaktivacija tumor supresora PTEN povezana s rezistencijom na deprivaciju androgena pa se tijekom hormonalne terapije događa

selekcija stanica s ovom mutacijom (Haffner i sur., 2013). Model CSC-a govori kako svaka stanica nije sposobna stvoriti tumor, već postoji mala subpopulacija stanica odgovorna za inicijaciju i napredovanje tumora te njegovu sposobnost preživljenja (recidiva) nakon antitumorske terapije. Takve stanice, poznate kao CSC mogu se samostalno obnavljati i diferencirati u heterogene stanične linije koje sačinjavaju tumor. Porijeklo CSC-a mogu biti normalne matične stanice koje genetičkim i epigenetičkim promjenama poprime tumorogeni fenotip, a mogu nastati i iz diferenciranih stanica koje malignom transformacijom steknu svojstva matičnih stanica (Packer i sur., 2016).

U procesu karcinogeneze stanica mora mutirati više puta, točnije, prije se smatralo da broj mutacija iznosi 7, dok neki drugi modeli govore u prilog puno manjem broju od samo 3 mutacije u solidnim tumorima. Ove mutacije nazivaju se pokretačkima (engl. *driver mutations*), te donose stanici proliferativnu prednost pred drugim stanicama (Packer i sur., 2016). Identificirano je oko 140 gena čije mutacije doprinose nastanku raka, a odnose se na regulaciju 12 signalnih puteva koji doprinose staničnom fitnessu poput mehanizama DNA popravka, regulacije staničnog ciklusa i odlaska u apoptozu, kromatinskih modifikacija i regulacije transkripcije. Ostale mutacije koje se nakupljaju u stanicama i ne osiguravaju joj proliferativnu prednost nazivaju se suputničkim (engl. *passenger mutations*), te su najčešće neutralne, ali neke od njih mogu donijeti adaptivnu prednost u odgovoru na određeni selekcijski pritisak poput liječenja (Vogelstein i sur., 2013).

Rak prostate jedan je od hormonski najosjetljivijih tipova raka, stoga valja objasniti ulogu androgena u njegovom nastanku. Većina stanica prostate eksprimira AR, međutim samo luminalne stanice trebaju androgene hormone da bi preživjele. Hiperproliferacija luminalnih stanica u PIN-u i raku ukazuje na važnost AR-a i androgena u razvitku ovih bolesti. AR je transkripcijski faktor ovisan o ligandu koji kontrolira ekspresiju specifičnih gena. Primarni ligandi AR-a, androgeni hormoni testosteron i DHT, pokreću muški spolni razvoj i diferencijaciju. Sintetizirani testosteron iz Leydigovih stanica testisa ulazi u stanice prostate gdje uz pomoć enzima 5- $\alpha$ -reduktaze prelazi u metabolit DHT koji potiče rast i preživljenje stanica prostate. DHT se visokim afinitetom veže za AR i mijenja mu konformaciju pa se AR uz pomoć adaptorskog proteina importina- $\alpha$  premješta u jezgru. U jezgri se veže za specifične elemente DNA (elementi odgovora androgena, ARE) u promotorskim regijama ciljnih gena poput PSA potičući transkripciju koja vodi staničnim odgovorima poput rasta i preživljenja. Promjene gena koji kodira za AR mogu voditi razvoju raka

prostate. Točnije, od 1029 utvrđenih mutacija u genu AR, njih 159 je onkogeno (Tan i sur., 2015). Visoka hormonska ovisnost raka prostate iskorištava se u strategijama liječenja pa je tako najčešći izbor kod liječenja androgen-deprivacijska terapija (ADT), odnosno uklanjanje djelovanja androgena na stanice raka. To se može postići obostranom orhidektomijom (odstranjenjem testisa) kako bi se uklonio testosteron iz testisa ili davanjem lijekova inhibitora signalnog puta AR-a poput antiandrogena. Iako je u početku terapija uspješna, većina tumora se vrati nakon dvije do tri godine zbog razvijanja rezistencije raka na liječenje, odnosno pojave androgen-neovisnog oblika raka prostate (Rushworth i sur., 2020). Takvi pacijenti liječe se kemoterapijom uključujući i antimitotik docetaksel koji pomaže u preživljenju pacijenata (Tan i sur., 2015). Stanice adenokarcinoma prostate mogu transdiferencirati u stanice nalik neuroendokrinima. Takve stanice sudjeluju u napredovanju raka prostate izlučivanjem brojnih neuropeptida i faktora rasta koji imaju mitogeni učinak na okolne stanice raka i tako mogu doprinosti androgen-neovisnoj proliferaciji stanica raka prostate (Yuan i sur., 2007).

Stanice PC-3 koriste se kao model karcinoma prostate neovisan o androgenu. Ova stanična linija ima visok metastatski potencijal u usporedbi s drugim modelima staničnih linija raka prostate (Kamalideghan i sur., 2018). Kultura je uspostavljena 1979. godine iz koštane metastaze adenokarcinoma prostate 62-godišnjeg muškarca. Ove stanice karakterizira prisutnost abnormalnih jezgara, jezgrica i mitohondrija te aneuploidni kariotip (Kaighn i sur., 1979). Tai i suradnici (2011) u svom istraživanju ističu kako stanična linija PC-3 ne predstavlja adenokarcinom prostate, već više nalikuje neuroendokrinom karcinomu malih stanica prostate (engl. *small cell neuroendocrine carcinoma*, SCNC), koji je jedan od rijetkih tumora prostate te može nastati *de novo* (samo u oko 1 % pacijenata) te kao recidivirajući tumor pacijenata koji su imali adenokarcinom i primali ADT (Huang i sur., 2019). Takvi pacijenti često naglo razviju široko rasprostranjene metastaze na neobičnim lokacijama poput jetre, bez povišenja PSA u serumu. SCNC prostate je stoga visokoagresivni tip karcinoma prostate s prosjekom preživljenja manjim od 12 mjeseci (Grignon, 2004). Još nije sasvim jasno stanično podrijetlo ovog tipa raka (Huang i sur., 2019). Usporedbom staničnih linija PC-3 i LNCaP (engl. *lymph node carcinoma of the prostate*) pokazano je kako stanice LNCaP ekspimiraju AR i PSA te se njihov rast može inhibirati deprivacijom androgena kao i kod adenokarcinoma prostate. S druge strane, PC-3 ne ekspimiraju AR, ni PSA te je njihova proliferacija androgen neovisna kao kod SCNC. Također, stanice PC-3 pokazuju visoku ekspresiju

neuroendokrinih markera kromogranina A (CgA) i neuron specifične enolaze (NSE), dok su LNCaP negativne na ove markere (Tai i sur., 2011). Nadalje, stanice PC-3 eksprimiraju IL-8 te interleukinski receptor CXCR2. Oni su dio autokrinog signalnog puta IL-8-CXCR2-p53 u kojemu IL-8 aktivira CXCR2, a on zatim aktivira p53 koji inhibira proliferaciju stanica. Mutacije p53 dovode do inaktivacije spomenutog puta i hiperproliferacije stanica, a aktivirani CXCR2 dodatno stimulira rast stanica. Kako je utvrđeno da gotovo svi SCNC prostate imaju mutacije u genu za p53, pretpostavlja se da je upravo ovaj signalni put odgovoran za njegovu agresivnost. Stanice PC-3 također imaju mutirani gen za p53 i pokazuju veliki proliferativni kapacitet, što ih čini dobrim modelom SCNC-a prostate (van Bokhoven i sur., 2003; Chen i sur., 2012).

## 1.2. Imidazolijevi spojevi

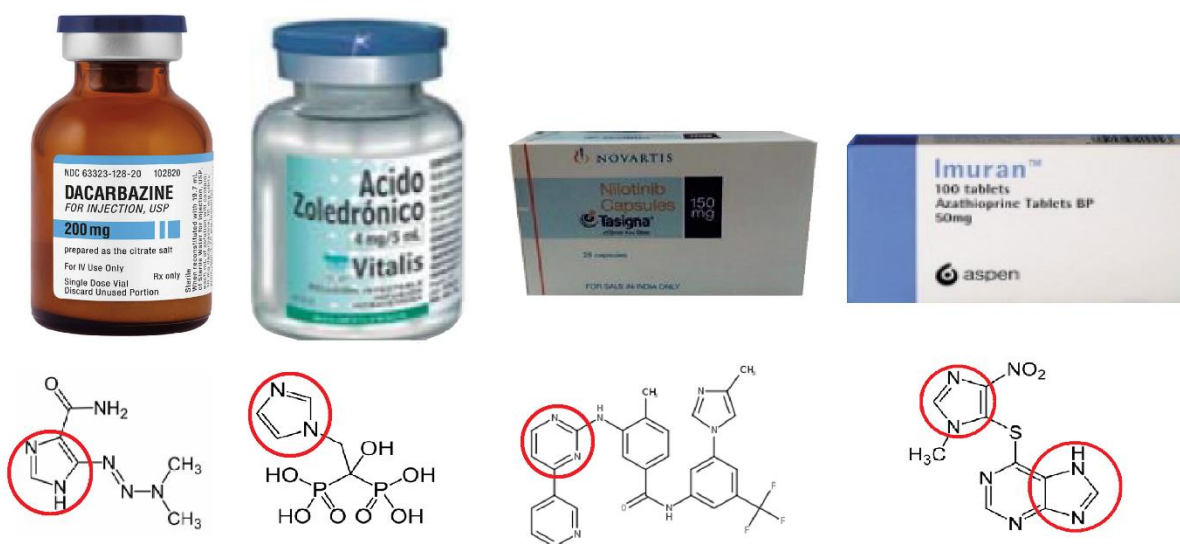
Imidazolijevi spojevi su heterocikličke aromatske strukture, prisutne u sastavnicama ljudskog organizma poput aminokiseline histidina, vitamina B12, DNA, histamina i biotina, te su i dio molekule teofilina u čaju i kavi koja stimulira centralni živčani sustav. Svima im je zajedničko prisustvo imidazolijeva peteročlanog planarnog prstena molekularne formule  $C_3H_4N_2$ , topivog u vodi i drugim polarnim otapalima. Imidazolijev prsten je amfoteričan, odnosno ponaša se i kao kiselina i baza (Verma i sur., 2013). Njegova svojstva proizlaze iz strukture – posjedovanja sekundarnog i tercijarnog atoma dušika povezanih u konjugirani ciklički sustav sa 6  $\pi$ -elektrona. Imidazolijev prsten prima i otpušta protone i lako stvara slabe interakcije što doprinosi lakom vezanju za brojne enzime i receptore u biološkim sustavima čime se postižu brojne biološke aktivnosti (Bernard i sur., 1958). Prvi imidazolijevi derivati otkriveni su već 1840-ih, dok je sam spoj imidazol sintetiziran 1858. godine. Od tada pa do danas imidazolijevi spojevi privlače pažnju znanstvene zajednice zbog širokog spektra farmakoloških djelovanja poput antibakterijskih, antiupalnih, antifungalnih, antituberkularnih, anti-HIV, analgetskih i antitumorskih (Zhang i sur., 2014). Zbog svega navedenog, imidazolijevi se derivati se intenzivno istražuju kao potencijalni lijekovi za brojna patološka stanja.

Oksimi su spojevi koji sadrže skupinu  $C=NOH$  te mogu reaktivirati enzim acetilkolinesterazu (AChE). Zbog toga se upotrebljavaju kao protuotrovi prilikom trovanja organofosfornim spojevima (OP). Naime, oksimi nukleofilnom supstitucijom uklanjaju OP

kovalentno vezan unutar katalitičkog mjesta AChE. U medicinskoj se praksi kao reaktivatori AChE koriste oksimi poput 2-PAM i HI-6, no još uvijek se istražuju novi strukturni analozi koji bi lakše prelazili krvno-moždanu barijeru te imali veći reaktivacijski potencijal uključujući i imidazolijske oksime (Renou i sur., 2013; Katalinić i sur., 2016; Zandona i sur., 2021).

### 1.2.1. Imidazolijski spojevi kao antitumorski agensi

Povoljna svojstva imidazola upotrebljavaju se za razvoj učinkovitih antitumorskih terapeutika pa je tako danas na tržištu dostupno nekoliko imidazolijskih derivata koji se koriste u kliničke svrhe poput dekarbazina, zoledronatne kiseline, azatioprina i nilotiniba (Slika 1) (Zhang i sur., 2014). Daljnji naponi ulažu se u sintezu novih spojeva s poboljšanim svojstvima i raznim metama djelovanja koje ću ukratko objasniti u nastavku.



**Slika 1.** Pakiranja i kemijske strukture nekoliko antitumorskih lijekova baziranih na strukturi imidazolu. Crvenim krugom označen je imidazolijski prsten (preuzeto i prilagođeno iz Ali i sur. (2017)).

Hiperprodukcija stanica uslijed poremećene kontrole staničnog rasta i diobe jedna je od karakteristika transformiranih stanica raka. U tom je procesu osobito važna uloga mikrotubula, proteinskih kompleksa koji se sastoje od heterodimera  $\alpha$  i  $\beta$  tubulina. Oni se u prisutnosti GTP-a organiziraju u dugačka proteinska vlakna, tzv. protofilamente koji daljnjim grupiranjem



sačinjavaju cjevaste mikrotubule. To su dinamične strukture u kojima se konstantno održava ravnoteža između jednog kraja na koji se dodaju proteinski dimeri i koji se produljuje te drugog kraja koji se skraćuje. Ovakva precizna kontrola duljine mikrotubula rezultira vitalnim staničnim funkcijama poput citoskeleta koji održava oblik i strukturu stanice, staničnog pokretanja i prijenosa organela unutar stanice te formiranja diobenog vretena koje je neophodno za pravilnu segregaciju kromosoma tijekom stanične diobe (Jordan i sur., 1998). Postoji više klinički odobrenih agenasa koji stupaju u interakciju s tubulinima i ometaju njihovu polimerizaciju poput vinka alkaloida, kombretastatina, paklitaksela, docetaksela i drugih (Ali i sur., 2017). Bioizosterička zamjena olefinske veze imidazolijevim prstenom u kombretastatinu omogućava bolju topivost u vodi, farmakokinetička svojstva i oralnu bioraspoloživost (Zhang i sur., 2014). Analizi ovakvog spoja s dodatno supstituiranim jodom ili bromom pokazuju inhibitornu aktivnost prema polimerizaciji tubulina, dok dibromid pokazuje selektivnu inhibiciju prema cervikalnim KB-3-1 i stanicama raka PC-3 (Biersack i sur., 2011). Sličan imidazolijev analog kombrestatina pokazao se kao odlični inhibitor polimerizacije tubulina te je kao takav zaustavljao stanični ciklus i stvaranje diobenog vretena što je induciralo staničnu smrt apoptozom u staničnim linijama HeLa i Jurkat. U ispitivanju *in vivo*, ovaj je spoj pokazao značajno smanjenje tumorske mase u usporedbi s referentnim kombrestatinom bez toksičnog učinka na miševе (Romagnoli i sur., 2016). Imidazolijev prsten supstituiran karbonilnom skupinom i 4-metil-benzenom pokazuje značajnu antitumorsku aktivnost inhibirajući polimerizaciju tubulina u staničnim linijama melanoma i raka prostate. Međutim, u *in vitro* primjeni pokazalo se da N-metilni supstituent na imidazolijevom prstenu nije bio metabolički stabilan te je ispitan demetilirani analog koji je pokazao bolji antitumorski potencijal od referentnog kolhicina na stanicama raka prostate LNCaP, PC-3 i PPC-1 te stanicama melanoma A375 (Chen i sur., 2011; Chen i sur., 2010).

Topoizomeraze (TOP) su enzimi koji reguliraju superuvijanje lanaca DNA pa sudjeluju u brojnim procesima stanične regulacije poput replikacije i rekombinacije DNA. DNA topoizomeraze I i II važne su mete antitumorskih lijekova. Oko 50 % dostupnih antitumorskih agenasa djeluje upravo inhibicijom TOP mehanizama. Međutim, kratko vrijeme djelovanja, loša topivost i jaka toksičnost onemogućavaju njihovu dugotrajniju upotrebu u liječenju, stoga se i dalje istražuju agensi koji bi se pokazali učinkovitijima. Imidazolijev se prsten zbog mogućnosti formiranja vodikovih veza često dodaje bioaktivnim strukturama kako bi povećao topivost. To je svojstvo iskorišteno i kod sinteze novih inhibitora TOP. Prvi učinkoviti inhibitor TOP I je

kamptotecin (CPT), biljni alkaloid slabo topiv u vodi što limitira njegovu primjenu. Dodatkom etilne i imidazolijeve skupine njegova se topivost poboljšala (Ali i sur., 2017). Također, dodatkom imidazolijeve prstena na poziciju 20 dobiva se stabilniji derivat CPT-a koji pokazuje veći antitumorski potencijal kod nekoliko staničnih linija, posebice PC-3 (Li i sur., 2009). Indimitecan je kandidat za kliničku antitumorsku primjenu u liječenju solidnih tumora koji sadrži imidazolijev prsten i pokazuje dobra inhibitorna svojstva jer može inducirati lomove DNA i cijepati TOP I na jedinstvenim mjestima u genomu (Holleran i sur., 2010).

Raf kinaze su serin/treonin kinaze, dio signalnog puta kinaze MAP koji regulira brojne stanične funkcije poput staničnog rasta, diferencijacije i apoptoze, te također predstavljaju potencijalnu metu antitumorskih lijekova (Chong i sur., 2003). Primjerice, u liječenju raka bubrega primjenjuje se sorafenib, jedan od Raf inhibitora. Međutim, njegovi imidazolijevi analozi pokazuju bolju antitumorsku aktivnost i inhibitornu učinkovitost prema c-Raf kinazi u stanicama melanoma WM3629 (Lee i sur., 2010). Još je nekoliko sličnih spojeva koji sadržavaju imidazolijeve strukture pokazalo jednaku ili bolju antiproliferativnu aktivnost od sorafeniba na staničnim linijama karcinoma pluća A549, karcinoma kolona DLD-1, akutne mijeloične leukemije MV4-11 i stanicama melanoma A375P i WM3629 (Rajitha i sur., 2011; Yu i sur., 2010). Također, triciklički sustav pirazolnog prstena u kombinaciji s imidazolijevim pokazao je dobru inhibitornu funkciju prema b-Raf s dobrom citotoksičnom aktivnošću ( $IC_{50} = 0,24 \mu M$ ) u stanicama melanoma (Niculescu-Duvaz i sur., 2010).

Skupina enzima citokrom P450 (CYP) odgovorna je za katalitičku hidroksilaciju brojnih lipofilnih spojeva. CYP1, CYP2 i CYP3 i djelomično CYP4 uključeni su u metaboliziranje ksenobiotika, dok su CYP11, CYP17, CYP19 i CYP21 uključeni u sintezu endogenih molekula poput steroida, masnih kiselina i prostaglandina. Prekomjerna ekspresija nekih od enzima iz ove skupine u tumorskim stanicama prepoznata je kao meta antitumorske terapije (McFadyen i sur., 2004). CYP inhibitori bazirani na azolu, poput fadrozola i letrozola preporučuju se u liječenju raka dojke, međutim mogu izazvati sistemske nuspojave i zato se i dalje istražuju selektivniji i manje toksični inhibitori enzima CYP. Tako je otkriven spoj YM-116 s inhibitornom aktivnošću CYP enzima koji nosi imidazolijev prsten. Uz to, sintetizirane su i druge slične strukture koje pokazuju četiri puta bolju antitumorsku učinkovitost od komercijalno korištenog letrozola na staničnoj liniji H29R pri koncentraciji od  $10 \mu M$  (Doiron i sur., 2011). Ova otkrića zanimljiva su i u kontekstu

liječenja raka prostate budući da CYP17 inhibitori blokiraju biosintezu androgena. Međutim, potrebne su daljnje modifikacije već istraženih spojeva kako bi se povećala selektivnost i afinitet prema CYP17 (Zhang i sur., 2014). Istražuju se i spojevi koji imaju dvostruki učinak, tj. djeluju i kao antagonisti androgenog receptora i inhibitori CYP17. Steroidni imidazoli odlični su kandidati za buduću kliničku primjenu jer djelovanjem na više meta mogu povećati terapijsku učinkovitost i smanjiti rizike od interakcija više lijekova koje se javljaju prilikom kombinirane terapije. Kao takvi, mogli bi imati nizak rizik od pojave rezistencije na lijek zbog multifunkcionalnog učinka. Jedan takav steroidni imidazol pokazao se kao odličan inhibitor rasta stanica raka prostate LNCaP. Ovaj je spoj smanjio je ekspresiju PSA što potvrđuje dobar antiandrogeni učinak te je značajno smanjio enzimsku aktivnost CYP17, odnosno konverziju progesterona u androstendion, prekursorsku molekulu testosterona (Hou i sur., 2019).

Spomenuti androgen androstendion transformira se u prostati u testosteron uz pomoć 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze 5 (17 $\beta$ -HSD5) koja ostaje aktivna u stanicama raka prostate pacijenata koji primaju ADT. U staničnim linijama raka prostate ovaj enzim pokazuje pojačanu aktivnost, stoga bi mogao sudjelovati u njihovom rastu i daljnjem razvoju raka. Zato se kao jedna od terapijskih strategija istražuju inhibitori ovog enzima pa su tako ispitani učinci više imidazolijevih steroidnih derivata koji su pokazali značajan inhibitorni učinak *in vitro* i *in vivo* (Cabeza i sur., 2016).

DNA-vezujući agensi mogu utjecati na ekspresiju različitih gena pa tako i onih koji su povezani s rastom stanica raka. Imidazolijev prsten zbog dva dušikova atoma lako stvara slabe interakcije s DNA što se koristi kod razvoja antitumorskih lijekova. Kombiniranjem imidazolijevog prstena sa skupinama koje sadrže heteroatome poput dušika, sumpora i kisika sintetiziraju se novi učinkoviti antitumorski spojevi koji stupaju u interakcije s DNA (Zhang i sur., 2014). Neki od takvih spojeva poput tiadiazolnog derivata mogu pocijepati DNA stanica HT-29, ali ne inhibiraju značajno sintezu DNA u staničnim linijama HT-29 i MCF-7 (Özkay i sur., 2010). Pirol-imidazolijevi poliamidi su skupina malih molekula koji se vezuju na mali utor određenih sekvenci DNA pa onemogućavaju vezanje transkripcijskih faktora. Na taj način reguliraju gensku ekspresiju što im daje veliki potencijal za kliničku upotrebu (Chenoweth i sur., 2009). Pirol-imidazolijev poliamid ARE-1 pokazao se učinkovitim na stanicama LREX', modelu raka prostate rezistentnom na antiandrogeni lijek enzalutamid (Kurmish i sur., 2017). Naime, enzalutamid je AR

antagonist koji se koristi u standardnoj terapiji metastatskog raka prostate rezistentnog na kastraciju. Međutim, česta pojava rezistencije na ovaj lijek ograničava njegovu kliničku primjenu. Zato se istražuju spojevi koji osim AR-a utječu i na druge molekularne mete (Watson i sur., 2015). ARE-1 tako, uz AR, mijenja ekspresiju još jednog hormonskog receptora, glukokortikoidnog (GR). GR se veže na sekvence slične kao i AR, te je prekomjerna ekspresija ovog receptora jedan od mehanizama rezistencije na enzalutamid. Pokazano je da se dugotrajnim izlaganjem stanica LNCaP ARE-1 smanjuje transkripcijska aktivnost AR i GR, dok su ispitivanja *in vivo* na mišjim modelima pokazala smanjenje rasta raka prostate uz minimalnu toksičnost (Kurmis i sur., 2017). Nadalje, pirol-imidazolijevi poliamidi mogu narušiti elongacijsku fazu transkripcije uklanjajući RNA polimerazu II s DNA i degradirajući njenu podjedinicu RPB1 što je pokazano i na stanicama LNCaP. U ispitivanju sintetiziranog poliamida *in vivo* nakon tri tretmana, mišji modeli pokazuju smanjenje rasta raka prostate, što je popraćeno smanjenjem težine i povećanom razinom mokraćne kiseline. Ovo stanje može ukazivati na sindrom tumorske lize uzrokovanog ubrzanim raspadanjem stanica raka nakon izlaganja poliamidu (Yang i sur., 2013).

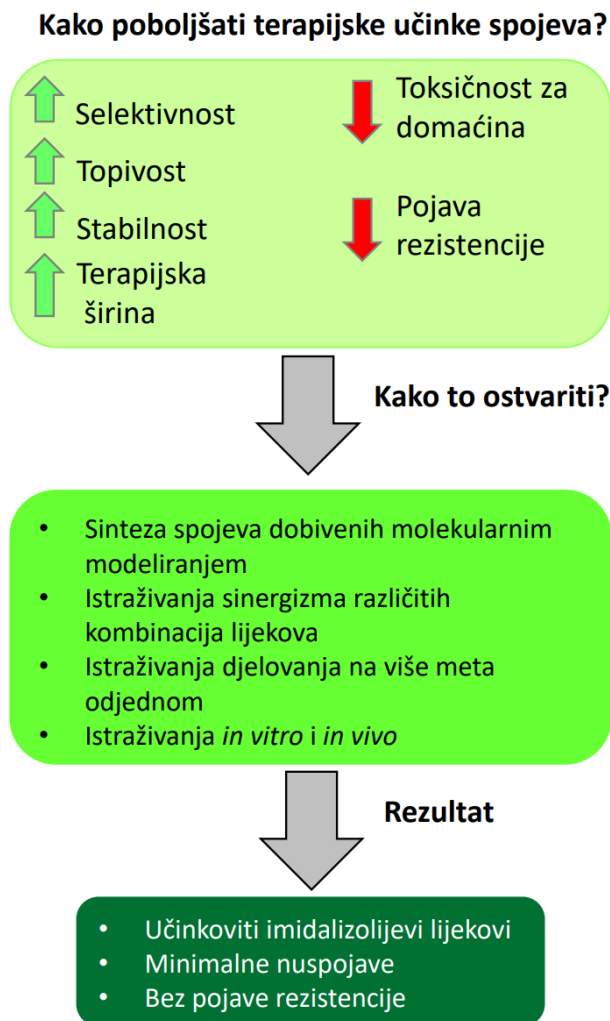
Angiogeneza je proces u kojemu stanice raka potiču stvaranje vlastite krvožilne mreže kako bi se opskrbile hranjivim tvarima i kisikom, te se potencijalno proširile po organizmu. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) važna je signalna molekula koju proizvode stanice raka kako bi stimulirale angiogenezu. U kliničkoj je upotrebi inhibitor angiogeneze bevacizumab koji se veže za VEGF i tako mu onemogućava djelovanje, međutim terapija je skupa i popraćena rizicima od nuspojava. Stoga se dalje proučavaju male molekule kao potencijalni antiangiogeni agensi. Nekoliko imidazolijevih spojeva istraživano je u tu svrhu te su derivati levamizola pokazali dobru antiangiogenu aktivnost *in vitro*, pogotovo N-metillevamizol i bromolevamizol (Hansen i sur., 2012).

Transformirajući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ) citokin je koji sudjeluje u napredovanju, angiogenezi i invazivnosti tumora. Interakcija TGF- $\beta$  s TGF- $\beta$  tip I receptorskom kinazom (ALK5) čini ovu kinazu poželjnom metom antitumorskih lijekova. Otkriveno je više selektivnih inhibitora ALK5 koji stupaju u interakcije s njegovim adenozin trifosfat (ATP)-veznim mjestom (Ling i sur., 2011). ALK5 inhibitori bazirani na imidazolijevoj strukturi pokazuju veliku učinkovitost (Dewang i sur., 2010).

Kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) je značajni medijator brojnih bolesti uključujući rak. Ona utječe na razvoj i metastaziranje raka regulacijom migracije i invazije stanica. Također, ekspresija kinaze FAK u endotelnim stanicama nužna je za stvaranje i stabilnost novog krvožilnog sustava te njena prekomjerna ekspresija potiče angiogenezu. Zbog navedenih svojstava dobra je meta antitumorskih lijekova. Imidazo[1,2-*a*][1,3,5]triazini i njihovi derivati pokazali su antitumorsku aktivnost u četiri ispitane stanične linije uključujući i stanice PC-3 (Dao i sur., 2015).

p53 je tumor supresor čija inaktivacija dovodi do poremećaja kontrole staničnog ciklusa i razvoja raka. Uzrok inaktivacije mogu biti mutacije u genu p53 ili prekomjerna ekspresija MDM2 i MDMX proteina koji negativno reguliraju p53. Ako je u pitanju drugi slučaj, molekule koje narušavaju interakcije između p53 i MDM2/MDMX mogu na taj način reaktivirati p53 (Popowicz i sur., 2010). U takve molekule spadaju Nutlin-3a i RG7112, imidazolidinski derivati koji su u ranim kliničkim fazama ispitivanja, međutim i dalje se istražuju spojevi s poboljšanim svojstvima. Trisupstituirani imidazolijevi spojevi u staničnim linijama osteosarkoma i raka debelog crijeva uzrokovali su disocijaciju p53-MDM2 kompleksa te posljedično izazvali nakupljanje p53 i proapoptotskog proteina p21 te zaustavili stanični ciklus što potvrđuje aktivaciju signalnog puta p53 (Twarda-Clapa i sur., 2017).

Poznata su i druga djelovanja imidazolijevih spojeva poput inhibicije kinaza nazvanih *checkpoint* (CHK), hem oksigenaza (HO-1 i HO-2), farnezil-transferaze, receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), histonske deacetilaze (HDAC1), te antagonista gonadotropin oslobađajućeg hormona (GnRH) (Ali i sur., 2017; Zhang i sur., 2014). Opisana dosadašnja istraživanja ukazuju na značajan potencijal imidazolijevih spojeva u borbi protiv raka. Na Slici 2 vidljive su smjernice za sintezu i ispitivanje imidazolijevih spojeva.



**Slika 2.** Prikaz smjernica za razvoj novih imidazolijskih spojeva kao potencijalnih antitumorskih lijekova (preuzeto i prilagođeno iz Ali i sur. (2017)).

### 1.3. Stanična smrt

Smrt stanica neophodna je za normalno funkcioniranje živog organizma, za kontrolu veličine i oblika tkiva kroz razne razvojne stadije, odnosno očuvanje ravnoteže između stanica koje se dijele i rastu (proliferirajućih) i uklanjanja onih koje su stare i/ili oštećene (Chaabane i sur., 2013). Tipovi stanične smrti razlikuju se po morfološkim karakteristikama, aktivnosti određenih enzima, oslobađanju staničnog sadržaja i imunološkom odgovoru, a koji će se tip smrti pokrenuti u određenoj stanici ovisit će o vrsti i intenzitetu štetnih signala, koncentraciji ATP-a, tipu stanice i

drugim čimbenicima (Hotchkiss i sur., 2009). Postoje tri glavna tipa stanične smrti: nekroza, apoptoza i autofagija.

Nekroza je neregulirani oblik stanične smrti koji obuhvaća ireverzibilne promjene u jezgri i citoplazmi kao što su bubrenje stanice, propusnost mitohondrijske i lizosomske membrane, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS), aktivacija proteaza poput kalpaina i katepsina, oštećenje i pucanje stanične membrane te izlivanje staničnog sadržaja u okolinu. Stoga je nekroza najčešće popraćena stvaranjem upalnog odgovora aktivacijom stanica urođene imunosti. Nekroza je najčešće uzrokovana izrazitim staničnim stresom kada se naglo i opsežno iscrpljuju zalihe ATP-a kao kod ishemije, mehaničke traume, temperaturnih ekstrema ili djelovanja toksina (Kroemer i sur., 2009). Međutim, u posljednje vrijeme smatra se kako je nekroza uređeniji proces nego što se prvotno mislilo. Tako može biti pokrenuta aktivacijom određenih površinskih receptora poput receptora smrti (pr. TNFR1) i receptora sličnih Tollu (engl. *Toll-like receptors*, TLR), osobito u uvjetima u kojima je apoptoza inhibirana. Bitna karakteristika nekroze je rano pucanje stanične membrane, dok apoptotične stanice zadržavaju cjelovitost i djelomično metaboličku aktivnost stanične membrane sve do kasnijih faza procesa. Zanimljivo je kako povećana koncentracija unutarstaničnih kalcijevih iona može inducirati više tipova stanične smrti. Tako će unos kalcijevih iona kroz plazmatsku membranu uzrokovati nekrozu, dok će njihovo ispuštanje iz endoplazmatskog retikuluma inducirati apoptozu (Hotchkiss i sur., 2009).

Apoptoza ili programirana stanična smrt strogo je regulirani tip stanične smrti koji ima bitnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze uklanjanjem nepotrebnih i oštećenih stanica. Pokreću ju nedostatak čimbenika rasta, oštećenja DNA, povećanje ROS-a, replikacijski stres i promjene u mikrotubulima (Galuzzi i sur., 2018). Apoptoza je najbrži oblik stanične smrti, a uzrokuje smanjenje staničnog volumena, kondenzaciju kromatina, fragmentaciju genomske DNA, degradaciju staničnih organela poput Golgijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma te njihovo pakiranje u membranom ovijene strukture - apoptotska tjelešca (Taylor i sur., 2008). Biokemijske promjene uključuju primjerice prenošenje lipida fosfatidil-serina (PS) s unutarnje na vanjsku površinu plazmatske membrane u ranoj fazi apoptoze. Takve promjene prepoznaju receptori na fagocitirajućim stanicama pa se apoptotska tjelešca i stanice vrlo brzo unesu u makrofage i uklone, a da ne izazovu upalni odgovor (Abbas i sur., 2018).

Apoptoza može biti potaknuta unutarnjim ili vanjskim putem. Unutarnji put reguliran je uz pomoć proapoptotskih i antiapoptotskih proteina iz porodice Bcl-2. Indukcijom proteina koje služe kao senzori staničnog stresa poput Bim aktiviraju se izvršni proteini Bax i Bak, čijim se djelovanjem povećava propusnost mitohondrija. Kao rezultat toga brojne komponente mitohondrija otpuštaju u citosol poput citokroma c koji se zatim veže na Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) te se formira apoptosom koji aktivira pokretačku kaspazu 9 koja potom kaskadno aktivira izvršne kaspaze 3, 6 i 7. Ove će kaspaze dalje cijepati stanične proteine što će naposljetku rezultirati smrću stanice apoptozom (Pollack i sur., 2001). Vanjski put apoptoze potaknut je vezanjem faktora smrti na specifične transmembranske receptore. Vezanjem vanstaničnog liganda na receptor dolazi do oligomerizacije receptora i vezivanja adaptivnih molekula te prokaspaze 8 ili 10 u kompleks nazvan DISC (engl. *death-inducing-signalling-complex*). Potom se nizvodno, direktno ili preko proteina Bid i mitohondrijskog puta, aktiviraju se izvršne kaspaze (Ashkenazi, 2008).

Autofagija je regulirana stanična smrt koja se javlja kao adaptivni odgovor na stres te na taj način štiti stanicu. Poremećaji u odvijanju autofagije rezultiraju problemima u razvoju i brojnim patološkim stanjima uključujući rak, neurodegeneraciju i kardiovaskularne bolesti (Galuzzi i sur., 2018). Prilikom pokretanja autofagije (primjerice pri nedostatku hranjivih tvari ili infekciji) dolazi do formiranja fagofora, prekursora autofagosoma izgrađenog od dva lipidna dvosloja. Fagofor se dodavanjem novih lipida produžuje kako bi mogao zaokružiti citosolne organele i proteine koji se trebaju razgraditi. Naposljetku tvori autofagosom koji se spaja s endosomom, a potom s lizosomom stvarajući autolizosom. Hidrolitički enzimi iz endosoma i lizosoma razgrađuju unutarnji lipidni dvosloj, a zatim i njegov sadržaj. Metaboliti se otpuštaju u citoplazmu i mogu služiti kao izvor energije ili kao građevni elementi za nove proteine i lipide (Zhou i sur., 2012).

#### **1.4. Ispitivanje citotoksičnosti metodama *in vitro***

Paracelsusov koncept da sve tvari posjeduju toksični potencijal ovisno o dozi temelj je toksikologije i farmakologije (Rozman i sur., 2001). Tako je poznato da brojni lijekovi u niskim koncentracijama imaju povoljne fiziološke učinke, dok pri višim koncentracijama mogu uzrokovati staničnu smrt. Stoga je ispitivanje citotoksičnosti nužno prilikom istraživanja novih kemoterapeutika kako bi se utvrdio prag sigurne upotrebe koji ne predstavlja rizik od neželjenih



učinaka na normalne stanice, a postiže negativne učinke na primjerice stanice raka (Niels i sur., 2009).

Spoj se smatra citotoksičnim ako uzrokuje opsežne strukturne i morfološke stanične promjene, nepovoljno utječe na replikaciju ili smanjuje vijabilnost stanice, odnosno broj živih stanica u uzorku (Niels i sur., 2009). Učinci ovise o vremenu izloženosti spoju i mehanizmima citotoksičnosti kao i čimbenicima procesuiranja toksina u biološkom sustavu: apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju ksenobiotika. Ovi potonji vrsno su specifični, ovisni o genskoj podlozi i drugim faktorima, a specifičan odgovor na ksenobiotik može biti lokalni ili sistemski, reverzibilan ili ireverzibilan, trenutni ili s odgodom. Stoga su razvijeni različiti testovi *in vitro* kojima se određuje citotoksični odgovor kao funkcija koncentracije spoja od interesa na mjestu djelovanja (Timberell, 2000).

Dvodimenzionalne (2D) jednoslojne kulture su prikladni i učinkoviti model za testiranje molekula koje su kandidati za potencijalne kemoterapeutike. Danas se 2D stanični modeli koriste za predviđanje *in vivo* odgovora na lijekove te za otkrivanje mnogih meta i signalnih puteva njihovog djelovanja. Međutim, razvojem tkivnog inženjeringa razvijaju se i 3D kulture i modeli ko-kultura koje bolje oponašaju tkivno-specifičnu arhitekturu te interakcije stanica-stanica i stanica-izvanstanični matriks. Takve kulture uključuju višestanične sferoide, organoide, nosače, hidrogelove, organe na čipu i 3D bioprintanje. Ove tehnologije koriste se kako bi oponašale morfološka, funkcionalna i mikrookolišna svojstva ljudskih tkiva i organa. Međutim, još postoje brojni izazovi pred 3D modelima kao što su razlikovanje po kompleksnosti, veličini, morfologiji, 3D arhitekturi i protokolima. Djelotvornost i toksičnost mnogih molekula lijekova dobivenih 3D modelima razlikuju se od onih dobivenih 2D kulturama te je upitna njihova sličnost s kliničkim podacima. Sve navedeno predstavlja teškoće u standardizaciji kultura i protokola testova, fenotipova i podataka za analizu. Stoga se i dalje za probir i otkriće novih kemoterapeutika najviše koriste 2D kulture usprkos svojim ograničenjima u oponašanju uvjeta *in vivo* (Fang i sur., 2017).

Zlatni standard za ispitivanje citotoksičnosti *in vitro* je detekcija promjena integriteta membrane. Postoje mnoge metode koje za procjenu integriteta stanične membrane koriste unos ili isključivanje boje ili akumulaciju boje u lizosomima (Niels i sur., 2009). To su primjerice metode zadržavanja boja neutralnog crvenila, tripan plavog i fluorescentnog propidij jodida. Boju tripan plavo i fluorescentne boje zdrava stanica izbacuje tako da se selektivno boje samo mrtve stanice s

oštećenom membranom. Za razliku od njih, neutralno crvenilo akumulira se u lizosomima zdravih stanica, dok u stanicama s oštećenom lizosomskom membranom istječe u citosol i boji ga crveno pa se ovom metodom kvantificira broj živih neoštećenih stanica (Cho i sur., 2008).

Također, narušavanje integriteta membrane omogućava ispuštanje staničnog sadržaja u stanični medij te se ovaj proces iskorištava za mjerenje aktivnosti određenih enzima u vanstaničnom okolišu. Takav je primjerice fluorometrijski test laktat dehidrogenaze (LDH) korišten u ovom radu i objašnjen u Materijalima i metodama. Fluorometrijski su testovi osjetljiviji od kolorimetrijskih, brzi i jednostavni za izvedbu, te su primijenjivi i na adherentne stanice kao i na stanice koje rastu u suspenziji. U ovakve testove spada i test proteazne aktivnosti (GF-AFC test). Za razliku od testa LDH (LDH se ispušta iz stanice s oštećenom staničnom membranom pa je pokazatelj nekroze stanice), ovaj test koristi supstrat glicilfenilalanil-aminofluorokumarin (GF-AFC) koji ulazi u žive stanice u čijoj citoplazmi aminopeptidaze sa supstrata cijepaju glicin i fenilalanin stvarajući fluorescentni produkt aminofluorokumarin. U mrtvim se stanicama gubi proteazna aktivnost pa ova metoda selektivno mjeri signal proporcionalan broju živih stanica (Aslantürk, 2018; Niels i sur., 2009).

Neki od najčešće korištenih testova za određivanje citotoksičnosti su kolorimetrijski testovi koji prate aktivnosti mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze redukcijom tetrazolijevih soli u metaboličkim aktivnim stanicama. Najpoznatije tetrazolijeve soli koje se koriste su: MTT, XTT, WST i MTS, a testovi su brzi, jednostavni, ekonomični, precizni, osjetljivi i visoko reproducibilni (Aslantürk, 2018). MTT test koristi redukciju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolijevog bromida u plave kristaliće formazana u metabolički aktivnim stanicama. Nastale kristaliće potrebno je otopiti dodatkom organskog otapala poput DMSO-a te se spektrofotometrijski mjeri intenzitet obojenja otopljenog formazana proporcionalan broju živih stanica. Tetrazolijeve boje druge generacije su XTT (2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-fenilamino-karbonil-2H-tetrazolij), WST-1 (5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrophenil)-2H-tetrazolij) i MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) koje se temelje na istom principu, no njihov je produkt topiv u vodi pa su jednostavniji za izvedbu (Schröterová i sur., 2009). Više čimbenika može utjecati na proces redukcije spomenutih soli poput faze staničnog ciklusa, koncentracije unutarstaničnih iona i okolišnih uvjeta poput pH i koncentracije D-glukoze te reduktivna sposobnost unutar citoplazme, na membranama lizosoma i endosoma pa čak i u

vanstaničnom okolišu (Śliwka i sur., 2016). Jednostavan kolorimetrijski ne-enzimski test za brzu procjenu količine živih adherentnih stanica u uzorku je bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto koja se veže na genomsku DNA i proteine stanica (Ristov i sur., 2007). Mrtve stanice gube sposobnost adherencije i stoga će biti izuzete iz populacije stanica tijekom provođenja metode reducirajući intenzitet obojenja. Metoda je stoga poželjna za brzi probir utjecaja određenih spojeva na preživljenje stanica, ali n mjeri promjenu njihove metaboličke aktivnosti pa nije pogodna za praćenje brzine proliferacije stanica (Aslantürk, 2018).

Luminometrijski testovi koriste se za brzu i jednostavnu detekciju proliferacije stanica i citotoksičnog učinka tvari na stanice. Tako se bioluminiscentnim metodama može kvantificirati ATP prisutan u svim metabolički aktivnim stanicama koristeći primjerice enzim luciferazu koja u reakciji ATP-a i luciferina u prisutnosti magnezijevih iona katalizira nastanak luminiscentnog signala proporcionalnog koncentraciji ATP-a, odnosno broju živih stanica (Weyermann i sur., 2005). Naime, oštećene stanice gube sposobnost sinteze ATP-a i njegova razina u stanici naglo opada jer endogene ATP-aze troše preostali ATP. ATP test je najbrži i najosjetljiviji test za procjenu vijabilnosti stanica jer izostavlja inkubacijski korak pretvorbe supstrata u obojeni produkt (Niels i sur., 2009). Luminometrijski test stanične vijabilnosti u realnom vremenu, koristi luciferazu i luciferazni prosupstrat. Prosupstrat se reducira u supstrat samo u živim stanicama, i kao takav stupa u interakciju s luciferazom odašiljući luminiscentni signal proporcionalan broju živih stanica. Međutim, duljina trajanja signala koja odgovara broju vijabilnih stanica ovisi o njihovoj metaboličkoj aktivnosti, stoga je potrebno empirijski odrediti vrijednosti za svaki stanični tip i koncentraciju stanica (Duellman i sur., 2015).

Pri mjerenju citotoksičnog učinka neke tvari *in vitro* potrebno je uzeti u obzir na čemu se određena metoda temelji, odnosno koji su potencijalni mehanizmi djelovanja ispitivanog spoja. Svaka od metoda ima svoje prednosti i nedostatke, a za pojedini modelni sustav potrebno je odabrati odgovarajuću metodu imajući u vidu dostupnost materijala i opreme te trajanje, sigurnost, pouzdanost, učinkovitost, zahtjevnost i ekonomsku isplativost postupka. Stoga je poželjno koristiti najmanje dvije različite metode kako bi se povećala pouzdanost dobivenih rezultata (Aslantürk, 2018; Ristov i sur., 2007).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog diplomskog rada ispitati citotoksični učinak četiri novosintetizirana hidroksiimino-metil imidazolijeva bromida na stanice raka prostate PC-3 sa svrhom utvrđivanja njihove potencijalne primjene u antitumorskoj terapiji.

Specifični ciljevi ovoga diplomskog rada su:

1. Ispitati utjecaj imidazolijevih spojeva na promjenu vijabilnosti stanica PC-3 kolorimetrijskom MTS metodom
2. Ispitati narušavaju li imidazolijevi spojevi integritet stanične membrane stanica PC-3 te tako uzrokuju staničnu smrt nekrozom pomoću metode bazirane na ispuštanju laktat dehidrogenaze iz stanica
3. Ispitati pokreću li imidazolijevi spojevi programiranu staničnu smrt, odnosno apoptozu stanica PC-3 i kvantitativno odrediti udio stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te ukupan udio mrtvih stanica u uzorcima metodom protočne citometrije

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije, materijali i ostalo

##### 3.1.1. Kemikalije, otopine i reagensi

- **Dimetil-sulfoksid (99 % (v/v) DMSO, Kemika, Zagreb)** – koristila sam za pripremu otopina oksima.
- **Paraformaldehid (PFA) (4 % (v/v), Sigma Aldrich, Njemačka)** – koristila sam kao pozitivnu kontrolu za određivanje promjene vijabilnosti stanica i aktivacije procesa regulirane smrti stanice.
- **Triton X-100 (Sigma Aldrich, Njemačka)** – koristila sam u koncentraciji od 0,18 % kao sredstvo za permeabilizaciju stanične membrane.
- **Otopina boje tripan plavo (Sigma Aldrich, Njemačka)** – koristila sam u koncentraciji od 0,4 % za određivanje broja živih i broja mrtvih stanica.
- **Fosfatni pufer (PBS, pH 7,4)** – pripremila sam kao 10x koncentriranu otopinu, autoklavirala i pohranila u sterilnim uvjetima do korištenja. Prije korištenja pripremila sam otopinu PBS-a 1x razrjeđenjem sterilnom deioniziranom vodom.

Za određivanje učinaka ispitivanih spojeva na stanice PC-3 koristila sam komercijalno dostupne kitove:

- **CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, SAD)** – koristila sam za određivanje vijabilnosti stanica.
- **CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit (Promega, SAD)** – koristila sam za određivanje integriteta membrane.
- **The Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (Luminex Corporation, SAD)** – koristila sam za određivanje aktivacije procesa regulirane smrti stanice.

##### 3.1.2. Imidazolijevi spojevi

Imidazolijevi spojevi sintetizirani su na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ines Primožić (opisano u radu

Katalinić i sur., 2016). Piridinijev spoj HI-6 sintetiziran je u Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Češka Republika pod vodstvom dr. sc. Kamila Kuče (Musilek i sur., 2009) te je korišten kao negativna kontrola. Njihove su kemijske strukture i IUPAC imena prikazani u Tablici 1 i Tablici 2. Otopine spojeva IV i VI pripremila sam u destiliranoj vodi u koncentraciji  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok sam otopine spojeva VII i X pripremila u DMSO u koncentraciji  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Otopinu spoja HI-6 pripremila sam u destiliranoj vodi u koncentraciji  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Otopine su čuvane na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  do provedbe pokusa. Prije upotrebe otopine sam zagrijala do sobne temperature te ih dalje serijski i razrjeđivala u hranjivom mediju za uzgoj stanica. Spojeve sam testirala u rasponu koncentracija  $6,25 - 800 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

**Tablica 1.** Kemijske strukture i IUPAC imena ispitivanih imidazolijevih oksima.

Oksim	Kemijska struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
IV		1-butil-3-(4-klorobenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]-imidazolijev bromid
VI		1-(but-3-en-1-il)-3-(4-klorobenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]-imidazolijev bromid
VII		1,3-bis(4-klorobenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]-imidazolijev bromid
X		3-(4-klorobenzil)-2-[(hidroksiimino)metil]-1-(4-metilbenzil)-imidazolijev bromid

**Tablica 2.** Kemijska struktura i IUPAC ime piridinijevog oksima HI-6.

Oksim	Kemijska struktura	IUPAC kemijsko ime spoja
HI-6		4-karbamoil-1-[(2-[(hidroksiimino)metil]piridinio}metoksi)metil]piridinijev diklorid

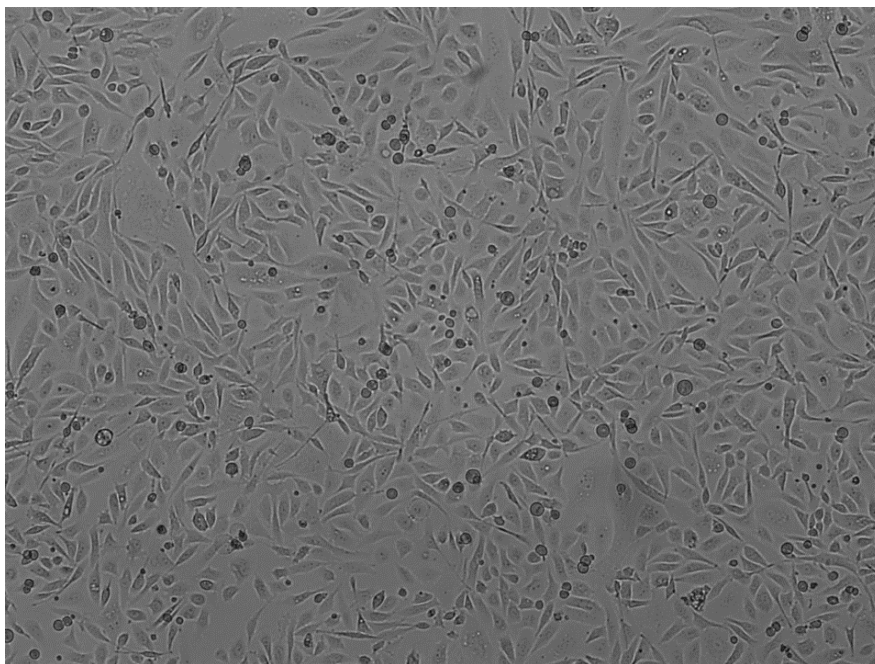
### 3.1.3. Uređaji korišteni za pokusna mjerenja

- **TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, SAD)** – koristila sam za određivanje broja živih i mrtvih stanica u suspenziji
- **Čitač mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska)** – na njemu sam provela spektrofotometrijska i fluorescencijska mjerenja
- **Guava® Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, SAD)** – koristila sam za specifično određivanje aktivacije programirane stanične smrti. Uređaj je baziran na protočnoj citometriji.

## 3.2. Stanična kultura

Stanice raka prostate PC-3 kupljene su u banci certificiranih staničnih kultura ECACC (ECACC 90112714, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska) i pohranjene u spremnik s tekućim dušikom. Stanice sam uzgajala kao jednoslojnu adherentnu kulturu (Slika 3) u posudama za uzgoj (T-bočice, Petrijeve zdjelice i pločice s bunarićima) u hranjivom mediju RPMI (*Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, Ujedinjeno Kraljevstvo) uz dodatak 7 % fetalnog govedeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1 % otopine antibiotika penicilina i streptomicina (Pen-Strep, Sigma-Aldrich, Njemačka) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Sve postupke staničnog uzgoja izvodila sam u sterilnim uvjetima u kabinetu za sterilni rad (laminar) s okomitim protokom zraka. Prilikom rada u staničnoj kulturi

koristila sam rukavice prethodno sterilizirane 75 %-nim etanolom te sam koristila jednokratne sterilne plastične pipete, mikropipete, sterilne plastične nastavke za mikropipete i sterilne epruvete.



**Slika 3.** Stanice PC-3 uzgajane kao jednoslojna kultura. Slika je dobivena pod svjetlosnim mikroskopom pri ukupnom povećanju 100x.

### 3.2.1. Presađivanje stanica

Stanice sam presađivala kada bi dosegle oko 80 % ispunjenosti prostora posuda za uzgoj (konfluentnosti), otprilike svaka tri do četiri dana. Nakon što sam pod mikroskopom provjerila konfluentnost stanica, u laminaru sam sterilnom staklenom pipetom odsisala medij iznad stanica te ih potom isprala fosfatnim puferom (PBS) (Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se uklonili ostaci seruma koji inhibiraju djelovanje proteaze tripsina. Za odvajanje stanica od podloge, odnosno dobivanje stanične suspenzije, koristila sam otopinu 0,25 %-tnog tripsina i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; *Sigma-Aldrich*, Njemačka) koju sam inkubirala na stanicama nekoliko minuta. Tripsin se primjenjuje zbog proteazne aktivnosti koja omogućuje odvajanje stanica jedne od druge i odvajanje stanica od podloge na kojoj rastu što rezultira pojedinačnim stanicama u suspenziji te se može dodatno provjeriti pod invertnim mikroskopom. Zatim sam promiješala stanice u mediju sa serumom (zagrijanom na 37 °C) i nasadila na mikrotitarske pločice u odgovarajućem broju za provedbu pokusa.



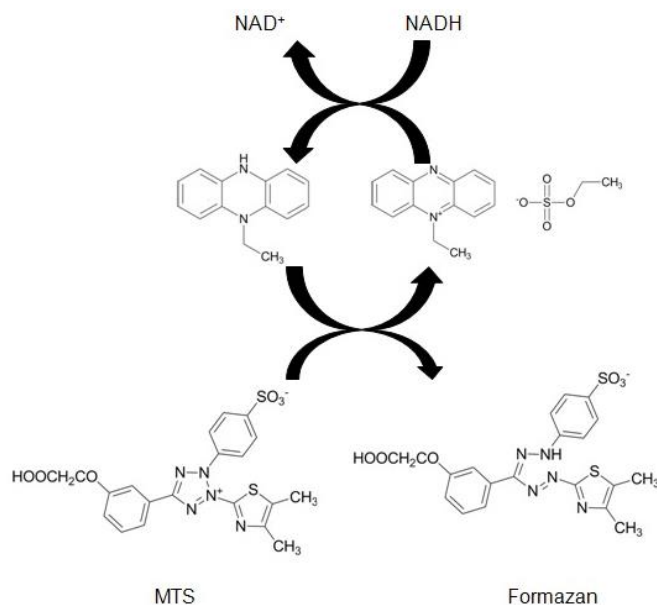
### **3.2.2. Brojanje stanica**

Određivanje broja stanica u pokusima važno je kako bi rezultati bili reproducibilni. Stoga sam prije svakog pokusa prebrojala stanice kako bih od ukupnog broja stanica izračunala broj stanica koji je potreban za pokus. Za brojanje stanica koristila sam otopinu boje tripan plavo (Sigma Aldrich, Njemačka). Boja ne ulazi u žive stanice koje ju aktivno izbacuju putem membranskih pumpi te žive stanice ostaju neobojene. Suprotno, mrtve stanice čije su membrane izgubile svoju cjelovitost nakupljaju boju pa pokazuju tamno plavo obojenje (Ristov i sur., 2007). Diferencijalno bojanje provela sam prema protokolu proizvođača automatskog brojača stanica TC20™. U mikroepreveti sam pomiješala 20 µL nerazrijeđene suspenzije stanica i 20 µL 0,4 % otopine boje tripan plavo te sam 10 µL smjese otpipetirala u komoricu pločice za brojanje (Cell Counting Slides, BioRad, SAD) i postavila u brojač stanica. Rezultat brojanja uređaj prikazuje kao ukupan broj stanica po mL te kao postotak živih stanica u uzorku. Prema vrijednosti broja stanica po mL, staničnu sam suspenziju dalje razrijeđivala za potrebe pokusa i održavanje stanične linije.

### **3.3. Stanični testovi *in vitro***

#### **3.3.1. Određivanje citotoksičnosti praćenjem promjene vijabilnosti stanica**

MTS test je standardna kolorimetrijska metoda za utvrđivanje broja živih stanica. Test se temelji na redukciji tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) žute boje u formazanski produkt smeđe boje. Reakcija je potpomognuta transferom elektrona druge komponente komercijalnog kita, akceptora elektrona fenazin etosulfata (PES). PES ulazi u stanicu i reducira se staničnim dehidrogenazama koje koriste NADH ili NADPH kao kofaktore, a aktivne su samo u živim stanicama (Chan i sur., 2013). Transformirani PES zatim reducira MTS u konačni produkt formazan, topiv u staničnom mediju te je nastalo obojenje kvantificirano mjerenjem apsorbancije na čitaču mikrotitarskih pločica pri 490 nm (Slika 4).



**Slika 4.** Kemijske strukture komponenata MTS testa: fenazin etosulfat (PES), MTS i formazan u reakciji u kojoj PES prenosi elektrone iz NADH u citoplazmi i reducira MTS u toplivi formazanski produkt (preuzeto i prilagođeno iz Riss i sur. (2019)).

Stanice PC-3 nasadila sam na pločice od 96 bunarića (BrandTech Scientific, SAD) u koncentraciji  $1 \times 10^5$  stanica/mL i inkubirala preko noći da se prihvate za podlogu. Idući sam dan u pločici s 96 bunarića volumena 2 mL pripremila razrijeđenja spojeva u hranjivom mediju za tretman stanica u triplikatu (Tablica 3). Nakon 24 h od nasađivanja stanica, uklonila sam medij iznad stanica te ih tretirala otopinom određenog spoja, 8 serijski razrijeđenih koncentracija počevši od 800 pa do  $6,25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

Stanice sam inkubirala s imidazolijevim spojevima pri kontroliranim uvjetima kroz 3 različita vremenska razdoblja: 1 h, 4 h i 24 h. Nakon što je vrijeme određene inkubacije prošlo, uklonila sam medij te su stanice isprane puferom PBS kako bi se uklonili ispitivani spojevi. Potom sam dodala otopinu čistog medija bez seruma i reagensa *CellTiter 96® AQueous One Solution* u omjeru 5:1 te inkubirala na  $37^\circ\text{C}$  1-3 h, odnosno do razvitka smeđeg obojenja. Apsorbanciju sam mjerila pri 490 nm na spektrofotometrijskom čitaču mikrotitarskih pločica. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je broju metabolički aktivnih stanica u bunariću. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam 4 % paraformaldehid, a kao negativnu HI-6 u serijskim razrijeđenjima  $6,25 - 800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

**Tablica 3.** Shema pločice sa serijskim razrijeđenjima spojeva. Crtice (-) označavaju prazne bunariće (M - medij, i.p. – iz prethodnog bunarića).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	<b>IV</b> → 800 µM 920 µL M + 80 µL 10 mM spoja	400 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	200 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	100 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	50 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	25 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	12,5 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	6,25 µM 500 µL M + 500 µL i.p.	Kontrola 500 µL M	PFA 4% 480µL M + 20µL PFA	-
C	-	<b>VI</b> → 920 µL M + 80 µL 10 mM spoja	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M	480µL M + 20µL PFA	-
D	-	<b>VII</b> → 992 µL M + 8 µL 100 mM spoja	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M	-	-
E	-	<b>X</b> → 992 µL M + 8 µL 100 mM spoja	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M	-	-
F	-	<b>HI-6</b> → 992 µL M + 8 µL 100 mM spoja	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M	-	-
G	-	<b>DMSO</b> → + 8 µL 99% otopine spoja	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M + 500 µL i.p.	500 µL M	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Postotak inhibicije vijabilnosti stanica PC-3 izračunala sam u odnosu na netretirane kontrolne stanice, pri čemu sam od dobivenih apsorbancija oduzela apsorbanciju slijepe probe (bunarić bez stanica, samo otopina medija i regensa) prema formuli:

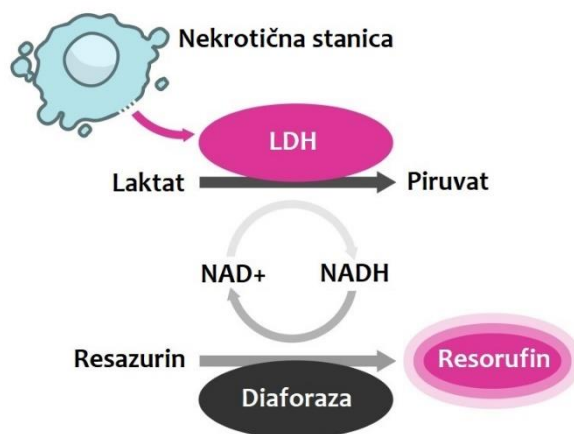
$$\text{Inhibicija vijabilnosti stanica (\%)} = 100 - \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica} - \text{apsorbancija slijepe probe}}{\text{apsorbancija netretiranih stanica} - \text{apsorbancija slijepe probe}} \cdot 100$$

Izračune sam radila u programu Microsoft Excel. Dobivene vrijednosti prikazala sam kao krivulju ovisnosti postotka nevijabilnih stanica o logaritmu ispitivanog koncentracijskog raspona spojeva. Krivulju sam radila pomoću programa GraphPad Prism 8.4. te sam odredila vrijednosti IC<sub>50</sub> za svaki spoj i svaku vremensku točku. IC<sub>50</sub> (engl. *inhibitory concentration*) jest koncentracija pri kojoj spoj inhibira rast 50% stanica u uzorku.

### 3.3.2. Određivanje integriteta stanične membrane

Narušavanje integriteta stanične membrane imidazolijevim spojevima utvrdila sam mjerenjem prisutnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) ispuštenog iz citoplazme u stanični medij. LDH u stanici katalizira konverziju piruvata u laktat, stoga je detekcija LDH u staničnom mediju naznaka oštećenja stanične membrane povezanog s pucanjem stanice prilikom stanične smrti uzrokovane nekrozom. U komercijalnom kitu koji sam koristila za ovaj test (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay) nalaze se sljedeći supstrati u suvišku: piruvat, NAD<sup>+</sup> i diaforaza kako bi omogućili da se reakcija odvije relativno brzo, tijekom 10 minuta (<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-one-homogeneous-membrane-integrity-assay-protocol.pdf?la=en>). Naime, LDH koji je ispušten iz nekrotične stanice, u staničnom mediju katalizira konverziju laktata u piruvat i u tom procesu nastaje NADH koji dalje služi kao kofaktor za redukciju resazurina u fluorogeni resorufin u prisutnosti enzima diaforaze (Slika 5) (Riss i sur., 2019). Porast

fluorescentnog signala odgovara aktivnosti LDH te sam ga detektirala mjerenjem na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini ekscitacije od 560 nm i emisije od 590 nm.



**Slika 5.** Shematski prikaz komponenta testa baziranog na ispuštanju LDH. LDH koji je ispušten iz nekrotične stanice u stanični medij katalizira konverziju laktata u piruvat i u tom procesu nastaje NADH. NADH dalje služi kao kofaktor za redukciju rezazurina u fluorogeni resorufin u prisutnosti enzima diaforaze (preuzeto i prilagođeno iz Riss i sur. (2019)).

Dan prije pokusa nasadila sam stanice ( $1 \times 10^5$  stanica/mL) u bijele mikrotitarske pločice s 96 bunarića s prozirnim dnom (BrandTech Scientific, SAD). Nakon 24 sata maknula sam medij iznad stanica te stanice tretirala otopinama spojeva u staničnom mediju bez FBS-a, u 5 koncentracija:  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Stanice sam inkubirala s imidazolijevim spojevima tijekom 3,5 h pri kontroliranim uvjetima ( $37^\circ\text{C}$  i  $5\% \text{CO}_2$ ) nakon čega su 30 minuta stajale na sobnoj temperaturi. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Njemačka) konačne koncentracije  $0,18\%$  te sam ga dodala u predviđene bunariće 5 minuta prije dodatka reagensa. Potom sam u svaki bunarić dodala reagens, protresla pločicu na tresilici mikrotitarskih pločica 30 sekundi, inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi te izmjerila signal pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Rezultate sam prikazala kao postotak ispuštenog LDH u odnosu na pozitivnu kontrolu, odnosno maksimalno ispušten LDH iz stanica tretiranih Tritonom X-100.

### 3.3.3. Određivanje indukcije apoptoze

Uređajem Guava® Muse® Cell Analyzer baziranim na detekciji signala protočnom citometrijom provela sam kvantitativnu analizu stanične smrti. Pomoću komercijalnog kita Muse® Annexin V & Dead Cell odredila sam udio živih stanica, udio stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te ukupan udio mrtvih stanica u uzorcima stanica tretiranim ispitivanim imidazolijskim spojevima. Navedeni kit sadrži reagense Annexin V i 7-aminoaktinomycin D (7-AAD). 7-AAD je fluorescentni spoj koji se interkalira u dvolančanu DNA s visokim afinitetom za GC bogate regije. Da bi ušao u stanicu, stanična membrana mora biti oštećena, stoga neće ulaziti u intaktne žive stanice, niti one ranoapoptotične, zbog čega se koristi kao marker za mrtve stanice i pokazatelj je integriteta stanične membrane (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1310#/A1310>). Annexin V je fosfolipid-vezujući protein s visokim afinitetom za fosfatidilserin (PS). PS je komponenta stanične membrane koja se u ranoj apoptozi premiješta s unutarnje strane plazmatske membrane na vanjsku površinu gdje može biti detektirana vezanjem Annexina V (Slika 6) (Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, 2019).

Primjenom ove metode mogu se razlikovati četiri populacije stanica u uzorku:

- a) žive stanice: Annexin V-negativne i 7-AAD-negativne
- b) rano apoptotične stanice: Annexin V-pozitivne i 7-AAD-negativne
- c) kasno apoptotične i mrtve stanice: Annexin V-pozitivne i 7-AAD-pozitivne
- d) raspadnute stanice: Annexin V-negativne i 7-AAD-pozitivne



**Slika 6.** Vežanje Annexina V na promijenjenu staničnu membranu apoptotičnih stanica. Molekule fosfatidilserina (crveno) premiještaju se na vanjsku površinu stanične membrane gdje se za njih veže fluorescentno obilježeni Annexin V (zeleno, žuto) (preuzeto i prilagođeno iz Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, 2019).

Za pokus sam nasadila stanice u koncentraciji  $3 \times 10^4$  stanica/mL na prozirne pločice s 12 bunarića (BrandTech Scientific, SAD). Nakon 48 h odsisala sam medij iznad stanica te ih tretirala spojevima (otopljenim u hranjivom mediju) u koncentraciji koja unutar 4 sata inhibira 20 – 25 % rasta stanica

( $\approx$  IC<sub>20-25</sub>), odnosno u LOAEL (engl. *low observed adverse effect level*) koncentraciji koju sam izračunala za svaki spoj iz prethodno provedenog testa citotoksičnosti. Odabrane su koncentracije od 400  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  za spojeve IV i VI te 200  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  za spojeve VII i X. Stanice su tretirane s otopinama spojeva 4 sata pri kontroliranim uvjetima (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>). Potom sam stanice isprala puferom PBS i tripsinizirala, u svaki bunarić dodala kompletan medij sa sniženim udjelom seruma (RPMI + 2% FBS) kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina te suspenziju stanica prebacila u mikroeprevete. Prema preporuci proizvođača, prebacila sam 80  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije u novu mikroeprevetu te joj dodala 100  $\mu\text{L}$  reagensa za detekciju i 20 minuta inkubirala na sobnoj temperaturi u tami. Pomoću uređaja Guava® Muse® Cell Analyzer detektirala sam promjene na stanicama praćenjem fluorescentnih proba mikrokapilarnom citometrijom. Parametre analize podesila sam uz pomoć negativne (netretirane stanice) i pozitivne (4 % PFA) kontrole, a to su: 1) prag veličine stanica koje se analiziraju (engl. *cell size index treshold*, vrijednost i 2) stanična populacija od interesa (engl. *population profile*). Po jednom mjerenju analizirano je minimalno 4000 stanica. Pokus sam provela tri puta (svaki u duplikatu). Rezultate sam prikazala kao postotak stanica u pojedinim fazama stanične smrti u odnosu na netretirane stanice.

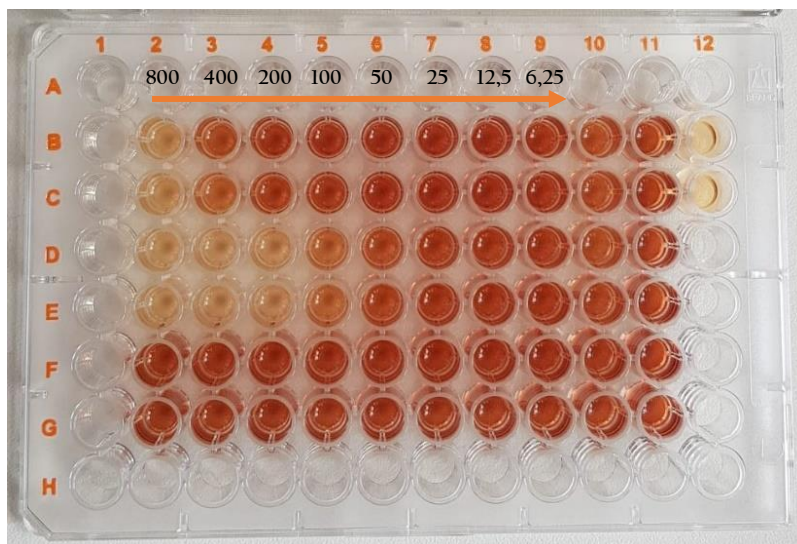
### 3.4. Statistička obrada podataka

Statističke analize provela sam u programu GraphPad Prism (verzija 8, GraphPad Software, SAD). Koristila sam jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) s višestrukim usporedbama ( $\alpha = 0,05$ ) radi provjere razlike među skupinama te Dunettov test za određivanje integriteta membrane i za aktivaciju apoptoze. Statističku značajnost prikazala sam na sljedeći način: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Pokusi su provedeni tri puta (svaki najmanje u duplikatu).

## 4. REZULTATI

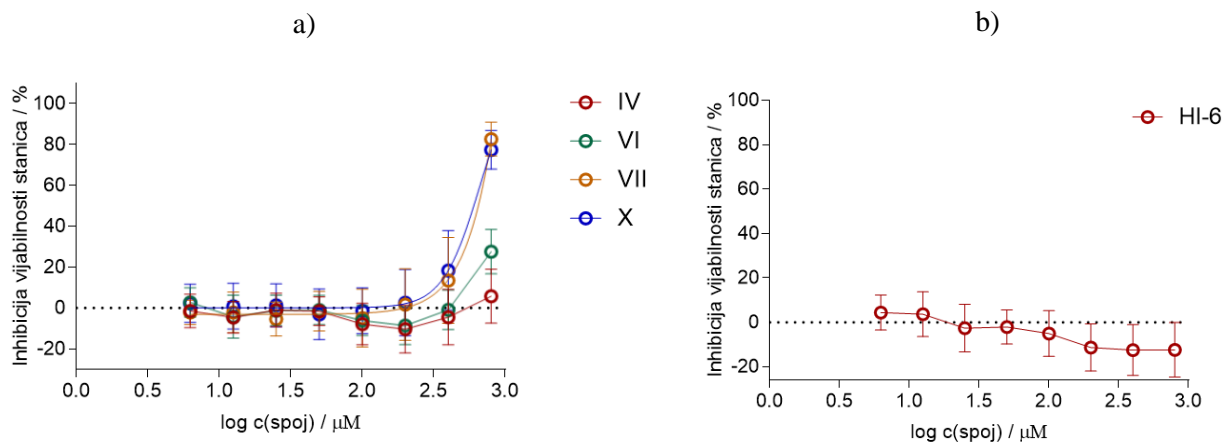
### 4.1. Citotoksičnost ispitivanih spojeva

U svrhu određivanja citotoksičnog učinka ispitivanih spojeva na staničnu liniju PC-3 mjerena je inhibicija metaboličke aktivnosti stanica kolorimetrijskim testom MTS. Stanice su izložene spojevima u vremenskim razdobljima od 1 h, 4 h i 24 h u koncentracijskom rasponu 6,25 - 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  koji je izabran kao fiziološki bitan prema koncentracijama spojeva koji su korišteni u prijašnjim *in vitro* ispitivanjima (Katalinić i sur., 2016; Zandona i sur., 2021). Na Slici 7 vidljiva je redukcija tetrazolijeve soli u formazan, popraćena promjenom boje reagensa iz žute u smeđu u živim stanicama, što je zatim spektrofotometrijski izmjereno. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 8, 9 i 10 (a) kao postotak inhibicije vijabilnosti stanica u ovisnosti o logaritmu koncentracije ispitivanog spoja nakon 1 h, 4 h ili 24 h. Rezultati za spoj HI-6 (negativna kontrola) prikazani na Slikama 8, 9 i 10 (b) po istom principu, u ovisnosti o periodu izloženosti stanica spojevima. Negativna kontrola koristi se kako bi bili sigurni da je citotoksični učinak isključivo posljedica djelovanja ispitivanih spojeva, a ne nekog drugog faktora poput zagađenja kulture, nedostatka hranjivih tvari u mediju i sl. Dakle, kao negativna kontrola koristi se spoj za koji se očekuje da neće imati citotoksični učinak na stanice.

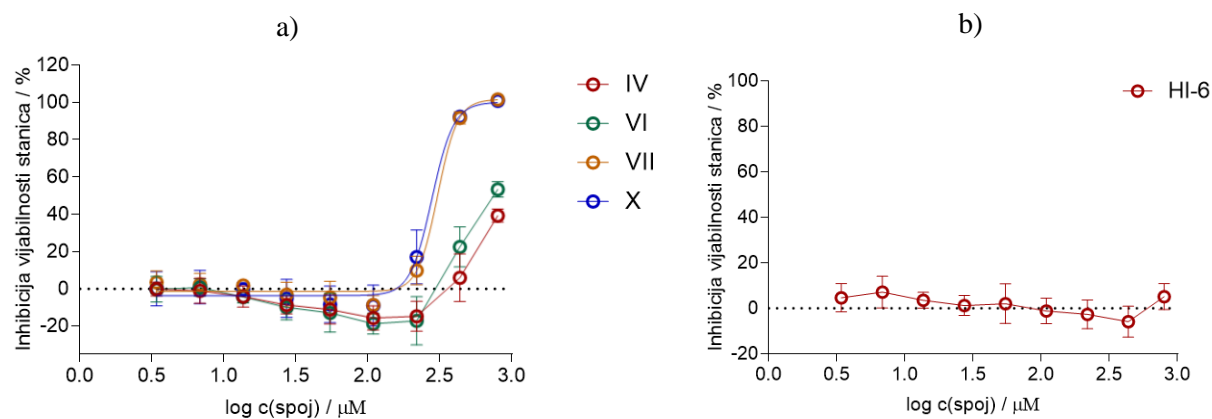


**Slika 7.** Fotografija reprezentativne pločice s 96 bunarića nakon provedenog testa MTS na stanicama PC-3 nakon izloženosti imidazolijevim spojevima tijekom 24 h. Koncentracije ispitivanih spojeva serijski se smanjuju od najveće (u drugom stupcu ( $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ )) do najniže ( $6,25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) u devetom stupcu). Promjena boje reagensa iz žute u smeđu vidljiva je kod metabolički aktivnih stanica (pri nižim koncentracijama spojeva), dok se boja ne mijenja kod stanica kojima je vijabilnost inhibirana (pri višim koncentracijama spojeva).

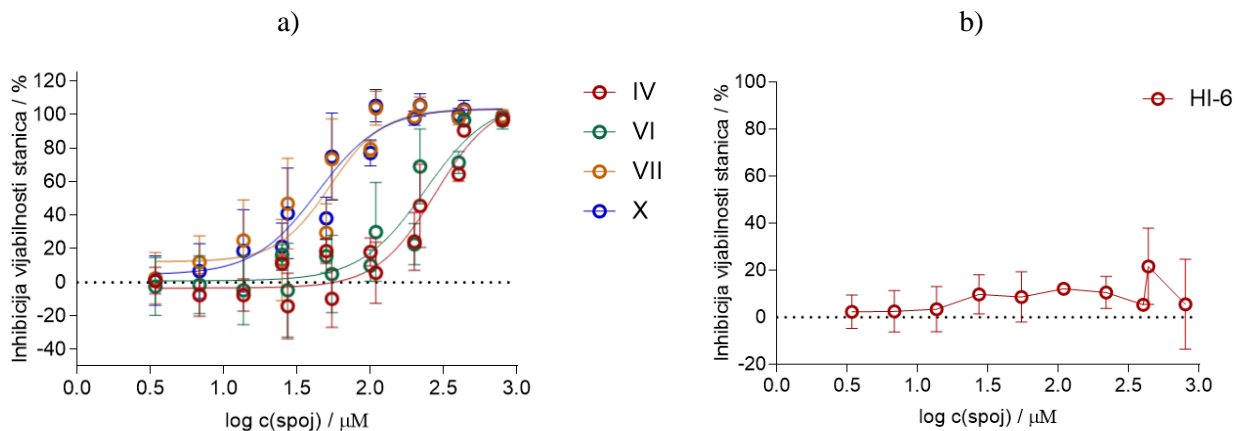




**Slika 8.** Inhibicija vijabilnosti stanica PC-3 (%) uslijed koncentracijski-ovisnog tretmana a) imidazolijevima spojevima (IV, VI, VII, X) b) spojem HI-6 (negativna kontrola). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ( $\pm$  standardna devijacija) inhibicije vijabilnosti stanica (7 replika) nakon 1 sata inkubacije u ovisnosti o logaritmu koncentracije spoja



**Slika 9.** Inhibicija vijabilnosti stanica PC-3 (%) uslijed koncentracijski-ovisnog tretmana a) imidazolijevima spojevima (IV, VI, VII, X) b) spojem HI-6 (negativna kontrola). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ( $\pm$  standardna devijacija) inhibicije vijabilnosti stanica (5 replika) nakon 4 sata inkubacije u ovisnosti o logaritmu koncentracije spoja.



**Slika 10.** Inhibicija vijabilnosti stanica PC-3 (%) uslijed koncentracijski-ovisnog tretmana a) imidazolijevim spojevima (IV, VI, VII, X) b) spojem HI-6 (negativna kontrola). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti ( $\pm$  standardna devijacija) inhibicije vijabilnosti stanica (4 replike) nakon 24 sata inkubacije u ovisnosti o logaritmu koncentracije spoja.

Kao pozitivnu kontrolu koristila sam 4 % paraformaldehid koji je u svim pokusima pokazao citotoksičnost  $\geq 94$  %. DMSO je korišten kao organsko otapalo za spojeve VII i X zbog njihove slabije topivosti u vodi te je stoga ispitan i njegov citotoksični učinak na stanice PC-3 kako bi se provjerilo utječe li već i samo otapalo na vijabilnost stanica. Konačni postotak DMSO-a u pokusima bio je od 0,006 % do 0,8 % te je njegov utjecaj na vijabilnost stanica u tom postotku bio zanemariv.

Vrijednosti  $IC_{50}$  ispitivanih spojeva, odnosno koncentracije pri kojima se inhibira rast 50 % stanica, određene su praćenjem vijabilnosti stanica nakon tretmana izloženosti od 1, 4 i 24 h. Vrijednosti su očitane iz krivulja ovisnosti postotka živih stanica o logaritmu ispitivanih koncentracija spojeva. Dobiveni rezultati sažeto su prikazani u Tablici 4 za svaki spoj i svako vremensko razdoblje tretmana. Pojedine  $IC_{50}$  vrijednosti zapisane su kao približna vrijednost zbog nemogućnosti postizanja platoa citotoksičnog profila krivulje, bez kojeg se ne može odrediti točna brojčana vrijednost inhibicije. U tim tretmanima maksimum profila postigao bi se pri znatno većim koncentracijama od testiranih.

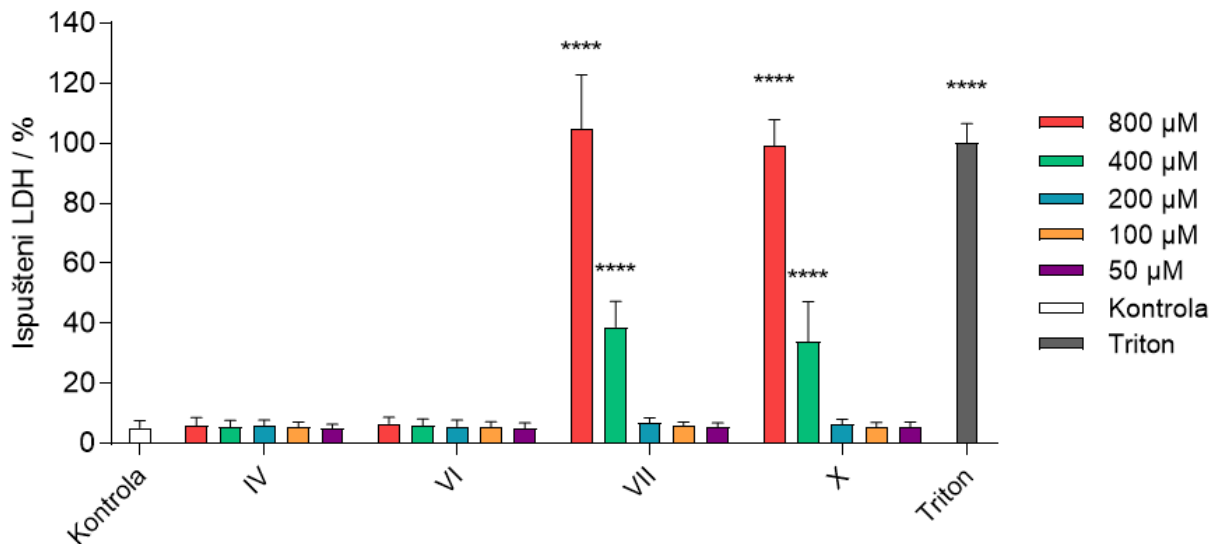
**Tablica 4.** IC<sub>50</sub> vrijednosti ispitivanih imidazolijevih spojeva (IV, VI, VII, X) nakon izloženosti stanica PC-3 u trajanju od 1, 4 i 24 h. Vrijednosti su izražene u  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ .

IC <sub>50</sub>	1h	4h	24h
IV	$\geq 800$	$\geq 800$	263
VI	$\geq 800$	$\geq 800$	219
VII	661	309	46
X	589	275	43

Prema dobivenim rezultatima za daljnja testiranja izračunate su koncentracije spojeva koje u određenom razdoblju inkubacije neće uzrokovati smrt stanice, ali će pokrenuti mehanizme toksičnosti. Odabrano je vremensko razdoblje od 4 h i koncentracija svakog spoja koja inhibira 20–25 % rasta stanica ( $\approx \text{IC}_{20-25}$ ) odnosno tzv. LOAEL koncentracija koja iznosi približno 400  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  za spojeve IV i VI, te 200  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  za spojeve VII i X.

## 4.2. Integritet stanične membrane nakon izloženosti ispitivanim spojevima

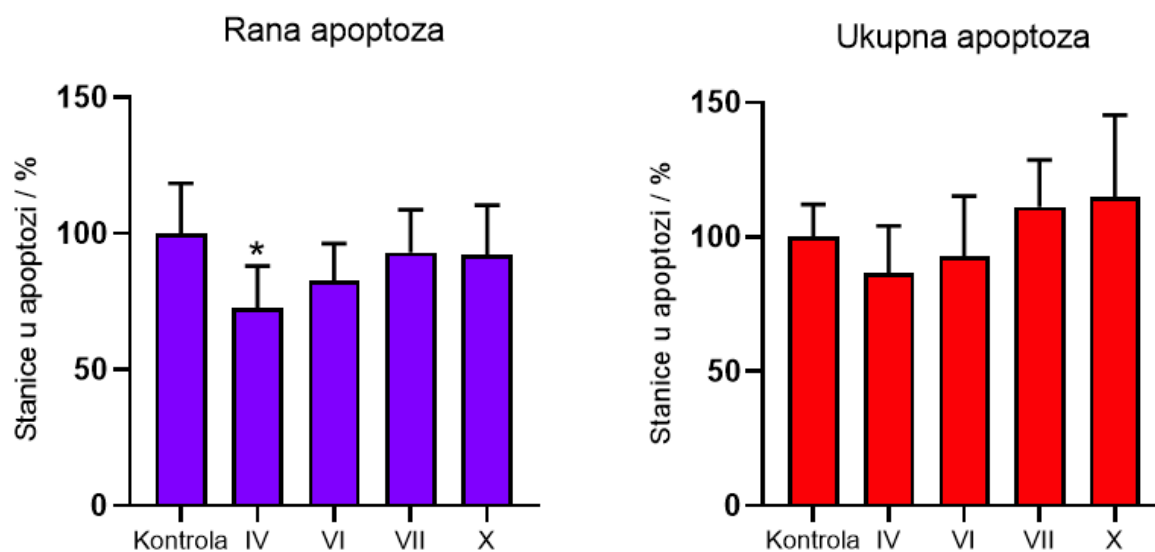
Integritet stanične membrane stanica PC-3 praćen je neposredno pomoću aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) ispuštene iz stanica u medij nakon 4-satne izloženosti stanica ispitivanim spojevima. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 11. Iz prikaza se može uočiti da spojevi VII i X u koncentracijama od 400 i 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  uzrokuju statistički značajno otpuštanje LDH u medij, odnosno pod njihovim djelovanjem mijenja se integritet stanične membrane. Nasuprot tome, spojevi IV i VI ne utječu na integritet membrane.



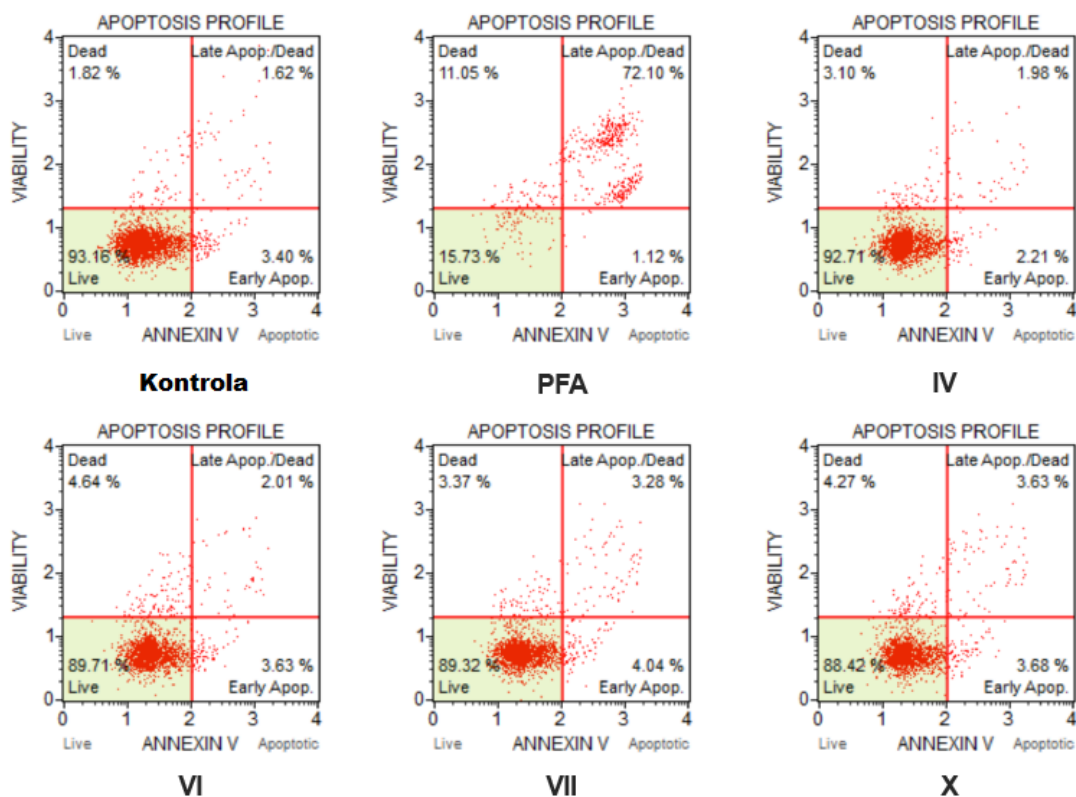
**Slika 11.** Postotak LDH ispuštenog u stanični medij nakon 4-satnog tretmana stanica PC-3 imidazolijevim spojevima (IV, VI, VII, X) u serijskom razrjeđenju 800 - 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i Tritonom kao pozitivnom kontrolom (0,18 %, 5 min.). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 6 eksperimentalno dobivenih vrijednosti ( $\pm$  standardna devijacija) ispuštenog LDH u odnosu na Triton, tj. pozitivnu kontrolu. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Kontrola – netretirane stanice.

### 4.3. Indukcija procesa stanične smrti apoptoze ispitivanim spojevima

Indukcija stanične smrti apoptozom i postotak zastupljenosti stanica u pojedinim fazama apoptoze određeni su pomoću fluorescentnih proba Annexin V i 7-AAD kod stanica PC-3 nakon 4-satne izloženosti ispitivanim spojevima. Slika 12 prikazuje dobivene rezultate kao postotak stanica u ranoj apoptozi, te ukupan postotak stanica u apoptozi (rana i kasna apoptoza) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Navedeni rezultati upućuju kako imidazolijevi oksimi ne povećavaju značajno broj stanica ni u jednoj od faza apoptoze. To je vidljivo i na prikazu profila stanica iz reprezentativnog pokusa (od ukupno tri), gdje je povećan broj apoptotičnih stanica vidljiv samo u pozitivnoj kontroli nakon tretmana s PFA (Slika 13).



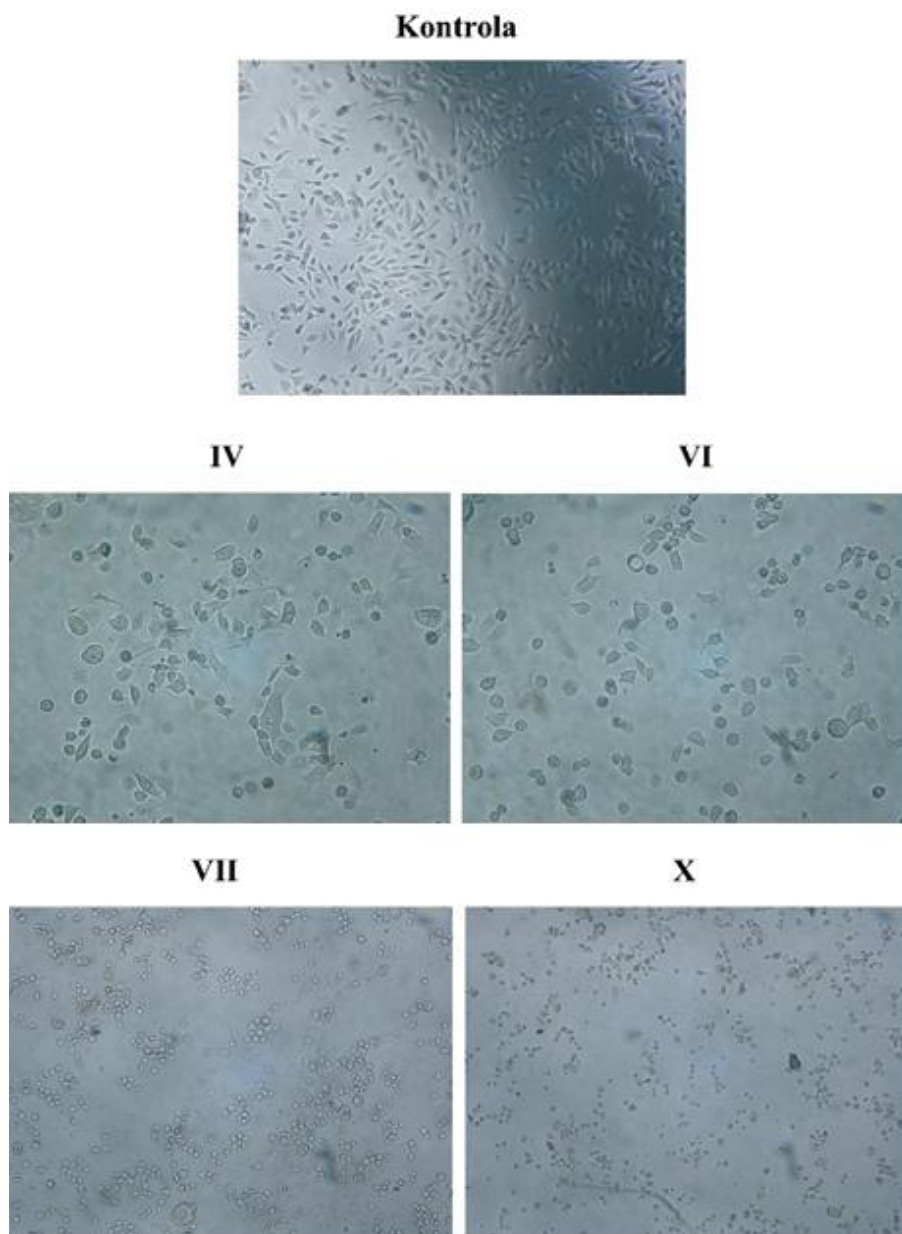
**Slika 12.** Postotak stanica PC-3 u ranoj apoptozi (lijevo) i u svim fazama apoptoze (desno). Rezultati su prikazani kao postotak od kontrole nakon 4-satnog tretmana imidazolijevim spojevima: IV i VI ( $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) te VII i X ( $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Paraformaldehid (PFA, 4 %) je korišten kao pozitivna kontrola s vrijednostima 51 % i 811 % za rano apoptozi, odnosno za ukupnu apoptozi (rezultati nisu prikazani). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 6 eksperimentalno dobivenih vrijednosti (+ standardna devijacija). Statistička značajnost u odnosu na kontrolne stanice: \*  $p < 0,05$ .



**Slika 13.** Reprezentativni profili stanica PC-3 nakon 4-satnog tretmana imidazolijevima spojevima IV, VI, VII i X, PFA (pozitivna kontrola) te korištenja kita Muse® Annexin V & Dead Cell. Crvene točke označavaju stanice detektirane uređajem. Grafički prikazi sastoje se od 4 kvadranta koji odražavaju različita stanična stanja (u postocima): gornji lijevi kvadrant sadrži mrtve (raspadnute) stanice (pozitivne samo na marker mrtvih stanica 7-AAD), gornji desni kvadrant sadrži stanice u kanoj apoptozi (pozitivne na Annexin V i 7-AAD), donji lijevi kvadrant sadrži žive stanice (negativne na oba markera) te donji desni kvadrant sadrži stanice u ranoj apoptozi (pozitivne samo na Annexin V). Kontrola – netretirane stanice; PFA – paraformaldehid.

#### 4.4. Promjena morfologije stanica nakon izlaganja ispitivanim spojevima

Morfološke promjene stanica PC-3 uočene su pod svjetlosnim mikroskopom tijekom 4-satnog tretmana imidazolijevim spojevima zbog ispitivanja integriteta stanične membrane. Najveće promjene uočene su pri najvećoj koncentraciji ( $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) te su prikazane na Slici 14. Netretirane (kontrolne) stanice su poligonalne i pojedinačne, dok su tretirane stanice postale nabubrene, zaokružene i stvorile nakupine. Uočene morfološke promjene mogle bi ukazivati na smrt stanica nekrozom.



**Slika 14.** Morfološke promjene stanica PC-3 nakon tretmana imidazolijevim spojevima. Stanice su uslikane pod svjetlosnim mikroskopom pri ukupnom povećanju 200x (kontrola, IV i VI) te 100x (VII i X) nakon 4 h tretmana s imidazolijevim spojevima IV, VI, VII i X u koncentraciji  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Kontrola – netretirane stanice.

## 5. RASPRAVA

Rak prostate jedan je od najučestalijih vrsta raka u muškaraca. Više od polovice (80%) dijagnosticiranih slučajeva raka prostate hormonski je osjetljivo i androgen-ovisno. Međutim, nakon jedne do tri godine liječenja ADT-om većina postaje androgen-neovisna (Tomek R., 2005). Neuroendokrini diferencijacija, transdiferencijacija stanica raka prostate u stanice nalik neuroendokrinima, jedna je od karakteristika raka prostate i može biti uzrokovana terapijskim agensima uključujući ADT i docetaxel te radioterapiju (Hu i sur., 2015). Stanice nalik neuroendokrinima potiču rast okolnih stanica raka što doprinosi napredovanju bolesti, stoga je potrebno razvijati lijekove kojima su mete neki od signalnih puteva i produkata ovog tipa stanica (Komiya i sur., 2009).

Razvoj lijeka je kompleksan proces koji može trajati i do 15 godina te uključuje faze otkrića potencijalnih kandidata i identifikaciju njihovih meta djelovanja (receptor, enzim, element regulacije genske ekspresije ili određeni događaj unutarstaničnih signalnih puteva). Nakon toga slijede pretklinička faza koja obuhvaća *in vitro* i *in vivo* procjene toksičnosti, farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara te naposljetku klinička faza ispitivanja na ljudima i odobrenje regulatornih tijela (Matthews i sur., 2016). Više od 90 % agenasa koji krenu u ispitivanje ne uspije zadovoljiti uvjete regulatornih agencija za korištenje u medicinske svrhe te ih najviše otpadne u ranim stadijima ispitivanja što govori o važnosti kvalitetnog ispitivanja *in vitro* (Brodiewicz i sur., 2010). Korištenje staničnih kultura pouzdan je način za brz probir velikog broja spojeva na već uspostavljenim staničnim modelima. Vodeći se načelom 3R (engl. *reduction, replacement, refinement*) nužno je eliminirati spojeve koji pokazuju neželjene učinke ili nedovoljno izražene učinke prije ispitivanja na životinjskim modelima (Jaroch i sur., 2018).

Citotoksičnost četiriju sintetiziranih imidazolijevih spojeva IV, VI, VII i X ispitana je *in vitro* i procijenjena na temelju njihove inhibicije vijabilnosti stanica raka prostate PC-3. Ispitani imidazolijevi oksimi općenito su pokazali puno veću citotoksičnost na stanice PC-3 od piridinijevog oksima HI-6, kao što je i očekivano. Naime, spoj HI-6 koristi se kao protuotrov u medicinskoj praksi te se na većini staničnih linija pokazao netoksičnim ili slabo toksičnim (Čalić i sur., 2006; Nakab i sur., 2014; Muckova i sur., 2019). Citotoksični učinak imidazolijevih spojeva ovisan je o vremenu izloženosti i njihovoj koncentraciji što se može uočiti iz  $IC_{50}$  vrijednosti koje su nakon 4 h bile 3 do 6,7 puta veće od onih zabilježenih nakon 24 h. Ispitani imidazolijevi oksimi



strukturno se razlikuju po pobočnom ogranku na imidazolijevom prstenu. Oksim IV s butilnim i oksim VI s but-3-enilnim pobočnim ogrankom nisu uzrokovali značajnu toksičnost u testiranom koncentracijskom rasponu na stanicama PC-3 nakon 1 h i 4 h, dok su nakon 24 h  $IC_{50}$  vrijednosti iznosile  $263 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , odnosno  $219 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Nasuprot tome, uvođenje aromatskog pobočnog ogranka u strukturu imidazolijevih oksima kao kod spojeva VII (4-klorbenzilni) i X (metilbenzilni) povećalo je citotoksični učinak na stanicama nakon 24 h s  $IC_{50}$  vrijednostima od  $46 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , odnosno  $43 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su u skladu s dosadašnjim istraživanjima u kojima se pokazalo da su spojevi s alifatskim supstituentima manje biološki aktivni od spojeva s aromatskim supstituentima (Li i sur., 2020). Ispitani su spojevi neutralni što predstavlja prednost pri prelasku bioloških barijera i zadržavanju u tkivima, ali je njihova topivost zbog toga slabija što treba uzeti u obzir prilikom sinteze novih derivata.

Ovaj rad prvo je istraživanje koje se bavi utjecajem novosintetiziranih imidazolijevih spojeva IV, VI, VII i X na stanice raka prostate PC-3, dok su prethodna istraživanja uključivala druge stanične linije raka: HepG2 - hepatocitni karcinom, THP1 - monocitnu leukemiju i SH-SY5Y – neuroblastom (Zandona i sur., 2021; Katalinić i sur., 2016). U tim su istraživanjima spojevi VII i X također pokazali značajniji citotoksični učinak od IV i VI (Zandona i sur., 2021; Katalinić i sur., 2016). Katalinić i suradnici testirali su linije HepG2 i THP1 u rasponu koncentracija do  $500 \mu\text{M}$  tijekom 24 h gdje su THP1 stanice u usporedbi s PC-3 pokazale sličnu osjetljivost, s  $IC_{50}$  vrijednostima za VII i X  $66 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $67 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , dok su HepG2 bile manje osjetljivije. Zandona i suradnici testirali su citotoksični učinak na staničnim linijama HepG2 i SH-SY5Y u rasponu koncentracija do  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$  nakon 1, 4 i 24 h. HepG2 stanice su se pokazale osjetljivijima od stanica neuroblastoma ( $IC_{50}$  (VII) =  $212 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ;  $IC_{50}$  (X) =  $187 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ), međutim rezultati na stanicama raka prostate iz ovog diplomskog rada pokazali su još veću osjetljivost, odnosno ispitivani spojevi su nakon 24-satnog izlaganja imali najveći citotoksični učinak na stanice PC-3. S druge strane, SH-SY5Y stanice pokazale su veću osjetljivost nakon najkraćeg perioda izlaganja (1 h) s  $IC_{50}$  vrijednostima za spojeve VII i X od  $549 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $525 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , naspram  $661 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $589 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u stanica PC-3 (Zandona i sur., 2021). Long i suradnici (2019) istraživali su učinak imidazola na vijabilnost stanica raka debelog crijeva DLD-1 i HCT-116. Test MTT provedi su pri nižim koncentracijama ( $0,5$  do  $36 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) i duljim vremenom izlaganja stanica spoju (48 h). Njihovi rezultati pokazali su da je pri najvećoj koncentraciji imidazola od  $36 \mu\text{mol dm}^{-3}$  vijabilnost stanica sa 100 % smanjena na 22 %, odnosno

28 %. Spojevi ispitivani u ovom radu pri bliskoj koncentraciji ( $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) nakon 24 h uzrokovali su smanjenje vijabilnost za prosječno 18.6 % (IV), 15,5 % (VI), 29,5 % (VII) i 38,2 % (X), odnosno postotak vijabilnih stanica bio je 81.4 % (IV), 84,5 % (VI), 70,5 % (VII) i 61,8 % (X). Može se zaključiti da imidazolijevi spojevi testirani u ovom diplomskom radu pokazuju značajno manji citotoksični utjecaj na stanice PC-3, ali treba uzeti u obzir da se u spomenutom istraživanju radi o drugoj vrsti raka, nesupstituiranom imidazolu i 24 h duljem tretmanu.

Jedan od mogućih uzroka utvrđene citotoksične aktivnosti spojeva je izazivanje stanične smrti nekrozom. Praćenjem aktivnosti LDH, markera oštećenja stanične membrane utvrđeno da spojevi VII i X, koji su pokazali najveći citotoksični učinak na stanice PC-3 uzrokuju upravo ovaj tip stanične smrti. Naime, ova dva spoja uzrokovala su značajno ispuštanje LDH u medij u koncentracijama od  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u usporedbi s kontrolom, za razliku od spojeva IV i VI kod kojih nije primjećen ovaj učinak u ispitanoj koncentracijskom rasponu. Ovi rezultati odgovaraju i opaženim morfološkim promjenama stanica nakon izlaganja ispitivanim spojevima. Naime, stanice su nakon tretmana, u odnosu na kontrolnu skupinu postale zaokružene (zbog odvajanja od staničnog supstrata) i tvorile su nakupine više takvih stanica (agregate), dok su kontrolne stanice poligonalne i pojedinačne. Ove morfološke promjene izražene su kod stanica tretiranih spojevima VII i X, što opravdava njihov veći citotoksični učinak od ostala dva spoja. Zandona i suradnici (2021) također su utvrdili značajnu aktivnost LDH pri istim koncentracijama spojeva VII i X u ispitanim tumorskim stanicama HepG2 i SH-SY5Y.

Kako spojevi IV i VI nisu pokazali indukciju stanične smrti nekrozom, željelo se ispitati hoće li njihov citotoksičan učinak rezultirati drugim oblikom stanične smrti, primjerice apoptozom (Voloshina i sur., 2020; Long i sur., 2019). Budući da apoptoza regulira nastanak i invazivnost raka, poželjno je da terapijski agens ima sposobnost izazivanja apoptoze u ciljnim stanicama. Stoga je provedena kvantitativna analiza programirane stanične smrti koja je pokazala da jedino spoj IV statistički smanjuje broj stanica u ranoj fazi apoptoze u odnosu na kontrolu. Takav bi rezultat mogao upućivati na proporcionalno povećanje stanica u kasnoj fazi apoptoze, no kako nije potkrijepljen ostalim provedenim testovima, nije uzet u daljnja razmatranja u ovom radu. Nadalje, niti jedan ispitani spoj ne povećava ukupni broj apoptotičnih stanica u odnosu na kontrolu nakon 4-satnog tretmana. Ovo je u skladu s istraživanjima Zandone i suradnika (2021) koji su utvrdili da imidazolijevi spojevi ne izazivaju apoptozu ni u drugim staničnim linijama mjerenjem aktivnosti

kaspaza 3, 8 i 9 koje nisu pokazale značajnu aktivnost nakon tretmana spojevima VII i X. Stoga možemo zaključiti da ovo nije tip stanične smrti koju ispitani imidazolijevi spojevi izazvaju. Moguće je da ispitivani spojevi induciraju staničnu smrt putem procesa autofagije, što je već pokazano u prethodnim istraživanjima (Zhang i sur., 2017; Chen i sur., 2016; Wang i sur., 2012), međutim taj učinak nismo ispitili te je u planu budućih istraživanja učinka imidazolijevih spojeva na stanicama raka prostate

Dobiveni rezultati ispitanih imidazolijevih oksima značajni su kao smjernica za buduća istraživanja te za sintezu novih, sličnih imidazolijevih analoga. Budući da su pokazali citotoksični učinak koji bi mogao upućivati na indukciju procesa nekroze stanica PC-3, spojevi VII i X imaju potencijal za nastavak ispitivanja *in vitro* kojima bi se detaljno ispitali molekularni mehanizmi njihovog djelovanja. Činjenica da većina tumorskih stanica ima poremećeno odvijanje procesa apoptoze te da ona predstavlja regulirani oblik stanične smrti koji ne izaziva upalu, čini ju važnom metom kod liječenja raka. Dakle, ispitani spojevi trebali bi biti modificirani kako bi bili pogodni kandidati za potencijalne antitumorske lijekove i specifično inducirali proces apoptoze samo kod stanica raka.

Zanimljivo je da se kombinacijom više toksičnih spojeva, stanični odgovor može povećati ili smanjiti. Ako je odgovor veći od onoga koji izaziva svaki spoj zasebno, radi se o sinergističkom učinku dvaju spojeva, dok manji odgovor smatramo antagonizmom (Timberell, 2000). Zandona i suradnici (2021) pokazali su da prilikom inkubacije stanica neuroblastoma SH-SY5Y s dvama imidazolijevim spojevima, točnije VII i X dolazi do njihovog sinergizma koji rezultira većom toksičnošću u usporedbi s pojedinačnim spojevima. Ovaj bi se učinak trebao ispitati i na stanicama PC-3 u daljnjim istraživanjima.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Ispitivani hidroksiimino-metil imidazolijevi bromidi pokazuju značajni citotoksični učinak na stanice PC-3 u ovisnosti o vremenu tretmana i koncentraciji.
2. Imidazolijevi spojevi VII i X s dva aromatska supstituenta, značajno narušavaju integritet stanične membrane kod stanica PC-3 što ukazuje na indukciju nekroze.
3. Imidazolijevi spojevi IV i VI nisu uzrokovali statistički značajno ispuštanje LDH iz stanica niti povećanje udjela stanica u apoptozi u odnosu na kontrolu što ukazuje na treći mogući mehanizam djelovanja koji treba potvrditi u daljnjim istraživanjima.
4. Budući da sva četiri ispitana imidazolijeva spoja ne izazivaju staničnu smrt apoptozom trebali bi biti modificirani kako bi bili pogodni za daljnja ispitivanja kao potencijalni antitumorski lijekovi u razvoju novih terapija liječenja raka prostate.

## 7. LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2018). Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, str. 324-326.

Ali, I., Lone, M. N., Aboul-Enein, H. Y. (2017). Imidazoles as potential anticancer agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 8(9), 1742-1773 .

Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(3-4), 325-331.

Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2, 64-80.

Barnard, E. A., Stein, W. D. (1958). The roles of imidazole in biological systems. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 20, 51-110.

Biersack, B., Muthukumar, Y., Schobert, R., Sasse, F. (2011). Cytotoxic and antivasular 1-methyl-4-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-5-(halophenyl)-imidazoles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(21), 6270-6273.

Brodniewicz, T., Gryniewicz, G. (2010). Preclinical drug development. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(6), 578-585.

Cabeza, M., Posada, A., Sánchez-Márquez, A., Heuze, Y., Moreno, I., Soriano, J., Garrido, M., Cortes, F., Bratoeff, E. (2016). Biological activity of pyrazole and imidazole-dehydroepiandrosterone derivatives on the activity of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(1), 53-62.

Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(1), 43-58.

Chan, G. K. Y., Kleinheinz, T. L., Peterson, D., Moffat, J. G. (2013). A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PloS one*, 8(5), e63583.

Chen, H., Sun, Y., Wu, C., Magyar, C. E., Li, X., Cheng, L., Yao, J., Shen, S., Osunkoya, A. O., Liang, C., Huang, J. (2012). Pathogenesis of prostatic small cell carcinoma involves the inactivation of the P53 pathway. *Endocrine-related cancer*, 19(3), 321.

Chen, J., Li, C. M., Wang, J., Ahn, S., Wang, Z., Lu, Y., Dalton, J. T., Miller, D. D., Li, W. (2011). Synthesis and antiproliferative activity of novel 2-aryl-4-benzoyl-imidazole derivatives targeting tubulin polymerization. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(16), 4782-4795.

Chen, J., Wang, Z., Li, C. M., Lu, Y., Vaddady, P. K., Meibohm, B., Dalton, J. T., Miller, D. D., Li, W. (2010). Discovery of novel 2-aryl-4-benzoyl-imidazoles targeting the colchicines binding site in tubulin as potential anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*, 53(20), 7414-7427.

Chen, L., Li, G., Peng, F. A., Jie, X., Dongye, G., Cai, K., Feng, R., Li, B., Zeng, Q., Lun, K., Chen, J., Xu, B. (2016). The induction of autophagy against mitochondria-mediated apoptosis in lung cancer cells by a ruthenium (II) imidazole complex. *Oncotarget*, 7(49), 80716.

Chenoweth, D. M., Harki, D. A., Phillips, J. W., Dose, C., Dervan, P. B. (2009). Cyclic pyrrole-imidazole polyamides targeted to the androgen response element. *Journal of the American Chemical Society*, 131(20), 7182-7188.

Cho, M. H., Niles, A., Huang, R., Inglese, J., Austin, C. P., Riss, T., Xia, M. (2008). A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicology in vitro*, 22(4), 1099-1106.

Chong, H., Vikis, H. G., Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular signalling*, 15(5), 463-469.

Čalić, M., Vrdoljak, A. L., Radić, B., Jelić, D., Jun, D., Kuća, K., Kovarik, Z. (2006). In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun-and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology*, 219(1-3), 85-96.

Dao, P., Smith, N., Tomkiewicz-Raulet, C., Yen-Pon, E., Camacho-Artacho, M., Lietha, D., Herbeuval, J. P., Coumoul, X., Garbay, C., Chen, H. (2015). Design, synthesis, and evaluation of novel imidazo [1, 2-a][1, 3, 5] triazines and their derivatives as focal adhesion kinase inhibitors with antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry*, 58(1), 237-251.

De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Epstein, J. I., Nelson, W. G. (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *The American journal of pathology*, 155(6), 1985-1992.

De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Zha, S., Luo, J., Nakayama, M., Platz, E. A., Isaacs, W. B., Nelson, W. G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*, 62(5), 55-62.

Dewang, P. M., Kim, D. K. (2010). Synthesis and biological evaluation of 2-pyridyl-substituted pyrazoles and imidazoles as transforming growth factor- $\beta$  type 1 receptor kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(14), 4228-4232.

Doiron, J., Richard, R., Touré, M. M., Picot, N., Richard, R., Čuperlović-Culf, M., Robichaud, G, A., Touaibia, M. (2011). Synthesis and structure–activity relationship of 1-and 2-substituted-1, 2, 3-triazole letrozole-based analogues as aromatase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 46(9), 4010-4024.

Duellman, S. J., Zhou, W., Meisenheimer, P., Vidugiris, G., Cali, J. J., Gautam, P., Wennerberg, K., Vidugiriene, J. (2015). Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay and drug development technologies*, 13(8), 456-465.

Fang, Y., Eglen, R. M. (2017). Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D*, 22(5), 456-472.

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

Grignon, D. J. (2004). Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology*, 17(3), 316-327.

Haffner, M. C., Mosbrugger, T., Esopi, D. M., Fedor, H., Heaphy, C. M., Walker, D. A., Adejola, N., Guerel, M., Hicks, J., Meeker, A. K., Haluschka, M. K., Simons, J. W., Isaacs, W. B., De Marzo, A. M., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S. (2013). Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(11), 4918-4922.

Hansen, A. N., Bendiksen, C. D., Sylvest, L., Friis, T., Staerk, D., Jørgensen, F. S., Olsen, C. A., Houen, G. (2012). Synthesis and antiangiogenic activity of N-alkylated levamisole derivatives. *PloS one* 7(9): e45405

Holleran, J. L., Parise, R. A., Yellow-Duke, A. E., Egorin, M. J., Eiseman, J. L., Covey, J. M., Beumer, J. H. (2010). Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the quantitation in human plasma of the novel indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors, NSC 743400 and NSC 725776. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52(5), 714-720.

Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., Swanson, P. E. (2009). Cell death. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570-1583.

Hu, C. D., Choo, R., Huang, J. (2015). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Frontiers in oncology*, 5, 90.

Huang, Y. H., Zhang, Y. Q., Huang, J. T. (2019). Neuroendocrine cells of prostate cancer: biologic functions and molecular mechanisms. *Asian journal of andrology*, 21(3), 291.



Hou, Q., He, C., Lao, K., Luo, G., You, Q., Xiang, H. (2019). Design and synthesis of novel steroidal imidazoles as dual inhibitors of AR/CYP17 for the treatment of prostate cancer. *Steroids*, 150, 108384.

Jaroch, K., Jaroch, A., Bojko, B. (2018). Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 297-312.

Jordan, A., Hadfield, J. A., Lawrence, N. J., McGown, A. T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Medicinal research reviews*, 18(4), 259-296.

Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1), 16-23.

Kamalidehghan, B., Ghafouri-Fard, S., Motevaseli, E., Ahmadipour, F. (2018). Inhibition of human prostate cancer (PC-3) cells and targeting of PC-3-derived prostate cancer stem cells with koenimbin, a natural dietary compound from *Murraya koenigii* (L) Spreng. *Drug design, development and therapy*, 12, 1119.

Karan, D., Holzbeierlein, J., Thrasher, J. B. (2009). Macrophage inhibitory cytokine-1: possible bridge molecule of inflammation and prostate cancer. *Cancer research*, 69(1), 2-5.

Katalinić, M., Hrvat, N. M., Baumann, K., Piperčić, S. M., 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.

Komiya, A., Suzuki, H., Imamoto, T., Kamiya, N., Nihei, N., Naya, Y., Ichikawa, T., Fuse, H. (2009). Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International Journal of Urology*, 16(1), 37-44.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16(1), 3-11.

Kumar, V. L., Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology*, 27(3), 231-243.

Kurmis, A. A., Yang, F., Welch, T. R., Nickols, N. G., Dervan, P. B. (2017). A pyrrole-imidazole polyamide is active against enzalutamide-resistant prostate cancer. *Cancer research*, 77(9), 2207-2212.

Lee, J., Kim, H., Yu, H., Chung, J. Y., Oh, C. H., Yoo, K. H., Sim, T., Hah, J. M. (2010). Discovery and initial SAR of pyrimidin-4-yl-1H-imidazole derivatives with antiproliferative activity against melanoma cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(5), 1573-1577.

Li, Q., Lv, H., Zu, Y., Qu, Z., Yao, L., Su, L., Liu, C., Wang, L. (2009). Synthesis and antitumor activity of novel 20s-camptothecin analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(2), 513-515.

Ling, L. E., Lee, W. C. (2011). Tgf-beta type I receptor (Alk5) kinase inhibitors in oncology. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(12), 2190-2202.

Long, Y., Wang, D. (2019). Inhibition of Colon Cancer Cell Growth by Imidazole Through Activation of Apoptotic Pathway. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 7597.

Marusyk, A., Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 105-117.

Matthews, H., Hanison, J., Nirmalan, N. (2016). “Omics”-informed drug and biomarker discovery: opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes*, 4(3), 28.

McFadyen, M. C., Melvin, W. T., Murray, G. I. (2004). Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Molecular cancer therapeutics*, 3(3), 363-371.

Muckova, L., Pejchal, J., Jost, P., Vanova, N., Herman, D., Jun, D. (2019). Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. *Drug and chemical toxicology*, 42(3), 252-256.

Musilek, K., Dolezal, M., Gunn-Moore, F., Kuca, K. (2009). Design, evaluation and structure—Activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Medicinal research reviews*, 31(4), 548-575

Nakab, L., Bardot, I., Bardot, S., Simar, S., Marzin, D., Nesslany, F. (2014). In vitro and in vivo genotoxicity assessment of HI-6 dimethanesulfonate/oxime. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 762, 30-38.

Niculescu-Duvaz, D., Niculescu-Duvaz, I., Suijkerbuijk, B. M., Ménard, D., Zambon, A., Nourry, A., Davies, L., Manne, H. A., Friedlos, F., Oglivie, L., Hedley, D., Takle, A. K., Wilson, D. M., Pons, J. F., Coulter, T., Kirk, R., Cantarino, N., Whittaker, S., Marais, R., Springer, C. J. (2010). Novel tricyclic pyrazole BRAF inhibitors with imidazole or furan central scaffolds. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(18), 6934-6952.

Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L. (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current chemical genomics*, 3, 33.

Özkay, Y., Işıklıdağ, İ., İncesu, Z., Akalın, G. (2010). Synthesis of 2-substituted-N-[4-(1-methyl-4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl) phenyl] acetamide derivatives and evaluation of their anticancer activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(8), 3320-3328.

Packer, J. R., Maitland, N. J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(6), 1238-1260.

Pollack, M., Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(11), B475-B482.

Popowicz, G. M., Czarna, A., Wolf, S., Wang, K., Wang, W., Dömling, A., Holak, T. A. (2010). Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonist drug discovery. *Cell cycle*, 9(6), 1104-1111.

Rajitha, C., Dubey, P. K., Sunku, V., Piedrafita, F. J., Veeramaneni, V. R., Pal, M. (2011). Synthesis and pharmacological evaluations of novel 2H-benzo [b][1, 4] oxazin-3 (4H)-one derivatives as a new class of anti-cancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 46(10), 4887-4896.

Renou, J., Mercey, G., Verdelet, T., Păunescu, E., Gillon, E., Arboléas, M., Liodice, M., Kliachyna, M., Baati, R., Nachon, F., Jean, L., Renard, P. Y. (2013). Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chemico-biological interactions*, 203(1), 81-84.

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., Vidugiriene, J. (2019). Cytotoxicity assays: In vitro methods to measure dead cells. *Assay Guidance Manual* [Internet].

Ristov, A. A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007). *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 94-97.

Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Prencipe, F., Oliva, P., Baraldi, S., Tabrizi, M. A., Lopez-Cara, L. C., Ferla, S., Brancale, A., Hamel, E., Ronca, R., Bartolozzi, R., Mariotto, E., Basso, G., Viola, G. (2016). Design and Synthesis of Potent in Vitro and in Vivo Anticancer Agents Based on 1-(3', 4', 5'-Trimethoxyphenyl)-2-Aryl-1 H-Imidazole. *Scientific reports*, 6(1), 1-17.

- Rozman, K. K., Doull, J. (2001). Paracelsus, Haber and Arndt. *Toxicology*, 160(1-3), 191-196.
- Rushworth, L. K., Hewit, K., Munnings-Tomes, S., Somani, S., James, D., Shanks, E., Dufes, C., Straube, A., Patel, R., Leung, H. Y. (2020). Repurposing screen identifies mebendazole as a clinical candidate to synergise with docetaxel for prostate cancer treatment. *British journal of cancer*, 122(4), 517-527.
- Schröterová, L., Králová, V., Voráčová, A., Hašková, P., Rudolf, E., Červinka, M. (2009). Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 23(7), 1406-1411.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpial, T., Lyzwa, P., Kielbasinski, P., Jaromin, K., Fils, A., Chilmonczyk, Z. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PloS one*, 11(5), e0155772.
- Sotelo, R., Arriaga, J., Azhar, R. A., Gill, I. S. (2015). Prostate Cancer A Patient's Guide. New York, Springer, str. 1-4.
- Sfanos, K. S., De Marzo, A. M. (2012). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*, 60(1), 199-215.
- 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.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z., Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668-1679
- Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., Yong, E. L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241.

Timbrell, J. A. (2000). Principles of biochemical toxicology, 3rd edn. Taylor & Francis Ltd, London

Tomek, R. (2005). Hormonalno liječenje raka prostate. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, 11(60/61), 137-141.

Twarda-Clapa, A., Krzanik, S., Kubica, K., Guzik, K., Labuzek, B., Neochoritis, C. G., Khoury, K., Kowalska, K., Czub, M., Dubin, G., Domling, A., Skalniak, L., Holak, T. A. (2017). 1, 4, 5-trisubstituted imidazole-based p53–MDM2/MDMX antagonists with aliphatic linkers for conjugation with biological carriers. *Journal of medicinal chemistry*, 60(10), 4234-4244.

van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W. U., Smith, E. E., Miller, H. L., Nordeen, S. K., Miller, G., Lucia, M. S. (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, 57(3), 205-225.

Verma, A., Joshi, S., Singh, D. (2013). Imidazole: having versatile biological activities. *Journal of Chemistry*, doi:10.1155/2013/329412.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558.

Voloshina, A. D., Gumerova, S. K., Sapunova, A. S., Kulik, N. V., Mirgorodskaya, A. B., Kotenko, A. A., Prokopyeva, T. M., Mikhailov, V. A., Zakharova, L. Y., Sinyashin, O. G. (2020). The structure–Activity correlation in the family of dicationic imidazolium surfactants: Antimicrobial properties and cytotoxic effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864(12), 129728.

Wang, X. J., Chu, N. Y., Wang, Q. H., Liu, C., Jiang, C. G., Wang, X. Y., Takashi, I., Cheng, M. S. (2012). Newly synthesized bis-benzimidazole derivatives exerting anti-tumor activity through induction of apoptosis and autophagy. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(19), 6297-6300.

Watson, P. A., Arora, V. K., Sawyers, C. L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(12), 701-711.

Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International journal of pharmaceutics*, 288(2), 369-376.

Yang, F., Nickols, N. G., Li, B. C., Marinov, G. K., Said, J. W., Dervan, P. B. (2013). Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1863-1868.

Yu, H., Jung, Y., Kim, H., Lee, J., Oh, C. H., Yoo, K. H., Sim, T., Hah, J. M. (2010). 1, 4-Dihydropyrazolo [4, 3-d] imidazole phenyl derivatives: A novel type II Raf kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(12), 3805-3808.

Yuan, T. C., Veeramani, S., Lin, M. F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-related cancer*, 14(3), 531-547.

Zandona, A., Maraković, N., Mišetić, P., Madunić, J., Miš, K., Padovan, J., Pirkmajer, S., Katalinić, M. (2021). Activation of (un) regulated cell death as a new perspective for bispyridinium and imidazolium oximes. *Archives of Toxicology*, 1-18.

Zhang, J., Yao, D., Jiang, Y., Huang, J., Yang, S., Wang, J. (2017). Synthesis and biological evaluation of benzimidazole derivatives as the G9a Histone Methyltransferase inhibitors that induce autophagy and apoptosis of breast cancer cells. *Bioorganic chemistry*, 72, 168-181.

Zhang, L., Peng, X. M., Damu, G. L., Geng, R. X., Zhou, C. H. (2014). Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. *Medicinal research reviews*, 34(2), 340-437.

Zhou, S., Zhao, L., Kuang, M., Zhang, B., Liang, Z., Yi, T., Wei, Y., Zhao, X. (2012). Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?. *Cancer letters*, 323(2), 115-127.

Internetske poveznice:

[https://www.luminexcorp.com/download/\\_trashed-6-5/](https://www.luminexcorp.com/download/_trashed-6-5/) (Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, str. 1, 2019) (pristupljeno 15. 6. 2021.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1310#/A1310> (pristupljeno 15. 6. 2021.)

<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-one-homogeneous-membrane-integrity-assay-protocol.pdf?la=en>  
(pristupljeno 15. 6. 2021.)

<https://www.wcrf.org/dietandcancer/prostate-cancer/> (pristupljeno 24.7.2021.)



## 8. ŽIVOTOPIS

Dunja Kureljak

dkureljak@stud.biol.pmf.hr

Pohađala sam opću gimnaziju u SŠ Mate Balote Poreč gdje mi je najveći uspjeh bilo osvojeno drugo mjesto na Državnom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživačkih radova. Akademske godine 2016./2017. upisujem Preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, a tri godine kasnije diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na istom fakultetu.

Tijekom studija sudjelovala sam na raznim istraživačko-edukacijskim projektima uključujući projekte *Insula Tilagus 2017*, *Posjetitelji bez ulaznica* i *Mala škola mamalogije* u sklopu Udruge studenata biologije BIUS te na dvije *Noći biologije*. Također, bila sam sudionik Seminara Invazivne vrste u Novom Sadu. Volontirala sam na projektu *ConFish* te projektu restauracije i digitalizacije herbarijske zbirke u Hrvatskom herbariju. Obavila sam dvije stručne laboratorijske prakse na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za molekularnu biologiju i Zavodu za molekularnu medicinu. Položila sam tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim A kategorija, tijekom zadnje studijske godine.

Služim se engleskim, njemačkim i talijanskim jezikom. Ljeta 2016. i 2017. godine radila sam kao recepcionerka u Lanterna Premium Camping Resortu.

U slobodno vrijeme volim boraviti u prirodi, peći kolače, družiti se s dragim ljudima i proširivati znanja i vještine.