

Biološka aktivnost konjugata ferocena i 2-tiouracila određena na HeLa staničnoj liniji

Fišić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:922271>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Katarina Fišić

**BIOLOŠKA AKTIVNOST KONJUGATA
FEROCENA i 2-TIOURACILA ODREĐENA
NA HeLa STANIČNOJ LINIJI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević te uz pomoć pri izradi mag.ing. Martine Bagović.

Od srca zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na ukazanom povjerenju, izuzetnoj ljubaznosti, prenesenom znanju, korisnim savjetima, stručnoj pomoći i vođenju tijekom izrade ovog rada. Hvala mojim prijateljima, a najveća hvala mojoj obitelji na nesebičnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST KONJUGATA FEROCENA I 2-TIOURACILA ODREĐENA NA HeLa STANIČNOJ LINIJI

Katarina Fišić, univ. bacc.ing. biotechn.

0058213254

Sažetak: Ferocenski konjugati su organometalni spojevi sa specifičnim elektrokemijskim i biološkim svojstvima, što ih čini zanimljivima za istraživanje u razvoju novih lijekova. Budući da mnogi od njih pokazuju antitumorski učinak, u ovom radu je ispitana *in vitro* aktivnost tri biokonjugata ferocena i 2-tiouracila na HeLa stanicama praćenjem stanične vijabilnosti te klonogenom analizom. Nadalje, protočnom citometrijom određeno je s kojim se staničnim procesom može povezati zapažena citotoksičnost. Ispitani biokonjugati ferocena i 2-tiouracila djeluju inhibitorno na rast HeLa stanica pri čemu je inhibitorni učinak ovisan o dozi. Najsnažniji citotoksični učinak pokazuje spoj 1 sa IC_{50} vrijednošću 23,39 μ M. Inhibitorni učinak može se povezati s poticanjem stanične smrti mehanizmom apoptoze. Slijedom navedenog može se zaključiti da biokonjugati ferocena i 2-tiouracila imaju potencijal kao antitumorski agensi.

Ključne riječi: derivati ferocena, tumorska stanična linija HeLa, citotoksičnost, *in vitro* testovi

Rad sadrži: 41 stranica, 16 slika, 2 tablice, 37 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Martina Bagović, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Teuta Murati (član)
4. prof. dr. sc. Senka Djaković (zamjenski član)

Datum obrane: 24. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF FERROCENE AND 2-THIOURACIL CONJUGATES ASSESSED ON
THE HeLa CELL LINE

Katarina Fišić, univ. bacc.ing. biotechn.
0058213254

Abstract: Ferrocene conjugates are organometallic compounds with specific electrochemical and biological properties, what makes them interesting in drug development research. Since many of them exhibit antitumor effects, in this study the *in vitro* activity of three ferrocene and 2-thiouracil bioconjugates on HeLa cells was examined by cell viability and clonogenic assays. Furthermore, flow cytometry was used to determine which cellular processes are associated with the observed cytotoxicity. The tested bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil have an inhibitory effect on the growth of HeLa cells, which is dose-dependent. The strongest cytotoxic effect is shown by compound 1 with an IC₅₀ value of 23.39 μM. The inhibitory effect can be related to the induction of cell death by the apoptosis. Therefore, it can be concluded that bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil have potential as antitumor agents.

Keywords: ferrocene derivates, tumor cell line HeLa, cytotoxicity, *in vitro* tests

Thesis contains: 41 pages, 16 figures, 2 tables, 37 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Kristina Radošević, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Martina Bagović, MSc

Reviewers:

1. Jasmina, Lapić, PhD, Associate professor (president)
2. Kristina, Radošević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Teuta, Murati, PhD, Associate professor (member)
4. Senka, Djaković, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 24th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. POTREBA ZA RAZVOJEM NOVIH LIJEKOVA	2
2.2. PRELIMINARNI TESTOVI NA KULTURAMA STANICA	4
2.3 FEROCEN	7
2.4. NUKLEOZIDI, NUKLEOTIDI I DUŠIČNE BAZE	9
2.4.1. Uracil i analozi uracila.....	10
3. ESKPERIMENTALNI DIO	14
3.1 MATERIJALI	14
3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila.....	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Pufferi.....	15
3.1.4. Uređaji i oprema	16
3.1.5. HeLa stanice	16
3.2. METODE	17
3.2.2. Uzgoj stanica i određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	18
3.2.3. MTS metoda određivanja preživljenja stanica.....	19
3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica otopinom kristal-ljubičasto	20
3.2.5. Analiza stanične smrti primjenom Muse™ analizatora staničnog zdravlja	22
3.2.5.1. <i>Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a</i>	22
3.2.6. Obrada podataka.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. UTJECAJ BIOKONJUGATA FEROCENA NA PREŽIVLJENJE HeLa STANIČNE LINIJE	26
4.2. KLONOGENA ANALIZA UTJECAJA BIOKONJUGATA FEROCENA NA HeLa STANIČNU LINIJU	29
4.3. UTJECAJ FEROCENSKIH BIOKONJUGATA NA POTICANJE STANIČNE SMRTI U HeLa STANIČNOJ LINIJI	31
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1.UVOD

Jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjeg vremena su tumori, koji svake godine uzrokuju smrt više od milijun ljudi. Tumori nastaju zbog abnormalnog rasta stanica koje mogu napadati druga tkiva i širiti se na druge dijelove tijela. Kemoterapija je glavni pristup liječenju raka, no problem je nemogućnost ciljane isporuke lijeka samo u stanice raka bez utjecaja na zdrave stanice. Zbog visoke smrtnosti od tumora, znanstvenici i farmaceutske kompanije intenzivno rade na novim antitumorskim lijekovima, stalno sintetizirajući i ispitujući nove spojeve (Rajguru i sur., 2019). Novi terapijski spojevi mogu se brzo testirati na staničnim kulturama kako bi se preliminarno procijenilo njihovo djelovanje i odredio mehanizam djelovanja. Uzgojene stanice, koje pokazuju genetičke i biokemijske abnormalnosti, služe kao modelni sustavi za određene bolesti.

Ferocenski derivati su organometalni spojevi u kojima je ferocen, iz skupine metalocena, povezan s biološkim molekulama ili ugrađen u strukturu postojećih lijekova. Zahvaljujući svojim jedinstvenim biološkim i elektrokemijskim svojstvima, ferocenski derivati se istražuju i koriste u kemiji materijala, biosenzorima te farmaceutskoj industriji kao novi biološki aktivni spojevi. Osim različitih bioloških aktivnosti, ferocenski derivati pokazuju i antitumorsku aktivnost.

Cilj ovog rada je bio ispitati *in vitro* djelovanje tri derivata ferocena i 2-tiouracila sintetizirana u Laboratoriju za organsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. U radu je ispitan njihov učinak na humanu tumorsku staničnu liniju HeLa određivanjem stanične vijabilnosti i klonogenom analizom te je primjenom Muse™ analizatora staničnog zdravlja pokazano koji je stanični proces potaknut učinkom derivata ferocena i 2-tiouracila.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POTREBA ZA RAZVOJEM NOVIH LIJEKOVA

Jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice su neoplazme ili tumori od kojih svake godine umire više od milijun ljudi te je vjerojatno da će uz takav trend smrtnost od tumora presteći kardiovaskularne bolesti, koje su trenutno prvi uzrok smrtnosti na svjetskoj razini. Tumorom se općenito nazivaju oblici bolesti kod kojih dolazi do abnormalne proliferacije stanica i sposobnost takvih stanica da napadnu druga tkiva što dovodi do stvaranja tumorske mase, vaskularizacije te u konačnici metastaziranja (širenja raka putem krvotoka na druge dijelove tijela). Tumore se dijeli na benigne i maligne. Maligni ili zloćudni tumori imaju svojstvo razarati okolno tkivo i širiti se na druge dijelove organizma, odnosno metastazirati, dok benigne nazivamo dobroćudnima jer ne nemaju tu sposobnost. Stvaranje novih krvnih žila iz već postojećih naziva se angiogeneza i normalan je proces tijekom rasta i razvoja organizma, no angiogeneza je također ključni korak prelaska benignog tumora iz stanja mirovanja u maligni. Kemoterapija je jedan od glavnih pristupa liječenju raka i funkcionira isporukom citotoksičnog sredstva u stanice raka, no glavni problem konvencionalne kemoterapije jest nemogućnost isporuke točne količine lijeka ciljano u stanice raka bez utjecaja na zdrave odnosno normalne stanice. Obzirom na već spomenutu iznimno visoku smrtnost od tumora znanstvenici i farmaceutske kompanije intenzivno istražuju i rade na novim lijekovima s antitumorskim potencijalom. S tim ciljem stalno se sintetiziraju i ispituju novi spojevi (Rajguru i sur., 2019). Među njima su i takozvani pametni lijekovi koji uključuju proteine, monoklonska protutijela i peptide. Peptidi imaju mnoge prednosti nad monoklonskim protutijelima i proteinima kao što su: veličina, jednostavnost sinteze i modifikacije, sposobnost prodiranja u tumor kao i dobru biokompatibilnost.

Proces programirane stanične smrti, poznat kao apoptoza, prepoznaje se po specifičnim morfološkim karakteristikama i biokemijskim mehanizmima koji zahtijevaju energiju. Apoptoza igra ključnu ulogu u različitim procesima, uključujući normalnu staničnu obnovu, pravilnu funkciju i razvoj imunskog sustava, atrofiju ovisnu o hormonima, embrionalni razvoj i smrt stanica uzrokovanu kemikalijama. Neprikladna apoptoza, bilo da je u pitanju prekomjerna ili nedovoljna, povezana je s mnogim ljudskim stanjima, uključujući neurodegenerativne bolesti, ishemijska oštećenja, autoimune poremećaje i razne vrste raka. Sposobnost kontrole stanične smrti ili preživljavanja stanica ima veliki terapijski potencijal. Stoga se istraživanja i dalje usmjeravaju na razjašnjavanje i analizu mehanizama staničnog

ciklusa i signalnih putova koji reguliraju zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu. Istraživanje apoptoze napreduje vrlo brzo, a iako su identificirani mnogi ključni apoptotski proteini, molekularni mehanizmi njihovog djelovanja ili nedjelovanja još uvijek nisu u potpunosti razumljivi (Elmore, 2007).

Kako je patogeneza mnogih bolesti usko povezana s neprikladnom apoptozom pri čemu rak predstavlja stanje u kojem se javlja nedovoljna apoptoza, koja dovodi do maligne proliferacije stanica. Greške u bilo kojem dijelu putova apoptoze mogu uzrokovati maligne transformacije zahvaćenih stanica, metastaze tumora i otpornost na lijekove protiv raka. U zaobilaženju apoptoze tijekom nastanka i razvoja raka uključeno je nekoliko glavnih molekularnih mehanizama. Obitelj proteina Bcl-2 i kaspaze ključni su sudionici u mehanizmu apoptoze i reguliraju staničnu smrt. Njihov nedostatak uzrokuje izostanak apoptotskog signala i na kraju neučinkovitu apoptozu u stanicama raka, što može dovesti do karcinogeneze. Strategije usmjerene na ove glavne regulatore u stanicama karcinoma postale su glavni fokus u istraživanjima raka. Stoga, unatoč tome što apoptoza može biti uzrok problema, može biti i ciljno mjesto u terapiji raka (Farghadani i Naidu, 2022).

Novi terapijski spojevi mogu se brzo i učinkovito testirati primjenom staničnih kultura i na taj način preliminarno procijeniti djelovanje potencijalnih lijekova kao i odrediti mehanizam njihovog djelovanja. Pri tome su od iznimne važnosti uzgojene stanice kao modelni sustavi za određene bolesti, odnosno one koje pokazuju genetičke i biokemijske abnormalnosti kao što su promjene u receptorima i signalnim putevima (Allen i sur., 2005). U odgovarajućim uvjetima i uz pravilne kontrole, stanične linije raka zadržavaju većinu genetskih svojstava izvornog tumora. Usporedba genomskih podataka većine staničnih linija raka potvrdila je ovu tvrdnju, kao i nalaze dobivene proučavanjem tumorskih tkiva uključenih u bazu podataka atlasa genoma raka (engl. *the Cancer Genome Atlas*, TCGA). Atlas genoma raka je zajednički program Nacionalnog instituta za rak (engl. *National Cancer Institute*, NCI) i Nacionalnog instituta za istraživanje ljudskog genoma (engl. *National Human Genome Research Institute*) koji je započeo 2006. godine, okupljajući istraživače iz različitih disciplina i razne institucije. Kroz taj program genomike raka, molekularno je karakterizirano preko 20 000 primarnih karcinoma i upareni su uzorci koji obuhvaćaju 33 tipa raka. Danas imamo pristup opsežnim i javno dostupnim skupovima podataka o staničnim linijama koji opisuju njihove molekularne i stanične promjene s velikom točnošću, što zajedno s mogućnošću postizanja uvjeta uzgoja kultura koji oponašaju *in vivo* mikrokoliš (npr. trodimenzionalne kokulture), dodatno osnažuje i daje važnost primjeni staničnih linija raka u medicinskim istraživanjima. Međutim, važno je da se korištenje staničnih linija provodi prema utvrđenim smjernicama kako bi se osigurala reproducibilnost i kvaliteta podataka te spriječe neželjeni događaji poput unakrsne kontaminacije i kontaminacije mikoplazmom (Mirabelli i sur., 2019).

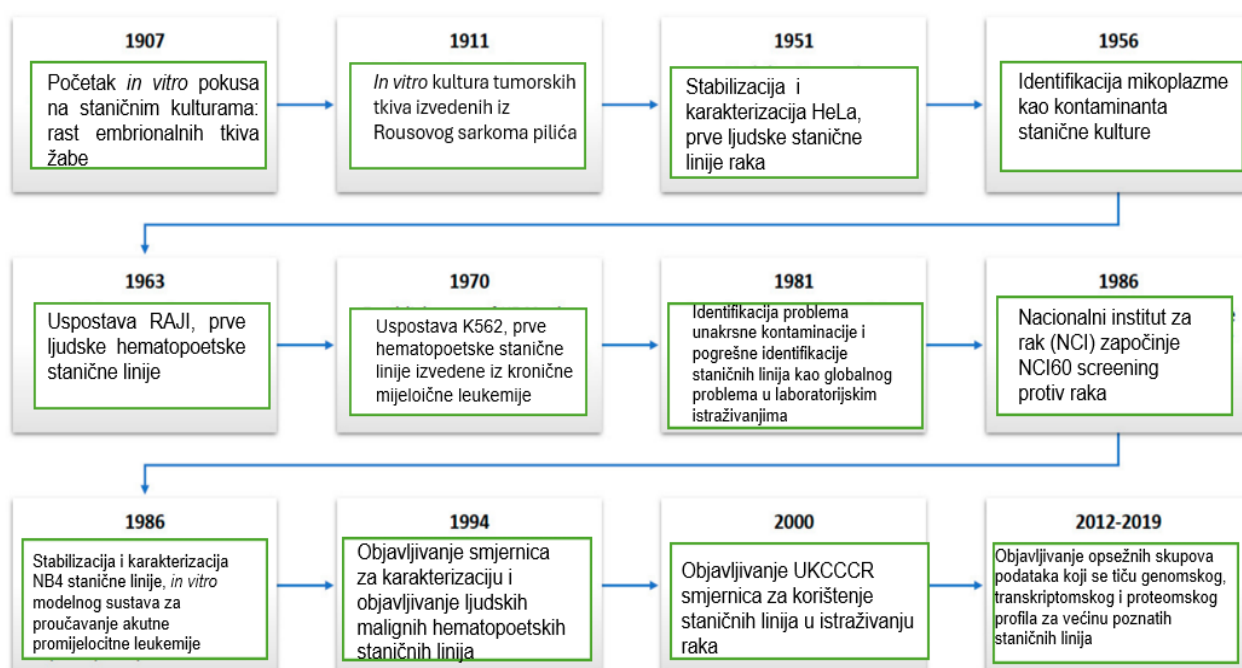
Većinu antitumorskih lijekova koje je odobrila američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) čine organske molekule, dok su metalni terapijski agensi još uvijek vrlo rijetki. Prvi otkriven i upotrebljavan terapijski spoj na bazi metala je cisplatin, čime je pokrenuto novo doba primjene kompleksa prijelaznih metala u liječenju tumora. Cisplatin djeluje protiv tumora glave, pluća, jajnika, jednjaka i vrata. Nažalost, osim širokog antitumorskog djelovanja cisplatina i njegovih derivata, on se u konačnici pokazao citotoksičnim te ima mnoge nuspojave kao što su: periferna neuropatija, gubitak kose i supresija koštane srži. Nadalje, tumori mogu razviti otpornost na lijekove pa oni postaju manje učinkoviti ili neučinkoviti u potpunosti i onda je liječenje neuspješno. Zbog svega navedenog, istraživanja novi lijekova za liječenje karcinoma je u stalnom porastu, pa se tako istražuju i razvijaju kompleksi metala za koje se smatra da imaju antitumorski potencijal protiv velikog broja različitih tumora (Zeng i sur., 2017).

2.2. PRELIMINARNI TESTOVI NA KULTURAMA STANICA

Preliminarni testovi na kulturama stanica temeljni su korak u procesu razvoja novih terapijskih spojeva, omogućujući uvid u potencijalne učinke i sigurnost prije složenije faze istraživanja. Omogućuju procjenu osnovnih karakteristika i ponašanja stanica u kontroliranim uvjetima. Ovi testovi su ključni za razumijevanje stanične biologije, toksikologije, farmakologije i mnogih drugih biomedicinskih područja.

Kako bi se ispitalo biološko djelovanje spojeva koji su potencijalni novi lijekovi potrebno je provesti niz testova na kulturama stanica (*in vitro*) kao i na živim organizmima (*in vivo*) te se na temelju tih rezultata može pretpostaviti učinak na ljudski organizam. Kultura stanica je izrazito poželjna jer pruža sustave za izravan pristup i procjenu tkiva, upotreba tkivne kulture vrijedan je alat za proučavanje problema kliničke relevantnosti, posebno onih povezanih s bolestima te studijama mehanizama toksičnosti. Jednostavan pristup stanicama omogućuje laka istraživanja staničnih mehanizama koji mogu ukazivati na nove potencijalne lijekove te u slučaju tkiva dobivenog iz patološkog procesa zanimljiva je primjena u evaluaciji terapijskih agenasa koji potencijalno mogu liječiti određene disfunkcije. Ipak u početku je potrebno obratiti posebnu pažnju na postavljanje stabilne *in vitro* stanične linije. U primarnoj kulturi stanice zahtijevaju posebne supstrate (kolegen, laminin, itd.), faktore rasta, topljive dodatke mediju od kojih neki mogu biti prilično složeni u svom sastavu. Ti zahtjevi kao i poteškoća dobivanja dovoljne količine tkiva potaknuli su interes za razvoj imortaliziranih staničnih linija koje mogu osigurati neograničene količine tkiva (Allen i sur., 2005).

U današnje vrijeme kultura životinjskih stanica glavna je grana moderne biotehnologije, napreduje povezivanjem istraživanja u medicini, proteinskoj kemiji, biologiji i inženjerstvu. Kulturu životinjskih stanica predstavljaju uzgojene stanice, izolirane iz različitih tkiva ili organa životinja u hranjivom mediju. Rastom u kontroliranom okruženju odnosno uvjetima kroz više generacija dobivamo homogenu populaciju (Slivac i sur., 2016). Dakle nakon ograničenog broja generacija konačna stanična linija postaje kontinuirana (besmrtna) kao rezultat genotipskih promjena, one se mogu postići postupcima imortalizacije stanica. U tu svrhu primjenjuje se transfekcija viralnim genima ili transdukcija virusima. Svojstva koja su najvažnija kod kontinuirane stanične linije su: povećana brzina rasta, mogućnost adherentnog rasta ili rasta u suspenziji, neograničen životni vijek, promijenjena morfologija stanica i povećana učinkovitost kloniranja (Freshney, 2010).



Slika 1. Popis glavnih dostignuća u povijesnom napretku istraživanja staničnih linija raka (prema Mirabelli i sur.,2019).

Kultura stanica primjenjuje se u znanosti već dugi niz godina i Ross Harrison, američki znanstvenik, smatra se njezinim utemeljiteljem. On je početkom 20.stoljeća izolirao i kultivirao dio tkiva žabljeg embrija, nekoliko godina kasnije znanstvenik Carrel kultivirao je uzorak tkiva srca pilećega embrija. Prva humana stanična linija HeLa uspostavljena je 1951. godine, a pregled glavnih dostignuća u napretku istraživanja staničnih linija raka prikazan je na slici 1.

Stanična linija nazvana je po pacijentici Henrietti Lacks iz čijeg su karcinoma vrata maternice izolirane tumorske stanice te prilagođene na uzgoj u laboratorijskim uvjetima. HeLa stanična linija jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u svrhu znanstvenih istraživanja (Castilho i sur., 2008). Tumorske stanične linije koje se koriste u farmakologiji, toksikologiji i drugim istraživanjima su iz banke stanica *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (NCI, National Cancer Institute) iz 1990. godine uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za ispitivanje djelovanja različitih spojeva u određenim rasponima koncentracija, kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta, odnosno odredila tzv. bazalna citotoksičnost spoja za svaku staničnu liniju (Boyd i Paul, 1995).

Kao posljedica etičkih, znanstvenih i ekonomskih zahtjeva razvijeni su i upotrebljavani *in vitro* testovi citotoksičnosti, oni su alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, staničnim linijama, primarnim staničnim kulturama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. Nedostatak *in vitro* testova jest što ne mogu u potpunosti zamijeniti *in vivo* testove na životinjskim organizmima jer ne odgovaraju na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, metaboličke promjene koje se događaju u živim organizmima te adaptivni odgovor, ali u prilog im ide dokazana činjenica da je podudarnost oko 80 % (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Dakle stanične linije su *in vitro* modelni sustavi široko upotrebljavani u različitim područjima medicine, posebice temeljnim istraživanjima raka i otkrivanja lijekova. Korisnost se očituje neograničenim izvorom biološkog materijala za eksperimentalne svrhe. U kontroliranim i odgovarajućim uvjetima stanične linije raka zadržavaju većinu genetičkih svojstava. Uspostavljanje nove stanične linije vrlo je složen proces, traje i do dvije godine i uspješnost je niska i nepredvidiva. Ova činjenica može zvučati kao paradoks jer stabilizacija stanične linije započinje uzorkom tumora koji se snažno razvija i raste *in vivo*, izmičući se svim staničnim mehanizmima koji su uključeni u kontrolu staničnog ciklusa i stanične smrti apoptozom. Međutim, uzroci poteškoća za uspostavu nove stanične linije mogu se bolje razumjeti ako se uzmu u obzir razlike *in vitro* i *in vivo* mikrookoliša kao što su: ovisnost o faktoru rasta, postotak kisika, interakcija s imunološkim stanicama, itd. Primjerice kontinuirane stanične linije kronične mijeloične leukemije karakterizira visoka stopa proliferacije leukemijskih stanica *in vivo*, no te iste stanice umiru nakon nekoliko tjedana *in vitro* (Mirabelli i sur., 2019).

Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kulture stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). MTT bazira se na mjerenju redukcije topljive žute tetrazolijeve soli u plavi i netopljivi formazan (Mossman, 1983). U današnje vrijeme koriste se supstrati kao MTS koji se razgrađuju u produkt topljiv u mediju za uzgoj stanica. Apsorbancija koja se očita proporcionalna je broju živih stanica. Postoje i brojni drugi testovi koji se primjenjuju kao što su: Neutral Red metoda, metoda otpuštanja laktat-dehidrogenaze, test proliferacije stanica, smanjenje razine ATP-a, Trypan Blue metoda, Kenacid Blue metoda. Osim informacije bazalne citotoksičnosti, primjenom više različitih metoda, može se dobiti saznanje o mogućem mehanizmu toksičnosti zbog različitih principa na kojima se one temelje (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

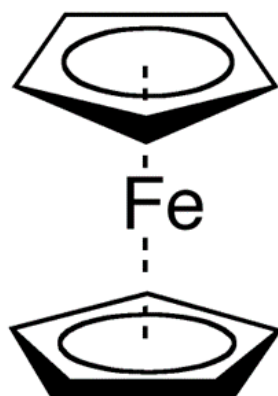
2.3 FEROCEN

Ferocen iz skupine metalocena (slika 2), najpoznatiji je organometalni spoj formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Sastoji se od dva ciklopentadielna prstena koja okružuju središnji atom željeza i upravo ta struktura osigurava stabilnost ovog spoja. Molekulska masa ferocena iznosi $186,03 \text{ g mol}^{-1}$, gustoća $1,49 \text{ g cm}^{-3}$, temperatura tališta iznosi $172 \text{ }^\circ\text{C}$, vrelište mu je na $249 \text{ }^\circ\text{C}$. Izgled mu je u obliku narančastih kristala i miris sličan kamforu, nije topljiv u vodi. Na sobnoj temperaturi ovaj spoj je netoksičan i stabilan (NCBI, 2005).

Ferocen je otkriven nenamjerno kada su Pauson i Kealy (1951) neuspješno pokušali sintetizirati fulvalen (C_{10}H_8) reakcijom ciklopentadien bromida s željezo (II) kloridom te umjesto fulvalena dobili narančastu krutinu kao produkt. Tada je ferocen nazvan „sandwich“ spojem, jer se metalni atom željeza nalazi između dviju paralelnih prstenastih struktura (slika 2). Ferocen je izazvao interes zbog svoje strukture, reaktivnosti kao superaromatski elektrofil te svojstava kao što su stabilnost na zraku i visokoj temperaturi (do $400 \text{ }^\circ\text{C}$) te dobre topljivosti u organskim otapalima. Nadalje stabilan je i u fiziološkom mediju, lipofilan i podliježe poprilično jednostavnim kemijskim modifikacijama. Zbog svoje lipofilnosti ima mogućnost prolaska kroz stanične membrane (Barišić, 2018). Ovaj spoj ima mnoga zanimljiva svojstva i široku primjenu u kemiji, uključujući organometalnu kemiju, katalizu, materijale i lijekove. Ferocen i njegovi derivati često se koriste kao predkatalizatori u organskoj sintezi te kao stabilizatori polimera. Također su proučavani kao potencijalni lijekovi zbog svojih bioloških aktivnosti. Iz tih razloga ubrzo su sintetizirani mnogi ciklopentadielni derivati različitih metala koji su pronašli primjenu

u industriji bioloških senzora (detekcija glukoze u krvi, interakcije DNA i proteina), nanomedicini, ali i katalizi, baterijama i drugim materijalima.

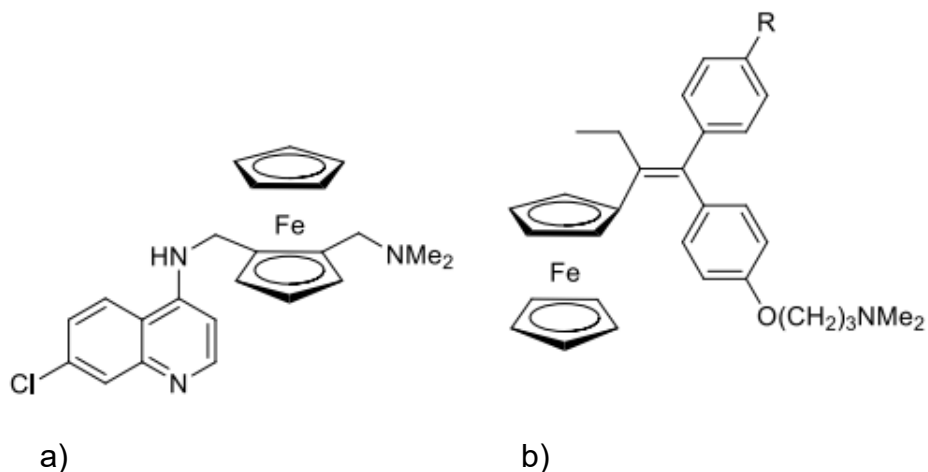
Može se reći da je pojava ferocena u 20. stoljeću dovela do revolucije u bioorganometalnoj kemiji (Astruc, 2017). Započeta su istraživanja s ferocenom modificiranim s cefalosporinima, penicilinima i rifamicinom, a nastavljena s derivatima koji sadrže različite farmakoforne skupine i strukturne fragmente biomolekula kao što su aminokiseline, peptidi, nukleobaze, steroidi i šećeri (Čakić-Semenčić i Barišić, 2017).



Slika 2. Struktura ferocena (Wang i sur., 2020)

Sam ferocen je niske citotoksičnosti, no konjugiran s biološki aktivnim spojevima dovodi do obećavajućeg antitumorskog potencijala, no mehanizam njegovog djelovanja je još uvijek poprilično nejasan. Pretpostavlja se kako je reverzibilna stanična oksidacija ferocenilnog dijela u ferocenijev ion, koji je citotoksičan, popraćena stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koje mogu oštetiti DNA i druge važne biološke molekule te dolazi do staničnih oštećenja i stanične smrti (Djaković i sur., 2020).

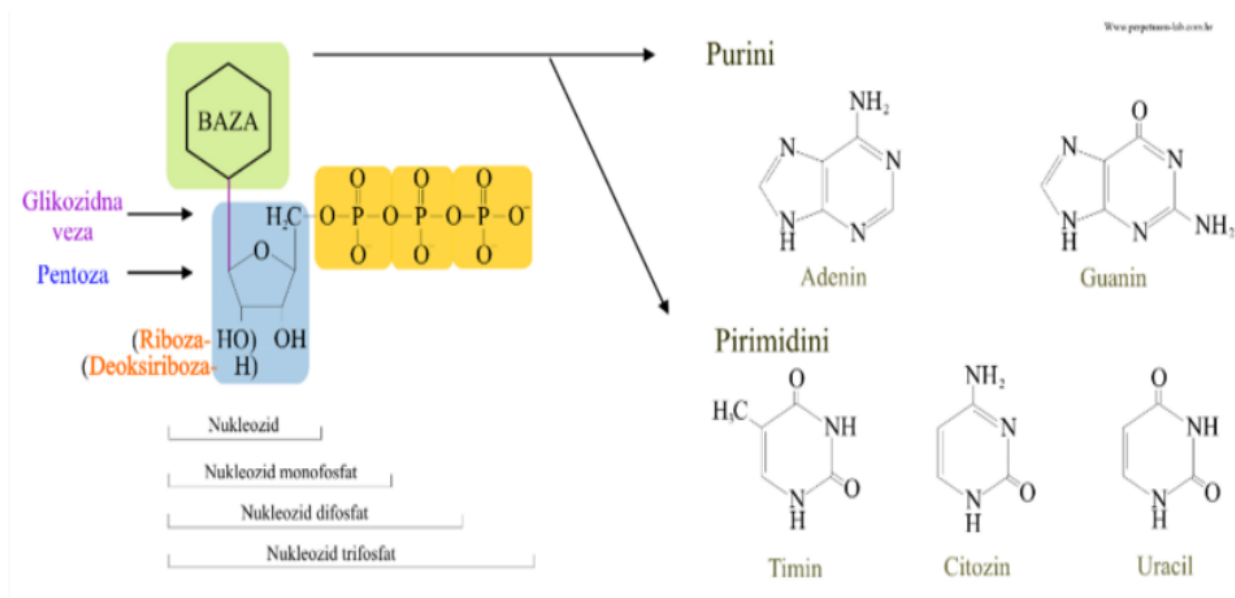
Derivati ferocena privukli su interes kao kandidati za lijekove protiv raka, bakterija, fungi i parazita. Dva najistaknutija ferocenska derivata otkrivena 1990-ih su ferokin (slika 3a) koji ima antimalarijski učinak i ferocifen (slika 3b) koji djeluje antiproliferativno na stanice raka dojke. Ferokin je trenutno u II. fazi kliničkih ispitivanja, a ferocifen u pretkliničkoj procjeni, tako još ni jedan organometalni spoj bilo koje vrste nije u kliničkim ispitivanjima (Patra i Gasser, 2017).



Slika 3. Kemijska struktura a) ferokina; b) ferocifena (Toma i Vrček, 2020)

2.4. NUKLEOZIDI, NUKLEOTIDI I DUŠIČNE BAZE

Nukleozidi su biološke molekule niske molekulske mase, ključne za biokemijske procese. Sastoje se od šećera 2-deoksiriboze ili riboze i pripadajuće dušikove baze povezane *N*-glikozidnom vezom na šećer (slika 4). Dušikove baze se prema kemijskoj strukturi dijele na dvije skupine purine i pirimidine. Pirimidini sadrže šesteročlani prsten s dva dušikova atoma, dok purini uz purini uz to sadrže i fuzionirani 5-eročlani imidazolni prsten. Pirimidine čine citozin, uracil i timin, a purine adenin i gvanin (slika 4). Nukleotidi su molekule slične nukleozidima, ali sadrže dodatnu fosfatnu skupinu koja je vezana za 5'-ugljični atom šećera. Stoga se nukleotidi sastoje od tri dijela: nukleobaze, pentoze i fosfatne skupine. Fosfatna skupina obično dolazi u obliku jednog, dva ili tri vezana fosfatna ostatka. Nukleotidi su gradivni blokovi nukleinskih kiselina (DNA i RNA) te su ključni za sintezu i funkcioniranje genetskog materijala u organizmima (Hess i Greenberg, 2012). Nukleozidi se u stanicama prevode u fosfatne derivate odnosno nukleotide koji čine osnovne gradivne jedinice DNA i RNA molekula. U ovoj reakciji sudjeluje enzim kinaza, pri čemu dolazi do fosforilacije na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera nukleozida. Nukleotidi i njihovi derivati imaju mnoge uloge u energetskom metabolizmu i enzimskoj regulaciji kao što su: alosterička regulacija, aktivirani intermedijeri, prekursori nukleinskih kiselina, strukturne komponente koenzima, i drugo. Jedan od najvažnijih nukleotida u staničnom metabolizmu je adenzin trifosfat (ATP), on opskrbljuje stanice energijom. Hidrolizom ATP-a u adenzin difosfat (ADP) pa u adenzin monofosfat (AMP) nastaje energija. Adenzin je ključna komponenta važnih koenzima, uključujući nikotinamid adenin dinukleotid (NADH/NAD⁺), flavin adenin dinukleotid (FADH₂/ FAD) i koenzim A (CoA) (Mintas i Raić-Malić, 2009).



Slika 4. Kemijska struktura nukleozida, nukleotida i dušikovih baza (Hess i Goldberg, 2012)

2.4.1. Uracil i analozi uracila

Uracil je dušikova baza, preciznije pirimidin molekulske formule $C_4H_4N_2O_2$ i sastoji se od heterocikličkog aromatskog prstena s dvije keto skupine koje su na položajima C-2 i C-4. Glavni je dio pirimidinskog sastava u ribonukleinskoj kiselini. U molekuli DNA sparuje se s timinom koji nastaje metilacijom uracila. RNA molekula formira se pomoću slijeda nukleotida, pri čemu svaki nukleotid obuhvaća šećer ribozu, fosfatnu skupinu i dušikovu bazu. U biosintezi RNA, prekursorski oblik uracila je UTP (uracil-trifosfat), koji također ima ulogu koenzima uključenog u sintezu određenih šećera (NCBI, 2004).

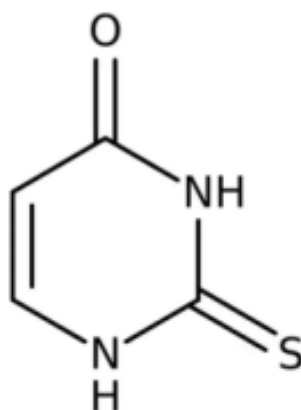
Analozi uracila strukturno su slični antimetaboliti koji imaju širok spektar djelovanja i klinički su aktivni kod tumora i hematoloških maligniteta. Mnogi od ovih agenasa se ugrađuju u DNA pomoću enzima polimeraza tijekom uobičajene sinteze DNA, tako blokiraju daljnje produljenje novonastalog lanca i uzrokuju zastoj replikacijske viljuške. Molekularni mehanizmi koji osjete zaustavljene replikacijske viljuške aktiviraju kontrolne točke staničnog ciklusa kao i procese popravka DNA, što može doprinijeti otpornosti na lijekove. Kada ove molekule ne stabiliziraju replikacijske viljuške ili kada su kasniji procesi popravka DNA preopterećeni, pokreće se apoptoza, ili putem istih senzora oštećenja DNA ili alternativnim mehanizmima. Nedavno su strategije usmjerene na ciljanje kontrolnih točaka oštećenja DNA ili procesa popravka DNA

pokazale učinkovitost kod osjetljivosti stanica na nukleozidne analoge, pružajući tako način za izbjegavanje otpornosti na lijekove. Osim njihovih djelovanja usmjerenih na sintezu DNA, mnogi nukleozidni analogi pokreću proces apoptoze jedinstvenim mehanizmima, poput uzrokovanja epigenetskih modifikacija. Pregled staničnih i molekularnih odgovora na klinički relevantne agense pruža razumijevanje mehanizama koji uzrokuju apoptozu i može pružiti osnovu za razvoj novih terapijskih strategija (Ewald i sur., 2008).

Zbog gore navedenih mehanizama uracil i njegovi derivati imaju značajnu ulogu u istraživanju i razvoju lijekova s raznolikim biološkim djelovanjem. Često se ističu antivirusne i antitumorske aktivnosti analoga uracila, a istovremeno pokazuju i herbicidno, insekticidno te baktericidno djelovanje (Lindahl, 1993). Iako se obično povezuje s kemoterapijom, uracil i njegovi derivati imaju široku primjenu u liječenju različitih bolesti, uključujući virusne infekcije, dijabetes, bolesti štitnjače i genetske poremećaje koji su autosomalno recesivni. Modifikacijom strukture uracila stvaraju se derivati s unaprijeđenim farmakološkim i farmakokinetičkim svojstvima, uključujući povećanu bioaktivnost, selektivnost, metaboličku stabilnost, apsorpciju i manju toksičnost. Razvoj novih derivata uracila kao bioaktivnih tvari povezan je s modifikacijama supstituenata na N-1, N-3, C-5 i C-6 položaju pirimidinskog prstena (Ramesh i sur., 2020; Pałasz i Ciez, 2014).

Spojevi koji proizlaze iz zamjene halogenom na C-5 položaju uracila čine značajnu klasu analoga zbog svoje mutagene i antiviralne djelotvornosti. Prisutnost alkinilne skupine na C-5 položaju pirimidina povoljna je za kemijske transformacije, dok se selektivnost antivirusnog djelovanja tih spojeva povećava s rastom veličine supstituenata (Blewett i sur., 2001; Lindahl, 1993).

Tiouracil ($C_4H_4N_2OS$) je kemijski derivat uracila u kojemu je atom kisika na 2-poziciji prstena supstituiran sumporom (slika 5), koji je prvi takav tioamidni antitireoidni lijek. Tio-derivati pirimidinskih baza, kao što su 2-tiouracil, 6-metil-2-tiouracil i 2-tiocitozin, prisutni su kao manje komponente t-RNA, te imaju značajnu ulogu u biološkoj, farmakološkoj i medicinskoj kemiji zbog svojih bioloških, farmakoloških i spektroskopskih svojstava. Njihovi derivati koji su supstituirani sumporom, dušikom ili oboje, pokazali su terapijska svojstva, posebno u kontekstu antivirusne terapije (Tanaka i sur., 1995).

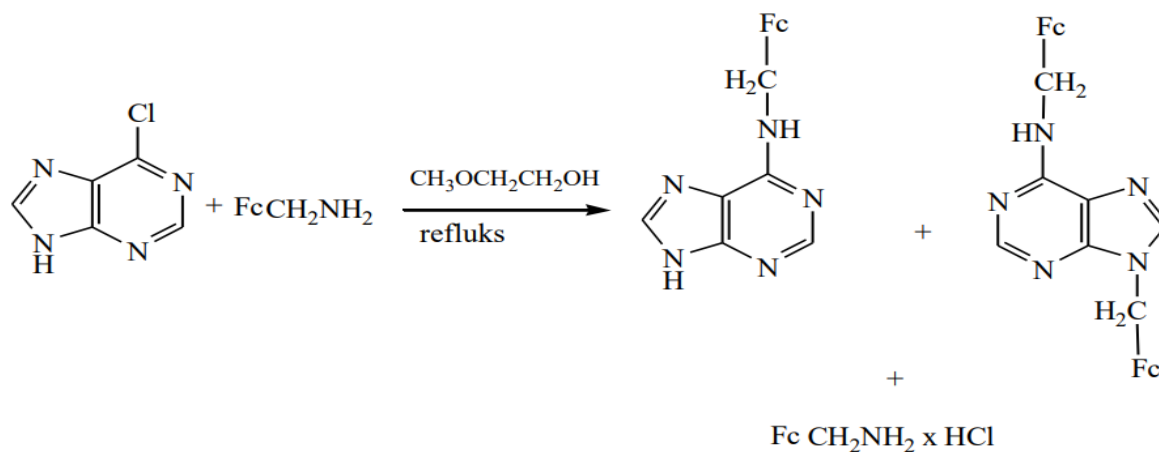


Slika 5. Struktura 2-tiouracila (Mohamed i sur., 2015)

2.4.2. Derivati ferocena i nukleobaza

Ferocenilna skupina zajedno sa purinima i pirimidinima čini zanimljive bioorganometalne spojeve jer njihove strukture sadrže komponente koje su biološki i elektrokemijski aktivne i širokog potencijala primjene zbog antitumorskih i antioksidativnih svojstava (Nguyen i sur., 2014).

Ferocen se pokazao kao izvrstan izbor u dizajnu novih lijekova zbog svojih jedinstvenih svojstava. Njegova mala veličina, aromatičnost, hidrofobnost, stabilnost prema zraku i vlazi, kao i povoljni redoks potencijali čine ga idealnim kandidatom za razvoj inovativnih farmaceutskih spojeva (Esparza-Ruiz i sur., 2012). Chen i sur. (1980) su prvi puta sintetizirali derivat ferocena i nukleobaze 1980. godine tako što su povezali ferocen i adenin (slika 6). Ove reakcije provedene su u vodi te je dobiveno relativno nisko iskorištenje. Volumetrijskom tehnikom pokazano je kako derivati mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom putem vodikovih veze (Chen, 1980).



Slika 6. Reakcija derivata ferocena i derivata adenina (Chen, 1980)

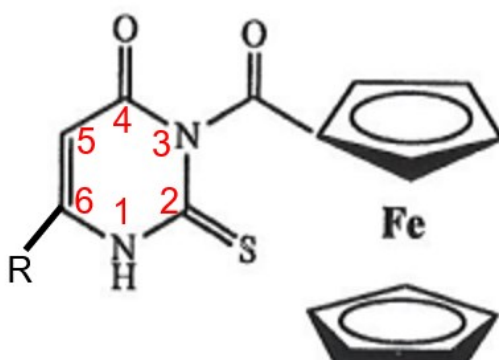
Nadalje, vezivanje supstituenata na molekulu ferocena omogućeno je rotacijom ciklopentadienilnih prstenova ferocena, što omogućuje molekuli da poprimi biološke karakteristike kada se na nju veže neka biološka molekula, poput nukleobaze. Ferocen se veže na dušičnu bazu kao N-supstituent, a mjesto vezivanja određuje biološka svojstva samog spoja (Kowalski i sur., 2013). Brojna *in vitro* istraživanja provedena s ferocenskim nukleobazama pokazuju citotoksično djelovanje na različite tumorske stanice (Nguyen i sur., 2014), a u ovom diplomskom radu ispitano je *in vitro* djelovanje novosintetiziranih derivata 2-tiouracila konjugiranih s ferocenom na HeLa staničnu liniju.

3. ESKPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila

U ovom diplomskom radu provedeno je ispitivanje biološke aktivnosti tri biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (slika 7), sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Pripravljene biokonjugate (1, 2, 3) razlikuju se u strukturi po supstituentu na C-6 položaju: 1) R=H (2-tiouracil), 2) R= -CH₃ (6-metil-2-tiouracil), 3) R= -CH₂CH₂CH₃ (6-propil-2-tiouracil). Opisani spojevi sadrže ferocenilni dio vezan karbonilnim mostom na N-3 položaju.



- 1) R=H
- 2) R= CH₃
- 3) R= CH₂CH₂CH₃

Slika 7. Kemijska struktura ispitivanih biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila

3.1.2. Kemikalije

- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Medij za uzgoj stanica, DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

- Metanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- Fetalni goveđi serum, FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kristal ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- Reagens za određivanje stanične smrti: Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Reagens za određivanje vijabilnosti stanica: The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, SAD
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

3.1.3. Pufferi

PBS puffer (pH=7,4):

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄ 1,44 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- Destilirana voda do 1000 mL

Otopina tripan plavo (0,4 %):

- Boja tripan plavo 0,04 g
- PBS puffer do 10 mL

Otopina kristal ljubičasto (0,2 %):

- Boja kristal ljubičasto 0,2 g
- 2 % etanol 10,00 mL

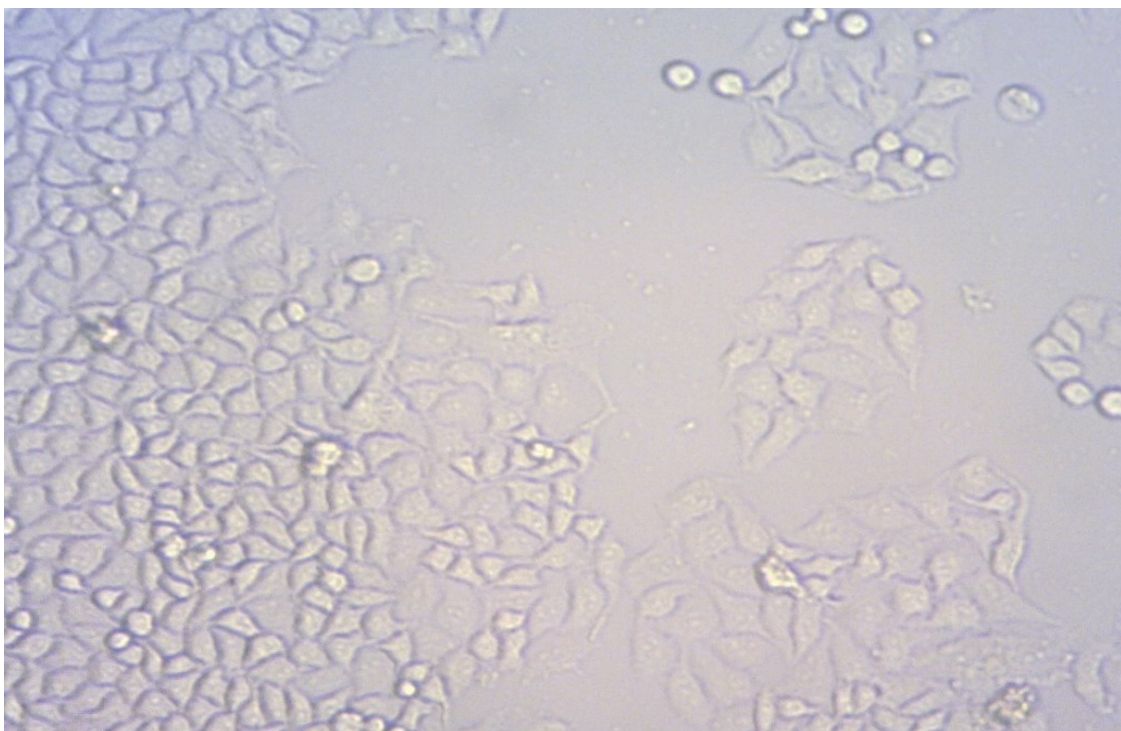
3.1.4. Uređaji i oprema

- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak i zamrzivač (+4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, Eppice)
- Analizator staničnog zdravlja - Muse™ Cell Analyzer, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Ploče s 6 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T-boce od 25 cm², Corning, SAD
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija

3.1.5. HeLa stanice

U ovom diplomskom radu korištena je HeLa kontinuirana stanična linija koja je izolirana iz tumora vrata maternice i upotrebljava se kao izvrstan biološki model za razna *in vitro*

istraživanja. Kontinuirane stanične linije su ključne za istraživanja jer omogućuju ponovljive eksperimente kao i dugoročna istraživanja na istim tipu stanica što bi inače bilo nemoguće s primarnim staničnim kulturama koje imaju ograničen životni vijek. HeLa stanice postale su ključni alat u biomedicinskim istraživanjima zbog svoje sposobnosti beskonačne diobe i uporabe u raznim znanstvenim studijama uključujući istraživanja raka, virusologije i genske terapije. HeLa stanična linija iz CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany) radne banke stanica, prikazana je na slici 8. Ova stanična linija je adherentna, morfološki epitelna te se uzgaja u inkubatoru s atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % ugljikovog dioksida pri temperaturi 37 °C. Uzgoj HeLa stanica provodi se u petrijevim zdjelicama ili u ploči s jažicama prilikom postavljanja eksperimenata.



Slika 8. Mikroskopska slika HeLa stanične linije (*vlastita fotografija*)

3.2. METODE

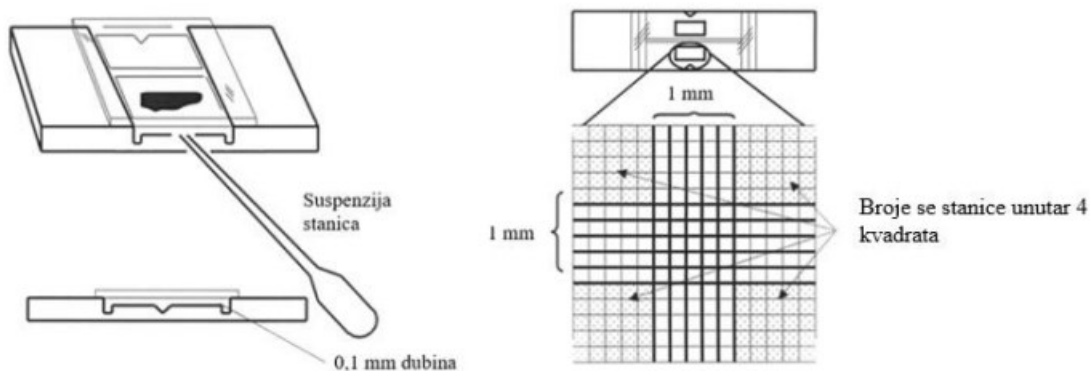
U radu sa staničnim linijama obavezni su aseptični uvjeti uz korištenje steriliziranog laboratorijskog pribora. U ovom istraživanju sav rad s HeLa stanicama provoden je u laminaru, odnosno, komori za sterilni rad. Također kako bi se mogućnost kontaminacije svela na najmanju moguću mjeru, ruke i radna površina su prije bilo kakvog rada prebrisane 70 %-tnim

etanolom.

3.2.2. Uzgoj stanica i određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

HeLa stanice čuvane su na -70 °C u ampulama u mediju za zamrzavanje i te je ampule potrebno prvo odmrznuti uranjanjem u vodenu kupelj gdje se stanice zagrijevaju do 37 °C. Nakon odmrzavanja suspenziju je potrebno centrifugirati kako bi se uklonio medij za zamrzavanje, a potom se talog stanica resuspendira u svježem DMEM mediju uz dodatak 10 % seruma. Potom se stanice uzgajaju u inkubatoru pri kontroliranim uvjetima (37 °C, atmosfera zraka koja sadrži 5 % ugljikovog dioksida). Kako je HeLa stanična linija adherentnog tipa prije precjeppljivanja potreban je tretman tripsinom kako si se stanice odvojile od podloge za rast. Prvo se uklanja medij za uzgoj, zatim se stanice ispiru PBS puferom i potom se dodaje tripsin. Nakon dodatka tripsina petrijeva zdjelica sa stanicama odlaže se u inkubator na nekoliko minuta, dok se stanice ne odvoje od podloge. Odvajanje stanica od podloge pratimo pod inverznim mikroskopom, kada se stanice odvoje zaustavlja se djelovanje tripsina dodatkom svježeg medija. Sterilno se izuzme mali alikvot suspenzije stanica i pomiješa sa bojom tripan-plavo te koristi za određivanje broja stanica. Mrtve stanice sa propusnom membranom obojati će se plavo, žive stanice ostati će nebojene i svjetlije. Pri brojenju stanica koristi se Neubauerova komorica (slika 9). Neubauerova komorica sadrži mrežu jednog velikog kvadrata koji unutar sebe sadrži 9 manjih kvadrata. Stanice se broje u četiri rubna kvadrata koja su podjeljena na 16 manjih kvadrata (4x4). Broj stanica po mililitru suspenzije određuje se prema formuli [1].

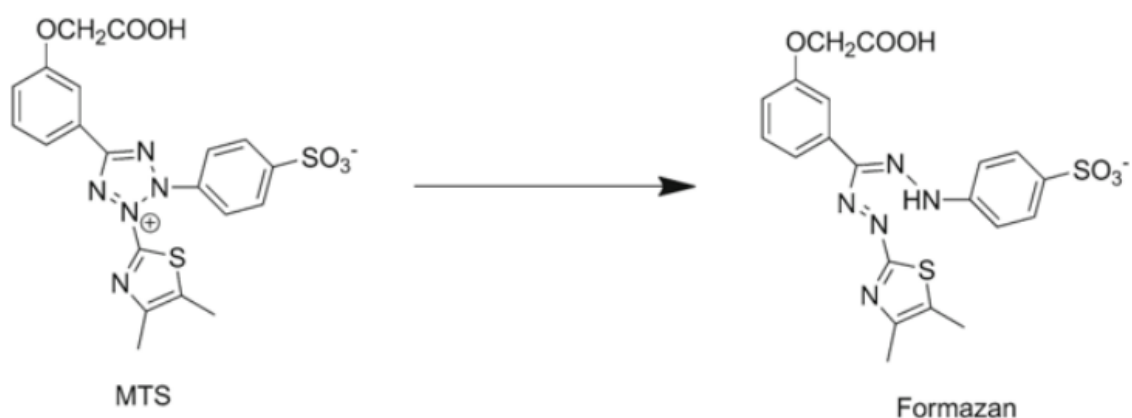
$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} * 5000 \quad [1]$$



Slika 9. Mreža Neubauerove komorice (prema NIOS, 2022)

3.2.3. MTS metoda određivanja preživljenja stanica

Kako bi se odredilo preživljenje stanica odnosno njihova vijabilnost u testovima citotoksičnosti i proliferacije koristi se kolorimetrijska metoda MTS. The CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution reagens sadrži tetrazolijevu sol MTS [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES (fenazin etosulfat) čija uloga je poboljšati stabilnost reagensa. U stanicama se MTS sol reducira do ljubičasto obojenog produkta, formazana koji je topljiv u staničnom mediju (slika 10). Redukcija tetrazolijeve soli u formazan odvija se uz oksidaciju koenzima NADPH ili NADH u NADP⁺ ili NAD⁺ u metabolički aktivnim stanicama djelovanjem enzima dehidrogenaze. Intenzitet obojenja medija, koji se razvio, izravno je proporcionalan broju živih stanica.



Slika 10. Redukcija tetrazolijeve soli (MTS) u formazan (prema McCauley i sur., 2013)

Nakon brojanja stanica u Neubauerovoj komorici izračunat je potreban volumen za naciepljivanje stanica u ploču s 96 jažica te je u svaku jažicu naciepljeno po 100 μL suspenzije stanica početne koncentracije oko 3×10^4 stanica mL^{-1} . Stanice se potom stavljaju u inkubator na 37 °C te nakon 24h, što je vrijeme potrebno kako bi se stanice prihvatile za podlogu za rast i nastavile proliferaciju, tretiraju se ispitivanim biokonjugatima ferocena i 2-tiouracila u željenim koncentracijama. Nakon određenog vremena (24, 48 ili 72 sata) u svaku jažicu dodaje se po 10 μL MTS reagensa te se stanice inkubiraju naredna 3 do 4 sata na 37 °C. Intenzitet razvijene boje mjeri se spektrofotometrijskim čitačem ploča i očitava kao apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm. Apsorbancija koja je izmjerena proporcionalna je količini nastalog formazana, kao i broju živih stanica. Postotak preživljenja stanica izračunava se množenjem omjera apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica sa 100 tj., prema formuli [2]:

$$\text{Preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100 \quad [2]$$

3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica otopinom kristal-ljubičasto

Test formiranja kolonija, poznat i kao klonogeni test jest *in vitro* metoda za procjenu

preživljenja stanica, odnosno njihovog klonogenog rasta. Ova metoda temelji se na sposobnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju, pri čemu se kolonija definira kao skupina od najmanje 50 stanica (Franken i sur., 2006). Klonogena analiza prati sposobnost svake stanice u populaciji da formira klonove, odnosno ispituje svojstvo neograničenog rasta, što je karakteristično obilježje tumorskih stanica. Klonogena analiza obično se koristi za mjerenje utjecaja ionizirajućeg zračenja ili citotoksičnih agensa na proliferaciju stanica i njihovu sposobnost stvaranja kolonija. Ova metoda često se primjenjuje u istraživanjima kako bi se predvidjelo ponašanje tumorskih staničnih linija na nove kemoterapeutske agense.

Postupak klonogene analize započinje naciepljivanjem prethodno uzgojenih HeLa stanica u ploče s 6 jažica, u početnoj koncentraciji od 100 stanica mL⁻¹, odnosno 200 stanica u 2 mL medija za uzgoj po svakoj jažici. Stanice se inkubiraju te se nakon 24 sata radi tretman s ispitivanim ferocenskim biokonjugatima. Tretman je proveden s dvije koncentracije spojeva, 10 μM i 50 μM. Također u obje ploče nalaze se i kontrolne stanice koje nisu tretirane ferocenskim biokonjugatima. Tri dana nakon tretiranja stanica uklonjen je hranjivi medij u kojemu su dodani ispitivani spojevi te je dodan svježi medij i stanice su vraćene na inkubaciju.

Nakon tretmana ispitivanim tvarima, stanicama koje su preživjele, potrebno je oko 1-3 tjedna kako bi se formirale kolonije. U ovom radu kolonije su bile vidljive 20 dana nakon naciepljivanja. Potom je potrebno provesti bojanje stanica, odnosno poraslih kolonija bojom kristal-ljubičasto. Postupak započinje uklanjanjem medija i ispiranjem stanica s 1 mL PBS pufera. Zatim se dodaje 1,5 mL metanola za fiksaciju stanica, koji se nakon 10 minuta uklanja. Ploča se ostavlja na zraku kako bi se osušila u potpunosti, a kako bi se ovaj proces sušenja ubrzao mogu se ploče staviti nakratko u inkubator. Nakon sušenja dodaje se 0,5 mL boje kristal-ljubičasto koju je važno ravnomjerno rasporediti u jažicama. Nakon 10 minuta, zadnji korak ove metode uključuje uklanjanje boje, ispiranje jažica s 1 mL PBS pufera i deionizirane vode.

Na temelju broja poraslih kolonija izračunata je učinkovitost naciepljivanja (engl. *plating efficiency*, PE) tj. omjer broja poraslih kolonija u odnosu na broj stanica koje smo naciepili i to za kontrolne stanice koje nisu tretirane. Također, izračunata je frakcija preživljenja (engl. *surviving fraction*, SF), odnosno udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima (Franken i sur., 2006).

Učinkovitost naciepljivanja (PE):

$$PE = \frac{\text{broj stanica poraslih u kontroli}}{\text{broj stanica koje smo naciepili}} * 100 \quad [3]$$

Frakcija preživljenja (SF):

$$SF = \frac{\text{broj kolonija poraslih nakon tretmana}}{\text{broj stanica koje smo nacijepili*PE}} \quad [4]$$

3.2.5. Analiza stanične smrti primjenom Muse™ analizatora staničnog zdravlja

Muse™ analizator staničnog zdravlja je jednostavnija izvedba protočnog citometra, takozvani mini protočni citometar koji omogućuje praćenje broja i preživljenja stanica, stanične proliferacije, apoptoze i staničnog ciklusa, kao i oksidativnog stresa. Protočna citometrija je objektivna, osjetljiva, brza, točna i kvantitativna metoda koja omogućuje analizu velikog broja stanica i staničnih svojstava po uzorku. Koristi za detekciju i mjerenje fizičkih i kemijskih svojstava populacije stanica ili čestica. Primjenjuje se u raznim granama medicine, kao što su patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina, ali najčešće se koristi u hematologiji i imunologiji.

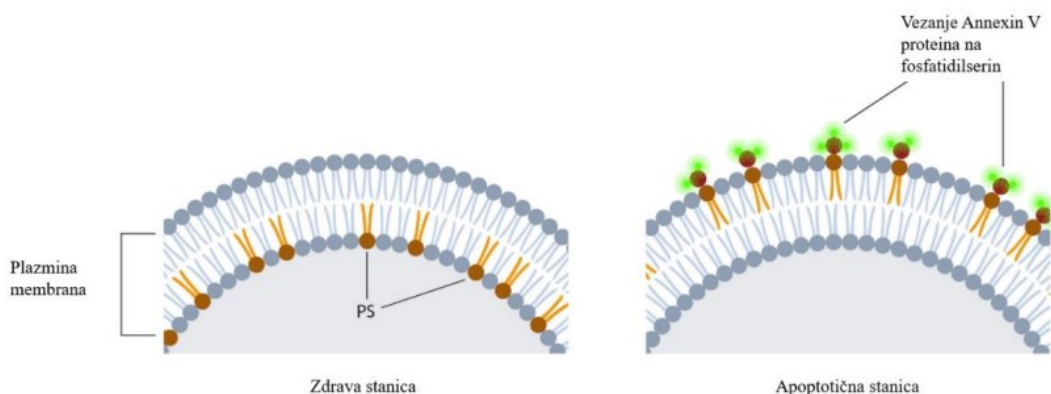
Tijekom ispitivanja biološke aktivnosti različitih spojeva *in vitro*, zapažena citotoksičnost je najčešće posljedica učinka tih tvari na dva osnovna stanična procesa, staničnu diobu i staničnu smrt. Navedeni procesi mogu se pratiti primjenom protočne citometrije, koja omogućuje analizu velikog broja stanica u kratkom vremenu. Analiza stanica se provodi na temelju izgleda i volumena, odnosno veličine stanica te specifičnog obilježavanja fluorescentnim tvarima.

3.2.5.1. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit omogućuje kvantitativnu analizu živih stanica, stanica u ranoj i u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica pomoću Muse™ analizatora staničnog zdravlja, bilo da se radi s adherentnim ili suspenzijskim staničnim linijama. Dobiveni rezultati se izražavaju kao koncentracija (stanica mL⁻¹) te postotak živih, stanica u ranoj, kasnoj ili ukupnoj apoptozi te mrtvih stanica.

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagens sadrži Annexin V, kalcij-ovisan protein koji ima visok afinitet za vezanje na fosfatidilserin (PS). PS je lipid koji se u zdravim stanicama nalazi na unutarnjoj strani stanične membrane, dok se u stanicama koje su ušle u proces

apoptoze premješta na vanjsku stranu membrane. U ranoj fazi apoptoze, molekule PS migriraju na vanjsku površinu stanične membrane gdje se Annexin V veže na njih. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagens također sadrži 7-aminoaktinomicin D (7-AAD), fluorescentni interkalator koji pokazuje spektralni pomak nakon vezanja na DNA. Kompleks 7-AAD/DNA pobuđuje se pri 488 nm, dok je maksimum emisije pri 647 nm, što omogućuje analizu uzoraka. 7-AAD se uglavnom izlučuje iz živih stanica, ali može označiti stanice s oštećenom staničnom membranom ili one koje su prethodno fiksirane i permeabilizirane, što ga čini markerom za mrtve stanice, dok ne obilježava žive, zdrave i rano apoptotične stanice. Ova metoda omogućuje raniju detekciju apoptoze u usporedbi s metodama koje određuju fragmentaciju DNA ili aktivaciju kaspaza, budući da je jedna od prvih promjena u ranoj apoptozi premještanje PS s unutarnje na vanjsku stranu membrane (slika 11).



Slika 11. Translokacija fosfatidilserina na vanjsku stranu membrane i vezanje Annexin V proteina (*prema AAT Bioquest, 2021*)

Na temelju navedenoga primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a moguće je razlikovati četiri populacije stanica:

- žive i zdrave stanice: annexin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: annexin V (+) i 7-AAD (-)
- stanice u kasnoj fazi apoptoze i mrtve stanice: annexin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: annexin V (-) i 7-AAD (+)

Medij u kojem su uzgajane adherentne stanice potrebno je sakupiti u čiste tubice, isprati stanice PBS-om te dodati odgovarajuću količinu tripsina da se stanice odvoje od podloge. Zatim je potrebno pripojiti tripsinizirane stanice sakupljenom mediju i nakon toga uzeti alikvot stanica (20 μL) za određivanje broja stanica u uzorku. Potom se uzorci centrifugiraju 5 minuta na 300 g. Supernatant se uklanja, a ovisno o izračunatom broju stanica, stanice se resuspendiraju u odgovarajućem volumenu DMEM medija s minimalno 1 % FBS-a da bi konačna koncentracija stanica bila $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . 100 μL reagensa i 100 μL tako pripremljene suspenzije stanica čine reakcijsku smjesu, koju je zatim potrebno inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićenu od svjetla. Prije mjerenja na Muse™ uređaju svaki je uzorak potrebno lagano resuspendirati da agregirane stanice ne bi začepile cjevčice. Parametri analize se postavljaju s negativnom i pozitivnom kontrolom te slijedi analiza pojedinačnih uzoraka.

3.2.6. Obrada podataka

Za potrebe statističke obrade podataka pojedinačnih uzoraka dobivenih eksperimentalno, rezultati su iskazani kao prosječne vrijednosti uzoraka u provedenim pokusima [5], te su iskazani i sa standardnim devijacijama [6], pri čemu je n ukupan broj uzoraka, a x_i vrijednost pojedinačnog uzorka:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [5]$$

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [6]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

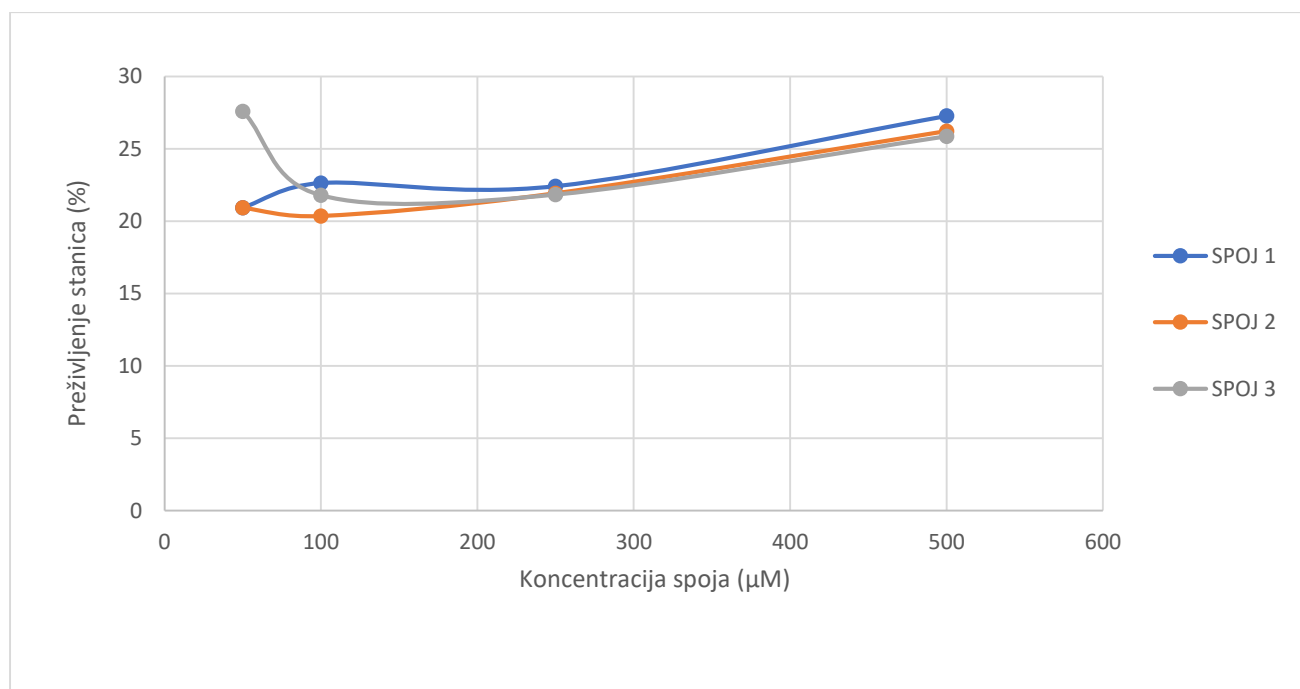
Tumori su značajan zdravstveni problem širom svijeta, a utječu na živote milijuna ljudi svake godine. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije u 2020. godini zabilježeno je približno 19,3 milijuna novih slučajeva raka, kao i 10 milijuna smrti uzrokovanih rakom. Najčešći tipovi raka uključuju rak dojke, pluća, debelog crijeva, prostate i želuca. Pojavnost i smrtnost od raka variraju širom svijeta, pri čemu razvijene zemlje s visokim prihodima imaju veću pojavnost, a zemlje s niskim i srednjim prihodima veću smrtnost zbog ograničenog pristupa dijagnostici i liječenju. Rana dijagnostika i liječenje ključni su za poboljšanje ishoda pacijenata s rakom. Moderne metode dijagnostike uključuju slikovne tehnike (CT, MRI, PET), biopsije i laboratorijske testove. Liječenje može uključivati kirurške zahvate, kemoterapiju, radioterapiju, imunoterapiju i ciljane terapije. Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju, izazovi ostaju. To uključuje nejednakosti u pristupu zdravstvenoj skrbi, potrebu za razvojem učinkovitijih i pristupačnijih terapija, te borbu protiv otpornosti na liječenje. Tumori predstavljaju kompleksan problem koji zahtijeva multidisciplinarni pristup i intenzivna istraživanja lijekova koji mogu imati antitumorski potencijal, a često su to i novosintetizirani spojevi.

Antitumorski lijekovi koji sadrže ferocen predstavljaju zanimljivo područje istraživanja u medicinskoj kemiji i farmaciji. Djeluju putem 3 mehanizma: redoks aktivnosti, interkalacije s DNA molekulom i inhibicijom enzima. Istraživanja ferocenskih spojeva za liječenje tumora još su u prekliničkim fazama, ali su obećavajuća, budući da *in vitro* i *in vivo* studije pokazuju da mnogi ferocenski derivati imaju snažno antitumorsko djelovanje.

Obzirom na navedeno u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, pripremljeni su spojevi koji uključuju ferocen kao elektrokemijski aktivni fragment i nukleobaze kao osnovne strukturne jedinice nukleinskih kiselina. U ovom radu je ispitano biološko djelovanje tri takva spoja, derivata ferocena i 2-tiouracila, na *in vitro* rast humanih stanica karcinoma grlića maternice (stanična linija HeLa), kao i njihovo djelovanje na osnovne stanične procese. MTS metodom ispitivan je citotoksični učinak te je izračunata IC_{50} vrijednost. Pomoću analizatora staničnog zdravlja Muse™ praćeno je potiču li ispitivani spojevi staničnu smrt te je također ispitan i učinak ferocenskih spojeva na klonogeni rast.

4.1. UTJECAJ BIONKONJUGATA FEROCENA NA PREŽIVLJENJE HeLa STANIČNE LINIJE

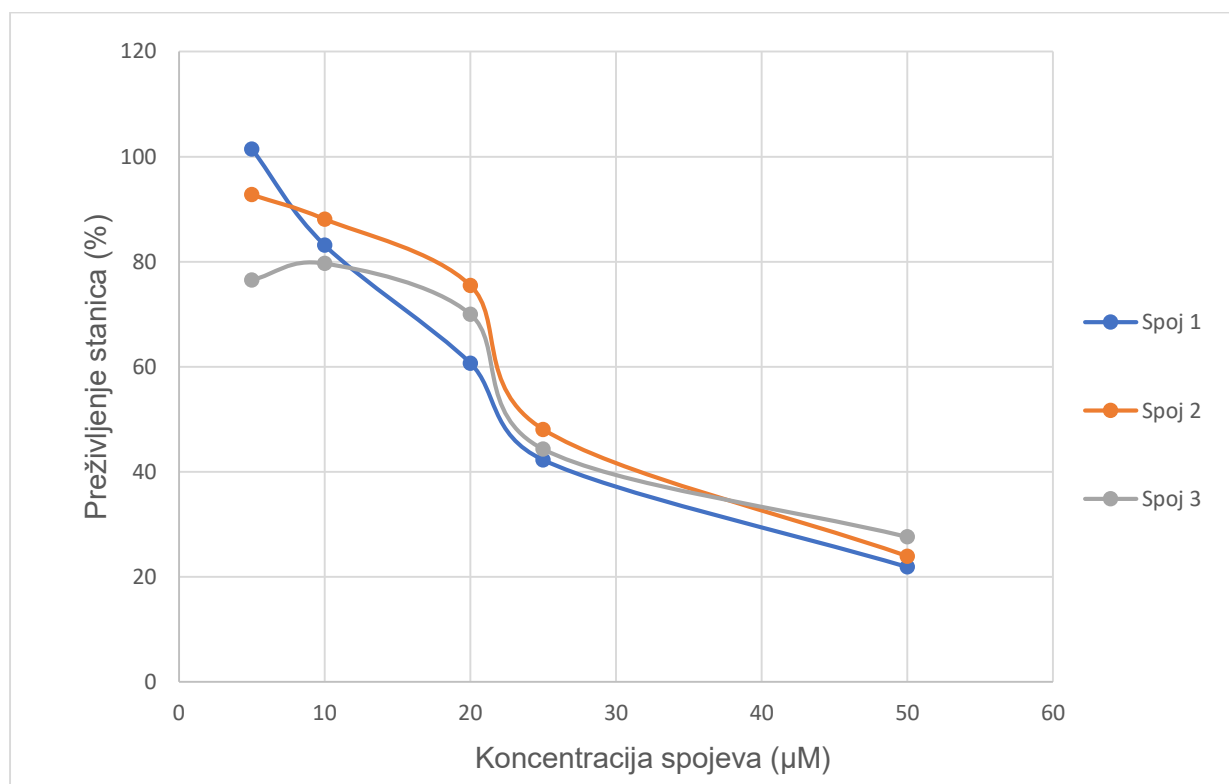
Kako bi se ispitao citotoksični učinak ferocenskih derivata 2-tiouracila, odnosno djelovanje ovih spojeva na preživljenje HeLa stanica, stanice su prethodno uzgojene te nacijepijene u mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Nakon 24 sata tretirane su ispitivanim spojevima. U prvotnoj fazi istraživanja, s obzirom na to da su spojevi novosintetizirani i nisu do sada ispitani *in vitro*, radilo se sa širim rasponom koncentracija, jer se nije mogao predvidjeti njihov učinak. Stoga su tri novosintetizirana spoja testirana do visoke koncentracije od 500 μM , odnosno s nizom različitih koncentracija (50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM). Nakon 72 sata od tretmana, MTS metodom te primjenom čitača mikrotitarskih ploča određeno je preživljenje stanica. Na slici 12 nalazi se grafički prikaz rezultata mjerenja, prikazanih kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji ispitivanih spojeva.



Slika 12. Utjecaj spojeva 1-3 (50 μM - 500 μM) na preživljenje HeLa stanične linije tijekom 72 satnog tretmana određen MTS metodom

Na slici 12 prikazani su rezultati djelovanja sva tri derivata tiouracila u koncentracijama do 500 μM . Tu nije vidljiv učinak ovisan o dozi, jer je zabilježen jak inhibitorski učinak u

ispitivanom rasponu koncentracija, otprilike oko 65 % do 80 %, ovisno o spoju. Zbog toga su u nastavku istraživanja HeLa stanice tretirane manjim koncentracijama spojeva, u rasponu koncentracija do 50 μM . Kao što je vidljivo na slici 13, stanice su tretirane koncentracijama: 5 μM , 10 μM , 20 μM , 25 μM i 50 μM , kako bi se ispitalo hoće li pri tretmanu nižim koncentracijama biti vidljiv učinak ovisan o dozi i hoće li citotoksičnost biti manja.



Slika 13. Utjecaj spojeva 1-3 (5 μM - 50 μM) na preživljenje HeLa stanične linije tijekom 72 satnog tretmana određen MTS metodom

Prema rezultatima prikazanim na slici 13 može se zaključiti kako sva tri spoja djeluju inhibitorno na rast HeLa stanične linije te u rasponu od 5 μM do 50 μM pokazuju učinak ovisan o dozi. S porastom koncentracije ispitivanih spojeva smanjuje se preživljenje HeLa stanica, koje je u konačnici, pri 50 μM , vrlo slično. Nema značajnije razlike između ova tri spoja međusobno te svi pri jednakim koncentracijama imaju sličan učinak. U usporedbi s drugim spojevima, spoj 1 pokazuje pri nižim koncentracijama nešto izraženije citotoksično djelovanje, odnosno pad preživljenja je do 25 μM drastičniji u odnosu na spojeve 2 i 3. Do navedene koncentracije (25 μM), spoj 2 pokazuje najviše preživljenje stanica, što sugerira da je najmanje citotoksičan u rasponu od 5 μM do 25 μM , nakon čega je i njegov učinak sličan onome kod spojeva 1 i 3. Pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 50 μM , sva tri spoja pokazuju vrlo sličnu

razinu preživljenja stanica, oko 20 %. To ukazuje na to da pri visokoj koncentraciji, sva tri spoja imaju sličan citotoksični učinak, bez obzira na početne razlike u citotoksičnosti pri nižim koncentracijama.

Kada se pri eksperimentalnom radu i ispitivanju *in vitro* citotoksičnosti postigne 50 % inhibicije staničnog rasta, može se izračunati IC₅₀ vrijednost (engl. *Inhibitory concentration*) ili 50-postotna inhibitorna koncentracija. IC₅₀ vrijednost definira onu koncentraciju spoja koja inhibira 50 % rasta stanica. Iz podataka prikazanih na slikama 12 i 13 moguće je izračunati IC₅₀ vrijednosti. IC₅₀ vrijednosti se dobivaju iz eksperimentalne ovisnosti preživljenja stanica o dozi ispitivanog spoja, koristeći za izračun onu jednadžbu pravca ili krivulje koja najpreciznije opisuje tu ovisnost ($R^2 \sim 1$). Izračunate IC₅₀ vrijednosti su prikazane kao masene i molarne koncentracije u tablici 1 za sva tri ispitana spoja.

Tablica 1. IC₅₀ vrijednosti za spojeve 1-3

	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (mg L ⁻¹)
Spoj 1	23,39	7,96
Spoj 2	29,22	10,35
Spoj 3	28,34	10,82

Iz tablice 1 može se uočiti da sva tri ferocenska konjugata imaju slične IC₅₀ vrijednosti, što je u skladu s grafičkim prikazom rezultata preživljenja HeLa stanica na slici 13. Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako spoj 1 ima nešto izraženiji inhibitorni učinak, odnosno najnižu IC₅₀ vrijednost, što se može povezati sa zapaženim nešto jačim učinkom tog spoja pri koncentracijama nižim od 25 μM.

Ispitivani biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila nalaze se u početnoj fazi istraživanja kao potencijalni terapijski agensi. Prema dostupnoj literaturi, ne postoje

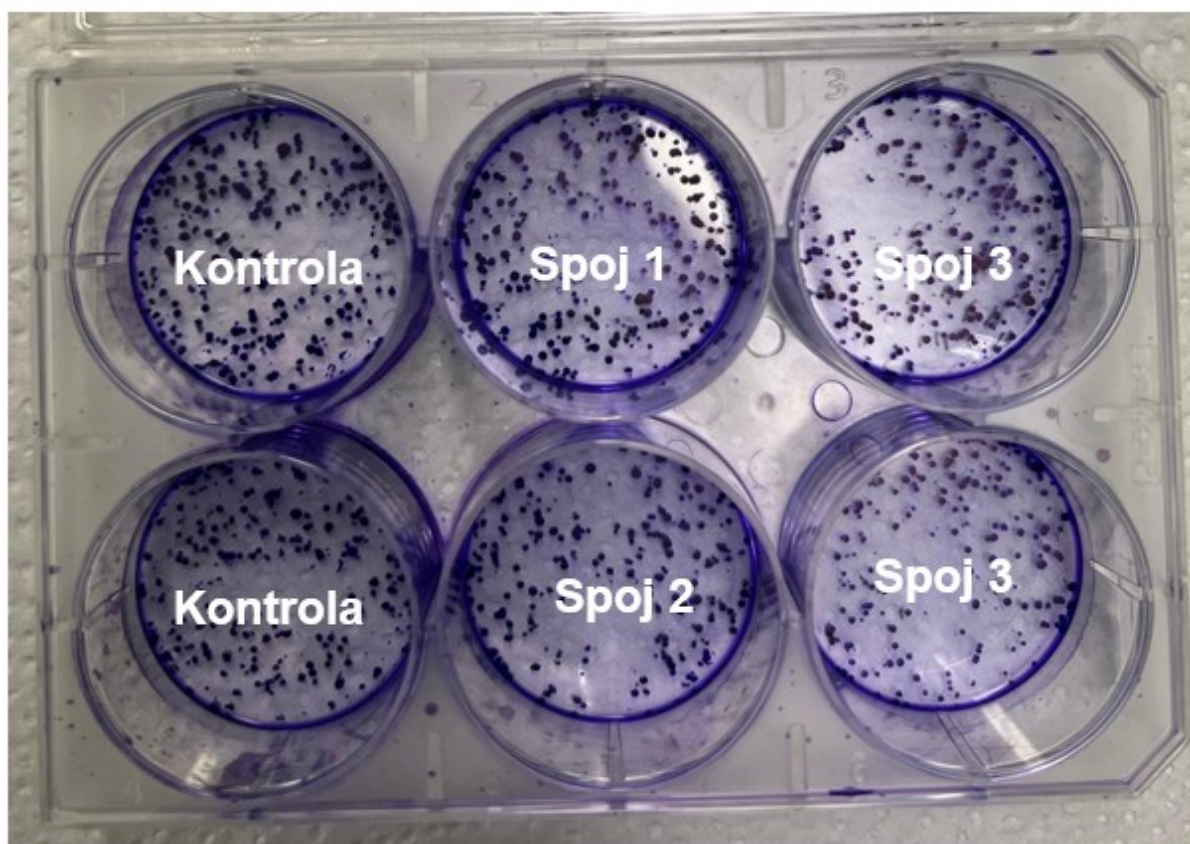
znanstveni radovi o njihovom biološkom učinku. Djaković i suradnici (2021) sintetizirali su mono- i bis-ferocenske konjugirane 5-supstituirane uracilske derivate, koji su povezani 1,2,3-triazolnim mostom. Uočeno je kako ferocenska jedinica i razmaknica između ferocena i triazola utječu na sposobnost hvatanja radikala, a bis-ferocenski uracilski derivati pokazali su bolju antiproliferativnu aktivnost od svojih mono-ferocenskih analoga (neobjavljeni rezultati). Bis-ferocenski metil i halogen-supstituirani uracilski derivati pokazali su izražene i selektivne citostatičke aktivnosti na stanice adenokarcinoma kolona (CaCo-2) i Burkittovog limfoma (Raji) s rasponom IC_{50} vrijednosti od 3,7 do 13 μM ovisno o ispitivanom konjugatu i tipu stanice, s većom potentnošću i selektivnošću od referentnog lijeka 5-fluorouracila čija IC_{50} vrijednosti iznosi 8 μM . Bis-ferocenski 5-klorouracil izazvao je značajan poremećaj u membranskom potencijalu mitohondrija, što je bilo popraćeno aktivacijom apoptoze u stanicama CaCo-2, Raji i stanicama akutne limfoblastične leukemije. Prema HeLa staničnoj liniji pokazao je izrazitu inhibiciju s IC_{50} vrijednosti od 5,6 μM što je manje od IC_{50} vrijednosti dobivenih ispitivanjem spojeva u ovome radu. Snažna antiproliferativna aktivnost navedenih spojeva mogla bi biti povezana s poremećajem membranskog potencijala mitohondrija praćenim indukcijom apoptoze (Djaković i sur., 2021).

Nadalje, rezultati u ovom radu mogu se i usporediti s antitumorskim lijekovima čija je aktivnost dobro poznata, kao što je npr. cisplatin. Ispitan je citotoksični učinak cisplatina na HeLa staničnu liniju, pri kojem IC_{50} vrijednost iznosi 22,4 μM nakon 24h, odnosno 12,3 μM nakon 48 h (Becit i sur., 2020). U radu Kovačević i sur. (2021) navode se podaci za poznate kemoterapeutike, kao što su doksorubicin i cisplatin, čije IC_{50} vrijednosti variraju između 0,1 μM i 15 μM , ovisno o tipu stanične linije na kojoj je učinak spojeva ispitan. Prema tome sva tri spoja ispitana u ovome radu posjeduju potencijal kao antitumorski lijekovi, budući da su njihove IC_{50} vrijednost istog reda veličine kao i za spomenute lijekove. Svakako su potrebna daljnja istraživanja, no dobiveni rezultati su obećavajući i vrijedi ih dodatno istražiti. Također, pružaju dobre smjernice za sintezu i razvoj novih, sličnih antitumorskih agenasa.

4.2. KLONOGENA ANALIZA UTJECAJA BIONKONJUGATA FEROCENA NA HeLa STANIČNU LINIJU

Tumorske stanice imaju sposobnost nekontroliranog i ubrzanog dijeljenja. Dok normalne stanice slijede kontrolirane cikluse rasta i dijeljenja, tumorske stanice često

zaobilaze ove mehanizme kontrole, što dovodi do stvaranja tumora i nekontrolirane proliferacije. Klonogena analiza koristi se za procjenu sposobnosti stanica da formiraju kolonije nakon izlaganja različitim uvjetima, poput kemoterapeutskih sredstava ili drugih oblika tretmana. Ova metoda pomaže u određivanju koliko su stanice sposobne preživjeti i dalje se dijeliti nakon tretmana. U osnovi, testira koliko su stanice otporne na određeni stres ili toksične uvjete. Budući da je jedan od glavnih ciljeva liječenja raka smanjenje sposobnosti tumorskih stanica da se dijele i formiraju nove kolonije, ova metoda pomaže u procjeni kako učinkovito lijekovi ili druge terapije inhibiraju rast tumora.



Slika 14. Klonogena analiza nakon tretmana HeLa stanica ispitivanim spojevima 1, 2 i 3 (50 μM) (*vlastita fotografija*)

HeLa stanice nacijepljene su na ploču sa 6 jažica te sljedeći dan tretirane ispitivanim biokunjugatima ferocena u koncentraciji 50 μM kako bi se ispitalo utjecaj spojeva na sposobnost stanica da stvaraju kolonije. Nakon 20 dana uzgoja stanica kolonije su porasle, obojane su otopinom kristal-ljubičasto te izbrojane (slika 14). Na temelju dobivenih rezultata izračunate su frakcije preživljenja (SF) koje su prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Frakcije preživljenja (SF) određene za spojeve 1-3 pri koncentraciji 50 μ M

	SF
Spoj 1	0,008727
Spoj 2	0,008061
Spoj 3	0,007879

U tablici 2 prikazane su vrijednosti SF stanica tretiranih ispitivanim spojevima. Raspon SF vrijednosti kreće se od 0 do 1, pri čemu niže vrijednosti (~ 0) označavaju smanjenu sposobnost stanica za formiranje kolonija nakon tretmana ispitivanim spojem. S druge strane što je frakcija preživljenja veća (~ 1) stanice imaju veću sposobnost stvaranja kolonija nakon tretmana ispitivanim spojem. SF vrijednosti za sva tri ispitana spoja u ovom radu sličnih su vrijednosti, odnosno može se zaključiti da su rezultati klonogene analize u skladu s rezultatima preživljenja HeLa stanica nakon tretmana spojevima 1, 2 i 3. Spoj **2** i **3** su sličnog djelovanja odnosno sličnijih SF vrijednosti, a isto se pokazalo i pri provedenim MTS testovima.

4.3. UTJECAJ FEROCENSKIH BIODONJUGATA NA POTICANJE STANIČNE SMRTI U HeLa STANIČNOJ LINIJI

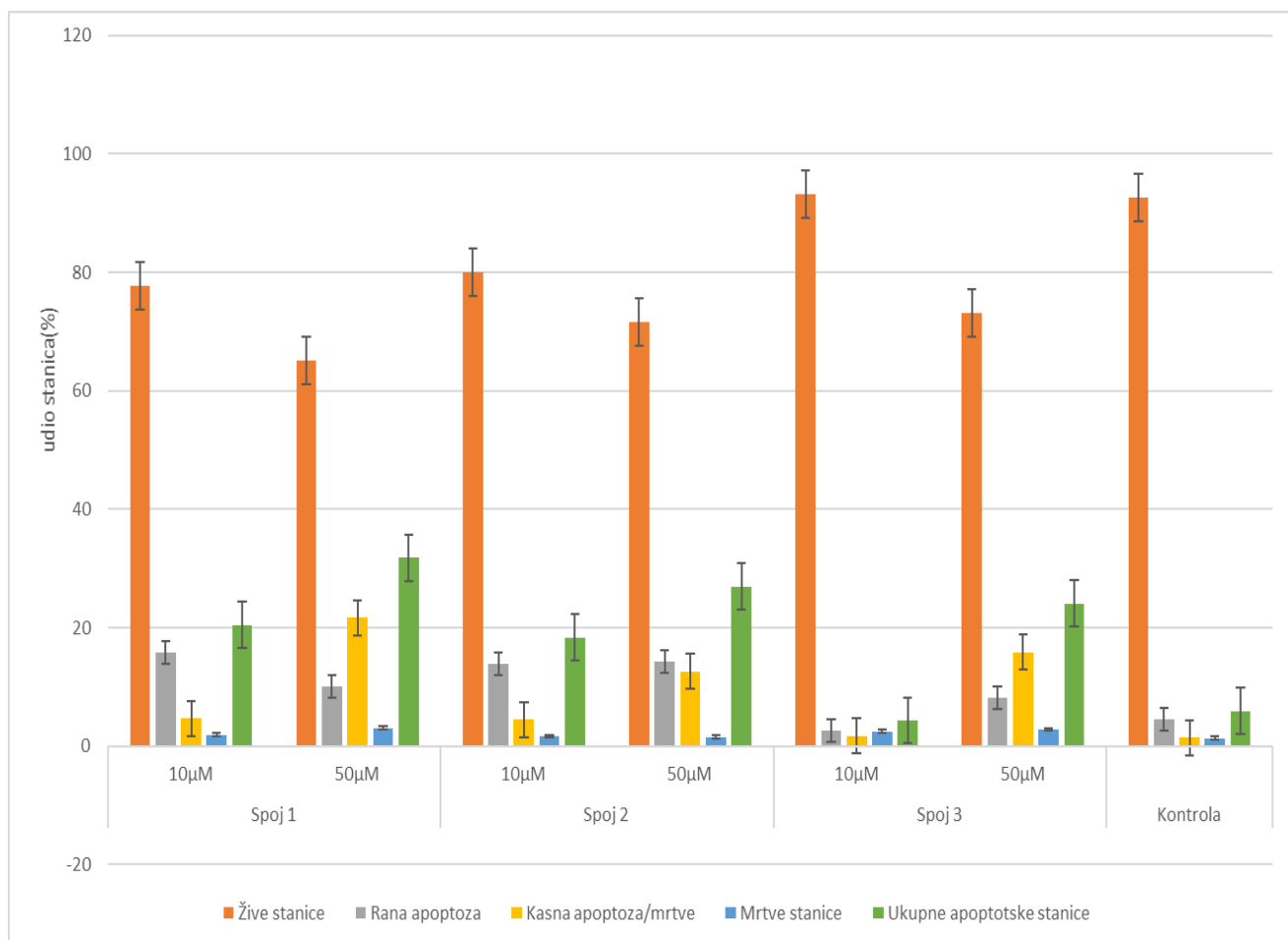
Apoptoza, proces programirane stanične smrti, ključna je za staničnu obnovu, funkciju imunskog sustava, hormonalno ovisnu atrofiju i embrionalni razvoj. Neprikladna apoptoza povezana je s neurodegenerativnim bolestima, ishemijskim oštećenjima, autoimunim

poremećajima i rakom. Kontrola stanične smrti ima veliki terapijski potencijal pa se istraživanja usmjeravaju na mehanizme staničnog ciklusa i apoptoze. Iako su mnogi ključni apoptotski proteini identificirani, njihovi molekularni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (Elmore, 2007).

Neprikladna apoptoza je usko povezana s patogeneom mnogih bolesti, uključujući rak, gdje nedovoljna apoptoza dovodi do maligne proliferacije stanica. Greške u apoptotskim putovima mogu uzrokovati maligne transformacije, metastaze i otpornost na lijekove. Ključni molekularni mehanizmi uključuju proteine Bcl-2 i kaspaze koji reguliraju staničnu smrt. Njihov nedostatak može dovesti do neučinkovite apoptoze i karcinogeneze. Stoga su strategije usmjerene na ove regulatore postale fokus istraživanja raka, jer apoptoza može biti ciljno mjesto u terapiji raka (Farghadani i Naidu, 2022).

Jedna metoda za detekciju apoptoze uključuje označavanje apoptotskih stanica proteinom Annexin V, koji se veže na PS premješten na vanjsku stranu membrane stanica u apoptozi. Annexin V se koristi s fluorescentnim markerom za detekciju. Muse™ analizator staničnog zdravlja, kompaktni stolni instrument koji koristi protočnu citometriju, omogućuje kvantifikaciju i analizu stanične vijabilnosti, staničnog ciklusa, apoptoze i ekspresije proteina. U ovom istraživanju, Muse™ analizator je korišten za analizu živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi, te mrtvih stanica, s rezultatima prikazanim na slici 15.

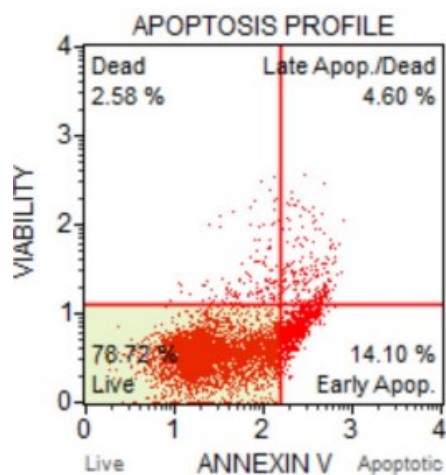
Na slici 15 može se vidjeti kako populaciju HeLa stanica, nakon dodatka određene koncentracije ispitivanih ferocenskih spojeva, pretežno čine žive stanice, s približno sličnim udjelom (%) kao kod kontrolnih, netretiranih stanica. S druge strane, u odnosu na kontrolne stanice vidljiv je porast ukupnih apoptotskih stanica kod HeLa stanica tretiranih sa sva tri spoja. Pri tretmanu stanica spojem **1** u koncentraciji 50 µM udio ukupnih apoptotskih stanica iznosi 31,77 %, spojem **2** (50 µM) 26,92 % i spojem **3** (50 µM) 24,08 %.



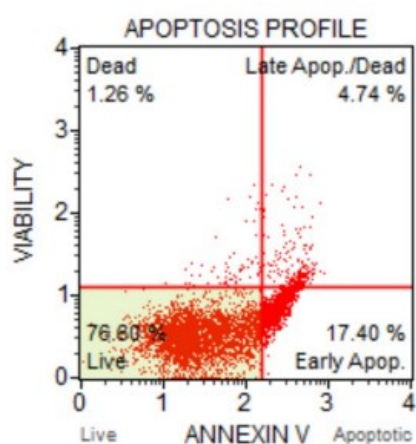
Slika 15. Raspodjela udjela ukupnih HeLa stanica u populaciji: žive, rana apoptoza, kasna apoptoza, mrtve i ukupne apoptotske stanice nakon tretmana sa spojevima 1-3 pri 10 μM i 50 μM

Također, zamjećuje se razlika u % ukupnih apoptotičnih stanica za sva tri spoja ovisno o koncentraciji spoja, 10 μM, odnosno 50 μM. Svi spojevi inhibiraju i pokazuju citotoksični učinak, pri visokim koncentracijama djeluju izrazito citotoksično, uzrokujući trenutnu smrt stanica, dok su pri nižim koncentracijama prisutni manje izraženi učinci. Ova tri spoja pokazala su slično djelovanje na poticanje stanične smrti, no ne tako drastično izraženo s obzirom na preživljenje pri 10 μM i 50 μM. Pri nižoj koncentraciji vidljiv je veći udio stanica u ranoj apoptozi, a pri višoj 50 μM, porast udjela stanica ide u smjeru kasnije apoptoze.

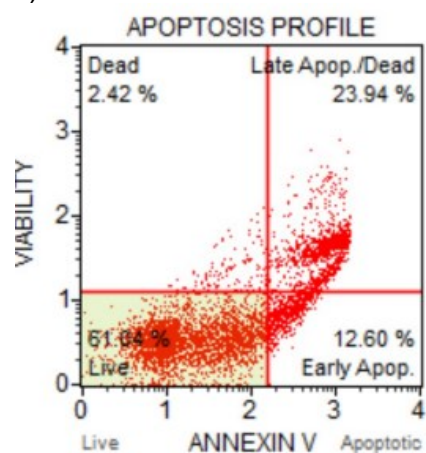
a)



b)

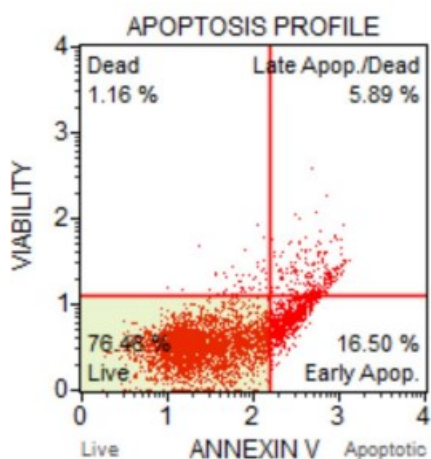


c)

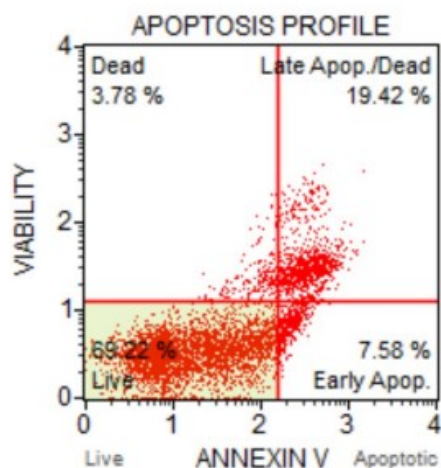


Slika 16. Reprezentativni histogrami analize tipa stanične smrti u uzorcima HeLa stanica: a) kontrolne stanice; b) nakon tretmana spojem 1 (10 μM); c) nakon tretmana spojem 1 (50 μM); d) nakon tretmana spojem 2 (10 μM); e) nakon tretmana spojem 2 (50 μM); f) nakon tretmana spojem 3 (10 μM); g) nakon tretmana spojem 3 (50 μM)

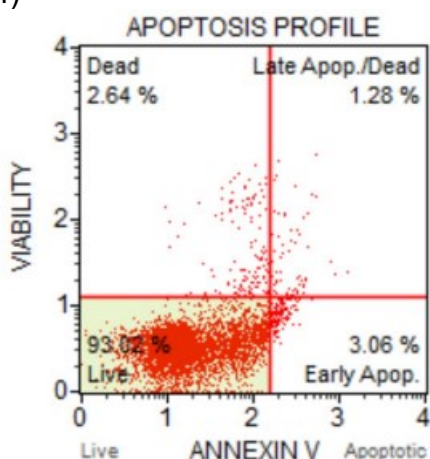
d)



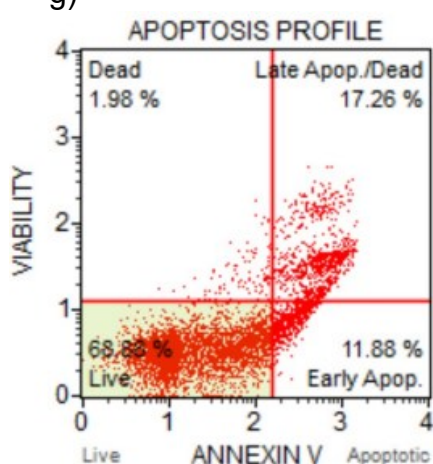
e)



f)



g)



Slika 16. Reprezentativni histogrami analize tipa stanične smrti u uzorcima HeLa stanica: a) kontrolne stanice; b) nakon tretmana spojem 1 (10 µM); c) nakon tretmana spojem 1 (50 µM); d) nakon tretmana spojem 2 (10 µM); e) nakon tretmana spojem 2 (50 µM); f) nakon tretmana spojem 3 (10 µM); g) nakon tretmana spojem 3 (50 µM) - *nastavak*.

U konačnici, na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, možemo zaključiti da biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila imaju potencijal u razvoju antitumorskih lijekova. Spojevi su malih strukturnih razlika pa su i njihovi učinci slični. Testovi preživljenja HeLa stanica su pokazali inhibiciju staničnog rasta i do 80 %, odnosno nisko preživljenje stanica od svega 20-tak % (u odnosu na kontrolni uzorak) pri 50 µM za sva tri spoja. Dobiveni rezultati su vrijedan doprinos karakterizaciji novosintetiziranih biokonjugata ferocena i derivata 2-

tiouracila, budući da njihovo biološko djelovanje nije ispitano, no svakako su nužna daljnja istraživanja ovih spojeva kao potencijalnih antitumorskih tvari. Nadalje, dobiveni rezultati mogu poslužiti i kao smjernica u sintezi i razvoju novih terapijskih spojeva, strukturno sličnih derivata ferocena i nukleobaza. Klonogeni rast nije potisnut, odnosno kolonije su dobro porasle, iako su tretirane s koncentracijom spojeva koja je testovima citotoksičnosti pokazala izrazito nisko preživljenje, oko 20 %. Apoptoza je prisutna, no nije tako drastična, kao što bi se možda očekivalo obzirom na preživljenje stanica uslijed tretmana ispitivanim spojevima. No svakako se može učinak na preživljenje tretiranih HeLa stanica povezati s aktivacijom apoptoze.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Sva tri biokonjugata ferocena i 2-tiouracila pokazuju jak inhibitorni učinak na HeLa stanice pri višim koncentracijama (do 500 μ M) bez obzira na dozu.
2. Ispitani biokonjugati ferocena i 2-tiouracila djeluju inhibitorno na rast HeLa te je inhibitorni učinak ovisan o dozi, a inhibicija rasta stanica proporcionalna je povećanju koncentracije spojeva. Najsnažniji citotoksični učinak pokazuje spoj **1**.
3. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila ne utječu značajno na klonogeni rast HeLa stanica, pri čemu su sva tri spoja pokazala slično djelovanje.
4. Inhibitorni učinak spojeva na rast HeLa stanica može biti povezan s induciranjem stanične smrti putem apoptoze koja nije izrazito jaka.

6.LITERATURA

AAT Bioquest (2021) Annexin V <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/annexin-v>. Pristupljeno 12. rujna 2024.

Allen D D, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Aguilar J S, Caviedes PA (2005) Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies. *Drug Dev Ind Pharm* **31**, 757-768, <https://doi.org/10.1080/03639040500216246>

Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Str. 1-41.

Becit M, Dilsiz SA, Basaran N (2020) Interaction of curcumin on cisplatin cytotoxicity in HeLa and HepG2 carcinoma cells. *Istanbul J Pharm* **50**, 202-210. <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2020.0039>

Blewett S, McGuigan C, Barucki H, Andrei G, Snoeck R, De Clerq E, i sur. (2001) Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side 38 chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors. *Nucleos Nucleot Nucl* **20**, 1063–1066. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002492>

Boyd MR, Paull KD (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Develop Res* **34**, 91-109.

Castilho LR, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (2008) Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy, Taylor & Francis, New York, str. 5-151.

Chen S (1980) The syntheses and mass spectra of some N-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J Organomet Chem* **202**, 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)90515-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)90515-1)

Čakić-Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90**, 537–569. <https://doi.org/10.5562/cca3246>

Djaković S, Glavaš Obrovac L, Lapić J, Maračić S, Kirchofer, Knežević M, i sur. (2020) Synthesis and biological evaluations of mono and bis ferrocene uracil derivatives. *Appl Organomet Chem* **35**. <https://doi.org/10.1002/aoc.6052>

Elmore S(2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522–6537.

Farghadani R, Naidu R (2022) The Role of Apoptosis as a Double-Edge Sword in Cancer. Regulation and Dysfunction of Apoptosis. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97844>

Franken N A P, Stap J, Rodermond H, Haveman J, Van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**, 2315-2319.

Freshney IR (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 115-132.

Hess JR, Greenberg NA (2012) The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications. *Nutr Clin Pract* **27**, 281–294. <https://doi.org/10.1177/0884533611434933>

Kealy, TJ, Pauson PL (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **168**, 1039–1040. <https://doi.org/10.1038/1681039b0>

Kovačević M, Čakić-Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Barišić L i sur. (2021) Conformational preferences and antiproliferative activity of peptidomimetics containing methyl 1'- aminoferrocene-1-carboxylate and turn-forming homo- and heterochiral Pro-Ala motifs. *Int J Mol Sci* **22**, 13532. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>

Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J, Rajnisz A, Therrien B (2013) Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure and Biological Activity. *Organometallics* **32**, 5766–5773. <https://doi.org/10.1021/om400294s>

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709– 715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>

McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D (2013) Bioassays for Anticancer Activities. U: Roessner U, Dias D (ured.) *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery*. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, str. 191-205.

Mintas M, Raić-Malić S (2009) *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, Zagreb.

Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers* **11**, 1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>

Mohamed MS, Youns MM, Ahmed NM (2015) Evaluation of anticancer activity of some thiouracil derivatives. *J Pharma Bio Sci* **5**, 159-163. <https://www.ijpbs.com/previousissue.php?year=2015&issue=4&page=2>

NCBI (2004) PubChem Compound Database. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>. Pristupljeno 12. siječnja 2024.

NCBI (2005) PubChem Compound Database. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7611>. Pristupljeno 13. prosinca 2023.

Nguyen HV, Zhao Z, Sallustrau A, Horswell SL, Male L, Mulas A, i sur. (2014) A ferrocene nucleic acid oligomer as an organometallic structural mimic of DNA. *Chem Commun* **48**, 12165–12167.

NIOS (2022) Maturation and development of leucocytes. NIOS - National Institute of Open Schooling, <https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/hbbt/Lesson-10.pdf>. Pristupljeno 12. rujna 2024.

Pałasz A, Ciez D (2014) In search of uracil derivatives as bioactive agents. Uracils and fused uracils: Synthesis, biological activity and applications. *Eur J Med Chem* **97**, 582-611. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.008>

Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>

Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček, Radošević K (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 169-175. <https://hrcak.srce.hr/177252>

Rajguru J R, Nagare SA, Gawai AA, Jadhao AG, Shirsat MK (2019) Cancer Chemotherapy with Peptides and Peptidomimetics Drug and Peptide Based-Vaccines. *Journal of Pharm. and Med. Sciences* **2**, 21-28.

Ramesh D, Vijayakumar BG, Kannan T (2020) Therapeutic potential of uracil and its derivatives in countering pathogenic and physiological disorders. *Eur J Med Chem* **207**, 1- 16. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112801>

Slivac I, Gaurina Srček V, Radošević K (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, str. 3-6.

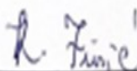
Tanaka H, Takashima H, Ubasawa M, Sekiya K, Inouye K, Baba M, i sur. (1995) Synthesis and antiviral activity of 6-benzyl analogs of 1- [(2-hydroxyethoxy)methyl]-5-(phenylthio)thymine (HEPT) as potent and selective antiHIV-1 agents. *J Med Chem* **38**, 2860-2865. <https://doi.org/10.1021/jm00015a008>

Toma M, Vrček V (2020) Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza. *Kem ind* **69**, 21-29. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.025>

Zeng L, Gupta P, Chen Y, Wang E, Ji L, Chao H, i sur. (2017) The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem Soc Rev* **46**, 5771-5804.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Katarina Fišić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis

