

In vitro biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika

Šintić, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:763715>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Anamaria Šintić

7340/BT

***In vitro* biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika**

ZAVRŠNI RAD

Predmet : Tehnologija vitamina i hormona

Mentor : Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2019.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević na pomoći, usmjeravanju, susretljivosti i savjetima tijekom izrade završnog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

In vitro biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika

Anamaria Šintić, 0058209195

Sažetak: Kako bi se ispitala biološka aktivnost i različita svojstva spojeva dobivenih kemijskom sintezom ili izoliranih iz prirodnih izvora, koriste se *in vitro* testovi citotoksičnosti na humanim ili životinjskim staničnim linijama. *In vitro* testovi često su prvi korak u ispitivanju biološki aktivnih spojeva te preliminarna smjernica u procesu stvaranja novih lijekova, čiji učinak se kasnije ispituje primjenom *in vivo* testova na životinjama. Peptidomimetici se definiraju kao spojevi koji oponašaju biološku aktivnost prirodnih peptida, modificirajući njihovu nativnu konformaciju s ciljem poboljšanja stabilnosti, selektivnosti te funkcionalnosti. U ovom istraživanju provedeno je *in vitro* ispitivanje djelovanja četiri različita ferocenska peptidomimetika na humanu tumorsku staničnu liniju (HeLa) te je određena vijabilnost stanica MTS metodom. Svi ispitani spojevi peptidomimetika pokazali su inhibitorni učinak na rast i proliferaciju tumorskih HeLa stanica 48 sati nakon tretmana. Također, proveden je test formiranja kolonija, kojim je dokazan inhibitorni učinak ispitanih spojeva i na sposobnost HeLa stanica da tvore kolonije. Dobiveni rezultati ukazuju da ispitani ferocenski peptidomimetici imaju antiproliferativno djelovanje na tumorske HeLa stanice što može ukazati na mogući antitumorski učinak.

Ključne riječi: citotoksičnost, ferocenski peptidomimetici, HeLa tumorska stanična linija, klonogena analiza, vijabilnost

Rad sadrži: 33 stranice, 13 slika, 2 tablice, 19 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Datum obrane: 14. lipnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

***In vitro* biological activity of ferrocene peptidomimetics**

Anamaria Šintić, 0058209195

Abstract: *In vitro* test of cytotoxicity on animal and human cell lines are used for examination biological activity and different properties of compounds obtained by chemical synthesis or isolated from natural sources. *In vitro* tests are often the first step in examination biologically active compounds and the preliminary guideline in the process of creating new drugs. Peptidomimetics mimic the biological activity of natural peptides with improved selectivity, functionality and bioavailability. In this research, biological activity of four different ferrocene peptidomimetics was tested on humane tumor cell line (HeLa) and viability was determined by MTS method. All tested peptidomimetics showed an inhibitory effect on cell growth and proliferation HeLa cell line 48 hours after the treatment. Furthermore, colony forming assay was performed, which demonstrated inhibitory effect on cell ability to form colonies. The obtained results indicate that ferrocene peptidomimetics have antiproliferative activity on tumor cells which may indicate a possible antitumor effect.

Keywords: cytotoxicity, clonogenic assay, ferrocene peptidomimetics, HeLa tumor cell line, viability

Thesis contains: 33 pages, 13 figures, 2 tables, 19 references

Original in: Croatian

Thesis is printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D.Kristina Radošević, Assistant Professor

Defence date: June 14th 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kultura životinjskih stanica	2
2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica	3
2.1.2. Vrste i karakteristike seruma.....	5
2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica	6
2.1.4. Određivanje biološke aktivnosti spojeva primjenom kultura stanica	8
2.1.5. Stanični ciklus i odumiranje stanica u kulturi.....	9
2.2. Peptidomimetici	10
2.3. Primjena peptidomimetika	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. HeLa stanična linija	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Ferocenski peptidomimetici.....	16
3.1.4. Otopine i puferi	17
3.1.5. Uređaji i oprema.....	17
3.2. Metode rada.....	18
3.2.1. Uzgoj HeLa stanične linije.....	18
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	18
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti ferocenskih peptidomimetika na HeLa staničnoj liniji.....	19
3.2.4. MTS metoda za određivanje vijabilnosti stanica	19
3.2.5. Klonogena analiza i bojanje HeLa stanica bojom kristal violet	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Učinak četiri ferocenska peptidomimetika na preživljavanje HeLa stanične linije	22
4.2. Klonogena analiza učinka ferocenskih peptidomimetika na HeLa staničnu liniju	25
4.3. Morfološke promjene HeLa stanica nakon tretmana uzorcima ferocenskih peptidomimetika.....	28
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	32

1. UVOD

Jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice, koji svake godine uzima milijune života, a uskoro će po smrtnosti preći i kardiovaskularne bolesti je tumor ili neoplazma. To je bolest od koje godišnje umre oko 7 milijuna ljudi, a prognoze su da će do 2020. godine broj oboljelih porasti na 16 milijuna na godišnjoj razini (Rajguru i sur., 2019). Tumor je općeniti pojam za različite bolesti kod kojih dolazi do abnormalne proliferacije stanica bez kontrole. Tumor može biti benigni (dobročudni) i maligni (zloćudni). Malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da prodi i razara okolno tkivo te se širi na druge dijelove organizma, odnosno formira metastaze. S obzirom na činjenicu da tumor zauzima drugo mjesto na ljestvici glavnih uzročnika smrtnosti, znanstvenici već nekoliko desetljeća intenzivno istražuju nove metode liječenja koje će biti učinkovitije od konvencionalnih metoda liječenja kemoterapijom ili zračenjem te neće uništavati normalne stanice i zdrava tkiva.

Peptidomimetici su heterogena skupina spojeva koji oponašaju biološku aktivnost prirodnih peptida ili oponašaju element peptidne sekundarne strukture odgovoran za molekularno prepoznavanje, a istovremeno se odlikuju poboljšanom stabilnošću i smanjenom fleksibilnošću u odnosu na prirodne peptide. Upravo zbog navedenih karakteristika tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je uspjeh u primjeni peptidomimetika kao inovativnih lijekova u terapiji HIV-infekcija, kao imunomodulatora u terapiji autoimunih bolesti te u imunoterapiji karcinoma (Barišić, 2018).

Kako bi se ispitalo biološko djelovanje potencijalno novih lijekova potrebno je provesti niz testova u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) i na živim organizmima (*in vivo*) kako bi se na temelju tih rezultata mogao procijeniti njihov učinak na ljude (Radojčić i sur., 2016). U ovom radu je za ispitivanje antitumorskog djelovanja sintetiziranih ferocenskih peptidomimetika korištena humana tumorska stanična linija HeLa, koja je prvi puta izolirana 1951.g. iz adenokarcinoma vrata maternice. Stanična linija nazvana je po pacijentici Henrietti Lacks iz čijeg su karcinoma vrata maternice izolirane tumorske stanice te prilagođene na uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Osim što se koristi u istraživanjima malignih tumora, HeLa stanice zaslužne su za neka od najvažnijih medicinskih dostignuća 20. stoljeća poput razvoja cjepiva za dječju paralizu, kloniranja i umjetne oplodnje.

Cilj rada je bio ispitati utjecaj različitih ferocenskih peptidomimetika na vijabilnost i morfološke karakteristike tumorskih stanica, odnosno ustvrditi kakav učinak imaju ferocenski peptidomimetici na proliferaciju tumorske HeLa stanične linije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura životinjskih stanica

Kultura stanica primjenjuje se u znanstvenim istraživanjima već dugi niz godina. Začetnikom i utemeljiteljem kulture stanica smatramo Rossa Harrisona, američkog znanstvenika koji je početkom 20. stoljeća izolirao i kultivirao dio tkiva žabljeg embrija, a nekoliko godina kasnije drugi znanstvenik Carrel kultivirao je uzorak tkiva srca iz pilećeg embrija. No tek je 1951.g. uspostavljena prva humana stanična linija nazvana HeLa , koja je i danas jedna od najčešće korištenih staničnih linija u znanstvenim istraživanjima (Castilho i sur., 2008).

Kulturu životinjskih stanica definiramo kao laboratorijsku tehniku u kojoj stanice, prethodno izolirane iz životinjskih organa ili tkiva, rastu u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Postupak uspostave kulture stanica sastoji se od nekoliko faza. Primarne stanice izolirane su direktno iz životinjskih organa i tkiva te imaju ograničen životni vijek. Subkultivacijom primarne kulture uspostavlja se konačna stanična linija, a nakon nekoliko subkultivacija postaje uniformna ili homogena. Nakon ograničenog broja generacija, konačna stanična linija odumire ili postaje kontinuirana (besmrtna) kao rezultat genotipskih promjena. Promjene se mogu postići postupcima imortalizacije stanica. U tu svrhu se najčešće primjenjuje transfekcija viralnim genima ili transdukcija virusima. Najvažnija svojstva kontinuirane stanične linije su: promijenjena morfologija stanica, povećana brzina rasta, mogućnost adherentnog ili rasta u suspenziji, povećana učinkovitost kloniranja i neograničen životni vijek (Freshney, 2010).

Tehnike kulture stanica imaju sličnosti s mikrobnim procesima, no mnogo su zahtjevnije za uzgoj jer su podložnije mehaničkom oštećenju i kontaminaciji te im je potreban kompleksniji medij za uzgoj. Prednosti korištenja kulture životinjskih stanica su bolja kontrola uvjeta uzgoja, temperature, pH, koncentracije kisika, hranjivih tvari te koncentracije metabolita, ali i visok stupanj standardizacije koja omogućuje rad s istim stanicama te dobivanje reproducibilnih rezultata. Najvažnija prednost kulture stanica svakako je smanjena potreba za *in vivo* testovima na životinjama što je vrlo važan etički segment. Neki od nedostataka su promjene svojstava stanica tijekom dugotrajnog *in vitro* uzgoja, primjerice dolazi do promjene u biokemijskim procesima u stanicama zbog nakupljanja proizvoda metabolizma. Najveći nedostatak kontinuiranih staničnih linija je kromosomska nestabilnost zbog koje dolazi do fenotipskih promjena u odnosu na izvorno tkivo.

2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica

Osnovna funkcija medija za uzgoj je osigurati stanicama sve potrebne fizikalno-kemijske uvjete koji trebaju biti što sličniji *in vivo* sustavu iz kojeg su izolirane. U samim začetima razvoja kulture stanica koristio se medij dobiven iz tkivnih ekstrakata i tjelesnih tekućina poput plazme, limfe ili ekstrakta pilećeg embrija. Takvi mediji bili su skupi, teško dostupni i nisu imali točno definiran kemijski sastav (Castilho i sur., 2008). Zahvaljujući razvoju tehnologije danas na tržištu postoje razne vrste standardiziranih medija koji sadrže optimalnu koncentraciju hranjivih tvari potrebnu stanicama za rast i diobu.

Mediji koji se najčešće koriste za uzgoj životinjskih stanica su Eagleov osnovni medij (*Eagle's Basal Medium* – BME, oblikovan za rast mišjih i HeLa stanica), a dodatkom veće koncentracije aminokiselina nastaje Eagleov minimalni esencijalni medij (*Eagle's Minimum Essential Medium* – EMEM). *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* – DMEM je medij dobiven povećanjem koncentracije aminokiselina i vitamina četiri puta u odnosu na osnovni medij.

Osnovne komponente svakog medija za uzgoj su voda, ugljikohidrati, aminokiseline, vitamini, soli, hormoni te faktori rasta. Voda ne smije biti tehničkog stupnja čistoće već mora biti pročišćena metodama mikrofiltracije, reverzne osmoze te deionizacije kako bi se uklonili potencijalni kontaminanti (mikroorganizmi, teški metali, željezo, kalcij, klorid, detergentsi) i elementi u tragovima koji bi utjecali na kvalitetu medija i stanični rast.

Glukoza je glavni izvor energije i ugljika, a najčešće se dodaje u koncentracijama od 5-25 mM. Glukoza se metaboličkim procesom glikolize prevodi do piruvata, a zatim, ovisno o aerobnosti procesa do acetil-CoA ili laktata. Acetil-CoA zatim ulazi u ciklus limunske kiseline, a kao krajnji produkt nastaju voda i CO₂, uz akumulaciju energije i međuprodukata, koji odlaze u druge metaboličke puteve poput sinteze aminokiselina. Neka provedena istraživanja pokazala su povišenu razinu laktata u kulturi stanica što može biti indikator da se TCA ciklus ne odvija jednako u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Previsoka koncentracija laktata može dovesti do acidifikacije medija i inhibirati rast stanica (Freshney, 2010).

Svaki tip stanice zahtjeva određenu količinu aminokiselina prisutnih u mediju, a koncentracija varira u rasponu od 0,1-0,2 mM. U hranjivi medij potrebno je dodati esencijalne aminokiseline (arginin, fenilalanin, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, cistein, treonin, triptofan, valin i tirozin), a ovisno o potrebama dodaju se i neesencijalne. Glutamin se dodaje u mnogo višoj koncentraciji od ostalih aminokiselina (2-4 mM) jer osim što je prekursor u sintezi purina i pirimidina, preteča je za intermedijare ciklusa limunske kiseline.

U medij se također dodaju ioni anorganskih soli: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- koji služe održavanju ionske ravnoteže i osmotskog tlaka u mediju, a imaju i važnu ulogu koenzima u enzimskim reakcijama. Na^+ , K^+ , Cl^- sudjeluju u regulaciji membranskog potencijala, dok SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- sudjeluju u sintezi makromolekula i reguliraju unutarstanični naboj (Freshney, 2010). Za regulaciju optimalne pH vrijednosti dodaje se bikarbonat, a uvjeti u inkubatoru podese se na 5-10% zasićenost plinovitim CO_2 .

Jedan od najvažnijih sastojaka medija su vitamini i hormoni, neophodni za rast i diferencijaciju stanica te održavanje homeostaze. Većina vitamina i hormona osigurava se dodatkom seruma, osim vitamina B-kompleksa koje je potrebno dodati naknadno. Folna kiselina, biotin i niacin dodaju se u niskim koncentracijama i imaju funkciju koenzima i prostetske skupine enzima.

Faktori rasta dodaju se mediju kako bi se potaknula proliferacija stanica i stimulirale specifične stanične funkcije. Dodaju se u malim količinama, a najbitniji su epidermalni faktor rasta (EGF, *epidermal growth factor*), fibroblastni faktor rasta (FGF, *fibroblast growth factor*), transformirajući faktor rasta (TGF- α i TGF- β , *transforming growth fact*), inzulinu-sličan faktor rasta (IGF-1 i IGF-2, *insulin-like growth factors*) te faktor rasta iz trombocita (PDGF, *platelet-derived growth factor*) kojima je svima zajedničko mitogeno djelovanje. Od prisutnih elemenata u tragovima, najvažniji su selen zbog svog antioksidacijskog djelovanja te kalcij koji je važan za diobu i prijenos signala između stanica (Castilho i sur, 2008).

Antibiotici su u počecima razvoja kultura stanica bili vrlo važna komponenta medija za uzgoj, jer aseptične tehnike rada i uvjeti nisu bili na visokoj razini. Iako se koriste i danas kako bi se mogućnost kontaminacije svela na minimum, treba ih sve više izbjegavati zbog pojave mikrobne rezistencije.

2.1.2. Vrste i karakteristike seruma

Serum je vrlo važna komponenta medija za uzgoj jer je izvor aminokiselina, peptida, proteina, hormona, vitamina, faktora rasta, minerala, lipida i drugih tvari koje su važne za proliferaciju stanica (Butler, 2004). Serum je bezstanična krvna komponenta dobivena zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla, a dodaje se u rasponu koncentracija 5-10% (vol/vol). Na tržištu su najzastupljeniji fetalni teleći serum (FCS, *Fetal Calf Serum*) i fetalni goveđi serum (FBS, *Fetal Bovine Serum*).

Fetalni goveđi serum (FBS) sadrži visok udio embrionalnih faktora rasta i nizak udio imunoglobulina te je zbog toga često prvi izbor u radu s kulturama stanica. Proces proizvodnje seruma ima vrlo niski prinos pa je samim time i cijena seruma visoka. Nedostatak upotrebe seruma je njegova kemijska nedefiniranost i razlike u sastavu između pojedinih šarži što može rezultirati nedosljednošću rezultata prilikom *in vitro* testova ili razlikama u produktivnosti proizvodnih sojeva (Freshney, 2010). Također, serum može biti izvor kontaminanata poput virusa ili priona pa ga je potrebno prije uporabe inaktivirati povišenom temperaturom.

Kako bi se izbjegli navedeni nedostaci, danas se sve više koriste mediji bez seruma (SF, *serum-free* medij) koji su selektivni za određeni tip stanica pa se i sastav medija može standardizirati. Posljedica je da primjenom takvih medija možemo postići dosljednost rezultata istraživanja, a promjenom koncentracija pojedinih sastojaka utjecati na određene stanične funkcije.

Primjena *serum-free* medija ima i svoje nedostatke, poput sporije proliferacije stanica, niže maksimalne koncentracije stanica, nižeg broja generacija stanica kod staničnih linija te visoka cijena tvari koje se moraju naknadno dodati (hormoni, faktori rasta). Također nije moguće formulirati idealni medij koji će biti pogodan za sve tipove stanica, jer svaka stanična linija ima specifičan metabolički profil i zahtjeva prilagođeni sastav medija.

2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Da bi životinjske stanice uspješno rasle *in vitro* potrebno im je osigurati uvjete kakve su imale u organizmu, odnosno tkivu iz kojeg su izolirane. Najvažniji parametri koje treba regulirati su temperatura, pH vrijednost, koncentracija kisika i CO₂, osmolalnost i viskoznost.

Bez obzira na to uzgaja li se kultura stanica u T-bocama, Petrijevim zdjelicama ili u bioreaktoru, temperatura je jedan od glavnih parametara koje treba regulirati. Napretkom tehnologije danas je vrlo lako kontrolirati uvjete jer postoje termostatski regulirani inkubatori. Optimalna temperatura ovisi o životinjskom organizmu ili tkivu iz kojeg su stanice izolirane, a kreće se u rasponu od 35-37 °C. Niže temperature usporit će rast kulture, dok na višim temperaturama dolazi do pregrijavanja kulture što može biti smrtonosno.

Temperatura utječe na topljivost kisika i ugljikovog dioksida. Iznimno je važno održavati koncentraciju otopljenog kisika na razini koja je potrebna za normalan rast i proliferaciju stanične kulture. Topljivost kisika ovisi o temperaturi, parcijalnom tlaku kisika, ali i o tvarima prisutnim u mediju, poput soli i glukoze, koje smanjuju njegovu topljivost. Povišenjem temperature smanjuje se topljivost dok se povećanjem parcijalnog tlaka povećava topljivost kisika. Za kulture tkiva u inkubatoru je potrebno osigurati 95% kisika i 5% zasićenosti ugljikovim dioksidom (Butler, 2004).

pH vrijednost pri kojoj stanice pokazuju optimalan rast za većinu životinjskih stanica iznosi 7,4. Indikator fenol crveno, koji je često sastavna komponenta komercionalno dostupnih medija za uzgoj stanica, osjetljiv je na vrlo male promjene pH pa je pri 7,8-7,4 karakteristične crvene (ružičaste) boje dok je pri 7,0 narančaste ili žute boje što može biti pokazatelj da je došlo do kontaminacije. pH kulture regulira se puferskim sustavom hidrogenkarbonat-CO₂ koji se nalazi u ravnoteži i odupire promjeni pH vrijednosti. Staničnim metabolizmom proizvodi se laktat i amonijak koji utječu na promjenu pH vrijednosti medija pa je ponekad potrebno koristiti sustav s većim puferskim kapacitetom (Castilho i sur., 2008).

Osmolalnost (koncentracija otopine) izražava se kao broj otopljenih čestica po kilogramu otapala. Optimalna osmolalnost medija za uzgoj iznosi 260-320 mOsmol kg⁻¹, a vrijednost ne bi trebala odstupati više od ± 10 mOsmol kg⁻¹. U slučaju povećane osmolalnosti, dolazi do negativne promjene u rastu i proliferaciji stanica, a do te pojave dolazi isparavanjem otapala prilikom inkubacije stanica u Petrijevim zdjelicama (Freshney, 2010).

Viskoznost medija nema velikog utjecaja na rast stanica, ali je važna prilikom korištenja sustava za miješanje stanica i nakon tripsinizacije, jer oštećenje koje je javlja prilikom tih procesa možemo smanjiti povećanjem viskoznosti pomoću karboksimetilceluloze (Freshney, 2010).

Adherentne stanične linije, poput HeLa stanica korištenih u ovom radu, trebaju površinu za adheziju, širenje i proliferaciju. Vrlo su važni sastav i priroda same površine za uzgoj stanica na koju će se stanice vezati. U prvim desetljećima razvoja kulture stanica, staklo, posebice borosilikatne površine, bile su glavni čvrsti supstrat za adheziju stanica. Šezdesetih godina prošlog stoljeća počinje su se koristiti plastični materijali poput polistirena, s hidrofobnim i negativno nabijenim površinama prikladnima za adheziju stanica (Castilho i sur., 2008).

Prilikom rada s kulturama stanica potrebno je održavati aseptične uvjete, jer su stanice vrlo osjetljive na kontaminacije plijesnima, bakterijama i kvascima. Kontaminaciju ćemo najlakše prepoznati po naglom padu pH vrijednosti uslijed koje dolazi do promjene boje i zamućenja medija. Kako bismo mogućnost kontaminacije sveli na minimum, potrebno je pridržavati se osnovnih načela rada s kulturama životinjskih stanica pa je tako npr. prije rada s kulturama stanica potrebno oprati i dezinficirati ruke etanolom. Nacjepljivanje, dodavanje uzoraka i sav drugi rad s kulturama stanica provodi se u komori za sterilan rad ili tzv. laminaru. U laminaru prije početka rada treba upaliti UV-lampu, površina se prebriše 70%-tnim etanolom, a sav laboratorijski pribor koji se koristi prethodno se sterilizira.

2.1.4. Određivanje biološke aktivnosti spojeva primjenom kultura stanica

Zahvaljujući razvoju znanosti i tehnologije, kulture životinjskih stanica imaju vrlo široku primjenu. Koriste se za znanstvena istraživanja u području molekularne biologije, toksikologije, proteomike, tkivnog i genetičkog inženjerstva. Kao modelni sustavi koriste se u staničnoj i molekularnoj biologiji za proučavanje fiziologije i interakcija stanica.

Vrlo su važne u farmakologiji i toksikologiji za ispitivanje citotoksičnosti i djelovanja lijekova u razvojnoj, odnosno pretkliničkoj fazi. U tu svrhu se najčešće koriste tumorske stanične linije 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. uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za ispitivanje djelovanja raznih spojeva u definiranim rasponima koncentracija, kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta, odnosno odredila tzv. bazalna citotoksičnost spoja za svaku staničnu liniju (Boyd i Paul, 1995).

Prednosti korištenja *in vitro* testova su visoka razina standardizacije te smanjeni broj pokusnih životinja, ali je vrlo teško opisati farmakokinetiku ispitivanog spoja, od apsorpcije do izlučivanja. Stoga nije moguće u potpunosti izbjeći *in vivo* testove na životinjama, ali postizanjem zadovoljavajuće korelacije između rezultata dobivenih *in vitro* i *in vivo* testovima, broj pokusnih životinja može se smanjiti.

Ispitivanja citotoksičnosti prirodnih ili sintetskih spojeva potrebno je provesti na različitim tipovima stanica tj. većem broju različitih staničnih linija kako bi se ustvrdilo koje su ciljne stanice na koje određeni spoj najbolje djeluje i koja je koncentracija spoja djelotvorna.

2.1.5. Stanični ciklus i odumiranje stanica u kulturi

Stanice izdvojene iz tkiva ili organa bile su diferencirane, obično se nisu dijelile i bile su pod kontrolom kemijskih i prostornih mehanizama rasta. Prijenos takvih stanica u *in vitro* uvjete zahtjeva prilagodbu na novu okolinu te može doći do gubitka visokospecijaliziranih funkcija (Slivac i sur., 2016).

Stanice u kulturi prolaze faze staničnog ciklusa i rasta. Stanični ciklus definiramo kao događaje između dvije uspješne diobe. Sastoji se od uzajamno povezanih koraka koji se mogu podijeliti u četiri glavne faze G1 (G znači gap faza), S (sinteza DNA), G2 i M (dioba stanice ili mitozu). U G1 fazi dolazi do sinteze velikog broja makromolekula koje su potrebne stanici prije ulaska u S fazu. S faza je doba sinteze DNA koja se mora odvijati visokom preciznošću. Kod stanica sisavaca ova faza traje 6-8 h pri čemu se kompletna kromosomska DNA udvostruči. Nakon S faze slijedi period od 4-5 h u kojem se stanica priprema za diobu te se sintetiziraju specifični proteini neophodni za diobu stanice i ta se faza naziva G2 faza (Slivac i sur., 2016).

Tijekom uzgoja stanice prolaze kroz tri karakteristične faze rasta: 1) lag-faza obično traje 2-24 h, obilježava ju prilagodba na nove uvjete i prihvaćanje za podlogu; 2) log-faza ili faza eksponencijalnog rasta koja je period učestalih dioba i preživljenje stanica je najviše. Trajanje log faze ovisi o dostupnosti hranjivih tvari, o broju stanica, o raspoloživosti površine za rast te o inhibitornom učinku metabolita. Pri kraju faze vrijeme umnožavanja se smanjuje i stanice ulaze u treću, stacionarnu fazu rasta. Ako kulturi ne osiguramo svježi hranjivi medij, broj stanica koje odumiru počinje premašivati broj onih koje se dijele i započinje zadnja, četvrta faza odumiranja kulture.

Proces odumiranja stanica najčešće se povezuje s dva tipa stanične smrti, nekrozom i apoptozom. Pod pojmom nekroze podrazumijeva se odumiranje stanica uzrokovano kemijskim i mehaničkim oštećenjem tkiva koje rezultira upalnim procesom okolnog tkiva. Sredinom prošlog stoljeća otkrivena je programirana stanična smrt apoptoza koju karakterizira kontroliran proces samouništenja stanica. Apoptozu mogu potaknuti podražaji poput oštećenja DNA, tretman s citotoksičnim tvarima, nedostatak hranjivih tvari, djelovanje slobodnih radikala, tretman zračenjem i slično. Do sada su opisana dva signalna puta apoptoze stanica. Vanjski prijenos signala započinje vezanjem liganda, tzv. signalnih proteina smrti na receptore na površini stanice. Unutarnji prijenos signala posljedica je interakcije niza molekula uslijed čega dolazi do depolarizacije mitohondrijske membrane i oslobađanja medijatora apoptoze (Castilho i sur., 2008).

2.2. Peptidomimetici

Proteini su molekule koje imaju esencijalnu ulogu u brojnim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, osiguravaju mehaničku potporu i imunološku zaštitu, prenose živčane impulse, kontroliraju rast i diferencijaciju. Konformacija u kojoj je molekula proteina biološki aktivna naziva se nativnom konformacijom i njome je definirana funkcionalnost pripadajućeg proteina.

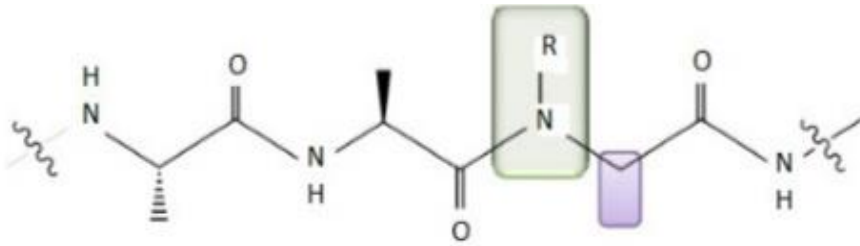
Unatoč velikom biološkom potencijalu i brojnim ulogama koje imaju u raznim staničnim procesima, proteini odnosno peptidi nisu pogodni za korištenje u terapijske svrhe iz nekoliko razloga. Velika fleksibilnost konformacije proteina omogućuje im interakciju s brojnim receptorima što može dovesti do neželjenih nuspojava. Također, podložni su djelovanju proteolitičkih enzima što dovodi do njihove razgradnje i gubitka biološke aktivnosti. Osim toga, velika molarna masa i polarnost otežavaju njihov prolazak kroz stanične membrane (Wang i sur., 1999)

Različitim modifikacijama u strukturi proteinske molekule moguće je poboljšati njihova farmakološka i biofarmaceutska svojstva te ostvariti kliničku primjenu biološki aktivnih peptida. Modificiranjem peptidne strukture kao i pripravom spojeva koji oponašaju uređenu trodimenzijsku strukturu prirodnih peptida dobivaju se peptidomimetici (Olsen i sur., 1993). Peptidomimetik se definira kao spoj čija su sekundarna strukturalna svojstva analogna prirodnom peptidu zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju, odnosno kao spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora (Barišić, 2018).

Učinak strukturalnih modifikacija u odnosu na biološku aktivnost izvedenih peptidomimetika su sljedeće: konformacijski ograničene strukture smanjuju vezanje na neželjene receptore, istovremeno povećavajući afinitet za ciljani receptor, smanjen je stupanj enzimske razgradnje, dok uvođenje hidrofobnih ostataka ili zamjena amidne veze rezultira olakšanim transportom kroz stanične membrane (Zorc, 2008).

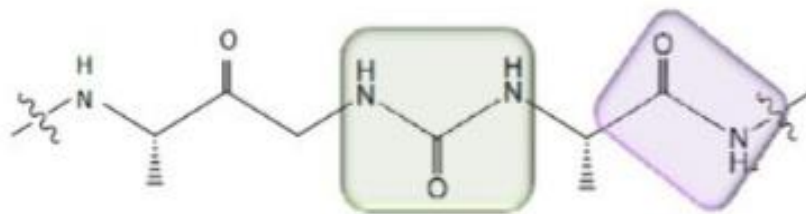
Peptidomimetici se dijele na mimetike glavnog lanca, aminokiselinskih bočnih ogranaka i mimetike s modificiranim i glavnim lancem i bočnim ograncima, a glavni tipovi peptidomimetika prikazani su na Slikama 1 do 6.

Peptoidom se naziva peptidomimetik s pomaknutim bočnim lancem sa Ca-atoma na amidni dušikov atom.



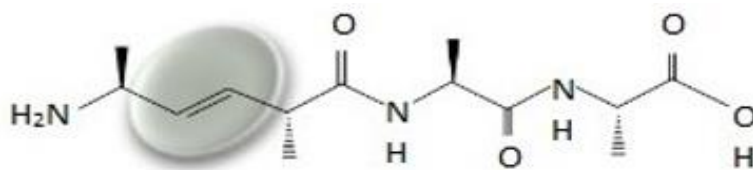
Slika 1. Peptoid

Ureidopeptid je onaj peptidomimetik u kojem je amidna veza zamijenjena ureidoskupinom.



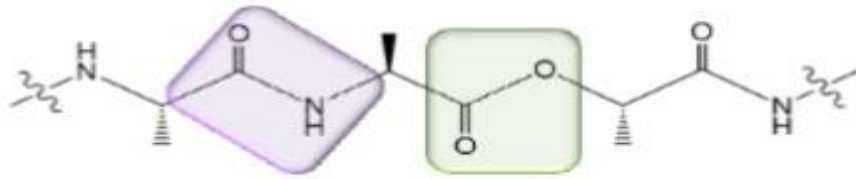
Slika 2. Ureidopeptid

Pseudopeptid je peptidomimetik koji sadrži pseudopeptidnu vezu kao zamjenu za amidnu vezu.



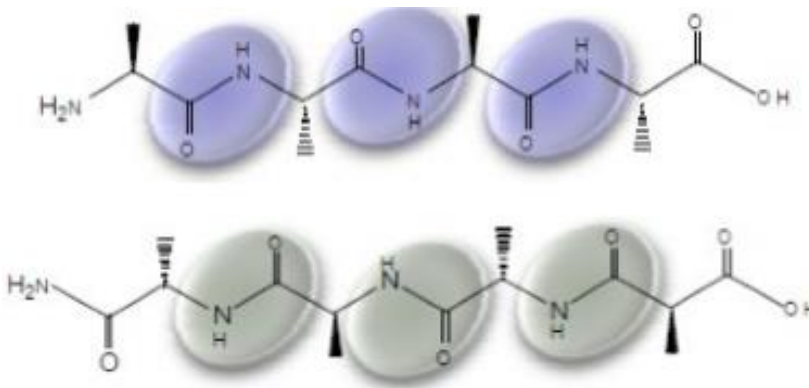
Slika 3. Pseudopeptid

Depsipeptid je pseudopeptid u kojem je amidna veza zamijenjena esterskom.



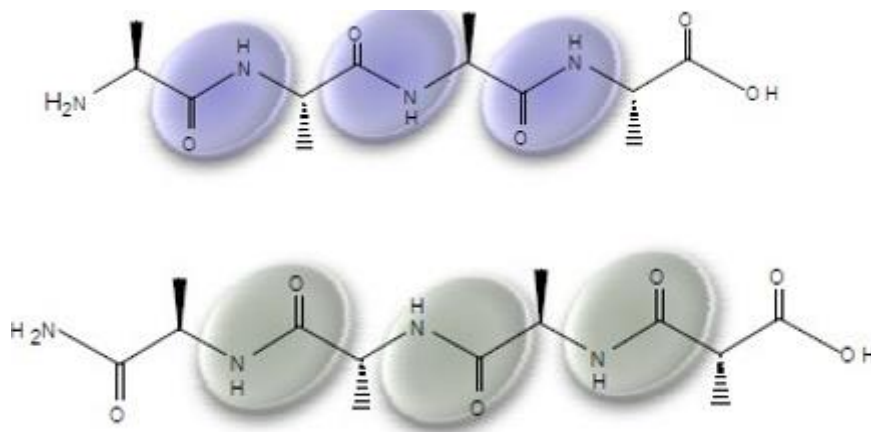
Slika 4. Depsipeptid

Retro-inverzni peptid ima izmijenjenu konfiguraciju pripadajućih aminokiselina u odnosu na prirodni peptid; obrnut je smjer peptidnog lanca.



Slika 5. Retro-inverzni peptid

Retropeptid ima istu konfiguraciju, a obrnut smjer peptidnog lanca u odnosu na prirodni peptid. Kod ovih peptidomimetika gubitak amidnog dušika, koji često sudjeluje u vodikovim vezama, ima za posljedicu smanjenu topljivost u polarnim otapalima.



Slika 6. Retropeptid

Tijekom posljednja dva desetljeća koncept primjene peptidomimetika pokazao se uspješnim u dizajnu i razvoju novih lijekova, s posebnim naglaskom na inhibitore enzima, kojima su uspješno prevladani nedostaci peptidnih terapeutika poput slabe oralne apsorpcije i brze razgradnje.

2.3. Primjena peptidomimetika

Peptidomimetici su, kao potencijalni terapeutici, predmet brojnih istraživanja u području medicinske kemije, biomedicine i biotehnologije. Razvoj i istraživanja u području peptidnih mimetika kao terapeutika urodilo je njihovom primjenom u liječenju autoimunih bolesti i karcinoma.

Autoimune bolesti javljaju se zbog nemogućnosti razlikovanja vlastitih stanica od stranih stanica i antigena. T-stanice imuno-sustava prepoznaju antigene i strane materijale i uklanjaju ih iz tijela, pri čemu imaju mogućnost razlikovanja antigena od vlastitih stanica. Aktivacija T-stanica u efektorske T-stanice uključuje nekoliko proteina i njihove interakcije, a nakon što je došlo do njihove aktivacije, T-stanice mogu izazvati imunološki odgovor (Gokhale, 2004). Kod autoimunih bolesti neophodna je imunomodulacija za kontroliranje posljedica dereguliranog imuno-sustava. Imunomodulatori mogu biti male organske molekule, antitijela, peptidi i peptidomimetici. Imunomodulatori imaju funkciju da suzbijaju ili blokiraju imunski odgovor (autoimune bolesti, transplantacija organa), djeluju kao simulatori imuno-sustava (virusne infekcije, karcinom) te uklanjaju pojedine tipove stanica imuno-sustava specifičnim antigenima (autoimune bolesti, karcinom). Peptidi i peptidomimetici korišteni u terapiji djeluju na proteine koji pokazuju prekomjernu ekspresiju i moduliraju imunološki odgovor. Nekoliko kosimulatornih molekula koje sudjeluju u upalnim procesima i odgovoru T-stanica koriste se za ciljanu terapiju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa, multiple skleroze ili sistemskog lupusa (Gokhale, 2004).

Korištenje peptidomimetika u terapiji HIV-infekcija započelo je otkrićem inhibitora HIV proteaze, simetričnog peptida koji je kasnije preveden u peptidomimetik. Dizajnirana molekula je mimetik sa anti-HIV aktivnošću, smanjene citotoksičnosti te je otporna prema enzimskoj degradaciji (Gokhale, 2004).

Peptidomimetici u terapiji karcinoma imaju prednost pred zračenjem i kemoterapijom jer djeluju specifično na tumorske stanice bez oštećenja zdravog tkiva. Stanice raka izbjegavaju imunološki tumorski odgovor blokadom specifičnih T-limfocita interakcijom pojedinih liganda na površini stanica raka i receptora na površini T-limfocita. Cilj imunomodulacije u imunoterapiji karcinoma jest omogućiti stanicama imunosustava da prepoznaju tumorske stanice i potom ih ciljano unište. Imunizacija peptidnim antigenima koji sadrže epitope B- i T-stanica može stimulirati pacijentov imunološki sustav u smjeru nastajanja visoko specifičnih antitijela (Bedke i Stenzl, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. HeLa stanična linija

U ovom istraživanju korištena je humana tumorska stanična linija HeLa. Stanična linija nazvana je po Henrietti Lacks, ženi iz čijeg su karcinoma vrata maternice izolirane tumorske stanice. Uzrok tumora bio je humani papiloma virus 18 (HPV 18), što je dokazano metodom *in situ* hibridizacije kromosoma pri čemu je utvrđeno više mjesta integracije virusne DNA (Popescu i sur., 1987). Pomoću HeLa stanične linije usavršen je uzgoj stanica i tkiva, a to je ujedno i najzastupljenija stanična linija u svim laboratorijima. Primjenom i radom na HeLa stanicama dan je doprinos u istraživanju malignih tumora, testiranju cjepiva i razumijevanju virusnog reprogramiranja stanice.

HeLa je besmrtna stanična linija koja se dijeli svaka 23 sata. Jedna od najvažnijih odlika je visoka stabilnost genoma, odnosno ne dolazi do većih genetičkih modifikacija kroz veći broj generacija. Karakterizira ih izdržljivost te prilagodljivost različitim uvjetima.

3.1.2. Kemikalije

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

Fetalni teleći serum (FBS), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Kristal violet, Kemika, Zagreb, RH

MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolijevazol)), Promega, SAD

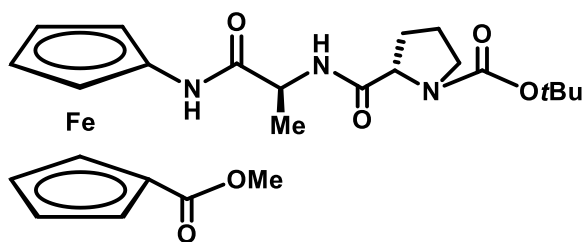
Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Ferocenski peptidomimetici

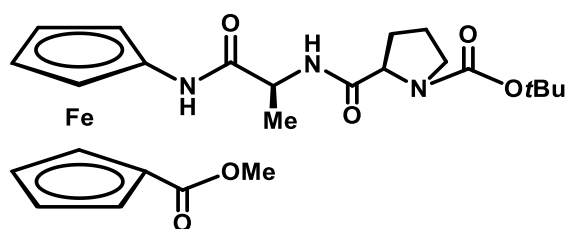
U ovo završnom radu ispitana je biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika, prethodno sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Ispitano je djelovanje četiri sintetizirana peptidomimetika (Slika 7) na HeLa staničnu liniju.

Spoj 1



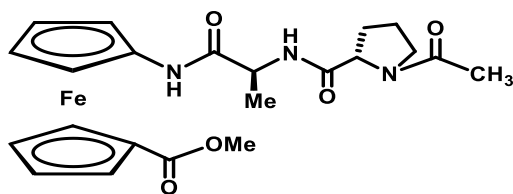
Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (1)

Spoj 2



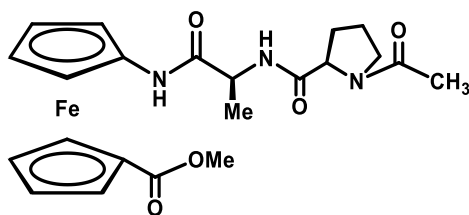
Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

Spoj 3



Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (3)

Spoj 4



Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (4)

Slika 7. Kemijska struktura ferocenskih peptidomimetika

3.1.4. Otopine i puferi

PBS pufer (pH= 7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4% otopina tripan-plavo:

Boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20,00 mL

0,2% otopina kristal violet:

Boja kristal violet	0,2 g
2% etanol	10,00 mL

3.1.5. Uređaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Dyno – Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan

Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija

Ploče s 6 jažica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

Čitač mikrotitarskih pločica, Tecan, Švicarska

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj HeLa stanične linije

HeLa stanice zamrznute su u mediju na temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najprije je potrebno uroniti ampulu sa stanicama u vodenu kupelj temperiranu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se stanice odmrznule. Zatim je potrebno provesti centrifugiranje pri 1000 okr min^{-1} i ukloniti medij za zamrzavanje. Preostali talog sa stanicama resuspendira se u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 5-10% FBS. Stanice se održavaju u T-bocama ili Petrijevim zdjelicama, u inkubatoru s kontroliranom atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5% CO_2 te reguliranom temperaturom od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzgoj se svakodnevno kontrolira pod inverznim mikroskopom kako bi se pratila brojnost stanica, morfologija i adhezija za podlogu. Stanice je potrebno precijepiti kada pokrivenost podloge prijeđe 80% kako stanice ne bi ušle u stacionarnu fazu rasta zbog kontaktne inhibicije. Važno je nadomjestiti komponente medija koje su iscrpljene, ali i ukloniti produkte metabolizma koji bi mogli narušiti pH ili fiziološko stanje stanica.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Kako bi rezultati bili vjerodostojni i reproducibilni važno je odrediti početni broj stanica prilikom nacjepeljivanja. Nakon što se ukloni hranjivi medij, dodaje se 1 mL otopine tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Kako bi ubrzali postupak tripsinizacije, potrebno je stanice u Petrijevim zdjelicama držati u inkubatoru. Tijek odvajanja prati se pod inverznim mikroskopom, a postupak odvajanja stanica od podloge je završio kada se stanice zaokruže.

Djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom medija sa serumom koji sadrži inhibitore proteaza. Stanice je potrebno dobro resuspendirati, a zatim se uzme alikvot od $20\text{ }\mu\text{L}$ suspenzije i pomiješa sa $20\text{ }\mu\text{L}$ boje tripan-plavo. Alikvot od $20\text{ }\mu\text{L}$ pripremljene otopine nanosi se u Neubauerovu komoricu za brojanje. Komorica se sastoji od 9 kvadrata površine $0,0025\text{ mm}^2$ i dubine $0,1\text{ mm}$. Stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze na kutevima velikog kvadrata, a podijeljeni su na 16 (4x4) malih kvadrata. Broj stanica računa se kao zbroj stanica u 4 velika kvadrata pomnožen s 5×10^3 . Velike polarne molekule reagensa ne mogu ući u živu stanicu već se vežu na unutarstanične proteine mrtvih stanica koje imaju oštećenu membranu i posljedično propuštaju molekule reagensa te bivaju obojene plavo. Broj stanica po mL suspenzije određuje se iz navedenog izraza:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5 \times 10^3 \quad (1)$$

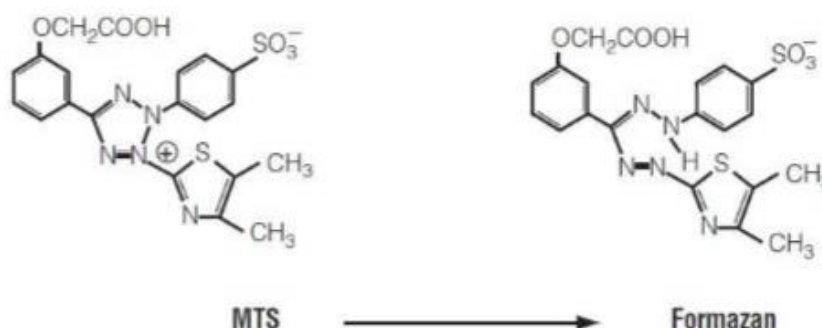
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti ferocenskih peptidomimetika na HeLa staničnoj liniji

Nakon brojanja stanica izračunali smo koliki je volumen suspenzije potreban kako bismo nacijepili stanice u ploču s 96 jažica u početnoj koncentraciji od oko 3×10^4 stanica mL^{-1} . U svaku jažicu nacijepili smo 100 μL suspenzije stanica te smo ploču inkubirali 24 sata kako bi se stanice prihvatile za površinu i nastavile rasti. Nakon 24 sata stanice smo tretirali s četiri različita uzorka peptidomimetika, prethodno sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju, u koncentracijama od 50 μM , 100 μM , 200 μM i 500 μM . Svaki uzorak imao je po 3 paralele, a na ploči se nalaze i kontrolne jažice koje nisu tretirane peptidomimeticima. Nakon 48 sati od dodatka peptidomimetika, određen je učinak spojeva na stanice primjenom MTS metode.

3.2.4. MTS metoda za određivanje vijabilnosti stanica

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje broja živih stanica u ispitivanjima citotoksičnog djelovanja tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5dimetiltiliazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevazol)). U živim stanicama prisutne su dehidrogenaze koje reduciraju tetrazolijevu sol u ljubičasto obojeni produkt formazan (Slika 8), koji je topljiv u staničnom mediju, a konverzija se vrši pomoću NADH i NADPH. Nakon 48 satne inkubacije stanica, u svaku jažicu dodali smo po 10 μL MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija te nastavili inkubirati stanice 3 sata u inkubatoru na 37 °C. Apsorbancija se određuje pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 490 nm. Intenzitet boje direktno je proporcionalan broju živih stanica. Vijabilnost se izražava kao omjer apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na srednju vrijednost apsorbancije kontrolnih stanica.

$$\text{Preživljenje (\%)} = (\text{Apsorbancija tretiranih stanica}) / (\text{Apsorbancija kontrolnih stanica}) \times 100 \quad (2)$$



Slika 8. Redukcija tetrazolijeve soli u formazan

3.2.5. Klonogena analiza i bojanje HeLa stanica bojom kristal violet

Test formiranja kolonija ili klonogeni test je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica, a temelji se na sposobnosti pojedinačne stanice da formira koloniju. Kolonija je definirana kao skup od najmanje 50 stanica (Franken i sur., 2006). Klonogenom analizom prati se sposobnost svake stanice u populaciji da formira klonove, odnosno ispituje se svojstvo neograničenog rasta, što je karakteristično obilježje tumorskih stanica. Test preživljenja stanica najčešće se mjeri utjecaj ionizirajućeg zračenja ili citotoksičnog agensa na proliferaciju stanica i zadržavanje sposobnosti stvaranja kolonija. Ova metoda često se koristi u istraživanjima kako bi se predvidjelo ponašanje tumorskih staničnih linija na nove kemoterapeutske agense.

Postupak klonogene analize započet je nacjepljivanjem prethodno uzgojenih HeLa stanica u dvije ploče sa 6 jažica, u početnoj koncentraciji od 200 stanica u 2 mL medija za uzgoj po jažici. Stanice su inkubirane pri optimalnim uvjetima temperature i tlaka, a nakon 24 sata tretirane su sa četiri uzorka ferocenskih peptidomimetika u koncentracijama od 100 μM i 500 μM . Također, u obje ploče bile su i kontrolne stanice koje nisu tretirane peptidomimeticima. Tri dana nakon tretiranja stanica uklonjen je hranjivi medij u koji su bili dodani ispitivani spojevi te je dodan novi svježi medij te su stanice vraćene na inkubaciju.

Nakon tretmana ispitivanim tvarima preživjelim stanicama potrebno je oko 1-3 tjedna za formiranje kolonija. U ovom radu formirane kolonije bile su vidljive 18 dana nakon nacjepljivanja. Zatim je potrebno provesti bojanje stanica odnosno poraslih kolonija bojom kristal violet. Postupak započinje uklanjanjem medija te ispiranjem stanica s 1 mL PBS pufera. Potom se doda 2,5 mL metanola za fiksaciju stanica, koji se nakon 10 minuta uklanja. Ploča se ostavlja na zraku kako bi se potpuno osušila, a kako bi se proces sušenja ubrzao, mogu se ploče staviti na kratko i u laminar. Nakon sušenja dodaje se 0,5 mL boje kristal ljubičasto koju je potrebno ravnomjerno rasporediti u jažicama i inkubirati 10 minuta. Završni korak uključuje uklanjanje boje i ispiranje jažica s 1 mL PBS pufera i deionizirane vode.

Na temelju broja poraslih kolonija izračunata je učinkovitost naciepljivanja (PE, eng. *plating efficiency*) 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 (SF, eng. *surviving fraction*), odnosno udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima (Franken i sur., 2006).

Učinkovitost naciepljivanja (PE) →

$$PE = \text{broj kolonija poraslih u kontroli} / \text{broj stanica koje smo naciepili} * 100 \quad (3)$$

Frakcija preživljenja (SF) →

$$SF = \text{broj kolonija poraslih nakon tretmana} / (\text{broj stanica koje smo naciepili} * PE) \quad (4)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

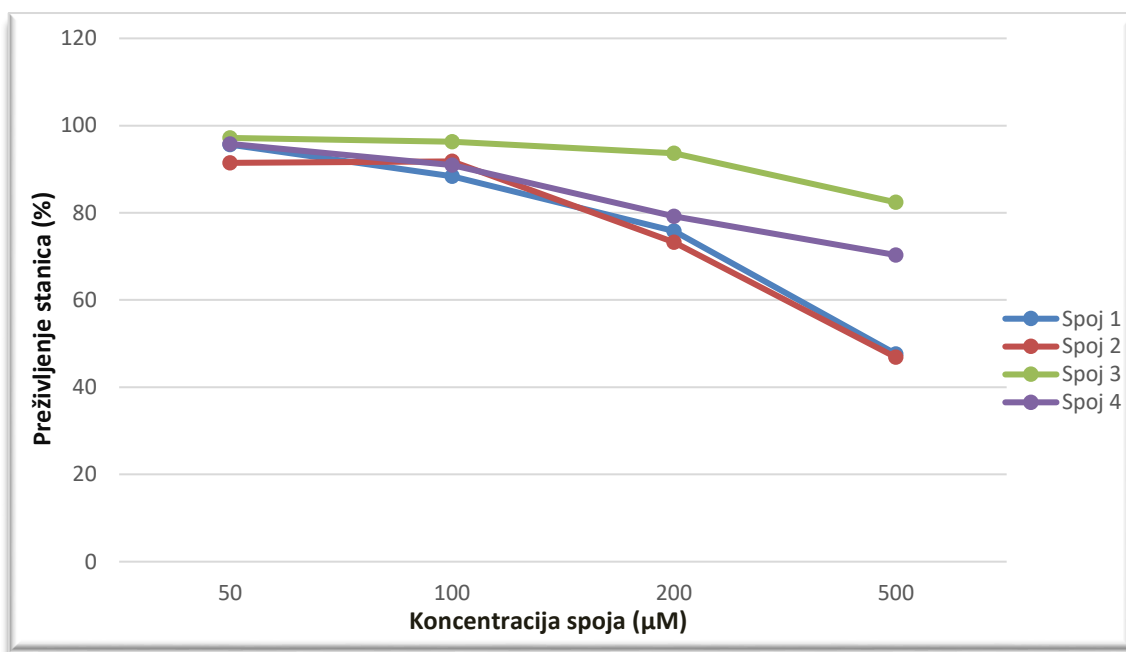
Proteini imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima, no njihovo korištenje kao terapeutika ograničeno je zbog niza nepovoljnih svojstava poput metaboličke nestabilnosti, loše biodostupnosti i slabe permeabilnosti kroz membrane. Linerni peptidi imaju vrlo kratko vrijeme poluživota od svega nekoliko minuta zbog čega je praktički nemoguće dopremiti peptidni lijek do ciljnog tkiva u potrebnoj koncentraciji. Oralno primijenjeni peptidni lijekovi podliježu brzom raspadu u probavnom sustavu. Primjenom peptidnih mimetika navedene prepreke mogu se izbjeći (Barišić, 2018).

Peptidomimetici se definiraju kao spojevi koji oponašaju biološku aktivnost prirodnih peptida, modificirajući njihovu nativnu konformaciju s ciljem poboljšanja stabilnosti, selektivnosti te funkcionalnosti. Upravo zbog navedenih karakteristika tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je uspjeh u primjeni peptidomimetika kao inovativnih lijekova u terapiji HIV-infekcija, kao imunomodulatora u terapiji autoimunih bolesti, kao i u imunoterapiji karcinoma (Barišić, 2018).

Stoga je u ovom radu ispitano je biološko djelovanje četiri ferocenska peptidomimetika, prethodno sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju, na rast i proliferaciju tumorske HeLa stanične linije.

4.1. Učinak četiri ferocenska peptidomimetika na preživljavanje HeLa stanične linije

Prethodno uzgojene HeLa stanice naciijepljene su u mikrotitarsku ploču sa 96 jažicate su nakon 24-satne inkubacije stanice su tretirane ferocenskim peptidomimeticima (1-4) u rasponu koncentracija od 50 μM do 500 μM . Nakon 48 sati od tretmana, određena je vijabilnost stanica pomoću MTS metode i primjenom čitača mikrotitarskih pločica. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji spoja s kojim su stanice tretirane (Slika 9.).



Slika 9. Učinak spojeva 1-4 na vijabilnost HeLa stanične linije

Analizom dobivenih rezultata vidljiv je inhibitorni učinak sva četiri spoja peptidomimetika na rast HeLa stanične linije. Najjači, i dosta slični, inhibitorni učinak pokazuju spoj 1 i spoj 2 gdje je postotak preživljenja pri najvišoj koncentraciji od 500 µM bio 47,65% odnosno 46,87%. Tretman spojem 3, koji je najblaže djelovao na preživljenje HeLa stanica, uzrokuje minimalnu inhibiciju od 2,83% pri koncentraciji od 50 µM i maksimalnu inhibiciju od 17,6% pri najvišoj koncentraciji od 500 µM. Nešto jači učinak imao je spoj 4, za koji je raspon inhibicije rasta iznosio 4,19% pri 50 µM i 29,68% pri 500 µM. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da spoj 3 i 4 također djeluju inhibitorno na rast stanica, ali u manjem intenzitetu nego spoj 1 i 2, dok je kod sva četiri ispitana spoja vidljivo da je inhibicija rasta proporcionalna povećanju koncentracije ispitivanog ferocenskog peptidomimetika, odnosno njihov učinak je ovisan o dozi. Iz dobivenih eksperimentalni podataka i odnosa učinak-doza moguće je matematički i/ili grafički odrediti IC_{50} vrijednost (eng. *inhibitory concentration*) odnosno onu koncentraciju peptidomimetika kod koje dolazi do 50%-tne inhibicije staničnog rasta. Iz grafa je vidljivo da je nakon 48-satnog tretmana IC_{50} vrijednost za spojeve 1 i 2 oko 480 µM.

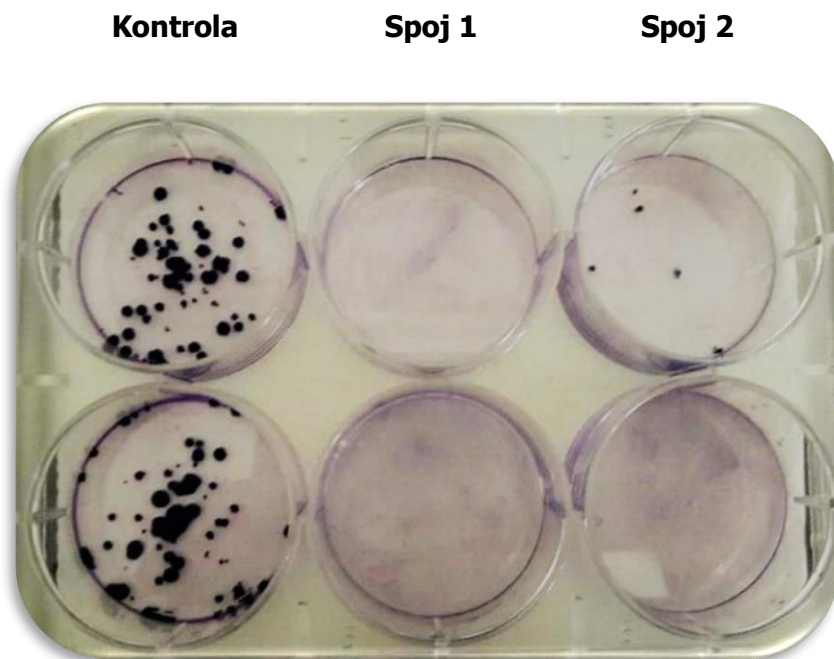
Dobiveni rezultati su u korelaciji s rezultatima koje su objavili Kovačević i sur. (2014), koji su također ispitivali biološko djelovanje četiri ferocenska peptidomimetika na HeLa i MCF-7 staničnoj liniji. U navedenom istraživanju vijabilnost stanica određena je 72 sata nakon tretmana ispitivanim spojevima rasponu koncentracija od 1 µM do 500 µM. Raspon IC_{50}

vrijednosti je od 203,27 μM do 474,99 μM , što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Razlike u IC_{50} vrijednostima, odnosno najjači učinak spoja za koji je određena IC_{50} vrijednost=203,27 μM se može objasniti činjenicom da je upravo taj spoj stabiliziran najslabijim intramolekularnim vodikovim vezama, što vjerojatno rezultira njegovom većom lipofilnošću u odnosu na preostala tri spoja ispitivana u navedenom radu. Polarnost, odnosno lipofilnost spojeva je važan preduvjet za njihovu terapijsku primjenu. Nadalje, ako se uspoređuju IC_{50} vrijednosti ispitivanih ferocenskih peptidomimetika s dobro poznatim antitumorskim agensima, poput cisplatina ili doksorubicina koji se koriste u kemoterapiji, i za koje, ovisno o staničnoj liniji IC_{50} vrijednosti iznose od 0,1 μM -15 μM (Bayoumi, 2012; Cortes i sur.,2012), možemo zaključiti da ispitani ferocenski peptidomimetici posjeduju slab citotoksični učinak, čak i pri najvišim ispitivanim koncentracijama. Takvi rezultati nisu zadovoljavajući u toj mjeri da bi spojevi 1-4 bili zanimljivi za nastavak istraživanja u smjeru razvoja novih antitumorskih agenasa, ali su svakako vrijedna smjernica u daljnjem razvoju ferocenskih peptidomimetika s poboljšanim biološkim svojstvima.

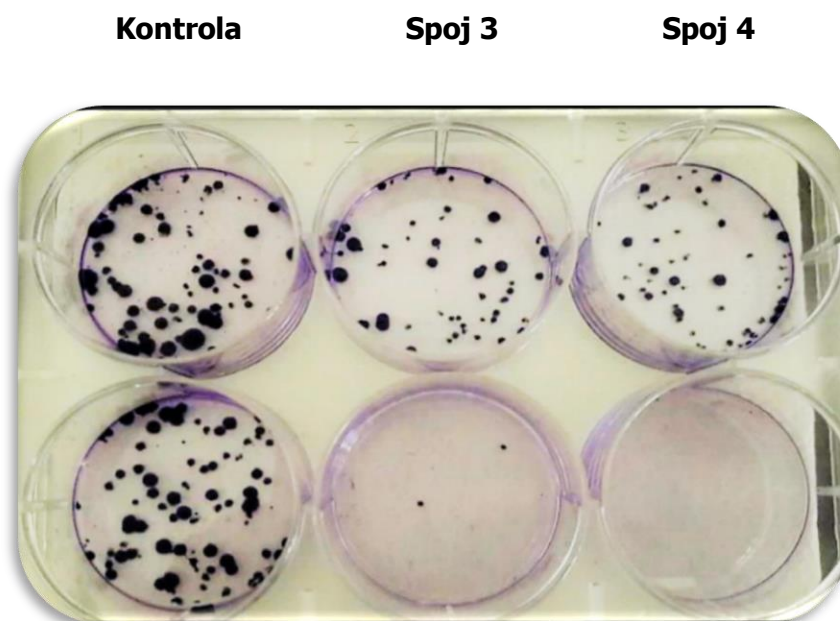
Sličan citotoksični učinak peptidomimetika na HeLa tumorsku staničnu liniju dokazan je u znanstvenom radu Kovač i sur. (2016) u kojem je ispitana biološka aktivnost ferocenskog peptidomimetika, u kojem je peptidna veza modificirana oksalamidnom podjedinicom na tri stanične linije (HEK293T, HeLa i HepG2). *In vitro* testovi su pokazali kako ferocenski peptidomimetik stimulira rast normalne HEK293T stanične linije dok najjači citotoksični efekt, ovisan o dozi, zapažen upravo na tumorskim HeLa stanicama s IC_{50} vrijednosti=252,79 μM . Zanimljivo je da je spomenuti oksalamidom modificirani ferocenski peptidomimetik pokazao dvojaki učinak tzv. hormetički efekt, ovisno o tipu stanica, te da je njegov učinak bio slabiji na normalne nego na tumorske stanice, što svakako ukazuje na njegov antitumorski potencijal.

4.2. Klonogena analiza učinka ferocenskih peptidomimetika na HeLa staničnu liniju

Test formiranja kolonija ili klonogeni test je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica koja se temelji na mogućnosti pojedinačne stanice da formira koloniju. Kako bismo ispitali djelovanje peptidomimetika na sposobnost HeLa stanica da stvaraju kolonije, provedena je klonogena analiza. Stanice su nacijepeljene u ploče sa 6 jažica, kako je opisano u poglavlju 3.2.5., a nakon 24 sata stanice su tretirane sa ispitivanim ferocenskim peptidomimetima u koncentracijama 100 μM i 500 μM . Nakon 18 dana uzgoja u inkubatoru došlo je do porasta vidljivih kolonija u jažicama te su stanice obojane bojom kristal violet (Slika 10. i Slika 11.), a porasle kolonije su izbrojane golim okom. Na temelju rezultata brojanja prikazanih u Tablici 1. izračunata je učinkovitost nacijepeljivanja (PE) i frakcija preživljenja (SF) što je navedeno u Tablici 2.



Slika 10. Rezultati klonogene analize nakon tretmana sa spojem 1 i 2 (100 μM , gornje jažice i 500 μM , donje jažice)



Slika 11. Rezultati klonogene analize nakon tretmana sa spojem 3 i 4 (100 μM , gornje jažice i 500 μM , donje jažice)

Tablica 1. Broj poraslih kolonija nakon tretiranja stanica spojevima 1-4 u koncentracijama od 100 μM i 500 μM

Kontrola	Koncentracija (μM)	Spoj 1	Spoj 2	Spoj 3	Spoj 4
56	100	0	10	50	66
71,5	500	0	0	2	0

Tablica 2. Učinkovitost naciepljivanja i frakcija preživljenja

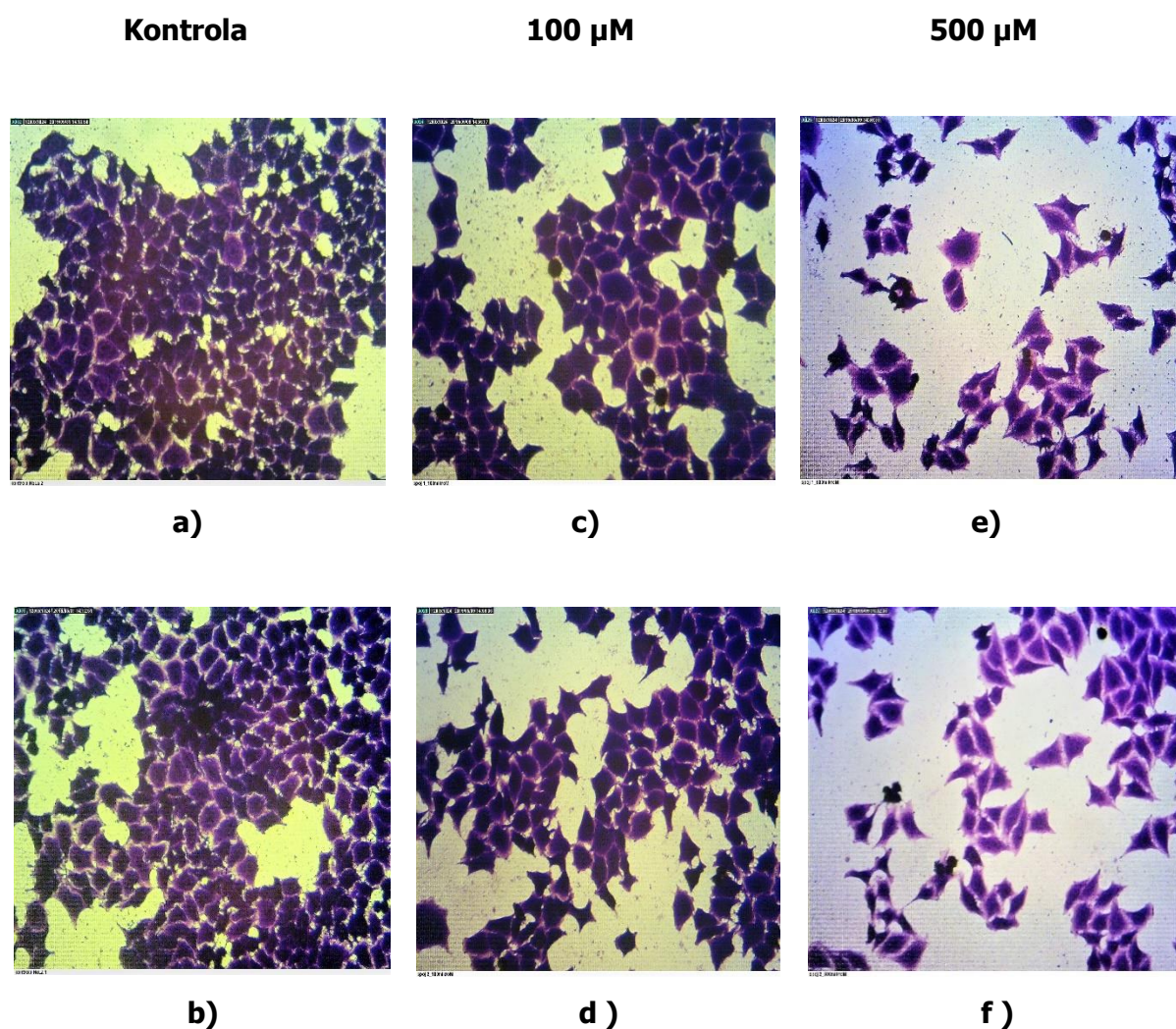
PE (%)	SF (spoj 1)	SF (spoj 2)	SF (spoj 3)	SF (spoj 4)
31,75	0	0,1575	0,7874	1,0394
	0	0	0,0315	0

Vrijednosti u Tablici 1. prikazuju broj poraslih kolonija nakon tretiranja stanica spojevima 1-4 u koncentracijama od 100 μM i 500 μM . Dobiveni rezultati pokazuju najveći broj poraslih kolonija u kontrolnim, netretiranim jažicama, što je i očekivano te potvrđuje uspješnost izvedbe analize. Broj poraslih kolonija kod tretiranih uzoraka najveći je u jažicama sa spojevima 3 i 4

pri koncentraciji 100 μM što je u skladu s rezultatima preživljavanja stanica određenih MTS metodom, dok je u jažicama gdje je dodan spoj 1, odnosno 2, najmanje poraslih kolonija (pri koncentraciji 100 μM), odnosno uopće ih nema pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 500 μM . Nadalje, u Tablici 2. prikazane su vrijednosti učinkovitosti nacjepljivanja za kontrolne stanice i frakcije preživljenja za stanice tretirane spojevima 1-4. Veća SF vrijednost znači da je zadržana veća sposobnost stvaranja kolonija nakon tretmana ispitivanom tvari. Veća vrijednosti su izračunate za spojeve 3 i 4 nego za spojeve 1 i 2, što je u skladu s našim očekivanjima, jer ti spojevi imaju slabije inhibicijsko djelovanje na HeLa stanice. Stoga možemo zaključiti da su rezultati klonogene analize u skladu sa citotoksičnošću ispitivanih ferocenskih peptidomimetika.

4.3. Morfološke promjene HeLa stanica nakon tretmana uzorcima ferocenskih peptidomimetika

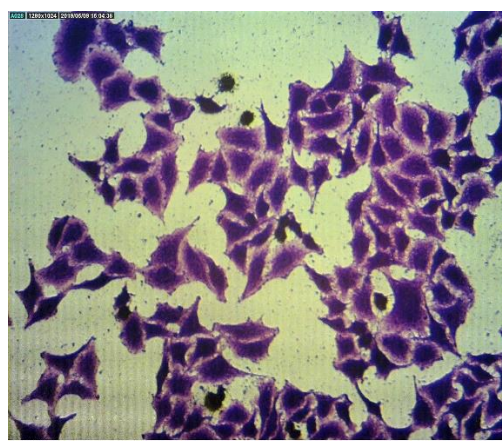
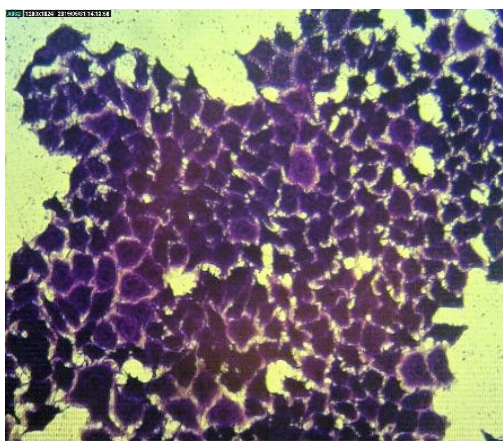
Inhibitorno djelovanje ferocenskih peptidomimetika na rast HeLa stanične linije dodatno smo potvrdili proučavanjem morfologije i brojnosti stanica pod svjetlosnim mikroskopom tijekom ispitivanja citotoksičnog djelovanja spojeva 1-4. Stanice su svakodnevno promatrane pod mikroskopom, a za potrebe fotografiranja i lakšeg uočavanja nastalih promjena u izgledu stanica obojane su bojom kristal violet nakon 48 sati tretmana što je prikazano na Slici 12 i Slici 13.



Slika 12. Morfološki izgled i brojnost HeLa stanica promatranih pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja kristal violet bojom: a) i b) kontrolne, netretirane stanice; c) i e) stanice tretirane spojem 1 u koncentracijama 100 μ M i 500 μ M; d) i f) stanice tretirane spojem 2 u koncentracijama 100 μ M i 500 μ M

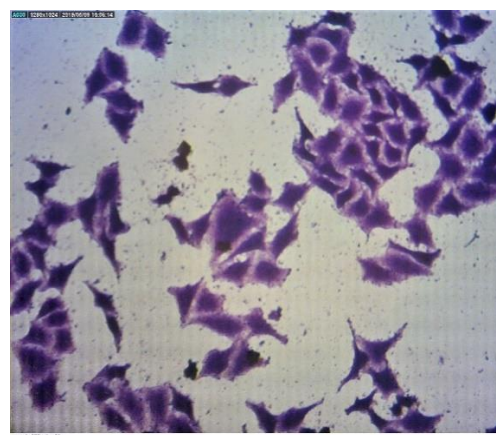
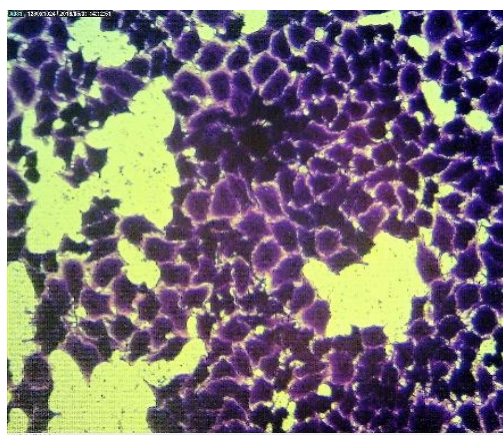
Kontrola

500 μ M



a)

c)



b)

d)

Slika 13. Morfološki izgled i brojnost HeLa stanica promatranih pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja kristal violet bojom: a) i b) kontrolne, netretirane stanice; c) i d) stanice tretirane spojevima 3 i 4 u koncentraciji od 500 μ M

Praćenjem brojnosti stanica svjetlosnim mikroskopom, vidljive su promjene ovisno o ispitivanom spoju i koncentraciji kojom su stanice tretirane. Kontrolne stanice koje nisu tretirane peptidomimeticima formiraju pravilni monosloj, veće su gustoće i karakteristične morfologije, što je vidljivo na slikama 12a) i 12b) te 13a) i 13b). Na slikama 12c), 12d) 12e) te 13c) i 13b) su prikazane stanice tretirane peptidomimeticima te je vidljivo smanjenje broja i gustoće stanica u odnosu na kontrolu. Prema MTS testu citotoksičnosti najjače inhibitorno djelovanje imaju spojevi 1 i 2 što je vidljivo i u morfologiji tih stanica te izgledu monosloja HeLa stanica.

Na kraju, možemo zaključiti kako je proliferacija i sposobnost stvaranja kolonija kod tumorskih HeLa stanica inhibirana djelovanjem ispitivanih ferocenskih peptidomimetika, pri čemu su vidljive morfološke promjene koje su u skladu s rezultatima citotoksičnosti. Na temelju dobivenih rezultata može se dalje istraživati mogući antitumorski potencijal ispitanih spojeva, osobito spojeva 1 i 2, koji su pokazali jače citotoksično djelovanje te učinak na sposobnost stvaranja klonova, koji je karakteristika tumorskih stanica, koje se upravo tako šire. Također, svakako je potrebno provesti daljna istraživanja kako bi se ustvrdio mogući mehanizam djelovanja ispitanih ferocenskih peptidomimetika te odredilo je li zapažena inhibicija rasta HeLa stanica rezultat stanične smrti ili zastoja u staničnom ciklusu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ferocenski peptidomimetici imaju inhibitorni učinak na rast i proliferaciju HeLa stanica. Najjaču citotoksičnost pokazuju spojevi 1 i 2, a učinak je ovisan o dozi.
2. Klonogenom analizom pokazano je da ispitani peptidomimetici utječu na smanjenu sposobnost HeLa stanica da formiraju kolonije. Broj poraslih kolonija ovisi o ispitivanom spoju i njegovoj koncentraciji te je u skladu s testom citotoksičnosti.
3. Djelovanje ferocenskih peptidomimetika rezultira smanjenjem broja HeLa stanica i gustoće formiranog monosloja u odnosu na kontrolne stanice te je svjetlosnom mikroskopijom potvrđen rezultat *in vitro* testa citotoksičnosti.
4. Ispitani ferocenski peptidomimetici pokazuju antiproliferativno djelovanje na HeLa stanice te imaju potencijal kao antitumorski agensi.

6. LITERATURA

Barišić L. (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 6-11.

Butler M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izdanje, Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York. str. 13-55.

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

Bayoumi A.H. (2012) Antiproliferative Properties of Vinyl Dipeptides: Synthesis and MCF-7 Cell Line Testing. *Open J. Med. Chem.* **2**: 105–111.

Bedke J., Stenzl A. (2013) IMA901: a peptide vaccine in renal cell carcinoma. *Expert Opin. Invest. Drugs.* **22**: 1329-1336.

Castilho L.R., Moraes A.M., Augusto E.F.P., Butler M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis, New York. str. 5-151.

Cortés R., Crespo M., Davin L., Martín R., Quirante J., Ruiz D., Messeguer R., Calvis C., Baldomà L., Badia J et al. (2012) Seven-membered cycloplatinated complexes as a new family of anticancer agents. X-ray characterization and preliminary biological studies. *Eur. J. Med. Chem.* **54**: 557–566.

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

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

Gokhale A.S., Satyanarayanajois, S. (2004) Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy* **6**: 755-774.

Kovačević M., Molčanov K., Radošević K., Srček Gaurina V., Roca S., Čiče A., Barišić L. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19**: 12866-12875.

Kovač V., Radošević K., Bebek A., Makarević J., Štefanić Z., Barišić L., Žinić M., Rapić V. (2016) The first oxalamide-bridged ferrocene: Facile synthesis, preliminary conformational analysis and biological evaluation. *Appl. Organometal. Chem.* 1–8.

Popescu N.C., DiPaolo J.A., Amsbaugh S.C. (1987) Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet. and Cell genet.* **44**: 58-62.

Olsen G. L. et al. (1993), Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **136**: 3039-3049.

Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016.) The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.

Rajguru J. R., Nagare S.A., Gawai A.A., Jadhao A.G., Shirsat M.K. (2019) Cancer Chemotherapy with Peptides and Peptidomimetics Drug and Peptide Based-Vaccines. *Journal of Pharm. and Med. Sciences* **2**: 21-28.

Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 25-46.

Wang W., Jiang J., Ballard C.E., Wang B. (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drugs. *Curr. Pharm. Design* **5**: 265-287.

Zorc B. (2008) Peptidomimetici. *Farmaceutski glasnik* **64**: 113 – 121.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Marija Štitić

ime i prezime studenta