

Biološka evaluacija ferocenskih peptidomimetika

Mihalj, Nika

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:320794>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Nika Mihalj

1019/MB

**BIOLOŠKA EVALUACIJA
FEROCENSKIH
PEPTIDOMIMETIKA**

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.

Najsrdajnije se zahvaljujem mentorici, izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na iskazanom povjerenju u suradnju, iznimnoj ljubaznosti, stečenim znanjima, brojnim savjetima, stručnoj pomoći i vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala prof.dr.sc. Lidiji Barišić na stečenim znanjima o peptidomimeticima na predavanjima, stručnoj pomoći, brojnim savjetima i iznimnoj ljubaznosti.

Zahvaljujem se i svim profesorima i asistentima u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija na suradnji i srdačnosti u Laboratoriju.

Hvala kolegama s Fakulteta i prijateljima koji su obogatili ovaj dio mog života, koji su dijelili sa mnom studentske brige i pružali mi moralnu potporu tijekom studiranja i izrade diplomskog rada.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i podršci koju su mi nesebično pružali tijekom cijelog života.

Hvala vam!

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

BIOLOŠKA EVALUACIJA FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA

Nika Mihalj, 1019/MB

Sažetak: Peptidomimetici su spojevi čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D strukturu prirodnog peptida i/ili proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima, pri čemu zadržavaju jednak ili unaprijeđen biološki učinak. Budući da su peptidomimetici poznati kao potencijalni antitumorski agensi, u ovom radu je ispitana *in vitro* biološka aktivnost četiri različita ferocenska peptidomimetika na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te je određen mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja protočnom citometrijom. Sva četiri ispitana ferocenska peptidomimetika pokazala su inhibitorni učinak na rast staničnih linija, pri čemu peptidomimetik **1** ima najveći inhibitorni učinak na proliferaciju stanica. Također, određivanjem tipa stanične smrti u uzorcima tretiranim ispitivanim spojevima primjenom protočne citometrije je pokazano da peptidomimetik **1** ima najveći potencijal za induciranje apoptotične smrti stanica od svih ispitivanih peptidomimetika. Dobiveni rezultati ukazuju na mogući antitumorski učinak ispitivanih ferocenskih peptidomimetika.

Glavne riječi: ferocenski peptidomimetici, antitumorsko djelovanje, *in vitro* biološka aktivnost, stanične linije, protočna citometrija

Rad sadrži: 42 stranice, 17 slika, 28 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Lidija Barišić
2. Izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević
3. Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
4. Doc.dr.sc. Monika Kovačević (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL EVALUATION OF FERROCENE PEPTIDOMIMETICS

Nika Mihalj, 1019/MB

Abstract: Peptidomimetics are compounds whose essential pharmacophore elements mimic a natural peptide or protein in 3D space and which retain the ability to interact with the biological target and produce the same or even pronounced biological effect. They are known to be potential antitumor agents so in this research, *in vitro* biological activity of four different ferrocene peptidomimetics on human tumor cell lines (HeLa and MCF-7) and the mechanism of their cytotoxic activity using flow cytometry were determined. Based on the obtained results, their impact on people could be determined. All tested peptidomimetics showed an inhibitory effect on cell lines growth and peptidomimetic **1** showed the greatest inhibitory effect on cell lines proliferation. The results have also shown that the greatest inductor of apoptotic cell death is peptidomimetic **1**. The obtained results indicate that these ferrocene peptidomimetics could have a possible antitumor effect.

Keywords: ferrocene peptidomimetics, antitumor activity, *in vitro* biological activity, cell lines, flow cytometry

Thesis contains: 42 pages, 17 figures, 28 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Kristina Radošević, Associate professor

Reviewers:

1. PhD. Lidija Barišić, Full professor
2. PhD. Kristina Radošević, Associate professor
3. PhD. Višnja Gaurina Srček, Full professor
4. PhD. Monika Kovačević, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Proteini i peptidi.....	2
2.2. Peptidomimetici	4
2.2.1. Peptidomimetici u prevladavanju nepovoljnih svojstava peptida i proteina	5
2.2.2. Konjugati 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline	6
2.3. Peptidomimetici kao lijekovi	7
2.4. Antitumorsko djelovanje peptidomimetika	9
2.5. <i>In vitro</i> ispitivanja biološke aktivnosti tvari primjenom kulture stanica	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Peptidomimetici	15
3.1.2. Kemikalije.....	16
3.1.3. Otopine i puferi	16
3.1.4. Humane stanične linije.....	17
3.1.5. Uređaji i oprema.....	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Uzgoj stanica.....	19
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	19
3.2.3. Tretman stanica ispitivanim peptidomimeticima i određivanje preživljenja stanica MTS metodom.....	20
3.2.4. Određivanje apoptoze uporabom fluorescentne mikroskopije i bojanja stanica fluorescein diacetatom i propidijevim jodidom.....	21
3.2.5. Protočna citometrija	22
3.2.6. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Biološka aktivnost peptidomimetika na staničnim linijama HeLa i MCF-7	26
4.2. Morfološke promjene stanica HeLa nakon tretmana ferocenskim peptidomimeticima	29
4.3. Određivanje mehanizma citotoksičnog djelovanja peptidomimetika protočnom citometrijom	33
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Peptidi i proteini imaju iznimno važne uloge u različitim staničnim procesima te se zbog toga izučavaju kao ciljne molekule za razvoj novih lijekova. Usprkos njihovoj ogromnoj raznolikosti u biološkoj strukturi i funkciji te stoga velikom potencijalu za primjenu u medicini, njihova primjena kao lijekova ograničena je nizom čimbenika. Peptidi i proteini imaju nisku metaboličku stabilnost prema proteolizi u gastrointestinalnom traktu i serumu, slabe su apsorpcije nakon oralne primjene, brzo se izlučuju kroz jetru i bubrege te mogu imati neželjene učinke zbog interakcija konformacijski fleksibilnih peptida s različitim receptorima. Poboljšanja ili promjene nepovoljnih strukturnih i bioloških svojstava peptida i proteina mogu se ostvariti primjenom njihovih mimetika (Barišić, 2018). Peptidomimetici su spojevi čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D strukturu prirodnog peptida ili proteina. Pri tom zadržavaju sposobnost interakcije s biološkim metama, proizvode isti ili poboljšani biološki učinak kao prirodni peptidi ili proteini te su dizajnirani na način da zaobiđu neke od spomenutih problema povezanih s prirodnim peptidima. Stoga, peptidomimetici imaju veliki potencijal u otkrivanju lijekova (Vagner i sur., 2008).

Zbog velikog broja tumorskih oboljenja i (ne)uspješnosti njihovog liječenja u svijetu, postoji velika potreba za razvojem novih antitumorskih lijekova. Među ostalima, kao potencijalni spojevi s antitumorskim djelovanjem ispituju se i razni peptidomimetici, koji imaju potencijal kao antitumorski agensi zbog svoje antitumorske aktivnosti (Kovačević i sur., 2014). Ferocenski peptidomimetici nastaju umetanjem 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvencu sa ciljem indukcije okreta. Ferocen ima ulogu začetnika okreta, a vodikove veze, koje se uspostavljaju između peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup, dovode do tvorbe struktura nalik β -nabranim pločama (Barišić, 2018).

Cilj ovog rada je ispitati biološku aktivnost četiri ferocenska peptidomimetika sintetizirana u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Sintetizirani peptidomimetici su konjugati 1'- aminoferocen-1-karboksilne kiseline, alanina i prolina, a u radu je ispitana njihova *in vitro* biološka aktivnost na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te se odredio mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja protočnom citometrijom, primjenom Muse™ analizatora staničnog zdravlja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROTEINI I PEPTIDI

Proteini su „najsvestranije“ biološke makromolekule koje se nalaze u svim živim sustavima. Njihova ključna svojstva ovise o strukturi molekule, a omogućuju im obavljanje širokog raspona funkcija u raznim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju razne molekule (primjerice kisik), osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, sudjeluju u gibanju, prenose živčane impulse te kontroliraju rast i diferencijaciju (Berg i sur., 2013). Općenito, proteini su linearni polimeri izgrađeni od 20 monomernih jedinica – aminokiselina, koje su vezane jedna na drugu. Prirodne L-aminokiseline međusobno se povezuju u polipeptidne lance koji se tijekom i poslije sinteze spontano smataju, tvoreći različite konformacije uslijed rotacije oko formalno jednostrukih veza. Konformacija u kojoj je neka molekula biološki aktivna naziva se nativnom konformacijom, a određena je redoslijedom aminokiselina u proteinskom lancu. Nativna konformacija proteina određuje funkciju određenog proteina, a smatanje proteinskih lanaca igra ključnu ulogu u regulaciji njegove biološke aktivnosti.

Proteini se međusobno razlikuju u strukturi i svojstvima bočnih ogranaka vezanih na glavni lanac ili okosnicu, kao što su: veličina, trodimenzijski oblik, naboj, sposobnost stvaranja vodikovih veza, polarnost te kemijska reaktivnost (Barišić, 2018). Također, mogu sadržavati različite funkcijske skupine: alkoholne, tiolne, tioeterne, karboksilne, karboksiamidne i razne bazne skupine, a većina njih je kemijski reaktivna. Kad se kombiniraju u različitom rasporedu, te funkcijske skupine omogućuju proteinima široki spektar djelovanja. Na primjer, njihova su reaktivna svojstva bitna za djelovanje enzima, proteina koji kataliziraju specifične kemijske reakcije u biološkim sustavima (Berg i sur., 2013).

Raspodjela polarnih i nepolarnih aminokiselina u strukturi proteina igra ključnu ulogu u regulaciji smatanja proteina te posljedično u funkciji proteina. Nepolarni, odnosno hidrofobni bočni ogranci se nakupljaju u unutrašnjosti molekule kako bi izbjegli kontakt s vodenom okolinom u stanici, dok se polarni i nabijeni ogranci zadržavaju blizu površine molekule kako bi mogli stvarati vodikove veze s vodom i drugim polarnim molekulama u stanici. Nabiranje proteinskih lanaca ovisi o slabim nekovalentnim interakcijama koje se uspostavljaju između različitih dijelova lanca. Te slabe nekovalentne interakcije mogu biti vodikove veze, ionske veze i van der Waalove sile. Nevalentne interakcije su i do 300 puta slabije od kovalentnih veza, međutim, njihova brojnost i simultanost omogućuje relativno čvrsto povezivanje regija

peptidnog lanca. Stabilnost tako smotanih proteina ovisna je o utjecaju velikog broja nekovalentnih interakcija, a posljedica utjecaja nekovalentnih interakcija je specifična trodimenzionalna struktura svakog proteina. Pogreške u nabiranju proteinskih lanaca vrlo često rezultiraju patološkim stanjima. Tako primjerice, neželjena agregacija proteinskih lanaca dovodi do tvorbe amiloidnih vlakana (plaka), koja se nakupljaju u tkivima te uzrokuju teška kronična oboljenja (amilodidioze). Neurodegenerativne bolesti, kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, posljedica su nakupljanja amiloidnog plaka u mozgu.

Aminokiseline se međusobno povezuju peptidnom vezom, koja je, zbog djelomično dvostrukog karaktera, planarna – atomi C_{α} , C, O, N, H i C_{α} leže u istoj ravnini i rigidna – nema slobodne rotacije oko veze između karbonilnog ugljika i dušikovog atoma. Rotacija oko jednostrukih veza omogućuje smatanje peptidnih lanaca, a ovisna je o veličini i naboju bočnog ogranka. Peptidna veza je u laboratorijskim uvjetima vrlo stabilna, odnosno može se pocijepati tek nakon dugotrajnog izlaganja koncentriranim kiselinama ili bazama pri visokim temperaturama. S druge strane, proteini iz hrane u želucu bivaju metaboliziranim pri puno blažim uvjetima zbog enzima s proteolitičkim djelovanjem, koji su prisutni u probavnom sustavu.

Postoje četiri strukturne razine proteina. Primarna struktura predstavlja slijed aminokiselina u lancu, sekundarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu međusobno blizu, tercijarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu udaljeni, a kvaterna struktura se odnosi na proteine građene od više polipeptidnih lanaca, odnosno na prostorni razmještaj tih polipeptidnih lanaca i prirodu njihovih interakcija (Barišić, 2018).

Proteini mogu stupati u interakcije međusobno ili s drugim biološkim makromolekulama tvoreći složene komplekse, unutar kojih mogu djelovati sinergistički i obavljati funkcije koje pojedinačni proteini ne mogu obavljati. Takvi primjeri uključuju makromolekularne aparate koji repliciraju DNA, prenose signale unutar stanice i upravljaju mnogim drugim bitnim procesima (Berg i sur., 2013). Takav način djelovanja u skladu je s Ehrlichovim načelom „Molekule ne djeluju ako nisu povezane“ (lat. *Corpora non agunt nisi fixata.*). Osnovni preduvjet koji se mora zadovoljiti da bi se postigao biološki odgovor je međusobno povezivanje dviju molekula nekovalentnim vezama. Na primjer, vezanjem antitijela na antigen stimulira se imunostav, supstrat se mora vezati na enzim da bi kataliza reakcije mogla krenuti, stanične reakcije se potiču vezanjem raznih signalnih molekula i tako dalje. Da bi se dvije molekule mogle povezati, nužno je da budu strukturno komplementarne.

Drugim riječima, trodimenzijske strukture moraju odgovarati jedna drugoj veličinom, oblikom, nabojem te hidrofobnim, odnosno hidrofilnim svojstvima (Barišić, 2018).

Peptidi su spojevi koji se sastoje od dvije ili više aminokiselina povezanih u lanac (Berg i sur., 2013). Imaju visoku specifičnost *in vivo*, što ih čini nezamjenjivima u terapiji različitih bolesti. Unatoč njihovoj ogromnoj raznolikosti u biološkoj funkciji i strukturi, primjena peptida kao lijekova nailazi na brojne zapreke, kao što su: metabolička nestabilnost, slaba permeabilnost kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru zbog njihove velike molekulske mase i polarnog karaktera te loša oralna biodostupnost. Nadalje, njihova velika fleksibilnost im omogućava interakciju s različitim receptorima, što može rezultirati nepoželjnim nuspojavama. Također, peptidi podliježu proteolitičkom djelovanju peptidaza iz seruma i gastrointestinalnog trakta, dok linearni peptidi imaju vrlo kratko vrijeme poluživota od svega nekoliko minuta, zbog čega je praktički nemoguće dopremiti peptidni lijek do ciljnog tkiva u djelatnoj koncentraciji. Također, peptidni lijekovi koji se oralno primjenjuju podliježu brzom raspadu u probavnom sustavu te se moraju primijeniti intravenozno, što za pacijenta podrazumijeva odlazak liječniku ili boravak u bolnici. Navedeni nedostaci korištenja peptida kao lijekova mogu se prevladati primjenom njihovih mimetika (Barišić, 2018).

2.2. PEPTIDOMIMETICI

Pojam biomimetika (eng. *Biomimetic*) datira od 1957. godine te opisuje koncept oponašanja prirodnih sustava pri dizajnu novih industrijskih proizvoda. Potječe od grčkih riječi *bios* (život) i *mimesis* (oponašati). Biomimetika je interdisciplinarno područje koje objedinjuje biologiju, fiziku, kemiju i znanost o materijalima, a kao koncept se primjenjuje i u arhitekturi i ekonomiji. U Merriam – Websterovom rječniku biomimetika je definirana kao studij tvorbe, strukture i funkcije prirodnih spojeva i materijala te bioloških mehanizama i procesa sa ciljem pripreme sličnih produkata pomoću umjetnih mehanizama (Barišić, 2018). Prema definiciji Europske federacije za biotehnologiju iz 1992. godine, biotehnologija povezuje prirodne i inženjerske znanosti da bi se postigla primjena organizama, stanica, njihovih dijelova i molekularnih analoga u dobivanju proizvoda za dobrobit čovječanstva (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2019). Stoga, biotehnologija kao znanstvena disciplina pripada polju biomimetike.

Peptidomimetika predstavlja interdisciplinarno znanstveno područje koje pripada polju biomimetike, a objedinjuje organsku kemiju, biokemiju, farmakologiju i biotehnologiju (Barišić, 2018). Za razliku od modificiranih peptida koji se definiraju kao peptidi čiji je osnovni aminokiselinski slijed ostao isti, ali peptid sadrži neprirodne aminokiseline, modificirane cisteinske ostatke ili fosforilirane aminokiseline, peptidomimetici su spojevi koji oponašaju strukturu i/ili biološki učinak peptida, neovisno o kemijskoj strukturi (Jerić, 2004).

Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.
- Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D strukturu prirodnog peptida i/ili proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima, pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak.

Peptidomimetici se mogu podijeliti na tri tipa:

1. Kratki peptidi koji oponašaju sekundarnu strukturu prirodnog peptida, sa zanemarivim izmjenama sekvence
2. Nepeptidne funkcionalne molekule koje ne oponašaju peptidnu sekundarnu strukturu
3. Nepeptidne molekule koje oponašaju regije iz prirodnog proteina koje sudjeluju u ključnim interakcijama (Barišić, 2018).

2.2.1. Peptidomimetici u prevladavanju nepovoljnih svojstava peptida i proteina

Peptidi mogu uzrokovati neželjene biološke učinke zbog interakcija konformacijski fleksibilnih peptida s različitim receptorima. Afinitet peptida za željeni receptor može se povećavati sintezom peptidomimetika u koji se uvode različita konformacijska ograničenja da bi se ograničila njegova fleksibilnost, što rezultira zauzimanjem rigidne bioaktivne konformacije (Slika 1).



Slika 1. Ograničavanje konformacijske slobode i „zaključavanje“ bioaktivne konformacije (Barišić, 2018).

Nadalje, prirodni peptidi nestabilni su u prisutnosti endopeptidaza, koje cijepaju unutarnje amidne veze, i egzopeptidaza, koje započinju hidrolizu na *N*- ili *C*-kraju peptidnog lanca. Taj problem može se prevladati eliminacijom pojedine amidne veze, uvođenjem D-aminokiselina ili kemijskom modifikacijom terminalnih skupina.

Slaba topljivost peptida u vodi može se poboljšati uvođenjem polarnih funkcijskih skupina, a slaba se permeabilnost kroz biološke barijere prevladava korekcijom fizičko-kemijskih svojstava i peptida i supstrata (Barišić, 2018).

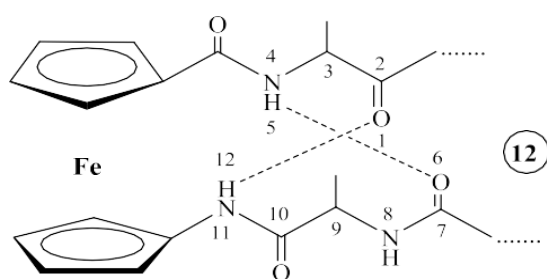
2.2.2. Konjugati 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline

Ferocen je organometalni spoj u kojem je željezov kation (Fe^{2+}) smješten između dva ciklopentadienilna liganda (Cp). Zbog takve strukture se ferocenski spojevi često nazivaju „sendvič“ spojevi. Ferocen se nalazi u središtu bioorganometalne kemije zbog svojih karakteristika. Odlikuje se redoks-svojstvima, stabilnošću pri visokim temperaturama (do 400 °C), topljivošću u organskim otapalima te niskoj toksičnosti. Također, stabilan je u fiziološkom mediju, podliježe relativno jednostavnim kemijskim modifikacijama i lipofilan je, zbog čega ima sposobnost prolaska kroz stanične membrane. Primjenjuje se u nanomedicini, katalizi i industriji biosenzora (Barišić, 2018).

Umetanje 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvenciju sa ciljem indukcije okreta je jedan od pristupa u sintezi ferocenskih peptidomimetika. 1,1'-disupstituirani ferocenski kalupi: ferocen-1, 1'-dikarboksilna kiselina (Fcd), ferocen-1, 1'-diamin (Fcda) i 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca) prepoznati su kao korisna i učinkovita bioorganometalna ograničenja osmišljena da induciraju nastanak kiralno organiziranih struktura nakon konjugacije s prirodnim aminokiselinama te mogu imati ulogu donora ili

akceptora vodikove veze (Kovačević i sur., 2014). Uvođenje kiralnih peptidnih lanaca na ferocen omogućuje njihovu komunikaciju intramolekulskim vodikovim vezama (IHB, eng. *intramolecular hydrogen bonding*), koje su potrebne za stvaranje 3D strukture i funkciju bioloških sustava. Nastajanje unutarmolekulskih vodikovih veza se u takvim konjugatima postiže zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å. Ferocen ima ulogu začetnika okreta, a vodikove veze uspostavljene između peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup dovode do tvorbe struktura nalik β-nabranim pločama (Barišić, 2018).

U ferocenskim mimeticima $Y-(AK)_n-NH-Fn-CO-(AK)_m-OMe$, koji se izvode iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline, uspostavljaju se dvanaesteročlani IHB-prstenovi (Slika 2)



Slika 2. Mimetik izveden iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Barišić, 2018).

2.3. PEPTIDOMIMETICI KAO LIJEKOVI

Korištenje peptidomimetika, koji imaju različite farmakološke aktivnosti, jedan je od novijih principa medicinske kemije za razvoj lijekova. Zbog njihove dokazane antimikrobne, antitumorske, antivirusne, antimalarijske, antioksidacijske i imunosupresivne aktivnosti te imunodetekcije i selektivnosti za DNA receptore, peptidomimetici se koriste za stvaranje i razvoj novih molekula lijekova koje mogu biti učinkovite u liječenju različitih bolesti (Kovačević i sur., 2014). Ukoliko se peptidomimetici odlikuju farmakološkim svojstvima kao što su: afinitet i selektivnost prema receptorima, metabolička stabilnost, minimalne nuspojave te dobra biodostupnost, odnosno brzina apsorpcije i količine aktivne tvari (lijeka) koja dopijeva u sistemska cirkulaciju te do ciljnih tkiva, mogu se koristiti u terapijske svrhe (Barišić, 2018). Veliki broj oboljenja u ljudi je posljedica prekomjerne ili nedovoljne ekspresije proteina te neadekvatnih protein-protein interakcija. Peptidomimetici i peptidi, koji

se već danas koriste u terapiji, djeluju na proteine koji pokazuju prekomjernu ekspresiju i moduliraju imunološki odgovor (Gokhale i Satyanarayanajois, 2004). Nekoliko kosimulatornih molekula koje sudjeluju u upalnim procesima i odgovoru T-stanica koriste se za ciljanu terapiju autoimunih bolesti, kao što su reumatoidni artritis, lupus, multipla skleroza i HIV (Jois i sur., 2006).

Peptidomimetički lijekovi koji su do danas odobreni u Europi, SAD-u i Japanu sintetizirani su na različite načine. Dezmpresin je sintetska zamjena vazopresinu te ima višestruko veću anti-diuretsku aktivnost od vazopresina, a sintetiziran je zamjenom L-arginina iz vazopresina D-argininom. Karbetocin je mimetik prirodnog hormona oksitocina, sintetiziran zamjenom leucina iz oksitocina neprirodnom aminokiselinom metil-tirozinom te disulfidne veze tioeterskom, a odlikuje se boljom metaboličkom aktivnošću od oksitocina. Prilikom sinteze peptidomimetičkog lijeka zikonotida korištena je ciklizacija. Zikonotid je ciklički polipeptid s tri disulfidne veze koji se primjenjuje kao analgetik zbog svoje sposobnosti inhibicije otpuštanja neurokemikalija povezanih s osjetom boli.

Glatimer (Copaxone) je peptidomimetički lijek koji je 2015. godine bio najprodavaniji, a koristi se u terapiji relapsno-remitentne multiple skleroze, najčešće kronične, upalne i autoimune bolesti središnjeg živčanog sustava. Radi se o polimeru koji oponaša mijelinski osnovni protein, a sastoji se od aminokiselina Glu, Ala, Tyr i Lys. Drugu poziciju najprodavanijih peptidomimetičkih lijekova ima skupina agonista GLP-1 (peptid-1-sličan glukagonu) za terapiju dijabetesa tipa 2. Radi se o liraglutidu (VictozaTM, SaxendaTM) i egzenatidu CR (BydureonTM). 2012. godine odobreni su agonisti somatostatina za liječenje akromegalije, hormonalnog poremećaja kod kojeg hipofiza proizvodi pretjerane količine hormona rasta, a u 2015. godini zauzeli su treću poziciju najprodavanijih peptidomimetičkih lijekova. Hrvatski pacijenti imaju mogućnost liječenja navedenim lijekovima.

Leuprorelin-acetat (Lupron depotTM) i goserelin (ZoladexTM) su peptidomimetički lijekovi koji se koriste za liječenje prostate te predstavljaju veliku skupinu agonista GnRH (gonadotropin-otpustajućeg hormona). Još 10 agonista i antagonista GnRH dostupno je na tržištu. Peptidomimetički lijekovi koji su odobreni za liječenje osteoporoze su teriparatid (ForteoTM) i abaloparatid (TymlosTM). Za liječenje infantilnog spazma koristi se kortikotropin (ActharGelTM), dok se za liječenje trombocitopenije, smanjenog broja trombocita u perifernoj krvi, primjenjuje romiplostim, mimetik trombopoetina. Vrijednost tržišta peptidnih terapeutika procjenjuje se na 25,4 milijarde američkih dolara, što premašuje iznos državnog proračuna Republike Hrvatske. Tržište peptidnih terapeutika eksponencijalno raste (Barišić, 2018).

2.4. ANTITUMORSKO DJELOVANJE PEPTIDOMIMETIKA

S obzirom na to da se rak smatra jednim od najozbiljnijih zdravstvenih problema u svijetu, otkriće novih, potentnih, sigurnih i selektivnih antitumorskih lijekova je od iznimne važnosti (Kovačević i sur., 2014). Većina antitumorskih lijekova koje je odobrila američka agencija za hranu i lijekove (FDA, eng. *U.S. Food and Drug Administration*) organske su molekule, dok su metalolijekovi vrlo rijetki. Prvi i najpoznatiji terapijski reagens na bazi metala, cisplatin, pokrenuo je novo razdoblje u primjeni kompleksa prijelaznih metala kao antitumorskih lijekova. Pokazalo se da cisplatin djeluje protiv raka pluća, glave, jajnika, vrata te jednjaka. Iako su cisplatin i njegovi derivati učinkoviti protiv velikog broja različitih tumora, također su citotoksični te izazivaju ozbiljne nuspojave koje uključuju perifernu neuropatiju, gubitak kose te supresiju koštane srži. Kod tumora se može razviti otpornost na platinu, što smanjuje učinkovitost takvog tipa lijekova ili ih čak učiniti neučinkovitima, što rezultira neuspjehom u liječenju. Unatoč tome, i nadalje se u razvoju novih antitumorskih lijekova istražuju kompleksi metala za koje se smatra da imaju potencijal kao novi antitumorski agensi protiv velikog broja različitih tumora (Zeng i sur., 2017).

Peptidomimetici imaju potencijal kao antitumorski agensi zbog svoje antitumorske aktivnosti, kako je zabilježeno u literaturi. Odnos između strukture i visoke specifičnosti prema tumorskim stanicama vjerojatno igra ključnu ulogu u citotoksičnosti peptidomimetika, s tim da treba imati na umu da su antitumorski lijekovi podložni razlikama u djelovanju ovisno o ciljnom tkivu i apsorpciji, a one mogu biti individualne za svakog pacijenta. Također, stečena otpornost na antitumorske lijekove smatra se jednim od razloga vraćanja tumora nakon izlječenja.

Antitumorski peptidomimetici se mogu vezati na ciljne proteine te potaknuti apoptotičnu smrt tumorskih stanica oponašanjem ključnih interakcija koje aktiviraju apoptotični put u tumorskim stanicama (Kovačević i sur., 2014). Također, Liao i sur. (2007) sintetizirali su novi neprirodni urea peptidomimetik koji ometa malignost neuroblastoma inhibiranjem sekretaze.

Nadalje, peptidomimetici svojim vezanjem na tumorske stanice remete negativno nabijenu membranu tumorske stanice, koja se sastoji od prekomjerno eksprimiranih anionskih molekula, kao što su glikoproteini koji su bogati sijalinskom kiselinom ili fosfatidilserinom. Ove razlike u sastavu membrana tumorskih stanica potpomažu stvaranje elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih peptida i negativno nabijene membrane tumorskih stanica. STAT proteini su obitelj citoplazmatskih transkripcijskih faktora, fosforilacija potiče njihovu

homo- ili heterodimerizaciju, a važna funkcija ovih dimera jest kontrola ekspresije gena. STAT3 se često aktivira u brojnim staničnim linijama tumora kod ljudi te je uključen u stanični razvoj i napredak, dok njegova deregulacija doprinosi porastu njegove aktivnosti i tumorigenezi. Tako je jedan od mehanizama antitumorske aktivnosti peptidomimetika izravno djelovanje na STAT3 signaliziranje te je do sada zapaženo da inhibitor STAT3 rezultira značajnim antitumorskim djelovanjem na stanice (Méndez-Samperio, 2014)

S obzirom na to da je jedan od faktora učinkovitog liječenja karcinoma dostava učinkovite koncentracije lijeka do ciljnog mjesta te smanjenje izloženosti zdravih tkiva lijeku, u istraživanjima antitumorskih lijekova se ispituju i mogućnosti inkapsulacije antitumorskih agenasa. Poboljšanja u mikroinkapsulacijskim tehnologijama rezultiraju povećanjem protektivnosti, dostupnosti i distribucije lijeka korištenjem različitih biorazgradivih platformi dostave, kao što su liposomi, dendrimeri, nanoemulzije, polimerni nanonosaci te nanočestice. Spomenute nanoformulacije mogu se koristiti za kontrolu otpuštanja lijeka/molekule te povećanje ciljane dostave i učinka. U literaturi je opisan uspješan primjer mikroinkapsulacije polipeptida izoliranog iz jednostanične zelene alge *Chlorella pyrenoidosa*. Navedeni polipeptid nazvan *Chlorella pyrenoidosa* je antitumorski polipeptid te je pokazao najveću inhibirajuću aktivnost na humane stanice raka jetre HepG2 (49%). Glavni mehanizam djelovanja ovog peptidomimetika je kondenzacija/fragmentacija jezgrinog kromatina. *In vitro* otpuštanje ovog peptida na stanice raka jetre pruža osnovu razvoja inkapsuliranih antitumorskih peptida (Wang i Zhang, 2013).

2.5. IN VITRO ISPITIVANJA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI TVARI PRIMJENOM KULTURE STANICA

Određivanje biološke aktivnosti novosintetiziranih kemikalija, kao i spojeva izoliranih iz prirodnih izvora provodi se izvođenjem niza testova u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) ili na različitim organizmima (*in vivo*) u svrhu procjene njihovog učinka na ljude. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvili su se kao posljedica znanstvenih, ekonomskih i etičkih zahtjeva. Razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Radojčić Redovniković i sur. 2016).

Danas je kultura životinjskih stanica glavna grana moderne biotehnologije te je njen napredak ostvaren povezivanjem istraživanja u područjima medicine, biologije, proteinske kemije i inženjerstva. Kultura životinjskih stanica predstavlja uzgoj stanica izoliranih iz različitih tkiva ili organa životinja u umjetnom hranjivom mediju. Homogena populacija stanica se može dobiti rastom u kontroliranim uvjetima kroz više generacija, što predstavlja prednost u odnosu na upotrebu tkiva životinja (Slivac i sur., 2016). Prvi korak je izolacija stanica iz željenog organa/organizma i njihovo nacjepljivanje u hranjivom mediju te održavanje kulture u optimalnim *in vitro* uvjetima, odnosno uspostavljanje primarne kulture životinjskih stanica. Primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete i najprikladnija je za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice jer stanice u primarnoj kulturi zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstava tkiva iz kojeg su potekle. Stanične linije nastaju subkultiviranjem primarne kulture i dostupne su putem banka stanica, od kojih su najveće ATCC (eng. *American Type Cell Culture*) i ECACC (eng. *European Collection of Animal Cell Culture*). Pri *in vitro* ispitivanju biološke aktivnosti prirodnih spojeva, ekstrakata biljnog podrijetla te prehrambenih proizvoda najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije (Radojčić Redovniković i sur. 2016). Stanične linije sisavaca rastu u kulturi na 37°C i djelomično održavaju stanične funkcije specijaliziranih stanica iz kojih potječu. Rast i funkcionalnost stanica su usko vezani za sastav medija (serum, dodaci), temperaturu i staničnu gustoću (Castaño i Gómez-Lechón, 2005). Naravno, postoje određena ograničenja u primjeni kultura stanica. Tako npr., nije moguće kultivirati mnoge tipove stanica, a kod onih koje su kultivirane, gubitak specifičnih staničnih funkcija učestao je problem. Također, korištenje nedefiniranih sastojaka medija za uzgoj stanica, kao što je serum, koji je najčešće ključan za održivost stanica u kulturi, može imati neželjene ili nedefinirane učinke na staničnu funkciju i biodostupnost tvari (Hodgson, 2004). Unatoč navedenim nedostacima, primjena kultura stanica u ispitivanju novosintetiziranih spojeva je neizostavan dio istraživanja i razvoja novih lijekova.

Naime, već desetljećima se u laboratorijima koji provode *in vivo* ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama nastoji primjenjivati takozvani 3R pristup (eng. *reduction, refinement i replacement*), kojim se nastoji smanjiti broj životinja potrebnih za testiranje, unaprijediti toksikološke procese kako bi bili što manje bolni i stresni za laboratorijske životinje te zamijeniti životinje pomoću *in vitro*, *ex-vivo* ili *in silico* sustava bez negativnog utjecaja na kvalitetu znanstvenog rada. Smanjenje (eng. *reduction*) se definira kao bilo koje smanjenje u broju životinja koje se koriste kako bi se dobile informacije u određenoj količini ili određene preciznosti, unaprjeđenje (eng. *refinement*) se definira kao bilo koje

smanjenje u učestalosti ili ozbiljnosti zahvata primijenjenih na životinje, a zamjena (eng. *replacement*) se definira kao supstitucija živih kralježnjaka neživim materijalom. Od 1986. godine koncept 3R podržan je zakonima Europske Unije, koji od ispitivača zahtijevaju korištenje dostupnih alternativa prije nego što provedu *in vivo* eksperimente. Deklaracija pod nazivom eng. *3 Rs Declaration of Bologna*, usvojena 1999. godine na kongresu naziva eng. *Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*, snažno je poduprla i potvrdila princip te tri metode. Danas su smanjenje, unaprjeđenje i zamjena osnovna načela istraživanja u EU te drugih politika koje se tiču korištenja životinja u znanstvenim testiranjima i eksperimentima.

Sljedeći se sustavi mogu koristiti kao djelomična ili potpuna zamjena životinja u toksikološkim eksperimentima: i) *in vitro* metode (primarne kulture, konačne stanične linije, kontinuirane stanične linije, rekonstruirana 3D tkiva), ii) *ex vivo* metode (izolirana životinjska tkiva i organi) te iii) *in silico* metode: računalne simulacije te matematički modeli, QSAR (eng. *Quantitative structure-activity relationshi*) itd. *In vitro* i *in silico* metode imaju značajnu ulogu u identificiranju rizika i procjeni toksikološkog profila spojeva, a napredne alternativne metode i kombiniranje istih koriste se za sigurnosnu procjenu konačnih proizvoda. Nekoliko alternativnih metoda, koje su odgovarajuća regulatorna tijela uključujući OECD (eng. *Organization for Economic Co-operation and Development*), FDA i EPA (eng. *Environmental Protection Agency*) znanstveno odobrila i prihvatila, danas se koriste.

In vitro testovi mogu služiti kao djelomična zamjena za test na životinjama, međutim, kad bi se *in vitro* testovi korisili višestruko, mogli bi služiti i kao metoda smanjenja ili unaprjeđenja. Ovisno o svrsi ispitivanja, ispravno odabrane *in vitro* metode u kombinaciji s temeljitim znanjem testiranih spojeva dobivenim iz baza podataka ili računalnih simulacija mogu više odgovarati za određena područja interesa od testiranja na životinjama. Uz smanjenje testiranja na životinjama, prednosti *in vitro* testiranja su: kontrolirani uvjeti testiranja, visoka razina standardizacije, smanjenje varijabilnosti među eksperimentima, testiranje je brzo te u većini slučajeva ekonomski povoljnije u odnosu na *in vivo* testove, potrebna je mala količina materijala za testiranje, proizvodi se ograničena količina toksičnog otpada, u testiranju se mogu koristiti ljudske stanice i tkiva, kao i transgenične stanice te se u kratkom vremenu može analizirati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija, što je svakako dobra preliminarna smjernica za planiranje *in vivo* studija. Međutim, metoda ima i ograničenja: ne mogu se testirati interakcije među tkivima i organima, sustavni učinci i farmakokinetici se ne mogu procijeniti, postoji mogućnost reagiranja ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj, itd. Stoga, *in vitro*

ispitivanja ne mogu nikada u potpunosti zamijeniti *in vivo* ispitivanja, budući da *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu. Osim toga, metoda ima i tehnička ograničenja, kao što je topivost spojeva, ali i moguća reakcija ispitivane tvari s plastikom koja se koristi kao posude za uzgoj stanica (Kandárová i Letašiová, 2011).

Testovi citotoksičnosti provode se kako bi se utvrdili potencijalni rizici ispitivanih spojeva i njihovih proizvoda na ljudsko zdravlje i okoliš (Arisanty, 2013). *In vitro* testovima citotoksičnosti se najčešće određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Navedeni testovi se koriste za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Podaci osnovne citotoksičnosti izraženi su kao IC₅₀ vrijednost (koncentracija koja inhibira rast 50% stanica u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama), koja se može matematički izračunati iz krivulje odnosa koncentracija-učinak. Općenito je pravilo da se stanice izlažu različitim koncentracijama ispitivanih spojeva u određenom vremenskom periodu. Stanice se obično naciepljuju u jažice mikrotitarskih ploča te se 18-24 sata kasnije tretiraju različitim koncentracijama ispitivanih spojeva, nakon čega se stanice sisavaca inkubiraju 24 h, 48h ili 72h. Nakon određenog vremena inkubacije se određuje učinak ispitivane tvari na rast stanica u kulturi, najčešće primjenom raznih kolorimetrijskih testova.

Mosmann je razvio MTT test, koji je najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica. MTT je brz, jednostavan, povoljan, raznolik, kvantitativan i visoko reproducibilan kolorimetrijski test za određivanje vijabilnosti i metaboličke aktivnosti životinjskih stanica te se koristi i u testiranju velikog broja različitih mikotoksina. Bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan pomoću enzima sukcinat-dehidrogenaze koji je aktivan u živim stanicama (Arisanty, 2013). Postoje i novije izvedbe te metode u kojima se kao supstrati koriste WST-1 i MTS, koji se metaboliziraju u produkt topiv u mediju za uzgoj stanica pa takav protokol ima jedan korak manje nego klasičan test. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica. U primjeni su i brojni drugi testovi kao što su: Kenacid Blue metoda,

Trypan Blue metoda, Neutral Red metoda, bojanje bojom kristal-ljubičasto, metoda otpuštanja laktat-dehidrogenaze, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a.

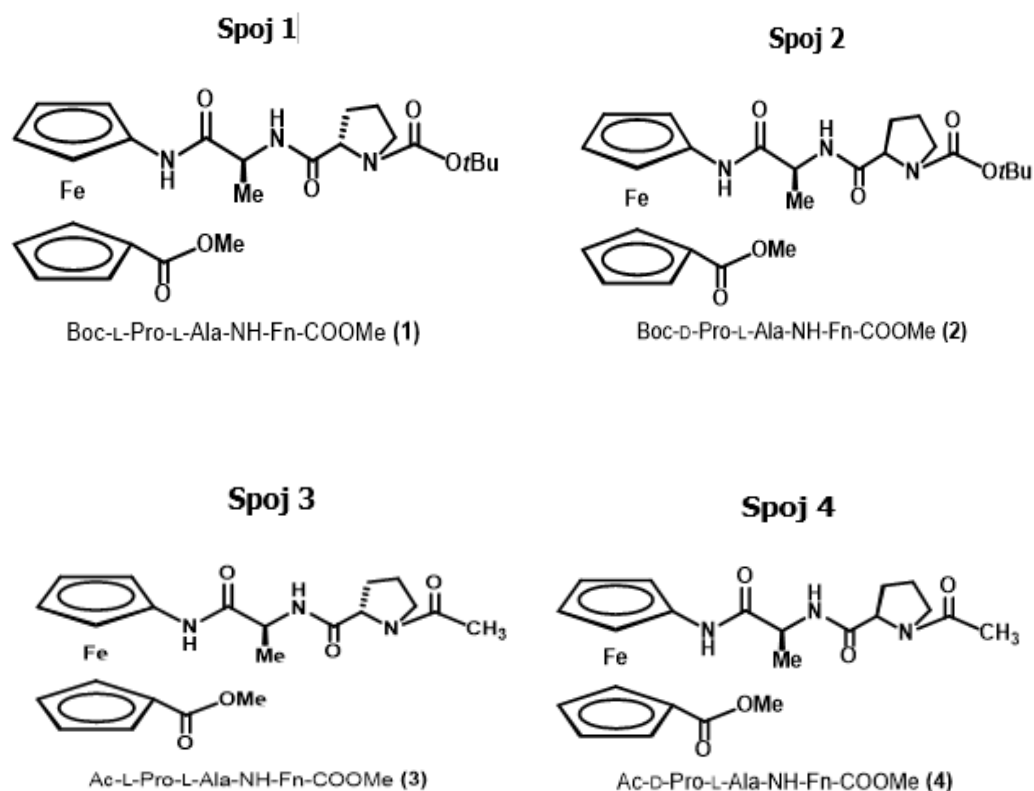
Primjenom više različitih metoda se, osim informacije o bazalnoj citotoksičnosti ispitivane tvari, može dobiti ideja mogućem mehanizmu toksičnosti zato što se metode temelje na različitim principima. Također, korištenje različitih staničnih linija može ukazati na ciljne stanice za ispitivanu tvar (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Američki nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) je 1990.g. predložio primjenu takozvanog primarnog *in vitro* testa koji uključuje 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija. Spojevi zanimljivi kao potencijalni antitumorski lijekovi testiraju se u definiranom rasponu koncentracija kako bi se utvrdio relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnost za svaku liniju stanica (Kovačević i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Peptidomimetici

U ovom diplomskom radu provedena je biološka evaluacija četiri peptidomimetika, konjugata 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline i dipeptida Pro-Ala, sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu (Slika 3). Pripravljene biokonjugate razlikuju se u kiralnosti peptidne sekvence (homokiralni peptidi **1** i **3** te heterokiralni peptidi **2** i **4**), kao i u voluminoznosti i lipofilnosti terminalne zaštitne skupine (lipofilniji, Boc-zaštićeni peptidi **1** i **2** te polarniji, Ac-zaštićeni peptidi **3** i **4**).



Slika 3. Kemijska struktura ispitivanih ferocenskih peptidomimetika.

3.1.2. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Tripin-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, SADMuse™ Annexin V & Dead Cell Kit, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Fluorescein diacetat (FDA), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Propidijev jodid (PI), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4):

- | | |
|------------------------------------|------------|
| • NaCl | 8,0 g |
| • KCl | 0,2 g |
| • Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| • KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| • Destilirana voda | do 1000 mL |

Otopina tripan plavo (0,4 %):

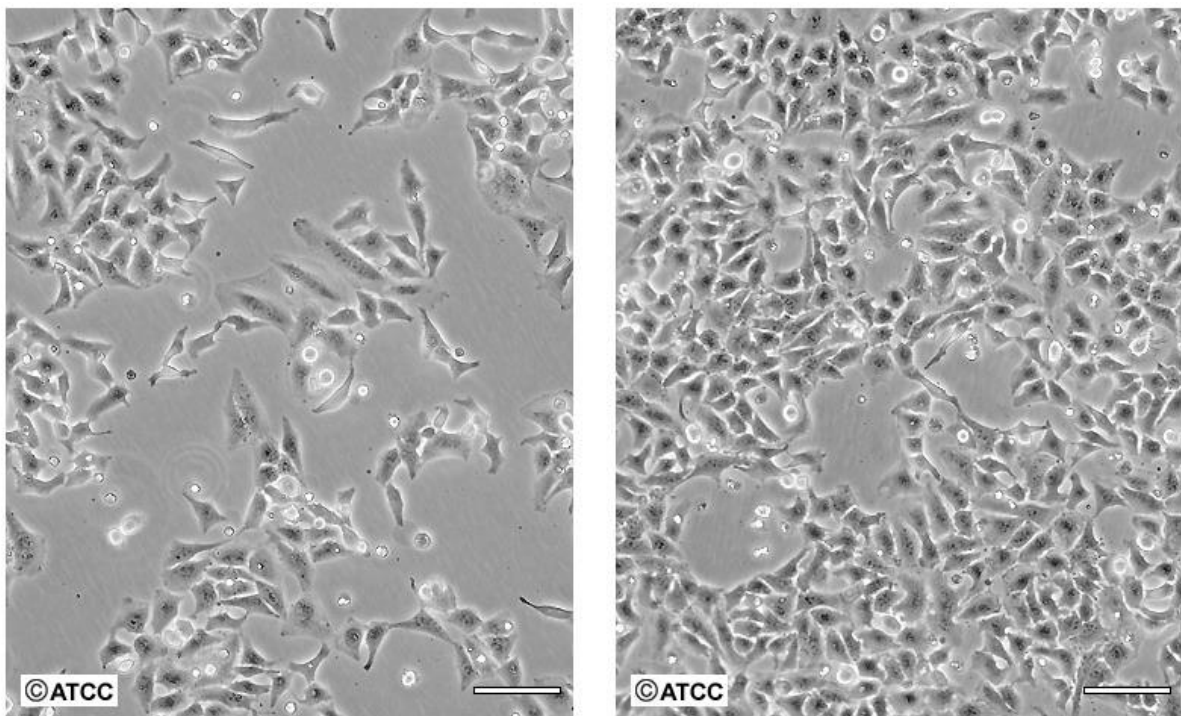
- | | |
|---------------------|----------|
| • Boja tripan plavo | 0,04 g |
| • PBS pufer | do 10 mL |

FDA/PI otopina za bojanje

- FDA (5 mg mL⁻¹) 8 µL
- PI (2 mg mL⁻¹) 50 µL
- Medij za uzgoj stanica bez FBS 5 mL

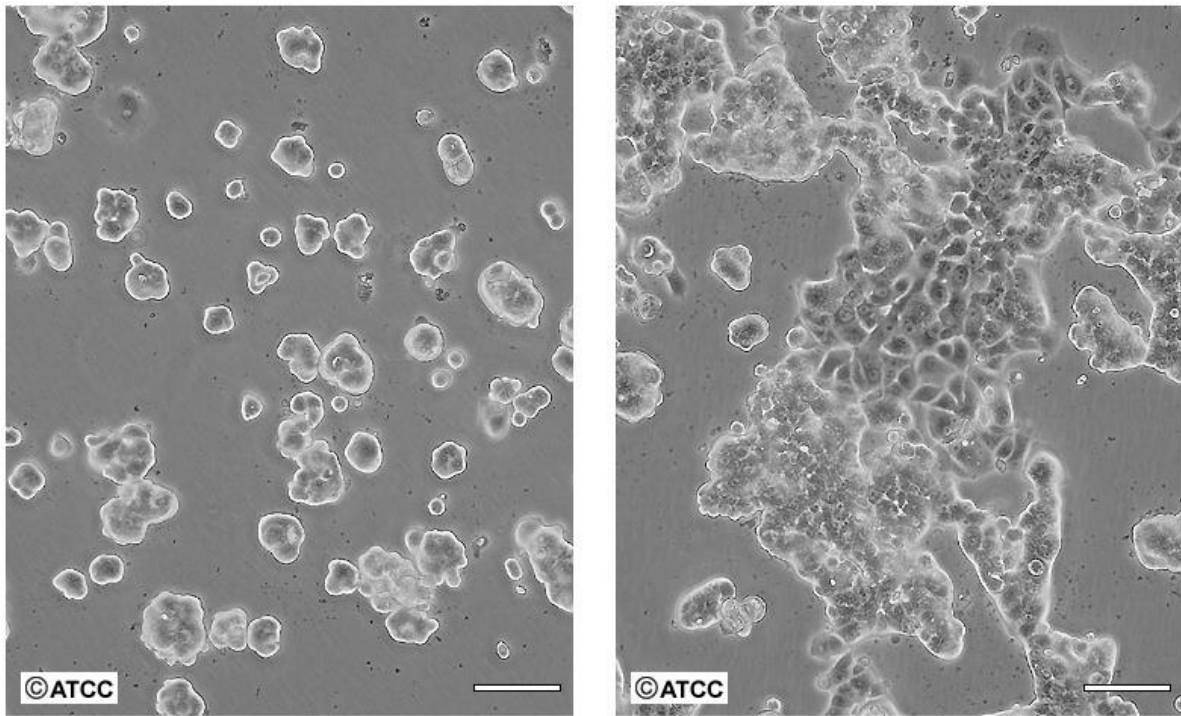
3.1.4. Humane stanične linije

U ovom istraživanju korištene su dvije tumorske humane stanične linije HeLa i MCF-7, koje su dobivene iz ATCC banke stanica. Stanična linija Hela (Slika 4) potječe od karcinoma cerviksa pacijentice Henriette Lacks, po kojoj je i dobila ime. HeLa je prva stanična linija koja je uspješno uzgojena u laboratoriju te predstavlja najčešće korištenu staničnu liniju u biološkim istraživanjima, zaslužnu za brojna dostignuća u biomedicini. Primjerice, Jonas Salk je 1954. godine koristio staničnu liniju Hela za razvoj polio cjepiva koje je indicirano za prevenciju paralize kod novorođenčadi, djece i odraslih, primarnu imunizaciju i docjepljivanje. Također, 1980.-ih godina istraživači su je koristili za identifikaciju i izoliranje virusa humane imunodeficijencije (HIV), a posljednjih godina stanična linija Hela je kritičan korak u razvijanju omičkih tehnologija, kao što su genomika, transkriptomika i proteomika.



Slika 4. Stanična linija HeLa (Anonymous 1, 2019).

Stanična linija MCF-7 (Slika 5) prvi put je izolirana 1970. godine iz malignog pleuralnog izljeva u tkivu dojke šezdesetdevetogodišnje žene s adenokarcinomom. Uspostavljena je 1973. godine u Michigan Cancer Foundation-7 institutu u Detroitu, po kojem je i dobila ime. Stanice MCF-7 su korisne u *in vitro* istraživanjima karcinoma dojke jer imaju nekoliko obilježja koja su karakteristična za epitel dojke. Jedno od tih obilježja je mogućnost pretvaranja estrogena u estradiol preko estrogenskih receptora u citoplazmi stanice.



Slika 5. Stanična linija MCF-7 (Anonymous 2, 2019).

3.1.5. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- T-boce od 25 cm², Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska

- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, Eppice)
- Muse™ Cell Analyzer, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Fluorescentni mikroskop „EVOS FLoid Cell Imaging Station“, Thermofisher, SAD

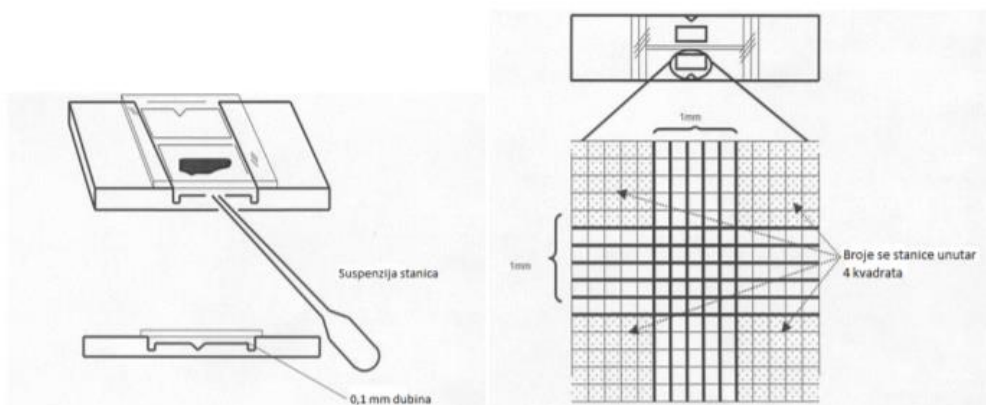
3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice se uzgajaju u DMEM mediju uz dodatak 10 % (v/v) FBS-a u plastičnim T-bocama ravnih stjenki ili u Petrijevim zdjelicama za održavanje biomase stanica te u pločama s jažicama, u kojima su postavljeni pojedinačni pokusi i u kojima je provedeno ispitivanje biološke aktivnosti ferocenskih peptidomimetika. Uzgoj stanica provodi se u kontroliranim uvjetima u inkubatoru s atmosferom koja se sastoji od 95 % zraka i 5 % CO₂ na temperaturi od 37 °C.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Tripan-plavo je boja koja se dodaje stanicama kako bi se omogućilo razlikovanje mrtvih stanica, koje se oboje plavo, od živih stanica, koje ostaju nebojene i svjetlije. Da bi se stanice pripremile za brojanje, najprije se ukloni hranjivi medij i potom se doda potreban volumen otopine tripsina, koji odvaja stanice od podloge. Stanice se vrate natrag u inkubator na oko 5 minuta kako bi tripsin djelovao, a povremeno se pod inverznim mikroskopom pogleda jesu li se stanice zaokružile, što ukazuje na to da su se odvojile od površine. Nakon toga, dodaje se određeni volumen medija sa serumom, koji je jednak volumenu tripsina, kako bi se zaustavilo njegovo daljnje djelovanje na stanice. Stanice se resuspendiraju te se uzme 20 µL alikvota suspenzije stanica i pomiješa s 20 µL boje tripan-plavo. Na kraju se s 20 µL tako pripremljene suspenzije napuni Neubauer-ova komorica za brojanje, koja je podijeljena na 4 velika kvadrata, od kojih svaki sadrži 16 manjih kvadratića (Slika 6).



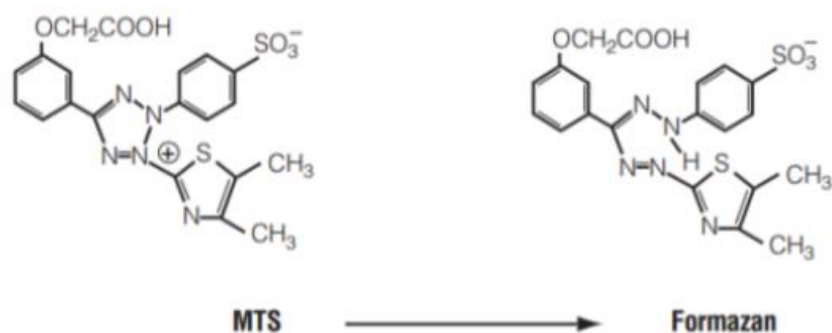
Slika 6. Neubauer-ova komorica (Anonymous 3, 2019).

Brojanje se vrši unutar četiri kvadratića, a broj stanica po mL suspenzije se izračuna iz izraza:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj izbrojenih stanica u 4 kvadratića} \times 5000 \quad (1)$$

3.2.3. Tretman stanica ispitivanim peptidomimeticima i određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Za određivanje preživljenja stanica je korišten je MTS test, odnosno The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, kolorimetrijska metoda za određivanje broja živih stanica u testovima citotoksičnosti i proliferacije. Navedeni reagens sadrži tetrazolijevu sol 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolij (MTS/Owenov reagens) i fenazin etosulfat (PES), koji je izrazito kemijski stabilan, što omogućuje njegovo miješanje s MTS-om i formiranje stabilne otopine. MTS sol se u stanicama reducira u obojeni produkt, formazan, koji je topljiv u staničnom mediju (Slika 7). Pretvorba MTS-a u formazan se odvija u metabolički aktivnim stanicama pomoću enzima dehidrogenaze, pri čemu dolazi do oksidacije koenzima NADPH ili NADH u NADP⁺ ili NAD⁺.



Slika 7. Struktura tetrazolijeve soli, MTS-a i i njenog produkta, formazana (Anonymous 4, 2019).

Stanice Hela i MCF-7, koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, se tripsiniziraju i nacijepe u ploče s 96 jažica te se stave u inkubator na 37 °C. Nakon 24 sata, kada se stanice prihvate za podlogu za rast i nastave proliferirati, dodaju se ispitivani ferocenski peptidomimetici u koncentracijama 10 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM i 500 μM. Nakon 72 sata tretmana stanica ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima, medij s ispitivanom tvari se ukloni te se u svaku jažicu doda 100 μL svježeg medija s MTS reagensom (10% v/v). Zatim slijedi inkubacija stanica u inkubatoru naredna 3 do 4 sata, ovisno o tipu stanica. Potom se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri valnoj duljini od 490 nm u odnosu na slijepu probu mjeri intenzitet razvijene boje. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u jažici jer je količina nastalog formazana proporcionalna broju živih stanica u kulturi.

Dobiveni rezultat izražava se kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane kontrolne stanice prema izrazu:

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

3.2.4. Određivanje apoptoze uporabom fluorescentne mikroskopije i bojanja stanica fluorescein diacetatom i propidijevim jodidom

U ploče s jažicama nacijepljeno je oko 3×10^4 HeLa stanica mL⁻¹, a 24 sata nakon nacijepljivanja stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivanog peptidomimetika. Kvalitativna analiza stanica provedena je 72 sata nakon tretmana bojanjem fluorescein diacetatom (FDA) i propidijevim jodidom (PI). Korištenje boja FDA i PI omogućuje razlikovanje živih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica u uzorku. Fluorescein diacetat je nenabijena fluorescentna boja koja može proći kroz membranu stanica, a unutar stanice ju

esterificiraju esteraze. Hidrolizom FDA nastaje fluorescein, koji fluorescira zeleno i koji zbog svoje polarnosti više ne može izaći iz žive stanice, dok iz nekrotične i/ili apoptotične (mrtve) stanice može izaći. S druge strane, propidij jodid je polarna boja koja može nesmetano ulaziti i izlaziti iz stanice koja je izgubila cjelovitost stanične membrane. Pri ulasku u stanicu PI se veže na DNA ili dvolančanu RNA te fluorescira crveno (Ambriović Ristov, 2007). Navedena metoda bojanja s FDA/PI može se koristiti za kvantifikaciju stanične smrti, iako se češće koristi kvalitativno, odnosno samo za vizualizaciju ima li ili nema stanične smrti u uzorku. Protokol bojenja primjenjiv je na adherentne stanice, suspenzijske stanice, pojedinačne stanice ugrađene u ekstracelularni matriks i 3D stanične strukture, kao na primjer višestanične sferoide (Anonymous 5, 2019). Ovisno o tipu stanica, protokol se može razlikovati u samoj pripremi stanica za bojanje.

U ovom radu bojane su adherentne stanice HeLa, kojima je nakon 72-satnog tretmana ispitivanim peptidomimeticima uklonjen medij za uzgoj stanica te su stanice 2 x isprane PBS puferom. Nakon toga, na stanice je dodana otopina za bojanje u dovoljnom volumenu za pokrivanje površine na kojoj stanice rastu te je provedena inkubacija 4-5 minuta na sobnoj temperaturi u tami. Potom je uklonjena otopina za bojanje, a uzorak je ispran PBS puferom. Nakon toga se na stanice doda PBS ili svježi medij bez seruma te je uzorak spreman za analizu na fluorescentnom mikroskopu. Analiza je provedena na fluorescentnom mikroskopu EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermofisher) u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

3.2.5. Protočna citometrija

Prilikom *in vitro* ispitivanja učinka neke novosintetizirane kemikalije primjenom kultura životinjskih stanica, zapažena citotoksičnost, odnosno inhibicija rasta, je najčešće posljedica učinka te tvari na dva osnovna stanična procesa:

- Staničnu diobu (mitozu)
- Staničnu smrt (odumiranje stanica nekim od mehanizama stanične smrti).

Oba procesa mogu se pratiti primjenom protočne citometrije, koja omogućuje analizu velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu, a razlikovanje stanica je moguće provesti na temelju izgleda i volumena, odnosno veličine stanica te specifičnog obilježavanja fluorescentnim

tvarima-bojama. Protočna citometrija je objektivna, osjetljiva, brza, točna i kvantitativna metoda koja omogućuje analizu velikog broja stanica i staničnih svojstava po uzorku. Najčešće se može analizirati 5000-10000 događaja, odnosno stanica po uzorku.

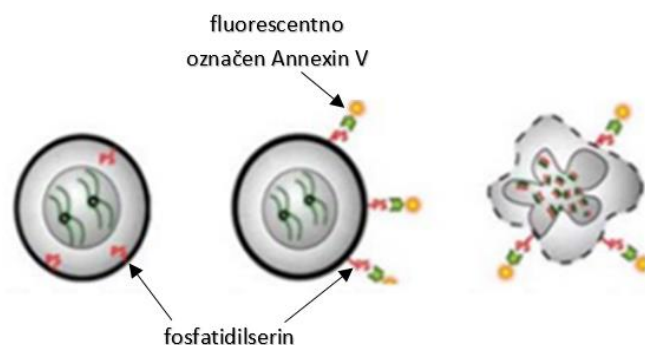
U ovom radu korišten je Muse™ analizator staničnog zdravlja („mini” protočni citometar) tvrtke Merck Millipore, koji omogućuje praćenje broja i preživljenja stanica, stanične proliferacije, stanične diobe, apoptoze, oksidativnog stresa te kvantifikaciju podataka na nivou pojedinačne stanice, a jednostavno i brzo mjerenje temelji se na analizi 3 parametra uz primjenu optimiranih kitova, razvijenih od strane istog proizvođača.

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

Pomoću Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a i "mini" protočnog citometra provedena je kvantitativna analiza živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica. Rezultati su izraženi kao:

- Koncentracija (stanica mL⁻¹) živih, stanica u ranoj, kasnoj ili ukupnoj apoptozi te mrtvih stanica
- Postotak živih, stanica u ranoj, kasnoj ili ukupnoj apoptozi te mrtvih stanica.

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagens sadrži Annexin V – protein ovisan o kalciju, koji ima visoki afinitet za vezanje na fosfatidilserin (PS), koji se u zdravim stanicama nalazi na unutarnjoj strani membrane stanice. U ranoj fazi apoptoze molekule fosfatidilserina se translociraju na vanjsku stranu stanične membrane, gdje se Annexin V veže na njih. 7-ADD (7-aminoaktinomicin) je sastojak Muse™ Annexin V & Dead Cell reagensa, koji služi kao marker za mrtve stanice i pokazatelj je integriteta stanične membrane. To je fluorescentni interkalator koji ima spektralni pomak nakon vezanja na DNA. Kompleks 7-AAD/DNA pobuđuje energija pri 488 nm, dok mu je maksimum emisije pri 647 nm, što se primjenjuje pri analizi uzoraka fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom. 7-AAD se uglavnom učinkovito izlučuje iz živih stanica, ali se može koristiti za obilježavanje stanica koje imaju oštećenu staničnu membranu ili su prethodno fiksirane i permeabilizirane. Neće obilježiti žive, zdrave stanice te one u ranoj apoptozi. Budući da je jedna od prvih promjena u ranoj apoptozi premještanje PS s unutarnje na vanjsku stranu membrane (Slika 8), ova metoda omogućuje raniju detekciju apoptoze nego metode kojima se određuje fragmentacija DNA ili aktivacija kaspaza.



Slika 8. Premještanje PS s unutarnje na vanjsku stranu membrane (Anonymous 6, 2019).

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 (-)
- kasna faza apoptoze i mrtve stanice: annexin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: annexin V (-) i 7-AAD (+).

Konkretno, medij u kojem su kultivirane adherentne stanice prvo se sakupi te se na monosloj stanica doda odgovarajuća količina tripsina da bi se stanice odvojile od podloge. Zatim se tripsinizirane stanice pripoje sakupljenom mediju i nakon toga se uzme alikvot stanica (20 μL) za određivanje broja stanica u uzorku. Potom slijedi centrifugiranje na 300xg. Supernatant se baci, a stanice se resuspendiraju u odgovarajućem volumenu DMEM-a s minimalno 1% FBS-a da bi konačna koncentracija stanica bila $1-5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Reagens se čuva u hladnjaku (+4 °C), a prije korištenja je potrebno u čistu Eppicu uzeti potreban alikvot – 100 μL po uzorku i staviti na sobnu temperaturu da se temperira. 100 μL reagensa i 100 μL tako pripremljene suspenzije stanica čine reakcijsku smjesu, koju je potom potrebno zamotati folijom i inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićenu od svjetla. Prije mjerenja na Muse™ uređaju potrebno je svaki uzorak lagano resuspendirati kako agregirane stanice ne bi začepile cjevčice. Parametri analize se postavljaju s negativnom i pozitivnom kontrolom. Zatim slijedi analiza pojedinačnih uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

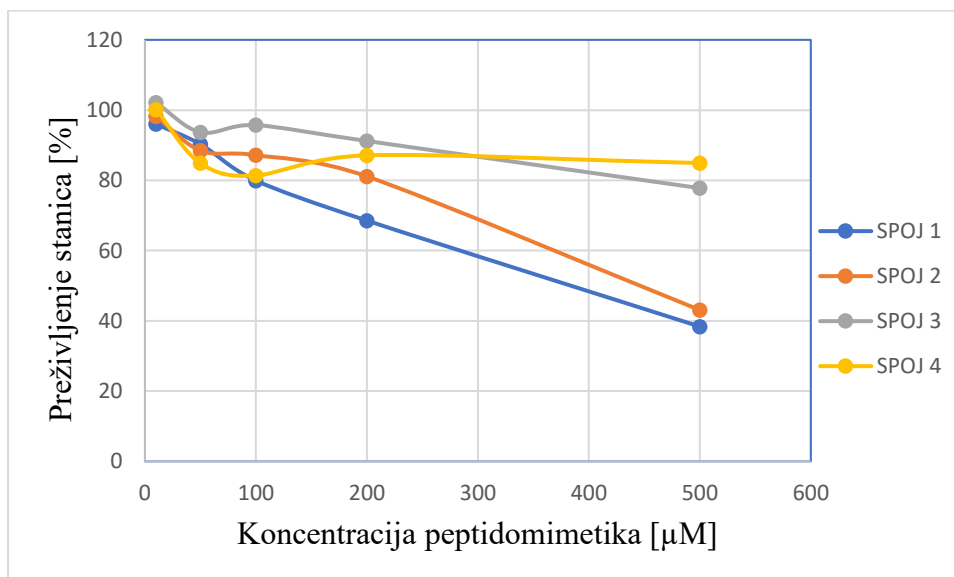
Tumor ili neoplazma je bolest koja nastaje kao posljedica nekontrolirane proliferacije bilo koje vrste stanica u organizmu pa tako danas postoji više od 100 različitih vrsta tumora. Od tumora godišnje umire 7 milijuna ljudi, a prognozira se da će se do 2020. godine broj smrtnih slučajeva popeti na 16 milijuna (Rajguru i sur. 2019). Danas je Republika Hrvatska, s udjelom smrtnih slučajeva uzrokovanih tumorima od 27,9 %, svrstana na visoko deseto mjesto na svijetu i drugo mjesto u Europskoj Uniji po broju smrtnih slučajeva uzrokovanih različitim vrstama tumora.

Stoga, trenutno u svijetu postoji ogromna potreba za što bržim razvojem novih potencijalnih antitumorskih lijekova, pri čemu su veliku pozornost izazvali peptidomimetici, koji imaju veliki potencijal u liječenju različitih vrsta tumora zbog svoje visoke potentnosti i specifičnosti protiv malignih stanica (Méndez-Samperio, 2014) te je u posljednja dva desetljeća zabilježen uspjeh u primjeni peptidomimetika u imunoterapiji karcinoma (Barišić, 2018). Razvoj novih peptidomimetika danas je usmjeren prema otkrivanju njihovih drugih mogućih primjena te sintezi novih spojeva s poboljšanim biološkim svojstvima (Kovačević i sur., 2014).

Znanstvenice u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu već se dulji niz godina bave istraživanjima peptidomimetika te su u ovom radu ispitana četiri novosintetizirana ferocenska peptidomimetika, konjugata 1'- aminoferocen-1-karboksilne kiseline i dipeptida Pro-Ala. Cilj je bio ispitati utjecaj njihove kemijske strukture, kiralnosti konstitutivnih prirodnih aminokiselina te voluminoznosti i lipofilnosti *N*-terminalne zaštitne skupine na inhibiciju rasta stanica karcinoma grlića maternice (stanična linija HeLa) i stanica karcinoma dojke (stanična linija MCF-7) te odrediti mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja.

4.1. BIOLOŠKA AKTIVNOST PEPTIDOMIMETIKA NA STANIČNIM LINIJAMA HeLa i MCF-7

Prethodno uzgojene stanice HeLa i MCF-7 nacijspljene su na mikrotitarske ploče s 96 jažica kako bi se ispitao učinak četiri različita ferocenska peptidomimetika na njihov rast i proliferaciju. Tretman ispitivanim spojevima u koncentracijama 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM i 500 μM trajao je 72 sata, nakon čega je MTS metodom i primjenom čitača mikrotitarskih ploča određena vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja su izraženi grafički kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji peptidomimetika kojim su tretirane stanice i prikazani su na slikama 9 i 10.

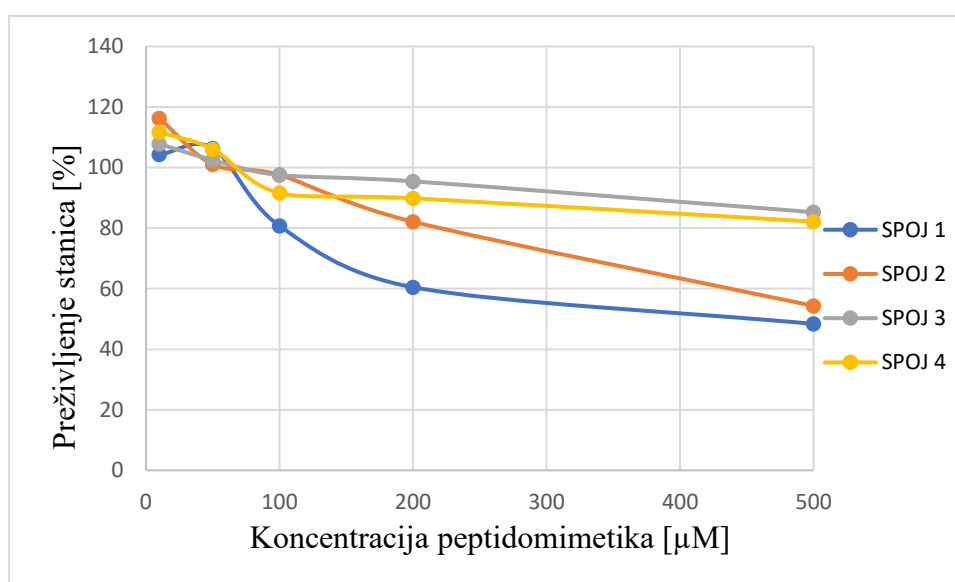


Slika 9. Utjecaj spojeva **1** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), **2** (Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), **3** (Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) i **4** (Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) u koncentracijama od 10 μM – 500 μM na preživljenje stanične linije HeLa.

Sva četiri spoja imaju inhibitorni učinak na rast stanične linije HeLa, kao što je vidljivo na slici 9. Učinak peptidomimetika na inhibiciju rasta stanica ovisi o dozi te je inhibicija rasta proporcionalna povećanju njihove koncentracije. Spoj **1** i **2** pokazuju najveći inhibitorni učinak od svih ispitivanih spojeva, gdje postotak preživljenja stanica tretiranih najvišom koncentracijom od 500 μM iznosi 38,38 % za spoj **1**, odnosno 43,09 % za spoj **2**. Spojevi **3** i **4** u koncentraciji od 10 μM ne pokazuju inhibitorni učinak na rast stanica. Tek je pri većim

koncentracijama spojeva **3** i **4** vidljiv blagi inhibitorni učinak na rast stanica, pri čemu je on to veći što je koncentracija ispitivanog spoja veća pa je tako pri najvećoj koncentraciji (500 μM) preživljenje HeLa stanica 77,79 % za spoj **3** te 84,92 % za spoj **4**.

IC_{50} vrijednost (eng. *Inhibitory concentration*) definirana je kao koncentracija ispitivanog spoja koja rezultira inhibicijom staničnog rasta od 50 %, a računa se iz jednadžbi krivulja ovisnosti preživljenja stanica o dozi testiranog spoja primjenom one krivulje koja ju najbolje opisuje ($R^2 \sim 1$). Iz grafa na Slici 9 je već vidljivo da najveću citotoksičnost naspram HeLa stanica pokazuje spoj **1**, za koji je izračunata IC_{50} vrijednost od 337,32 μM . IC_{50} vrijednosti za druge testirane spojeve nisu izračunate jer u ispitivanom rasponu koncentracija od 10 μM – 500 μM nije postignuta 50%-tna inhibicija staničnog rasta, stoga se njihove IC_{50} vrijednosti smatraju većima od 500 μM .



Slika 10. Utjecaj spojeva **1** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), **2** (Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), **3** (Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) i **4** (Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) u koncentracijama od 10 μM – 500 μM na preživljenje stanične linije MCF-7.

Iz grafa na slici 10 je vidljivo da sva četiri spoja imaju inhibitorni učinak na rast stanične linije MCF-7. Spoj **1** i **2** pokazuju najveći inhibitorni učinak od svih ispitivanih spojeva, gdje postotak preživljenja stanica tretiranih najvišom koncentracijom od 500 μM iznosi 48,37 % za spoj **1**, odnosno 54,33 % za spoj **2**. Nijedan od ispitivanih spojeva u koncentracijama od 10 μM i 50 μM ne pokazuje inhibitorni učinak na rast stanica MCF-7. Kod spojeva **3** i **4** vidljiv je blagi

inhibitorni učinak na rast stanica u koncentracijama od 100 μM do 500 μM , pri čemu je on to veći što je koncentracija ispitivanog spoja veća pa je tako pri najvećoj koncentraciji (500 μM) preživljenje stanica MCF-7 85,26 % za spoj **3** te 82,15 % za spoj **4**.

Iz grafa na slici 10 je vidljivo da najveću citotoksičnost naspram MCF-7 stanica pokazuje spoj **1**, za koji je izračunata IC_{50} vrijednost od 270,69 μM . IC_{50} vrijednosti za druge testirane spojeve nisu izračunate jer u ispitivanom rasponu koncentracija od 10 μM do 500 μM nije postignuta 50%-tna inhibicija staničnog rasta, stoga se njihove IC_{50} vrijednosti smatraju većima od 500 μM .

U radu Kovačević i sur. (2014) ispitana je biološka aktivnost četiri peptidomimetika građena iz ferocenske aminokiseline i prolina određivanjem vijabilnosti stanica HeLa i MCF-7 tijekom 72-satnog tretmana. Rezultati navedenog istraživanja su u skladu s rezultatima prikazanim u ovom diplomskom radu. Izračunate IC_{50} vrijednosti za HeLa stanice su u rasponu od 203,27 μM do 474,99 μM , što je u istom rangu kao i za ispitane spojeve u ovom radu. Najveći antiproliferativni učinak na rast stanične linije HeLa ima spoj s najmanjom IC_{50} vrijednošću (203,27 μM), što je strukturno gledano neočekivan rezultat, budući da je taj peptid stabiliziran najslabijim IHB-om u odnosu na ostala tri ispitana spoja u radu Kovačević i sur. (2014). Međutim, imajući u vidu da je polarnost ili lipofilnost spoja preduvjet za uspješnu farmaceutsku primjenu, takav rezultat je objašnjen većom lipofilnošću upravo tog peptida.

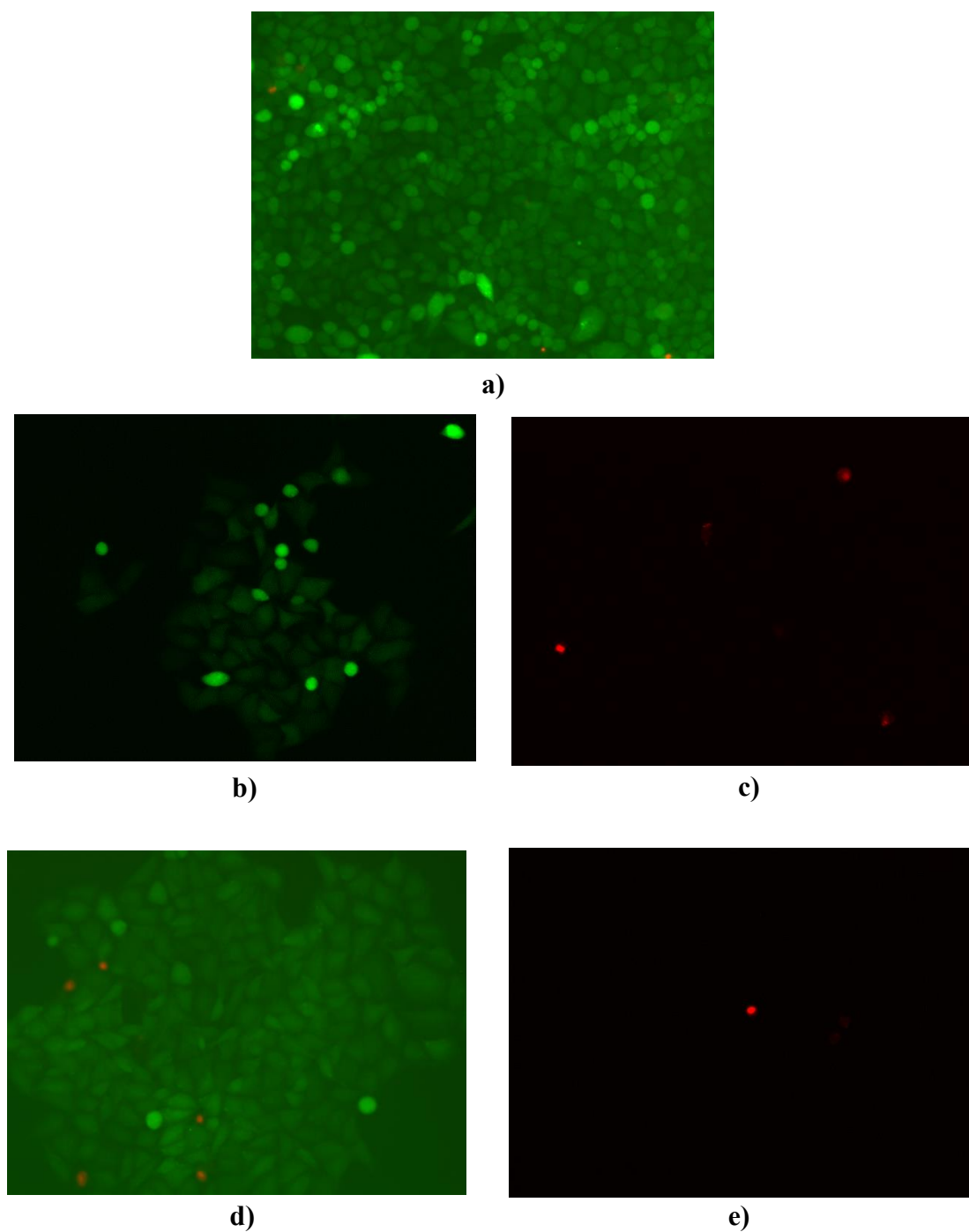
Slično je istraženo i u radu Kovač i sur. (2016), gdje je provedena biološka evaluacija ferocenskog peptidomimetika u kojem je peptidna veza modificirana oksalamidnom podjedinicom. Ispitivanje je provedeno na tri stanične linije: HEK293T, HeLa i HepG2, a najveća citotoksičnost zabilježena je na tumorskim stanicama HeLa (IC_{50} vrijednost = 252,79 μM). Navedeni peptidomimetik je istovremeno stimulirao rast normalne stanične linije HEK293T i inhibirao rast tumorskih stanica *in vitro*, što ide u prilog njegovoj mogućoj primjeni kao antitumorskog agensa. Također, u radu Kovač i suradnici (2016) prvi put je zapažen dvojak učinak peptidomimetika, tzv. hormetički efekt, koji opisuje povoljni učinak niskih koncentracija ispitivane tvari i inhibitorni učinak viših koncentracija.

Nadalje, izračunata IC_{50} vrijednost za spoj **1** od 337,32 μM za stanice HeLa, odnosno 270,69 μM za stanice MCF-7 relativno je visoka u usporedbi s referentnim lijekovima s dobro poznatom antitumorskom aktivnošću, kao što su doksorubicin i cisplatin. Prema literaturi, IC_{50} vrijednosti za doksorubicin i cisplatin određene na različitim humanim tumorskim staničnim linijama variraju uglavnom od 0,1 μM do 15 μM , ovisno o tipu stanice. Prema tome, spoj **1**, koji je ovdje pokazao najjači učinak na inhibiciju rasta dviju tumorskih staničnih linija, zapravo ima slab antitumorski potencijal te se ne može na temelju preliminarnog *in vitro* ispitivanja

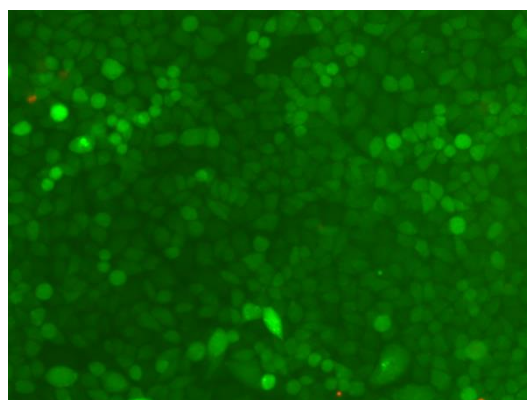
smatrati kandidatom za antitumorski lijek. Međutim, dobiveni su rezultati vrijedni kao smjernica za sintezu novih, sličnih analoga s poboljšanim biološkim svojstvima.

4.2. MORFOLOŠKE PROMJENE STANICA HeLa NAKON TRETMANA FEROCENSKIM PEPTIDOMIMETICIMA

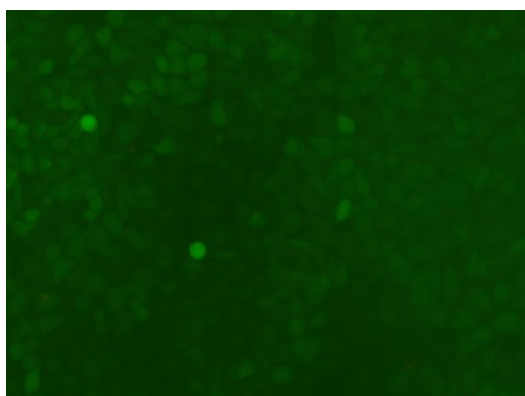
Prilikom tretmana stanica biokonjugatima **1-4** u svrhu ispitivanja citotoksičnosti često su mikroskopski vidljive morfološke promjene u izgledu stanica. Inače je izgled stanica potrebno svakodnevno pratiti pod svjetlosnim mikroskopom. Da bi uočene promjene bile bolje vidljive, stanice se mogu obojati. Zapažena citotoksičnost ispitivanih peptidomimetika može biti rezultat njihovog djelovanja na dva osnovna stanična procesa: staničnu diobu i/ili staničnu smrt. Budući da je programirana stanična smrt procesom apoptoze prvotno definirana na osnovi morfoloških karakteristika, često se identifikacija apoptotičnih stanica zasniva upravo na toj činjenici. Stoga su stanice HeLa naciijepljene u ploču s 12 jažica i tretirane 72 sata ispitivanim peptidomimeticima **1-4** u koncentracijama 100 μM i 500 μM . Nakon tretmana, stanice su obojene fluorescentnim bojama - fluorescein diacetatom (FDA) i propidijevim jodidom (PI) te pregledane i fotografirane pod fluorescentnim mikroskopom. Na slikama 11 i 12 prikazan je morfološki izgled i gustoća kontrolnih (netretiranih) stanica HeLa te stanica HeLa tretiranih ispitivanim peptidomimeticima.



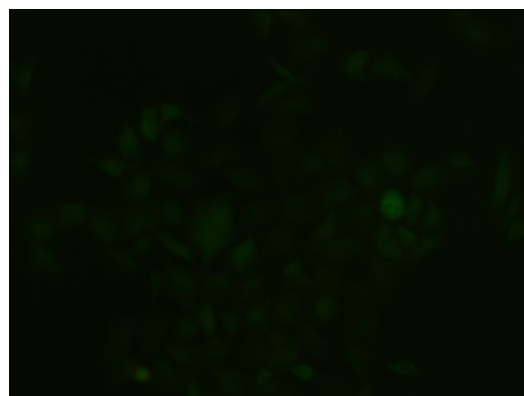
Slika 11. Stanice HeLa tretirane spojevima **1** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) i **2** (Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), obojane fluorescein diacetatom i propidijevim jodidom te slikane fluorescentnim mikroskopom: a) kontrolne, netretirane stanice; b) stanice tretirane spojem **1** u koncentraciji 100 μM ; c) stanice tretirane spojem **1** u koncentraciji 500 μM ; d) stanice tretirane spojem **2** u koncentraciji 100 μM ; e) stanice tretirane spojem **2** u koncentraciji 500 μM .



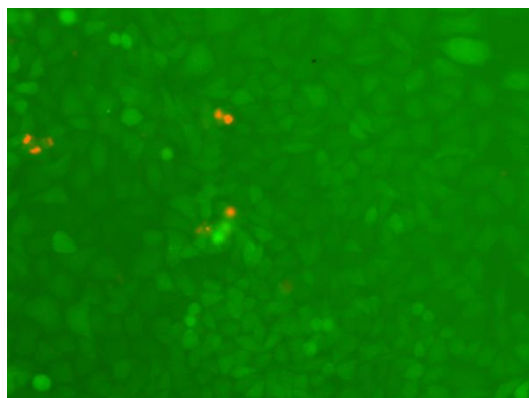
a)



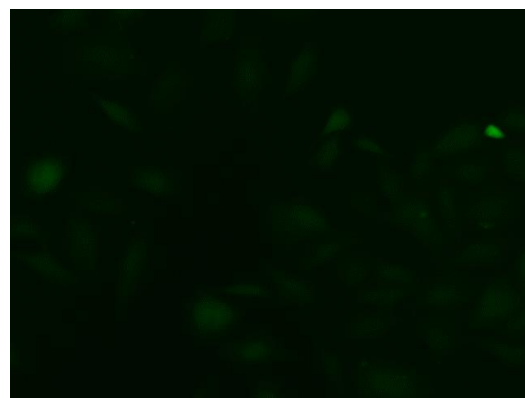
b)



c)



d)



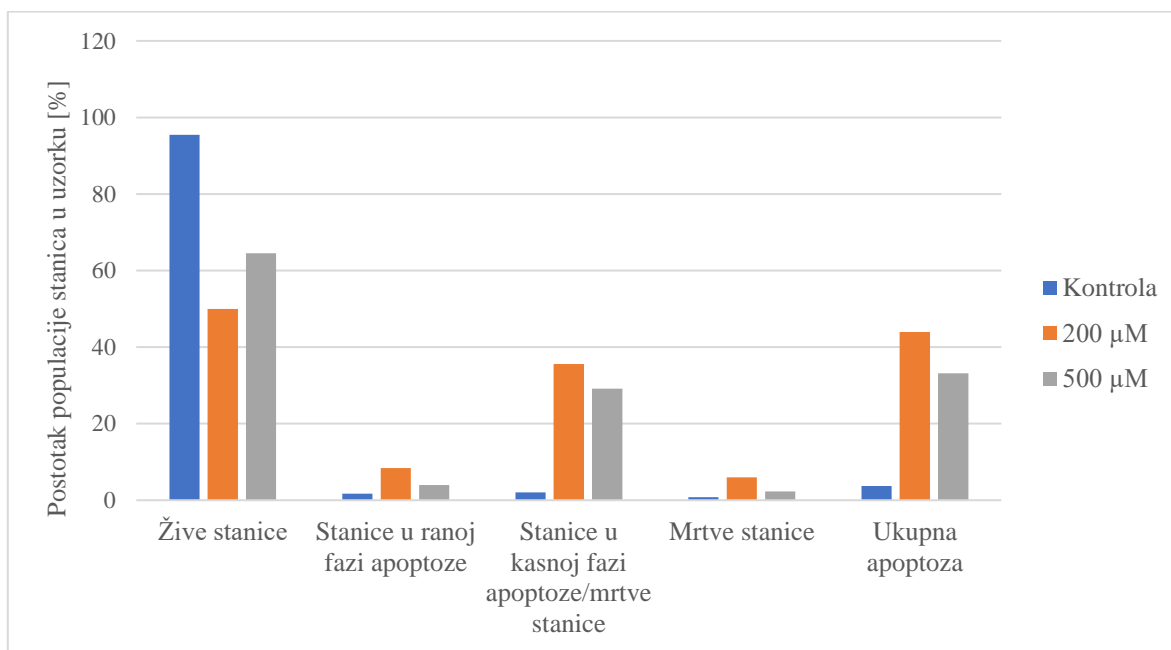
e)

Slika 12. Stanice HeLa tretirane spojevima **3** (Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe) i **4** (Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe), obojane fluorescein diacetatom i propidijevim jodidom te slikane fluorescentnim mikroskopom: a) kontrolne, netretirane stanice; b) stanice tretirane spojem **3** u koncentraciji 100 μM ; c) stanice tretirane spojem **3** u koncentraciji 500 μM ; d) stanice tretirane spojem **4** u koncentraciji 100 μM ; e) stanice tretirane spojem **4** u koncentraciji 500 μM .

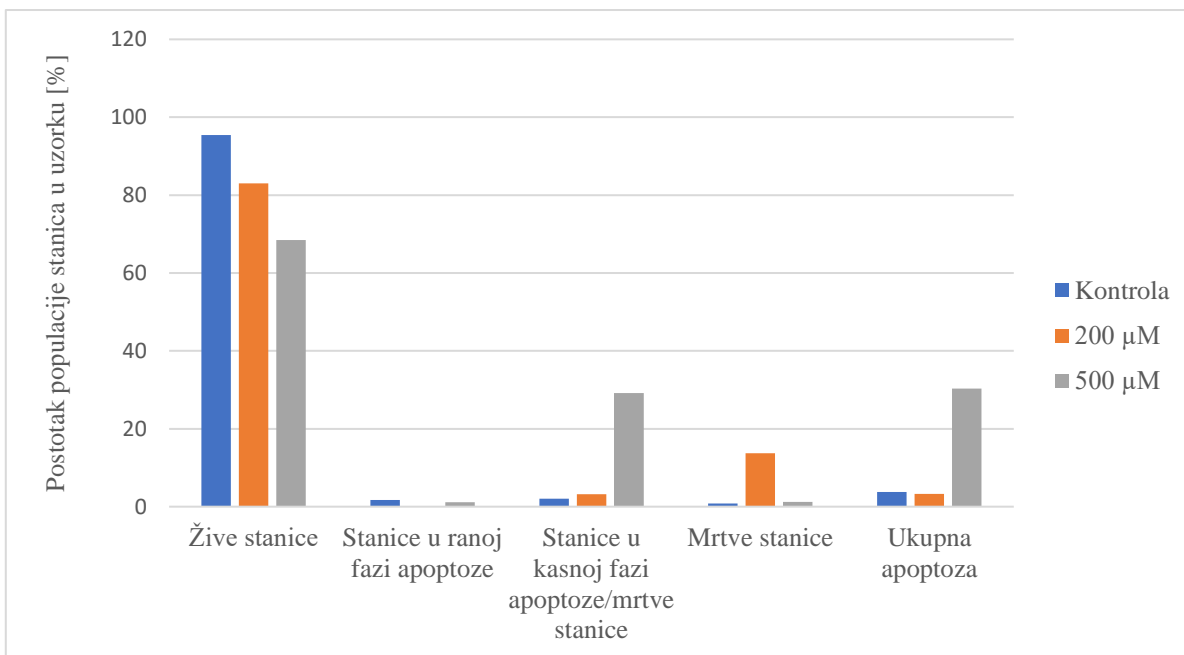
Na slikama 11 i 12 je vidljiva razlika u gustoći monosloja stanica između kontrolnih, netretiranih stanica i stanica tretiranih ispitivanim peptidomimeticima u koncentracijama od 100 μM i 500 μM . Kontrolne stanice formiraju pravilni monosloj, veće su gustoće i karakteristične morfologije, što se može vidjeti na slikama 11. a) i 12. a). Gustoća monosloja stanica tretiranih peptidomimeticima je to manja, što su stanice tretirane većom koncentracijom peptidomimetika. Prema MTS testu citotoksičnosti, najjači inhibitorni učinak na rast stanica imaju spojevi **1** i **2**, što je potvrđeno slikanjem stanica pod fluorescentnim mikroskopom. Korištenje boja FDA i PI omogućuje razlikovanje živih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica u uzorku. Fluorescein diacetat je nenabijena fluorescentna boja koja može proći kroz membranu stanica, a unutar stanice ju esterificiraju esteraze. Hidrolizom FDA nastaje fluorescein, koji fluorescira zeleno i koji zbog svoje polarnosti više ne može izaći iz žive stanice, dok iz nekrotične i/ili apoptotične (mrtve) stanice može izaći. S druge strane, propidij jodid je polarna boja koja može nesmetano ulaziti i izlaziti iz stanice koja je izgubila cjelovitost stanične membrane. Pri ulasku u stanicu, PI se veže na DNA ili dvolančanu RNA te fluorescira crveno. Navedena metoda bojanja s FDA/PI može se koristiti za kvantifikaciju stanične smrti, iako se češće koristi samo kvalitativno, odnosno samo za vizualizaciju ima li ili nema stanične smrti u uzorku. U uzorku stanica tretiranih spojem **1** od 100 μM (Slika 11. b)) još uvijek ima živih, zeleno obojanih stanica, dok su stanice koje su tretirane većom koncentracijom od 500 μM spoja **1** crveno obojane i vjerojatno u apoptozi (Slika 11. c)). Što se tiče tretmana stanica spojem **2**, određeni broj apoptotičnih stanica je vidljiv već i pri tretmanu nižom koncentracijom od 100 μM (Slika 11. d)). Na slici 12 prikazani su uzorci tretirani spojevima **3** i **4**, koji imaju manji inhibitorni učinak nego spojevi **1** i **2**. Više je živih, zeleno obojanih stanica, iako je na slici 12. d) vidljiva i pokoja crvena, mrtva stanica nakon tretmana spojem **4** u koncentraciji od 100 μM . Za potvrdu uočenih morfoloških promjena koje ukazuju na indukciju stanične smrti prilikom tretmana ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima te za kvantifikaciju stanične smrti, korištena je protočna citometrija, odnosno MuseTM analizator staničnog zdravlja.

4.3. ODREĐIVANJE MEHANIZMA CITOTOKSIČNOG DJELOVANJA PEPTIDOMIMETIKA PROTOČNOM CITOMETRIJOM

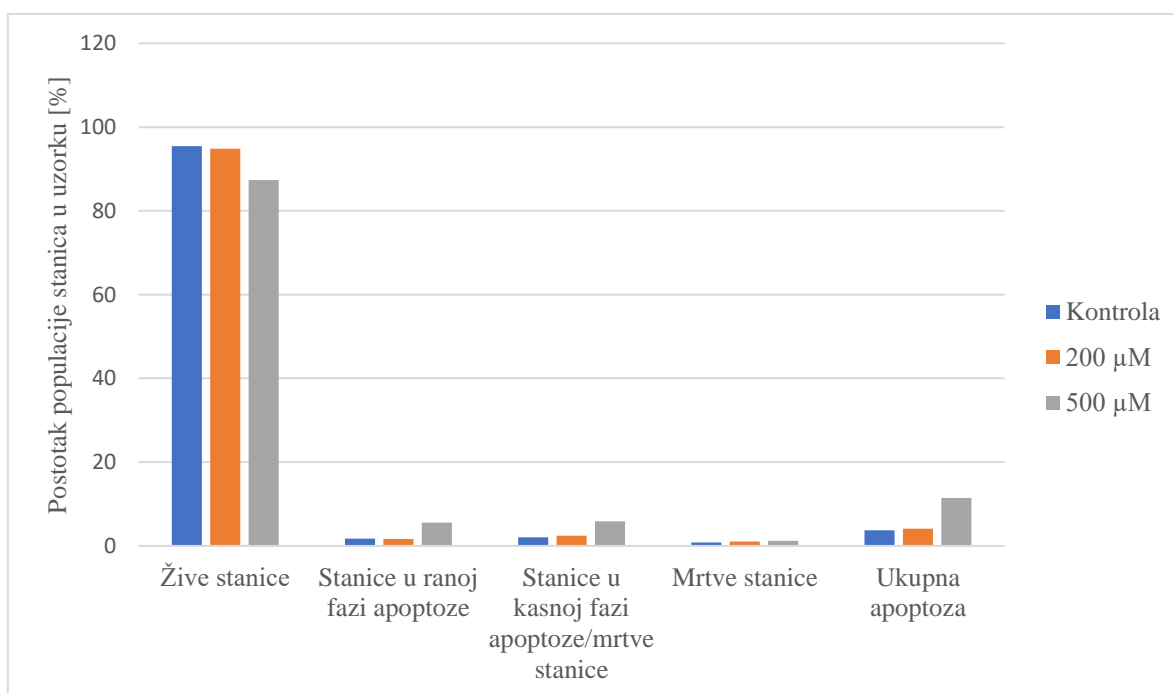
Nepisano je pravilo da se u znanstveno-istraživačkom radu prisutnost apoptoze dokazuje primjenom najmanje dvije do tri metode kako bi se izbjegle moguće metodološke greške, stoga je i u ovom radu korištena još jedna metoda. Jedna od najraširenijih metoda za detekciju apoptoze je obilježavanje apoptotičnih stanica Annexin-V proteinom, koji se specifično i reverzibilno veže za fosfatidilserin (PS). PS je lipid koji se normalno nalazi u unutarnjem sloju plazmine membrane, no, kod stanica koje su u procesu apoptoze, PS se translocira na vanjsku stranu plazmine membrane. Rekombinantni protein Annexin-V konjugiran s nekim markerom za detekciju, npr. nekom fluorescentnom bojom, primjenjuje se za utvrđivanje „vanjskog“ PS-a u apoptotičnim stanicama. U kombinaciji dvostrukog bojanja s propidijevim jodidom (PI), Annexin-V omogućuje razlikovanje živih, mrtvih i apoptotičnih stanica u uzorku primjenom protočne citometrije. U ovom radu korišten je Muse™ analizator staničnog zdravlja za kvantifikaciju živih, mrtvih te stanica HeLa u ranoj ili kasnoj apoptozi nakon tretmana ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima. Rezultati analize su prikazani na slikama 13, 14, 15 i 16 i 17.



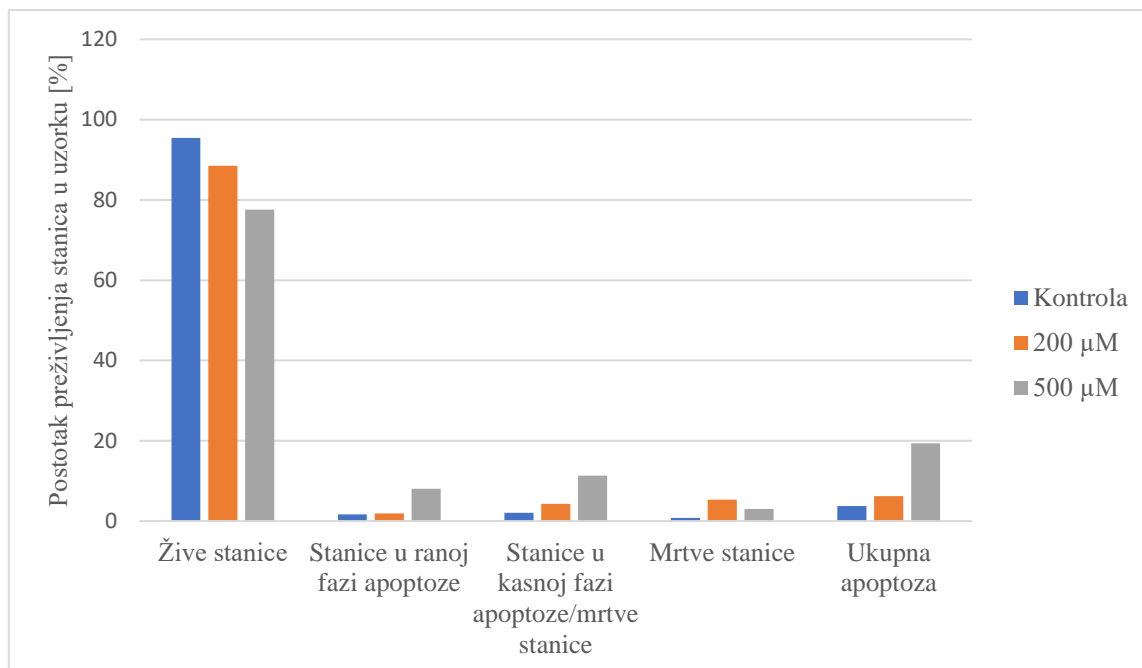
Slika 13. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasnoapoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih stanica HeLa nakon 72-satnog tretmana spojem **1** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME) u koncentraciji od 200 μM i 500 μM.



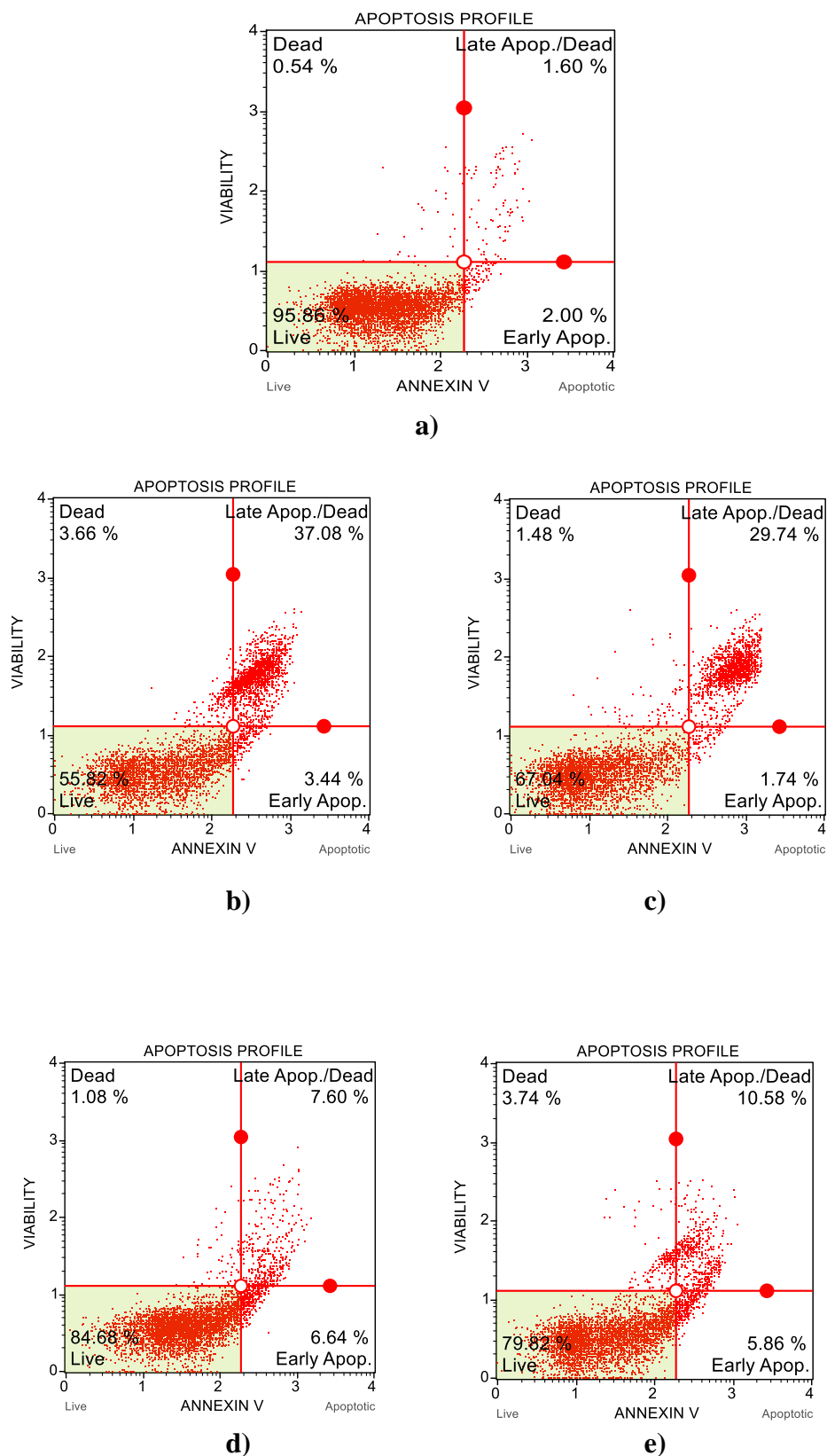
Slika 14. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasnoapoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih stanica Hela nakon 72-satnog tretmana spojem **2** (Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME) u koncentraciji od 200 µM i 500 µM.



Slika 15. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasnoapoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih stanica Hela nakon 72-satnog tretmana spojem **3** (Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME) u koncentraciji od 200 µM i 500 µM.



Slika 16. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasnoapoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih stanica HeLa nakon 72-satnog tretmana spojem **4** (Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME) u koncentraciji od 200 μM i 500 μM .



Slika 17. Reprezentativni histogrami analize tipa stanične smrti u uzorcima stanica HeLa: a) kontrolne stanice; b) stanice tretirane s 500 μM spoja **1** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME); c) stanice tretirane s 500 μM spoja **2** (Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME); d) stanice tretirane s 500 μM spoja **3** (Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME) i e) stanice tretirane s 500 μM spoja **4** (Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME).

Antitumorski peptidomimetici inhibitorno djeluju na nastanak i rast tumora, a jedan od tih inhibitornih mehanizama je poticanje, odnosno indukcija apoptoze u stanicama raka. Programirana stanična smrt je sastavni dio fiziološkog razvoja organizma i prisutna je u većini tkiva, počevši od programiranog uništavanja stanica tijekom embriogeneze. Patološka oštećenja stanica mogu biti uzrokovana različitim vanjskim i unutarnjim čimbenicima, zbog čega stanice postaju opasne i/ili nekorisne za organizam te ih se nastoji ukloniti aktiviranjem mehanizama programirane stanične smrti. Apoptoza može biti potaknuta slabljenjem ili potpunim nedostatkom signala koji su potrebni za preživljavanje stanica (citokini, faktori rasta i neki hormoni) ili zbog primanja negativnih signala iz okoline (oštećenja DNA, kemoterapeutici, lijekovi, mikotoksini i drugi DNA-reaktivni mikotoksini) (Žlender, 2003).

Kao što se može vidjeti iz priloženih grafičkih prikaza rezultata na slikama 13, 14, 15 i 16 te iz histograma na slici 17, spoj **1**, koji među sva četiri ispitana ferocenska peptidomimetika ima najjači citotoksični učinak, u najvećoj mjeri inducira apoptotičnu smrt stanica. Upravo je u tom uzorku, koji je tretiran spojem **1** u koncentraciji od 500 μM , izmjeren najveći postotak populacije ukupno apoptoznih stanica (33,19 %). Iza njega slijedi spoj **2**, s ukupnom apoptozom od 30,32 %, spoj **4**, s ukupnom apoptozom od 19,37 %, a najmanje apoptotičnih stanica je određeno u uzorku tretiranom spojem **3** u koncentraciji od 500 μM (11,45%). Povećanjem koncentracije ispitanih spojeva (200 μM vs. 500 μM) povećava se, uglavnom, i udio mrtvih stanica, što je u skladu s rezultatima citotoksičnosti, gdje je također učinak ovisan o dozi. Doduše, kod spojeva **3** i **4** ne postoji velika razlika između udjela živih stanica, rano apoptotičnih stanica, kasno apoptotičnih i mrtvih stanica između kontrolnih, netretiranih stanica i stanica tretiranih peptidomimeticima. Iz toga slijedi da spojevi **3** i **4** nisu potencijalni antitumorski reagensi, budući da nisu dovoljno jaki induktori programirane stanične smrti, a i njihove IC_{50} vrijednosti su veće od 500 μM , što je daleko više od onog što se na temelju preliminarnih *in vitro* testova smatra potencijalnim za daljnja ispitivanja antitumorskog potencijala. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom potvrdili su i u skladu su s rezultatima *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti peptidomimetika **1-4**. Spoj **1** ima najveći potencijal za poticanje apoptotične smrti stanica i najjači inhibitorni učinak na tumorske HeLa i MCF-7 stanice, dok je spoj **3** najslabiji obzirom na oba ispitana aspekta njegovog biološkog učinka.

Zaključno, rezultati prikazani u ovom radu, zajedno s rezultatima Šintiće (2019) koja je klonogenom analizom pokazala da ispitani peptidomimetici utječu na smanjenu sposobnost stanica HeLa za formiranje kolonija te da broj poraslih kolonija ovisi o ispitivanom spoju i njegovoj koncentraciji, možemo zaključiti da ferocenski peptidomimetici imaju potencijal u razvoju novih antitumorskih lijekova. Dobiveni rezultati svakako su vrijedna vodilja u budućim

istraživanjima ferocenskih peptidomimetika za sintezu novih, strukturno sličnih analoga spoju **1** s, nadamo se, poboljšanim biološkim svojstvima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitani ferocenski peptidomimetici **1-4** imaju inhibitorni učinak na rast i proliferaciju tumorskih staničnih linija HeLa i MCF-7. Njihov inhibitorni učinak ovisi o dozi te je inhibicija rasta stanica proporcionalna povećanju njihove koncentracije. Najjaču citotoksičnost na stanične linije pokazuju lipofilniji, Boc-zaštićeni peptidomimetici **1** i **2**, a najslabiju polarniji peptidomimetik **3**.
2. Ferocenski peptidomimetici uzrokuju smanjenje broja stanica i gustoće staničnih linija HeLa i MCF-7, što upućuje na indukciju stanične smrti.
3. Lipofilni homokiralni peptidomimetik **1** ima najveći potencijal za poticanje apoptotične smrti stanica i najjači inhibitorni učinak na tumorske stanične linije, dok se polarniji, homokiralni peptidomimetik **3** pokazao najslabijim, s obzirom na oba ispitana aspekta njegovog biološkog učinka.
4. Temeljem pokazanog antiproliferativnog učinka i sposobnosti indukcije stanične smrti u tumorskim stanicama, može se pretpostaviti da ispitivani ferocenski peptidomimetici imaju potencijal kao antitumorski agensi.

6. LITERATURA

Ambriović Ristov, A. (2007) Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 793-795.

Anonymous 1 (2019) HeLa (ATCC® CCL-2™), <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx?geo_country=hr&fbclid=IwAR38c8s6SLJBg7LWd273R-OAKrGCY18_5E_HsDO1SVtUywwq4adzKMPAbenk#characteristics>. Pristupljeno 22. lipnja 2019.

Anonymous 2 (2019) MCF7 (ATCC® HTB-22™), <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?fbclid=IwAR3WWZHQKn401J9xb4rdi_F6Z7rOg0K2w-uR_Kd3ZmRA6DMBqgdGYCkDroU#characteristics>. Pristupljeno 22. lipnja 2019.

Anonymous 3 (2019) Counting chamber, <http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/counting%20chamber.jpg>. Pristupljeno 22. lipnja 2019.

Anonymous 4 (2019) CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin. Instructions for Use of Products G3580, G3581, G3582, <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>>. Pristupljeno 23. lipnja 2019.

Anonymous 5 (2019) Live/dead staining with FDA and PI, <https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33_Live_Dead_staining_with_FDA_and_PI.pdf>, Pristupljeno 26. lipnja 2019.

Anonymous 6 (2019) Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide, <[http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER%27S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER%27S%20GUIDE.pdf)>. Pristupljeno 23. lipnja 2019.

Arisanty, D. (2013) In vitro cytotoxic study and detection of apoptosis on breast cancer cell lines MDA-MB 231 after exposed to Azadirachta Indica A. Juss (neem) Extract. *Jurnal Kesehatan Andalas* [online] **2(2)**, <jurnal.fk.unand.ac.id/index.php/jka/article/download/125/120>. Pristupljeno 23. lipnja 2019.

- Barišić, L. (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 1-41.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2013) Biokemija, 6. izd. (eng.), 1. izd. (hrv.) (preveli Weygand Đurašević, I., Jernej, B., Kućan, Ž.) Školska knjiga, Zagreb.
- Castaño, A., Gómez-Lechón, M.J. (2005) Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. *Toxicol. in vitro* **19**(5), 695-705.
- Gokhale, A.S., Satyanarayanajois, S. (2004) Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy* **6**, 755-774.
- Hodgson, E. (2004) A Textbook of Modern Toxicology, 3. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* [online] **53**, 495-504, <<https://core.ac.uk/download/pdf/33994867.pdf>>. Pristupljeno 21. lipnja 2019.
- Jois, S.D., Jining, L., Nagarajarao, L.M. (2006) Targeting T-cell adhesion molecules for drug design. *Curr. Pharm. Design.* **12**, 2797-2812.
- Kandárová, H., Letašiová, S. (2011) Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip. Toxicol.* **4**(3), 107-103.
- Kovačević, M., Molčanov, K., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Roca, S., Čače, A., Barišić, L. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* [online] **19**, 12852-12880, <http://fulir.irb.hr/2961/1/Kovacevic_Monika_et_al-2014-Molecules-Conjugates_of_1_aminoferrocene_1_carboxylic_acid_and_proline.pdf>. Pristupljeno 21. lipnja 2019.
- Liao, Y. F., Wang, B. J., Hsu, W.M., Lee, H., Liao, C. Y., Wu, S. Y., Cheng, H. T., Hu, M. K. (2007) Unnatural Amino Acid-Substituted (Hydroxyethyl)urea Peptidomimetics Inhibit γ -Secretase and Promote the Neuronal Differentiation of Neuroblastoma Cells. *Mol. Pharmacol.* **71**, 588-601.
- Méndez-Samperio, P. (2014) Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: current progress. *Infect. Drug Resist.* **7**, 229-237.

Prehrambeno-biotehnoški fakultet (2019) Biotehnologija, <<https://bit.ly/2XqoGZ1>>. Pristupljeno 25. lipnja 2019.

Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* [online] **11**, 169-175, <<https://hrcak.srce.hr/file/261274>>. Pristupljeno 23. lipnja 2019.

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-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. str. 3-6.

Šintiće, A. (2019) *In vitro* biološka aktivnost ferocenskih peptidomimetika. Završni rad Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Vagner, J., Hongchang, Q., Hruby, V.J. (2008) Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12(3)**, 292-296.

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

Wang, X., Zhang, X. (2013) Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biotechnol. Prog.* **29(3)**, 681–687.

Žlender, V. (2003) Apoptoza – programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* [online] **54**, 267-274, <<https://hrcak.srce.hr/file/817>>. Pristupljeno 22. lipnja 2019.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Nika Mihalj

Ime i prezime studenta