

# In vitro biološka evaluacija ferocenskih konjugata s aminokiselinama Val, Leu i Phe

---

Ivančić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:492271>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Marina Ivančić

***IN VITRO* BIOLOŠKA  
EVALUACIJA FEROCENSKIH  
KONJUGATA S  
AMINOKISELINAMA VAL, LEU I  
PHE**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Lidije Barišić (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u BICRO BIOCentar d.o.o. pod voditeljstvom dr. sc. Marka Marjanovića.



Ovaj rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta IP-2020-02-9162 "*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*" čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić

## ZAHVALA

*Najtopliju zahvalnost iskazujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Barišić koja me stručno i strpljivo usmjeravala tijekom izrade diplomskog rada kao i cjelokupnog fakultetskog obrazovanja. Veliko hvala na svesrdnoj podršci i ukazanoj srdačnosti i dragoj doc. dr. sc. Moniki Kovačević. Neizmjereno sam vam zahvalna na svakom savjetu, motivaciji, prilici, ljubaznosti i prenesenom znanju. Bila mi je iznimna čast i zadovoljstvo poznavati vas i uvjeriti se kako stečeno zvanje nije nužno samo posao, već čestit i plemenit životni poziv!*

*Srdačno zahvaljujem dr. sc. Marku Marjanoviću na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada kao i svim djelatnicima BICRO BIOCentra d. o. o. na susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi. Također, najljepše zahvaljujem i dr. sc. Mariji Lovrić na ukazanom povjerenju tijekom izrade ovoga rada!*

*Hvala mojim predivnim AMS djevojkama i Lašćinarkama, dragoj domskoj obitelji i podršci, koje su sa mnom svakodnevno dijelile i suze i smijeh. Znajte, uz vas je sve bilo lakše podnositi daleko od doma! Hvala vam na dragocjenom prijateljstvu!*

*Hvala Ani i Kikiju na osjećaju pripadnosti i prijateljstvu, karaokama, svakom (kasnom) razgovoru i podršci, osobito humoru koji „tuđi čovik nikad neće razumit“ uz kojeg smo preživjeli sve ono za što smo mislili da nikada nećemo moći!*

*Najtoplije hvala Jurici što je uvijek vjerovao u moj uspjeh i strpljivo sa mnom podnosio teška razdoblja, a radovao se lijepim!*

*Posebice zahvaljujem mojim dragim roditeljima, sestri, baki i djedu. Zahvaljujući vašem vedrom duhu, vjeri, nesebičnosti, brižnosti i ljubavi nikada nisam bila usamljena! Hvala vam što ste oduvijek moj najveći oslonac!*

*Naposlijetku, najsrdačnije zahvaljujem svim dragim prijateljima, mojem malom krugu velikih ljudi, koji su se radovali svakom mojem uspjehu kao vlastitome! Učinili ste ovo razdoblje plemenitijim i ljepšim!*

*Baki Mari, s ljubavlju!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## IN VITRO BIOLOŠKA EVALUACIJA FEROCENSKIH KONJUGATA S AMINOKISELINAMA VAL, LEU I PHE

Marina Ivančić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058209585

**Sažetak:** Strukturna modifikacija nativnih peptida predstavlja učinkovit pristup u dizajnu farmakološki aktivnih biomolekula. Konjugiranjem ferocenskih kalupa s aminokiselinama i malim peptidima pripravlja se visokouređeni i biološki aktivni peptidomimetici. U cilju ispitivanja odnosa strukture i biološke aktivnosti peptidomimetika, u ovome radu provedena je *in vitro* biološka evaluacija dvanaest homo- i heterokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s Val (**1–4**), Leu (**5–8**) i Phe (**9–12**) na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa, MCF-7 i HepG2). Najveću antiproliferativnu aktivnost i toksičnost prema svim staničnim linijama pokazali su heterokiralni konjugati **2, 4, 6, 8 i 10**. Sposobnost indukcije stanične smrti i narušavanje integriteta stanične membrane dodatno su ispitani analizom vezanja Annexina V i PI primjenom protočne citometrije tijekom 24- i 48-satnog tretmana stanica pri čemu se najučinkovitijim induktorom apoptoze pokazao heterokiralni Phe-peptid **10**. Analizom staničnog ciklusa utvrđeni su zastoji unutar G1 ili G2/M faze tijekom 48-satnog tretmana stanica heterokiralnim peptidima **4, 8 i 10**, što dodatno ukazuje na njihov antitumorski potencijal.

**Ključne riječi:** *ferocen, peptidomimetici, in vitro biološka evaluacija, antitumorski učinak, protočna citometrija*

**Rad sadrži:** 61 stranicu, 19 slika, 3 tablice, 72 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Komentor:** dr.sc. Marko Marjanović, znan. sur., BICRO BIOCentar d.o.o

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Monika Kovačević

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Lidija Barišić (mentor)
3. dr. sc. Marko Marjanović, znan. sur. BICRO BIOCentar d.o.o. (član)
4. doc. dr. sc. Monika Kovačević (zamjenski član)

**Datum obrane:** 18. srpanj 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory for Organic Chemistry**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

*IN VITRO* BIOLOGICAL EVALUATION OF FERROCENE CONJUGATES WITH AMINO ACIDS  
VAL, LEU AND PHE

*Marina Ivančić*, univ. bacc. ing. techn. aliment, 0058209585

**Abstract:** Structural modification of native peptides represents an effective approach for the design of pharmacologically active biomolecules. Highly ordered and biologically active peptidomimetics were prepared by conjugation of the ferrocene scaffold with amino acids and small peptides. In this work, twelve homo- and heterochiral conjugates of ferrocene-1,1'-diamine with Val (**1-4**), Leu (**5-8**), and Phe (**9-12**) were biologically studied *in vitro* on human tumor cell lines (HeLa, MCF-7 and HepG2). Heterochiral conjugates **2**, **4**, **6**, **8** and **10** showed the greatest antiproliferative activity and toxicity to all cell lines. The ability to induce cell death and affect cell membrane integrity was examined by analysis of Annexin V and PI staining using flow cytometry during 24- and 48-hour treatment of cells, with heterochiral Phe-peptide **10** being the most effective in inducing apoptosis. Cell cycle analysis revealed delays within G1 or G2/M phase during 48-hour treatment with heterochiral peptides **4**, **8** and **10**, providing further evidence of their anticancer potential.

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

**Thesis contains:** 61 pages, 19 figures, 3 tables, 72 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Lidija Barišić, PhD, Full professor

**Co-mentor:** Marko Marjanović, *Research Associate*

**Technical support and assistance:** Monika Kovačević, Assistant professor

### Reviewers:

1. Kristina, Radošević, PhD, Associate professor (president)
2. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (mentor)
3. Marko, Marjanović, PhD, Research Associate, BICRO BIOCentar d.o.o. (member)
4. Monika, Kovačević, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** July 18<sup>th</sup> 2022



# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. PEPTIDOMIMETICI .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. FEROCEN .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Derivati ferocena kao terapeutici .....	4
2.2.2. Ferocenski peptidomimetici .....	6
<b>2.3. STANIČNA SMRT .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. STANIČNI CIKLUS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. PRIMJENA KULTURE STANICA U <i>IN VITRO</i> ISTRAŽIVANJIMA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Ferocenski peptidomimetici .....	15
3.1.2. Humane stanične linije.....	15
3.1.2.1. <i>Stanična linija HeLa.....</i>	<i>15</i>
3.1.2.2. <i>Stanična linija HepG2 .....</i>	<i>16</i>
3.1.2.3. <i>Stanična linija MCF-7.....</i>	<i>17</i>
3.1.3. Kemikalije .....	18
3.1.4. Uređaji i oprema.....	19
3.1.5. Puferi .....	19
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Uzgoj stanica .....	20
3.2.2. Određivanje broja stanica uz dodatak tripanskog modrila.....	20
3.2.3. Određivanje citotoksične aktivnosti (IC <sub>50</sub> ) MTT metodom.....	21
3.2.4. Određivanje učinaka ferocenskih peptidomimetika na stanične procese protočnom citometrijom.....	23
3.2.4.1. <i>Određivanje stanične smrti protočnom citometrijom.....</i>	<i>23</i>
3.2.4.2. <i>Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom .....</i>	<i>25</i>
3.2.5. Statistička obrada rezultata .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HeLa, MCF-7 I HepG2 .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA MORFOLOGIJU HeLa, MCF-7 I HepG2 STANICA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3. . UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH</b>	

<b>PEPTIDOMIMETIKA NA AKTIVACIJU STANIČNE SMRTI HeLa, MCF-7 I HepG2 STANICA .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA STANIČNI CIKLUS HeLa I HepG2 STANICA.....</b>	<b>48</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>54</b>

# 1. UVOD

Jedan od najvećih suvremenih znanstveno-tehnoloških izazova jest pronalazak odgovarajućih terapijskih rješenja kojim bi se omogućilo prevladavanje rezistencije u liječenju zaraznih i autoimunih bolesti, karcinoma te drugih patoloških stanja. Stoga razvoj nekonvencionalnih strategija i inovacijski pristup u dizajnu biološki aktivnih molekula omogućuje unaprjeđenje kvalitete života na globalnom nivou. Upravo se istraživanje malih molekulskih kalupa sa sposobnošću oponašanja uvjeta unutar prirodnih sustava pokazalo izrazito učinkovitim pristupom u kreiranju takvih rješenja.

Strategija transformacije prirodnih proteina i peptida u potencijalne terapeutike temelji se na promjeni strukturnih nedostataka i posljedičnom poboljšanju bioloških svojstava, što se ostvaruje dizajnom njihovih peptidomimetičkih analoga. Esencijalni farmakoforni elementi iz peptidomimetika oponašaju 3D-strukturu prirodnih peptida i proteina što rezultira unaprjeđenjem njihovog farmakokinetičkog profila i terapijskog potencijala (1). O uspješnosti ovog pristupa svjedoče peptidomimetički terapeutici (antitumorski, antivirusni, antimikrobni, terapeutici za neurodegenerativne bolesti) dostupni na inozemnom i RH tržištu, kao i mnogobrojni peptidomimetici u fazi kliničkih ispitivanja (1-3).

Ovakav koncept primijenjen je u prethodnom radu istraživačke skupine iz Laboratorija za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu i to u vidu dizajna ferocenskih peptidomimetika i provođenja SAR-studija. Naime, poznato je kako umetanje ferocenske osnove u strukturu postojećih lijekova rezultira povećanjem njihove bioraspoloživosti i terapijskog djelovanja pa se derivati ferocena nerijetko odlikuju antiproliferativnim, antivirusnim, antimikrobnim i drugim poželjnim svojstva kao i niskom toksičnošću i povećanom lipofilnošću (4).

Stoga, cilj ovog rada bila je provedba *in vitro* biološke evaluacije s naglaskom na ispitivanje antitumorskog potencijala dvanaest ferocenskih peptidomimetika sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Provedenom *in vitro* biološkom evaluacijom nastojalo se utvrditi odnos strukture i antitumorskog učinka sintetiziranih homo- i heterokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D- Val, Leu i Phe na trima humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa, MCF-7, HepG2).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PEPTIDOMIMETICI

Biološka i kemijska raznolikost proteina posljedica je njihove specifične 3D-strukture određene slijedom aminokiselina unutar samih polipeptidnih lanaca kao i međusobno uspostavljenim nekovalentnim interakcijama. Pri tome nabiranje proteinskih lanaca i postignuta termodinamički najstabilnija konformacija reguliraju funkcionalnost i biološku aktivnost pripadajućeg proteina. Biološka funkcionalnost proteina ostvaruje se povezivanjem sa željenim receptorima i ligandima, što je pak uvjetovano strukturnom komplementarnošću liganada i receptora u vidu odgovarajućeg oblika i veličine, naboja te hidrofilitnosti i hidrofobnosti (5). Pogrešnim nabiranjem proteinskih lanaca uspostavljaju se neželjene konformacije što dovodi do poremećaja u protein-protein interakcijama (PPI) uključenima u esencijalne biološke procese, uslijed čega dolazi do različitih infektivnih oboljenja i patoloških stanja (Alzheimerova, Parkinsonova, Huntigtonova bolest) (6).

Usprkos ključnoj ulozi u imunološkim i neurološkim procesima, postoje mnoga ograničenja u primjeni peptida kao terapeutika. Njihov farmakokinetički profil karakteriziran je lošom apsorpcijom, nedostatkom specifičnog transportnog sustava i posljedično brzim izlučivanjem iz organizma, konformacijskom i proteolitičkom nestabilnošću, niskom selektivnošću te otežanim transportom kroz krvno-moždanu barijeru. Međutim, modifikacijom nativnih peptida moguće je unaprijediti njihova biofarmaceutska svojstva i učiniti ih prikladnijim za klinički razvoj i primjenu. Strategija transformacije prirodnih peptida u potencijalne terapeutike ogleda se u sintezi i dizajnu njihovih peptidomimetičkih analoga, čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju sekundarne strukturne elemente uključene u biološke interakcije (2, 7). Pristupi u dizajnu peptidomimetika podrazumijevaju: (i) ugradnju nepeptidnih kalupa u peptidnu sekvencu; (ii) zamjenu peptidne veze nepeptidnim analogima; (iii) konjugiranje aminokiselinskih bočnih ogranaka s malim molekulama; (iv) ciklizaciju glavnog lanca (2, 7).

Jedna od najvažnijih dijagnostičkih i terapijskih strategija u sprječavanju patofiziološke prirode i progresije bolesti jest inhibicija PPI ključnih u usmjeravanju biokemijskih puteva, što predstavlja veliki izazov obzirom na njihovu brojnost i veliku dodirnu površinu na kojoj se ostvaruju. Međutim, kako vezivanju doprinosi samo nekolicina aminokiselinskih ostataka, mimkrija je usmjerena na takve „hot spots“ regije bogate hidrofobnim aminokiselinskim

ostatcima (Tyr, Phe, Arg, Leu, Trp) koje doprinose afinitetu za vezivanje liganda, a organizirane su kao sekundarni strukturni elementi ( $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ - ploče, okreti) (8).

Zastupljenost peptidnih lijekova na farmaceutskom tržištu i različitim fazama kliničkih ispitivanja u konstantnom je porastu čemu svjedoči lista odobrenih lijekova od strane Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) tijekom posljednjih nekoliko godina (3, 9). Prema nedavnom izvješću, između siječnja 2015. i svibnja 2021. godine odobren je 21 lijek ovog tipa, što predstavlja 5 % svih lijekova na tržištu odobrenih od strane FDA u navedenom periodu. Primjerice, 2020. godine FDA je odobrila tri peptidomimetička lijeka: (i) relugolix (Orgovyx), oralno biodostupni antagonist receptora nepeptidnog gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) za liječenje uznapredovalog raka prostate; (ii) tirbanibulin (Klisyri), prvi klinički visoko selektivni inhibitor Src kinaze za liječenje aktinične keratoze lica i vlasišta; (iii) galij 68 PSMA-11, prvi radioaktivni peptidni lijek s DOTA kelatorom odobren za otkrivanje i lokalizaciju raka prostate pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) (9). Neki od najprodavanijih peptidomimetičkih lijekova koriste se u terapiji relapsno-remitentne multiple skleroze (Copaxone, polimer koji oponaša mijelinski osnovni protein) te liječenju dijabetesa tipa 2 gdje se radi o skupini agonista GLP-1 (peptid-1-sličan glukagonu) poput liraglutida (Victoza<sup>TM</sup>, Saxenda<sup>TM</sup>). (2, 3) Osim toga, uspješnost prethodno spomenutih strategija u dizajnu peptidomimetika očituje se i na primjeru lijeka dezmpresina, analoga vazopresina, kod kojega je zamjena L-Arg iz vazopresina s D-Arg rezultirala produljenjem vremena poluživota, povećanjem selektivnosti i terapijskog potencijala lijeka. Nadalje, neki peptidomimetici posjeduju i antivirusna svojstva te djeluju kao inhibitori ključnih enzima koji posreduju u replikaciji HIV-1, hepatitis C, SARS CoV-2 i MERS-CoV virusa (3). Također, unaprjeđenjem svojstava antimikrobnih peptida (engl. *Antimicrobial Peptide, AMP*) u vidu povećanja hidrofobnosti i osiguranja lakšeg transporta kroz staničnu membranu, nastoji se doprinijeti prevladavanju antimikrobne rezistencije, dok se sve intenzivnijim istraživanjem crijevne mikrobiote pokušava identificirati nove peptide koji bi mogli poslužiti u razvoju i istraživanju terapijika metaboličkih bolesti.

Osim unaprjeđenja afiniteta i selektivnosti prema receptorima, intenzivno se istražuju različiti načini primjene lijeka i njegove biodostupnosti. Naime, uslijed proteolitičke nestabilnosti većina peptidnih terapijika primjenjuje se u obliku injekcija, stoga posebnu pozornost privlači intranazalno ili transdermalno administriranje lijeka, kao alternativni načini primjene. Osobito je zanimljiv primjer kliničkog razvoja transbukalnog sustava za dostavu lijeka nastalog

kombinacijom zlatnih nanočestica i tehnologije (9).

## 2.2. FEROCEN

Ferocen  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$  pripada skupini metalocenskih spojeva. Odlikuje se tzv. „sendvič strukturom“ u kojoj je željezov kation ( $\text{Fe}^{2+}$ ) smješten između dvaju ciklopentadienilnih prstenova (Cp). Osim specifične strukture, ferocen se odlikuje nizom iznimnih fizikalno-kemijskih svojstava koji ga čine pogodnim supstratom za dizajn mnogobrojnih derivata. Stoga je njegovo otkriće sredinom prošloga stoljeća značajno doprinijelo razvoju organometalne kemije (4). Naime, konfiguracija plemenitog plina i aromatičnost doprinose njegovoj izrazitoj stabilnosti u fiziološkim uvjetima, dok je olakšani prolazak kroz staničnu membranu posljedica lipofilnog karaktera. Osim toga, karakteriziraju ga niska toksičnost, povoljna elektrokemijska svojstva, robusnost te dobra topljivost u organskim otapalima. Zahvaljujući jedinstvenom karakteru ferocena, njegovi derivati koriste se kao biosenzori, elektronički materijali, visokooktanski aditivi u motornim gorivima i polimeri, dok je njihov biološki potencijal osobito prepoznat u području (nano)medicinske te biomedicinske i tkivnog inženjerstva (4).

### 2.2.1. Derivati ferocena kao terapeutici

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do značajnog napretka u istraživanju terapijskog potencijala organometalnih spojeva. Osobita pozornost posvećena je razvoju metalnih proliješkova pri čemu se ferocen pokazao izrazito učinkovitim metalofarmakoforom. Poznato je kako terapeutici na bazi metala posjeduju raznolika elektronska i strukturna svojstva uključujući niz oksidacijskih stanja, koordinacijsku geometriju te vrstu i broj liganada (4, 11). Shodno tome, utvrđeno je kako metalni kompleksi mogu utjecati na staničnu redoks-ravnotežu izravno redukcijom/oksidacijom u metalnim ili ligandnim centrima, neizravno kroz interakciju s biomolekulama u redoks-procesima te stvaranjem viška citotoksičnih kemijskih vrsta poput slobodnih radikala (10, 11). Ovakav mehanizam djelovanja je učinkovita strategija u terapiji karcinoma obzirom na izrazitu redoks-osjetljivost tumorskih stanica.

Potruga za antitumorskim lijekovima na bazi metala intenzivirala se nakon otkrića cisplatina devedesetih godina, danas najzastupljenijeg lijeka u terapiji karcinoma. Međutim, visoka toksičnost, mnoge nuspojave i rezistencija nekih tumora na cisplatin ograničavaju njegovu primjenu što zahtijeva razvoj novih lijekova s platinom ili drugim metalima poput onih na bazi rutenija ili željeza, osobito u obliku ferocena, koji pokazuju dobre citotoksične

učinke uz smanjenu opću toksičnost i nuspojave (12, 13). Naime, istraživanje biološke aktivnosti derivata ferocena traje gotovo 70 godina pri čemu najznačajnije postignuće u tom području predstavlja unaprjeđenje terapijske učinkovitosti postojećih lijekova kao posljedice izosterne zamjene dijela strukture bioaktivne molekule s ferocenom (slika 1). Takvim pristupom pripravljeni su najučinkovitiji ferocenski bioizosteri, ferokin i ferocifen kao derivati klorokina i tamoksifena (13).



**Slika 1.** Vremenik istraživanja ferocenskih derivata (prema Patra, 2017)

Biološka aktivnost ferocenskih derivata pripisuje se njihovoj redoks-aktivnosti, odnosno sposobnosti generiranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*) kao i hidrosilnih radikala ( $\cdot\text{OH}$ ) nastalih Fentonovom reakcijom koji dovode do poremećaja u regulaciji staničnog ciklusa, metabolizma te apoptoze uslijed oštećenja DNA, stanične membrane, mitohondrija i sl (11-13). Opisani mehanizam djelovanja utvrđen je u slučaju ferokina koji zahvaljujući aktivnosti ferocenskog dijela molekule pokazuje pozitivan učinak protiv klorokin-rezistentnih *Plasmodium falciparum* vrsta, a pored antimalarijske aktivnosti pokazuje inhibitorni učinak prema infekcijama uzrokovanim virusom hepatitisa C, dok u kombiniranoj terapiji s određenim kemoterapeuticima dovodi do poboljšanja antitumorske aktivnosti. Antitumorska aktivnost ferocifena prema estrogen-receptor  $\alpha$ -ovisnom ( $\text{ER}\alpha^+$ ) i hormonski neovisnom ( $\text{ER}\alpha^-$ ) karcinomu dojke također se pripisuje ranije opisanom mehanizmu djelovanja ferocenskog dijela molekule, a ferocifen dodatno karakteriziraju visoka selektivnost prema tumorskim stanicama te *in vivo* generiranje ROS-a (13). Ključna uloga ferocenske jedinice kao bioizostera utvrđena je prilikom istraživanja antitumorske aktivnosti

organorenijevih ili organomanganskih derivata tamoksifena u kojima pripremljeni derivati nisu pokazali očekivanu antiproliferativnu aktivnost (13). Osim antitumorske aktivnosti, derivati ferocena pokazuju širok spektar biološke aktivnosti poput antimikrobne, antiparazitske, antioksidacijske, antikonvulzivne i antivirusne (14).

### 2.2.2. Ferocenski peptidomimetici

Osim umetanja ferocena u strukturu postojećih lijekova, zahvaljujući jednostavnoj funkcionalizaciji [uvođenju funkcijskih skupina na jedan (homoanularni derivati) ili oba ferocenska prstena (heteroanularni derivati)], pripremljen je veliki broj ferocenskih konjugata s biološki značajnim organskim ili anorganskim fragmentima. Prilikom dizajna potencijalnih terapeutika s umetnutim ferocenskim fragmentom važno je razmotriti utjecaj elektroaktivne ferocenske jezgre kao i konjugirane spojnice (koja može imati ulogu kromofora i sniziti oksidacijski potencijal) između ferocena i ostatka molekule kao čimbenika koji upravljaju svojstvima takvih biokonjugata (13, 14).

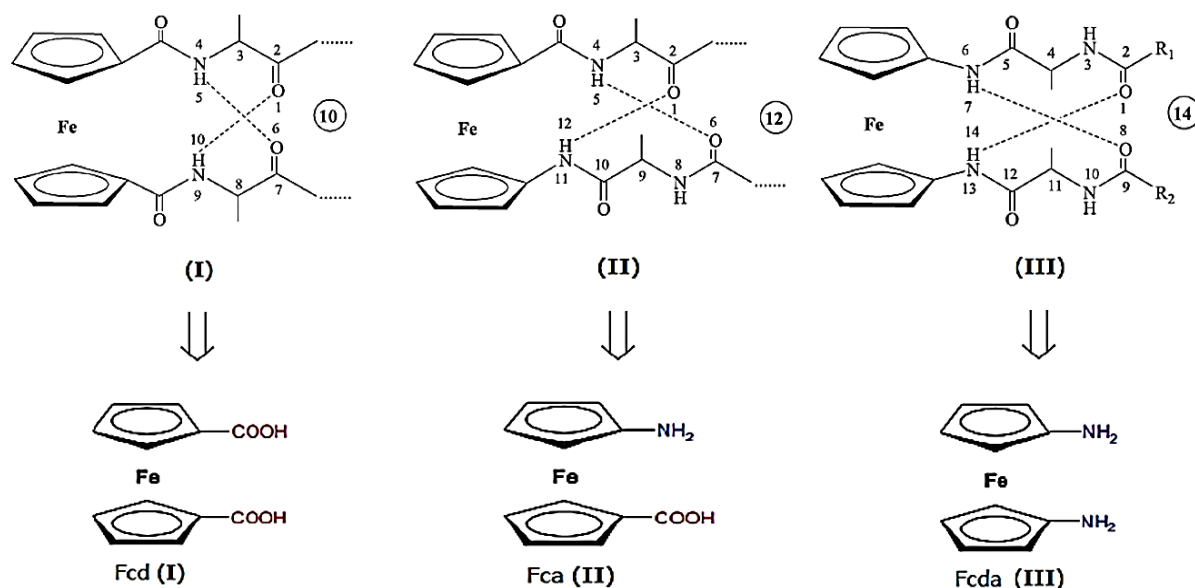
Kao što je prethodno opisano u poglavlju 2.1., elementi sekundarne strukture imaju ključnu ulogu u međusobnom molekulskom prepoznavanju i povezivanju tijekom protein-protein interakcija pa je razvoj farmakološki potentnih biomolekula usmjeren upravo na kontrolirano upravljanje PPI. Poseban interes iskazuje se za razvoj malih spregnutih mimetika  $\beta$ -okreta koji su smješteni na površini proteinske molekule te time izloženi susjednim molekulama, zbog čega izravno sudjeluju u različitim interakcijama, određujući tako svojstva peptida i proteina, ali i potencijalnih terapeutika (2). Oponašanjem  $\beta$ -okreta odgovarajućim začetnicima okreta (engl. *turn-inducer*) čiji rigidni kalup nakon konjugiranja s aminokiselinama i malim peptidima omogućava usmjeravanje bočnih ogranaka jednako kao u prirodnom peptidu, pripremljaju se mimetici s poboljšanom proteolitičkom stabilnošću i ograničenom konformacijskom fleksibilnošću.

Navedeni pristup u dizajnu mimetika okretâ intenzivno se istražuje u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta gdje su se 1,1'-disupstituirani feroceni pokazali pogodnim kalupom za pripremu konformacijski spregnutih peptida koji zauzimaju strukturu  $\beta$ -okreta i struktura nalik  $\beta$ -pločama. Pritom, biokonjugati nastali konjugiranjem 1,1'-disupstituiranih ferocenskih kalupa s prirodnim aminokiselinama poprimaju oblik visokouređenih heličnih struktura zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å kojom je omogućena tvorba intramolekulskih vodikovih veza (engl. *Intramolecular*



*Hydrogen Bond, IHB*) između podandnih peptidnih lanaca, dok ferocen djeluje kao začetnik okreta (2).

Ovisno o kiralnosti peptidne okosnice i vrsti ferocenskog kalupa kao začetnika okreta, moguće je regulirati nabiranje ferocenskih peptida i time neposredno utjecati na njihovu biološku aktivnost. Kako ferocenski kalupi CO–Fn–CO, CO–Fn–NH i NH–Fn–NH mogu akceptirati i/ili donirati vodikove veze, razlikuju se tri glavne skupine konjugata ferocena s prirodnim aminokiselinama (slika 2): (i) Fn–[CO–AK–OMe]<sub>2</sub> (I) u kojima se uspostavlja 10-člani IHB-prsten; (ii) Y–AK–NH–Fn–CO–AK–OMe (II) s 12-članim IHB-prstenom; (iii) Fn–[NH–AK–Y]<sub>2</sub> (III) s 14-članim IHB-prstenom, odnosno 2 simultana 10-člana IHB-prstena; [Fn = ferocenilen, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil)] (15).



**Slika 2.** Ferocenski peptidomimetici **I- III** (IHB označene isprekidanim crtama)

Pripravljena je serija ovakvih ferocenskih peptidomimetika pri čemu je poseban fokus istraživanja bio na detaljnoj spektroskopskoj analizi nastalih IHB-obrazaca i sekundarnih struktura (15-19). Rezultatima istraživanja utvrđena je ključna uloga alternirajuće kiralnosti aminokiselinskih sekvenci i *N*-terminalnih skupina pri indukciji različitih IHB-prstenova. Nadalje, u nekim od istraživanja pripremljeni biokonjugati podvrgnuti su biološkoj evaluaciji kako bi se utvrdila veza između njihove strukture i aktivnosti pri čemu su neki od njih pokazali antitumorski potencijal. U ovome radu provedena je *in vitro* biološka evaluacija homo- i heterokiralnih ferocenskih konjugata **III** s L- i D- Val, Leu i Phe.

### 2.3. STANIČNA SMRT

Stanična smrt jest izrazito složen temeljni biološki proces kojim se omogućuje pravilna dioba i diferencijacija stanica te održavanje homeostaze unutar živih sustava. Ovaj proces ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju i obnovi tkiva, ali i imunološkoj regulaciji u vidu eliminacije patogenima zaraženih stanica i kancerogenih stanica (20, 21). Poremećaji u odvijanju ovoga procesa doprinose razvoju različitih bolesti i stanja (neurodegenerativni poremećaji, karcinom, autoimune i zarazne bolesti) pa istraživanje i razumijevanje signalnih kaskada te mehanizama uključenih u regulaciju ovoga procesa predstavlja važan alat pri razvoju strategija za dizajn i biotehnološku proizvodnju biofarmaceutika.

U dosadašnjim istraživanjima staničnog umiranja predstavljene su različite klasifikacije i načini identifikacije različitih tipova stanične smrti izvršenih kroz različite te ponekad i djelomično preklapajuće signalne puteve (22). Obzirom na različite mehanizme staničnog umiranja i posljedično nastale morfološke promjene u umirućim stanicama, Odbor za nomenklaturu stanične smrti (engl. *The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD*) predložio je klasifikaciju oblika stanične smrti, shodno biokemijskoj i fiziološkoj prirodi signalnih puteva, u dvije kategorije: (i) slučajnu (engl. *Accidental Cell Death, ACD*) uzrokovanu teškim fizičkim i kemijskim oštećenjima i neosjetljivu na genetske i farmakološke promjene; (ii) reguliranu (engl. *Regulated Cell Death, RCD*) staničnu smrt kao vrlo koordinirani i genetski kontroliran proces pri čemu se RCD može dodatno kategorizirati na apoptotsku i neapoptotsku staničnu smrt (23). Shodno tome, definirane su tri glavna oblika stanične smrti međusobno različita po morfološkim i biokemijskim obilježjima: apoptoza, autofagija i nekroza (20, 21).

Nekroza predstavlja oblik pasivne i nekontrolirane stanične smrti potaknute vanjskim čimbenicima, odnosno iznenadnim i stresnim uvjetima uslijed izlaganja toksinima, hipoksiji, velikim promjenama temperature ili pH te drugim ekstremnim uvjetima. Ovaj proces karakterističan je po bubrenju organela i stanica, gubitku integriteta stanične membrane te nekontroliranom oslobađanju staničnog sadržaja u izvanstanični prostor što rezultira aktivacijom imunološkog sustava, tj. upalom i oštećenjem okolnih stanica i/ili tkiva. Ipak, recentna istraživanja upućuju na postojanje i programiranog oblika nekrotičke stanične smrti, tzv. nekroptoze (23).

Autofagija predstavlja višestupanjski katabolički proces pomoću kojeg se posredstvom lizosoma razgrađuju i recikliraju stanične komponente (oštećene makromolekule, organele i dr.) u svrhu dobivanja izvora energije ili pak supstrata za biosintezu. Ovaj proces pripada

neapoptotičkom mehanizmu programirane stanične smrti, a može biti induciran različitim stresnim stanjima, ponajviše nedostatkom hranjivih tvari, tj. izvora energije i aminokiselina. Obzirom na različite mehanizme prijenosa citoplazmatskog sadržaja do lizosoma, opisana su tri tipa autofagije: (i) mikroautofagija (vezanje supstrata za razgradnju na površinu lizosoma praćeno invaginacijom membrane lizosoma); (ii) makroautofagija (prijenos supstrata autofagosomima); (iii) autofagija posredovana šaperonima (izravna translokacija preko lizosomalne membrane) (24, 25).

Prvi identificirani strogo regulirani te detaljno proučeni oblik programiranog staničnog umiranja jest apoptoza. Pokretanje apoptoze posljedica je izostanka bitnih faktora za preživljavanje (faktori rasta, hormoni), odnosno primanja negativnih signala za odumiranje uslijed oštećenja DNA, djelovanja slobodnih radikala, tretmana citotoksičnim tvarima, vezanja signalnih molekula na površinske stanične receptore i sl. Morfološke karakteristike apoptoze su: kondenzacija kromatina i piknoza jezgre, fragmentacija DNA, protruzija stanične membrane te nastanak apoptotičkih tjelešaca (25, 26). Za razliku od nekroze, razgradnja stanice odvija se bez upalnih reakcija s minimalnim utjecajem na okolne stanice i tkivo. Najvažnije skupine proteina uključenih u ovaj oblik stanične smrti su proteini iz porodice kaspaza i Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*). Kaspaze su citoplazmatske cistein endoproteaze koje imaju središnju ulogu u inicijaciji i provođenju apoptoze, a u stanici su prisutne kao neaktivni prekursorski oblici (pro-kaspaze) koji podliježu proteolizi i homodimerizaciji s drugim pro-kaspazama uslijed kaskadne aktivacije posredovane drugim aktivnim kaspazama (24). Razlikujemo dvije skupine apoptotskih kaspaza: inicijatorske kaspaze (kaspaze -8,-9) te efektorske kaspaze (kaspaza-3, -6, -7) pri čemu apoptotski signali smrti aktiviraju inicijatorske kaspaze koje potom pokreću proteolitičku kaskadu i aktiviraju izvršiteljske kaspaze. Nadalje, proteini Bcl-2 porodice imaju ključnu ulogu u regulaciji apoptoze što se očituje njihovom pro- i anti-apoptotičkom aktivnošću. Shodno tome, dijele se u tri skupine: (i) anti-apoptotička koju čine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1, Bcl-B proteini s četiri konzervirane Bcl-2 homologne domene (BH1-BH4); (ii) pro-apoptotički proteini Bax, Bak i Bok koji sadrže tri homologne domene (BH1-BH3); (iii) pro-apoptotički tzv. BH3 proteini (Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa i Bmf) (27).

Ovisno vanjskom ili unutarnjem signalu za pokretanje apoptoze razlikujemo vanjski (put receptora smrti) te unutrašnji (mitohondrijski) put apoptoze pri čemu oba puta uključuju aktiviranje inicijatorskih kaspaza (-8, -9, -10) i efektorsku kaspazu-3. Vanjski put apoptoze započinje obradom izvanstaničnih signala u vidu aktivacije pro-apoptotičkih receptora, tzv.

receptora smrti na površini stanice vezanjem „signalnih proteina smrti“, odnosno proapoptotičkih liganada. Posredovan je molekulama iz skupine čimbenika nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor, TNF*) čija interakcija s TNFR (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor*) na staničnoj membrani dovodi do trimerizacije adaptornih proteina TRADD (engl. *TNF Receptor 1 Associated Death Domain*) te FADD (engl. *Fas Associated Death Domain*) kao i njihovog regrutiranja iz citoplazme na površinu stanice. Pri tome, FADD domene služe kao most između receptora i pro-kaspaze 8 čime nastaje multiproteinski kompleks DISC (engl. *Death-inducing Signaling Complex*) koji signalizira induciranje stanične smrti, odnosno slijedi aktivacija kaspaze-3 i -8 i posljedično apoptoza (27). Mitohondrijski put apoptoze induciran je unutarstaničnim signalima nastalim u uvjetima staničnog stresa koji doveo do citogenetskih oštećenja. Pri tome dolazi do permeabilizacije mitohondrija i oslobađanja apoptotičkih signalnih molekula u citosol (citokrom c, Smac/Diablo, HrtA2/Omi) pri čemu Smac/Diablo i HrtA2/Omi indirektno sudjeluju u pokretanju apoptoze inhibicijom inhibitora apoptotičkih proteina (IAP) (28). Citosolni citokrom c u interakciji s APAF1 (engl. *Apoptotic Protease Activating Factor 1*) stvara multimerni kompleks apoptosom koji aktivira kaspazu-3 i -9.

Tumorske stanice karakterizira sposobnost izbjegavanja mehanizama programirane stanične smrti pa se upravo zbog toga istražuju specifični kemoterapeutici za razvoj ciljanih terapija poput ciljanog tretiranja gena Bcl-2 porodice pri čemu se nastoji povećati količinu proapoptotičkih te smanjiti količinu antiapoptotičkih faktora (28). Također, dizajnirani su terapeutici koji služe kao agonisti receptora smrti i izravno aktiviraju vanjski put apoptoze vezanjem na receptore smrti (29).

## 2.4. STANIČNI CIKLUS

Stanični ciklus predstavlja visoko regulirani unutarstanični proces kroz koji stanica duplicira svoj genom, raste i dijeli se. On uključuje uređeni niz vremenski odvojenih makromolekularnih događaja koji dovode do diobe stanice i proizvodnje dviju stanica kćeri pri čemu se u svakoj od njih nalazi ravnomjerno raspoređen stanični materijal, identičan onome u roditeljskoj stanici. Općenito, stanični ciklus se može podijeliti na dvije velike faze, interfazu i mitozu.

Interfaza se odvija između dvije mitotske faze i predstavlja vrijeme staničnog rasta, odnosno najdulji dio staničnog ciklusa u kojem se odvija priprema stanice za diobu umnažanjem staničnog sadržaja i udvostručavanjem genetičkog materijala (30). Unutar interfaze razlikujemo

G1, S i G2 fazu. U G1 (engl. *gap 1*) fazi staničnog ciklusa, stanica pokazuje izrazitu metaboličku aktivnost u vidu sinteze RNA, enzima i drugih makromolekula nužnih za tvorbu staničnih sustava koji osiguravaju normalno održavanje funkcionalnosti stanice u daljnjim fazama ciklusa. Tijekom S faze staničnog ciklusa odvija se sinteza i replikacija DNA, dva važna i strogo regulirana stanična događaja. Nakon S faze slijedi G2 (engl. *gap 2*) faza u kojoj se provodi intenzivna sinteza proteina neophodnih za mitozu čime se zaokružuju posljednje pripreme stanice za dijeljenje.

Po završetku interfaze slijedi mitotska faza (M faza) čiji je smisao ravnomjerna raspodjela nasljednog i citoplazmatskog materijala ishodišne stanice u dvije novonastale stanice kćeri, a zauzima tek 10 % vremena staničnog ciklusa. Raspodjela se odvija kroz dva međusobno povezana događaja koji podrazumijevaju podjelu jezgre (kariokineza) te staničnih organela i citoplazme (citokineza). Ukratko, proces kariokineze dijeli se na četiri zasebne faze u kojima dolazi do: (i) kondenzacije kromosoma i pucanja jezgrine membrane (profaza); (ii) pružanja maksimalno kondenziranog kromosoma u mitotičkom aparatu (metafaza); (iii) razdvajanja sestrinskih kromatida dvostrukih kromosoma, putovanja jednostrukih kromosoma na suprotne polove stanice i izduživanja stanice (anafaza); (iv) dekondenzacije kromosoma i formiranja jezgrine ovojnice oko svakog seta kromosoma i jezgrice (telofaza) (30). Nakon završetka kariokineze dolazi i do konačnog fizičkog dijeljenja stanice majke.

Ovisno o vrsti stanica i njihovoj sposobnosti proliferacije, (ne)povoljnosti okolišnih uvjeta i mnogim drugim parametrima, novonastale stanice kćeri mogu ući u idući ciklus stanične diobe ili stanje mirovanja, odnosno G0 fazu staničnog ciklusa. Recimo, površinske epitelne stanice poput stanica slojevitog skvamoznog epitela kože i stupčaste epitelne stanice gastrointestinalnog trakta, kontinuirano se dijele, dok se parenhimske stanice jetre, bubrega i gušterače moraju potaknuti na ponovni ulazak u stanični ciklus izlaganjem faktorima rasta.<sup>31</sup> Primjerice, citokinima inducirani ponovni ulazak stanica ovog tipa u G1 fazu je važna komponenta upalnog odgovora, što je dobro okarakterizirana pojava u bubrezima (31). Osim toga, živčane i stanice srčanog mišića ne posjeduju sposobnost proliferacije te trajno miruju.

Kako bi se očuvao stanični i tkivni integritet, nužna je izuzetna uravnoteženost između sinteze DNA i stanične proliferacije te zaustavljanja rasta, popravka DNA ili apoptoze. To se postiže nizom pozitivnih i negativnih signala koji stanicu upućuju na napredovanje u staničnom ciklusu, odnosno zaustavljaju stanični ciklus kako bi se eliminirala oštećenja. Dakle, stanični ciklus mora biti strogo reguliran kako bi se onemogućio prijenos genetičkih abnormalnosti na

stanice kćeri te stoga postoje mnoge razine i putevi regulacije kojima se stanica osigurava od prijenosa grešaka na potomke. Regulacija staničnog ciklusa provodi se pomoću kontrolnih točaka i to (de)fosforilacijama, periodičnom sintezom i razgradnjom proteina uključenih u kontrolu, inhibitorima, aktivatorima i dr. Kontrolnim točkama kontrolira se redoslijed i vrijeme prijelaza iz jedne u drugu fazu staničnog ciklusa što omogućava dovršavanje ključnih staničnih događaja (replikacije DNA, segregacije kromosoma) s velikom preciznošću, u suprotnom slijedi zaustavljanje staničnog ciklusa i popravak oštećenja (32).

Ciklini i ciklin-ovisne kinaze (engl. *Cyclin-dependent Kinases*, *CDK*) pozitivni su regulatori staničnog ciklusa pa njihova aktivacija omogućuje stanici prelazak u iduću fazu staničnog ciklusa te naposljetku i diobu (31). CDK su negativno regulirane inhibitorima ciklin-ovisnih kinaza (CDKI) koji kao negativni regulatori zaustavljaju stanični ciklus i usmjeravaju stanicu prema oporavku ili programiranoj staničnoj smrti. Nadalje, unutarnjim kontrolnim sustavima, tj. osnovnim kontrolnim točkama (G1/S, G2/M, metafazna točka) provjeravaju se odnos veličine citoplazme i jezgre, oštećenje DNA, broj i raspored kromosoma, itd. Na prijelazu iz G1 u S fazu (prva kontrolna/restrikcijska točka, G1/S) vrši se provjera o enzimima i proteinima neophodnim u replikaciji DNA. Odlučuje se o nastavku ili završetku staničnog ciklusa, tj. ulasku u fazu smanjenje metaboličke aktivnosti (G0) do pojave povoljnih uvjeta (32). G2/M kontrolna točka služi za provjeru ispravno provedene replikacije DNA te registriranje oštećenja DNA, ali i prisutnost drugih molekula potrebnih za diobu stanice. U metafazi tzv. kontrolna točka diobenog vretena omogućuje provjeru i detektiranje nepravilnosti u položaju kromosoma i rasporedu mikrotubula (32).

Deregulacija staničnog ciklusa rezultira nekontroliranom proliferacijom stanica i povećanjem broja mutacija što najčešće dovodi do nastanka tumora. Tumorske stanice između ostalog karakterizira prekomjerno eksprimiranje ciklina, odnosno smanjeno eksprimiranje CDKI što im omogućuje nereguliran stanični rast (32). Osim toga, među najbolje proučenim proteinima koji dovode do zastoja staničnog ciklusa ili njezine smrti jest p53 protein. Pritom, mutacije gena p53 najčešće su mutacije povezane s nastankom karcinoma (31). Stoga, upravljanje staničnim ciklusom predstavlja obećavajuću strategiju u pronalasku prikladnih terapijskih rješenja u liječenju karcinoma. Mehanizam djelovanja nekih postojećih lijekova (karboplatin, cisplatin) podrazumijeva blokiranje jedne ili više faza staničnog ciklusa, a intenzivno se radi i na razvoju kombiniranih terapija te specifičnih biomolekula koje izravno inhibiraju CDK, transkripciju, neograničeni rast stanica te induciraju zaustavljanje staničnog

ciklusa deregulacijom kontrolnih točaka i sl (33, 34).

## 2.5. PRIMJENA KULTURE STANICA U *IN VITRO* ISTRAŽIVANJIMA

Pojam kulture životinjskih stanica podrazumijeva održavanje stanica izoliranih iz tkiva ili organa višestaničnih organizama u kontroliranom umjetnom okolišu, odnosno optimalnim *in vitro* uvjetima, omogućavajući pritom dobivanje homogene populacije stanica kroz više generacija. Stanične kulture jedan su od najmoćnijih biotehnoloških „alata“ današnjice čemu svjedoče razmjeri njihove primjene unutar mnogobrojnih različitih znanstvenih disciplina. Naime, kultura stanica koristi se za proizvodnju visokovrijednih biotehnoloških proizvoda poput virusnih cjepiva, monoklonskih protutijela, rekombinantnih terapijskih proteina, ali i umjetnih tkiva i organa što značajno doprinosi ubrzanom razvoju tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine. Osim toga, služe kao modelni sustavi u farmakološkim, imunološkim, biokemijskim i inim istraživanjima, dok se posebna pozornost pridaje uporabi različitih humanih staničnih linija u *in vitro* procjeni citotoksičnosti novosintetiziranih spojeva s ciljem otkrivanja i razvoja potencijalnih antitumorskih lijekova.

Provedba *in vitro* testova citotoksičnosti na staničnim linijama pokazala se izrazito korisnim alternativnim pristupom u (eko)toksikološkim istraživanjima, obzirom na sveprisutnije znanstvene, ekonomske i etičke zahtjeve s osobitim naglaskom na nedostatke *in vivo* istraživanja na pokusnim životinjama. Shodno tome, u znanstvenim krugovima nastoji se primjenjivati tzv. 3R pristup (engl. *Reduce, Refine, Replace*) koji podrazumijeva zamjenu *in vivo* testova alternativnim *in vitro* metodama kada je god to moguće kako bi došlo do smanjenja učestalosti korištenja pokusnih životinja (35). *In vitro* sustavi pogodni su za praćenje metaboličkih promjena tijekom ispitivanja toksičnosti nepoznate tvari koje uključuje ispitivanja na staničnim frakcijama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, primarnim staničnim linijama i dr (36). Ova ispitivanja temelje se na pretpostavci da se interakcija bioloških sustava i ispitivane tvari ponajprije odvija na staničnoj razini što se uveliko odražava na funkcionalnost i rad stanice pa je razumijevanjem toksičnosti na staničnoj razini moguće pretpostaviti utjecaj tvari i na razini organizma (35). Primjena *in vitro* testova toksičnosti rezultira određivanjem bazalne citotoksičnosti koja označava učinak ispitivane tvari na morfoloiju i preživljenje stanica u kulturi, odnosno cjelokupni metabolizam stanice što može poslužiti kao smjernica za nastavak istraživanja (36).

U tu svrhu najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije dostupne putem banki stanica pri čemu su *American Type Cell Culture (ATCC)* i *European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)* najveće banke stanica. Primarni *in vitro* test, čija je primjena predložena od strane Nacionalnog instituta za rak (engl. *National Cancer Institute, NCI*) devedesetih godina, uključuje 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje novosintetiziranih spojeva, prirodnih ekstrakata i različitih izolata nepoznatog toksikološkog profila u definiranim rasponima koncentracija (35, 36). Svrha preliminarnog *in vitro* testa jest ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju što olakšava otkrivanje potencijalnih terapeutika i probir za provedbu daljnjih istraživanja.

Shodno tome, razvijene su brojne metode za *in vitro* određivanje citotoksičnosti, utemeljene na različitim principima: *Neutral Red* metoda, *Kenacid Blue* metoda, *Trypan Blue* metoda, testovi redukcije tetrazolijeve soli (MTT, MTS, WST-1), metoda otpuštanja laktat-dehidrogenaze (LDH), bojanje bojilom kristal-ljubičasto, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (35). Prednost ovakvog pristupa ogleda se u mogućnosti primjene nekoliko različitih metoda za dobivanje informacija o bazalnoj citotoksičnosti ispitivane tvari i mehanizmu toksičnosti, dok korištenje više različitih staničnih linija može ukazati na selektivnost djelovanja ispitivane tvari prema određenoj vrsti stanica. Osim toga, moguće je u relativno kratkom vremenu analizirati veliki broj uzoraka u širokom rasponu koncentracija, rabe se manje količine ispitivane tvari pa posljedično nastaje i manje toksičnog otpada, postiže se dobra reproducibilnost rezultata i visok stupanj standardizacije (37, 38). Međutim, kako se radi o pojednostavljenom sustavu u odnosu na cjelokupni organizam, teško je opisati interakcije ispitivanih tvari unutar tkiva i organa, odnosno u potpunosti definirati tkivno-specifičnu toksičnost te definirati farmakokinetička svojstva od apsorpcije do eliminacije iz organizma i odrediti kronični učinak (37, 38). Također, odgovor stanica u kulturi može se razlikovati od onoga u *in vivo* uvjetima budući da postizanje učinka ksenobiotika na organizam u cjelini ovisi o mnogobrojnim parametrima kao što su: vrsta stanične linije, metabolička aktivnost stanica, sastav hranjivog medija, uvjeti uzgoja, vrijeme izlaganja stanica djelovanju ispitivanog spoja, primijenjena koncentracija i dr. Usprkos navedenim nedostacima, postiže se i do 80 %-tna podudarnost rezultata *in vitro* i *in vivo* provedenih testova, što *in vitro* testove čini prikladnim alatom za probir spojeva od interesa u različitim znanstvenim istraživanjima.

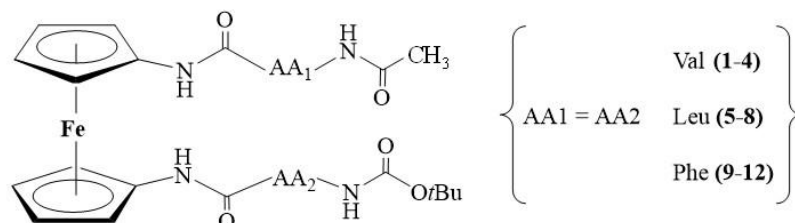


### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Ferocenski peptidomimetici

Kemijske strukture dvanaest homo- i heterokiralnih ferocenskih peptidomimetika ispitivanih u ovom radu prikazane su na slici 3. Ispitivani konjugati ferocen-1,1'-diamina s L- i D-Val (**1-4**), L- i D-Leu (**5-8**) i L- i D-Phe (**9-12**) sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu te su otopljeni u etanolu i čuvani na +4 °C do upotrebe u pojedinačnim eksperimentima. Otapanje spojeva potpomognuto je ultrazvučnom kupelji kako bi se dobile homogene otopine spojeva neposredno prije njihove upotrebe u pojedinačnim eksperimentima.



<b>1</b> (Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc)	<b>5</b> (Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc)	<b>9</b> (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc)
<b>2</b> (Ac-L-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc)	<b>6</b> (Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc)	<b>10</b> (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc)
<b>3</b> (Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc)	<b>7</b> (Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc)	<b>11</b> (Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc)
<b>4</b> (Ac-D-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc)	<b>8</b> (Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc)	<b>12</b> (Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc)

**Slika 3.** Kemijska struktura homo- i heterokiralnih ferocenskih peptidomimetika **1-12**

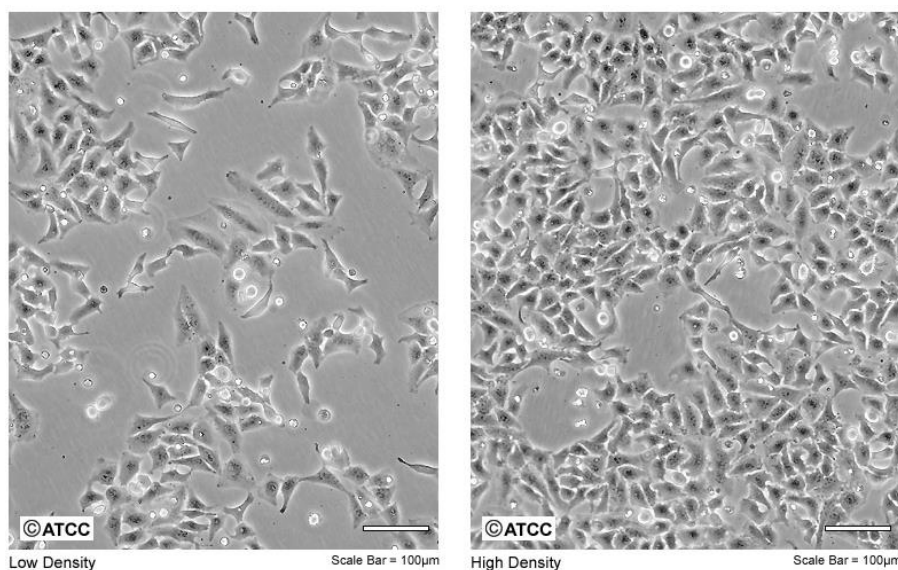
##### 3.1.2. Humane stanične linije

###### 3.1.2.1. Stanična linija HeLa

Stanična linija HeLa (slika 4) prva je besmrtna humana stanična linija pri čemu su stanice izolirane iz adenokarcinoma vrata maternice oboljele pacijentice (39). Proteklih nekoliko desetljeća stanična linija HeLa pridonijela je mnogim znanstvenim postignućima u području toksikologije, stanične biologije, genetike i istraživanja zaraznih bolesti. To je linija

adherentnih, epitelnih tumorskih stanica karakterističnih po iznimno velikoj specifičnoj brzina rasta, izdržljivosti i prilagodljivosti različitim okolišnim uvjetima (40). HeLa stanice predstavljaju robusni stanični model za *in vitro* istraživanja provedena u laboratorijskom, ali i većem mjerilu u bioreaktorima. Njihov uzgoj je relativno brz, jeftin i jednostavan proces, međutim uslijed nepravilnosti u održavanju stanične kulture i velike brzine umnažanja HeLa stanica, one nerijetko postaju kontaminantima ostalih laboratorijskih staničnih kultura, tj. dolazi do pojave unakrsne kontaminacije.

U ovom radu korištena tumorska humana stanična linija HeLa dobivena je iz ATCC radne banke stanica. Za uzgoj je korišten hranjivi medij DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) uz dodatak 10 % seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal Bovine Serum, FBS*), 1 % L-glutamina (L-Gln) i 1 % otopine antibiotika penicilina i streptomcina (Pen/Strep). Uzgoj se provodi u u pločama s jažicama i T-bocama u inkubatoru pri čemu atmosferu čine 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub> uz temperaturu od 37 °C.

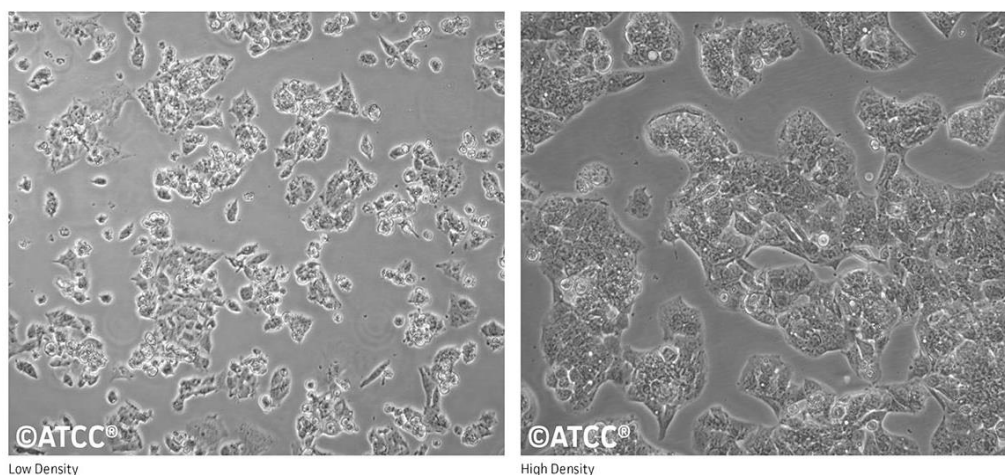


**Slika 4.** Stanična linija HeLa (ATCC,2022)

### 3.1.2.2. Stanična linija HepG2

Ova stanična linija uspostavljena je iz stanica epitelnog tkiva hepatocelularnog karcinoma jetre 15-godišnjeg muškarca (41). Uslijed nedostataka i nepraktičnosti primjene primarnih hepatocita u istraživanjima metabolizma lijekova i hepatotoksičnosti, HepG2 stanice koriste se kao njihove *in vitro* alternative. Usprkos ograničenijim metaboličkim

funkcijama HepG2 stanica u usporedbi s primarnim hepatocitima, visoka dostupnost, robusnost, besmrtnost te stabilan fenotip koji ne ovisi o karakteristikama donora čine ovu staničnu liniju najraširenijom staničnom linijom humanog hepatoma u provedbi farmakotoksikoloških istraživanja. HepG2 stanična linija (slika 5) je morfološki epitelna te adherentna prema načinu uzgoja (42). Njezin uzgoj provodi se u pločama s jažicama ili u T-bocama u inkubatoru pri čemu atmosferu čine 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub> uz temperaturu od 37 °C. Stanična linija HepG2 linija korištena u ovome radu dobivena je iz ATCC radne banke stanica te je za njezin uzgoj korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10 % FBS, 1 % L-Gln i 1 % Pen/Strep otopine.

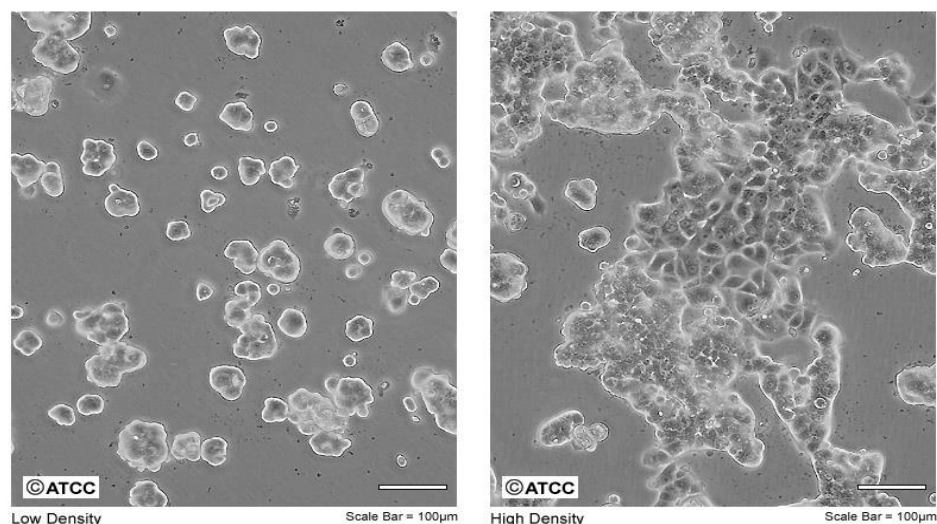


**Slika 5.** Stanična linija HepG2 (ATCC, 2022)

### 3.1.2.3. Stanična linija MCF-7

Humana stanična linija MCF-7 (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*) izolirana je iz pleuralnog izljeva 69-godišnje pacijentice oboljele od metastaziranog adenokarcinoma dojke (43). MCF-7 stanice karakterizira ekspresija estrogenskih, progesteronskih i glukokortikoidnih receptora kao i zadržavanje karakteristika diferenciranog epitela dojke, uključujući sposobnost obrade estrogena, u obliku estradiola, preko citoplazmatskih estrogenskih receptora (ER) (43, 44). Estrogen je nužan za proliferaciju MCF-7 stanica, međutim vezanjem tamoksifena, antagonista estrogena, postiže se inhibicija njihovog rasta što je svojevrsna reakcija na hormonsku terapiju (44). Prethodno spomenuta svojstva ovu staničnu liniju čine pogodnim *in vitro* modelom za proučavanje različitih mehanizama odgovora tumora na eksperimentalnu terapiju. Tijekom *in vitro* uzgoja, ove morfološki epitelne i prema načinu uzgoja adherentne stanice, imaju sposobnost tvorbe kupola.

Za istraživanja opisana u ovom radu, stanična linija MCF-7 dobivena je iz ATCC radne banke stanica (slika 6) (45). Uzgoj MCF-7 stanica provodi se u kontroliranim uvjetima u T-bocama, pločicama s jažicama u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i atmosferi koju čine 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10 % FBS, 1 % L-Gln i 1 % otopine Pen/Strep.



**Slika 6.** Stanična linija MCF-7 (ATCC, 2022)

### 3.1.3. Kemikalije

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma-Aldrich, Njemačka
- FBS (fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- DPBS Modified 10 X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DMSO (dimetilsulfoksid), Gram-Mol, RH
- Trypan blue, 0,4 % solution, Lonza, Švicarska
- PI (propidijev jodid), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Annexin V Alexa-flour 647, BioLegend, SAD
- MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil]tetrazolijev bromid}, Sigma-Aldrich, Njemačka
- HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kiselina), Carl Roth
- NaCl, Honeywell Fluka, Thermo Fisher Scientific
- CaCl<sub>2</sub>, Gram Mol

- RNase A, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Etanol 96 %, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pen/Strep solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- L-Glutamine, Sigma-Aldrich, Njemačka

#### 3.1.4. Uređaji i oprema

- Laminar za sterilni rad (BIOAIR Safemate 1.2), Italija
- CO<sub>2</sub> Inkubator za uzgoj stanica (BINDER CB 170), Njemačka
- Inverzni mikroskop, Micros, Austrija
- Termo mikser, Thermo Fisher Scientific
- T-boce od 75 cm<sup>2</sup> za uzgoj staničnih kultura
- Testne ploče s jažicama (6 i 96) za uzgoj staničnih kultura
- Čitač mikrotitarskih pločica (Hidex Chameleon V)
- Bürker-Turk komorica za brojanje, Thermo Fisher Scientific
- Laboratorijski pribor (automatski pipetor, serološke pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, epruvete)
- Centrifuga (Sorvall LYNX 6000), Thermo Fisher Scientific
- Centrifuga (Thermo Scientific SL8R), Thermo Fisher Scientific
- FACSVerse protočni citometar, Becton-Dickinson
- Laboratorijska analitička vaga (Balance XPR106DUHQ), Mettler Toledo
- Ultrazvučna sonična kupelj, Thermo Fisher Scientific

#### 3.1.5. Pufferi

- PBS 1x puffer
  - PBS 10x 100 mL
  - destilirana voda (do 1000 mL)
- Annexin V vezujući puffer
  - pH = 7,4
  - 10 mM HEPES 0,238 g

- 0,14 M NaCl 0,817 g
- 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> 0,028 g
- destilirana voda (do 100 mL)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice za uzgoj prethodno su pohranjene u parama tekućeg dušika u mediju za zamrzavanje. Uzgoj započinje odmrzavanjem, odnosno uranjanjem ampula sa stanicama u vodenu kupelj temperiranu na 37 °C. Po završetku otapanja, sadržaj ampula prenosi se u kivetu s 10 mL hranjivog medija. Potom slijedi centrifugiranje stanica pri 250 xg nakon čega se supernatant pažljivo ukloni, a stanice resuspendiraju u svježem hranjivom mediju. Stanice se prebacuju u T-boce za uzgoj i stavljaju u inkubator u kojem vladaju optimalni uvjeti za rast stanica (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Ovakav način uzgoja omogućava održavanje potrebne biomase stanica za postavljanje pojedinačnih pokusa u testne ploče sa 6 i 96 jažica u kojima se provodilo ispitivanje biološke aktivnosti ferocenskih peptidomimetika.

Uzgoj stanica svakodnevno se kontrolira pomoću inverznog mikroskopa pri čemu se prati njihova morfologija, brojnost te prihvaćanje za podlogu. Kada je pokrivenost podloge veća od približno 80 % njezine ukupne površine, stanice je potrebno precijepiti kako bi se spriječio njihov ulazak u stacionarnu fazu rasta uslijed pojave kontaktne inhibicije. Redovitim kontroliranjem uzgoja moguće je pravovremeno uočiti kontaminaciju stanične kulture, dok se precjepljivanjem stanica nadomještaju iscrpljene komponente medija i uklanjanju metabolički produkti čime se sprječava narušavanje optimalnih uvjeta za uzgoj stanica i njihovog fiziološkog stanja.

### 3.2.2. Određivanje broja stanica uz dodatak tripsanskog modrila

Za utvrđivanje broja stanica najprije je potrebno ukloniti hranjivi medij, površinu za uzgoj isprati sterilnim PBS puferom, a potom dodati proteolitički enzim tripsin koji služi za odvajanje adherentnih stanica od podloge za uzgoj. T-boca i/ili ploča za uzgoj stavlja se u inkubator na 5 minuta kako bi se stanice odvojile od podloge. Njihovo odvajanje od podloge očituje se u promjeni oblika što se prati pod inverznim mikroskopom. Naime, stanice izložene djelovanju tripsina postaju plutajuće i pravilnog, kružnog oblika. Reakcija

tripsinizacije zaustavlja se dodatkom hranjivog medija sa serumom koji sadrži inhibitore proteaza. Alikvot suspenzije stanica (20  $\mu\text{L}$ ) pomiješa se s 80  $\mu\text{L}$  otopine tripanskog modrila nakon čega se 10  $\mu\text{L}$  tako pripremljene suspenzije nanese u Bürker-Türk-ovu komoricu za brojanje (slika 7). Dodatkom tripanskog modrila omogućuje se razlikovanje mrtvih od živih stanica pri čemu se ono zadržava unutar mrtvih stanica koje posljedično poprime plavo obojenje, dok se u onih živih modrilo izbacuje van pa ostaju neobojane. Pod inverznim mikroskopom prebrojali smo stanice u 4 velika rubna kvadranta komorice, a broj stanica/mL izračuna se prema izrazu:

$$N (\text{stanica/ml}) = \frac{X}{4} \times 10^4 \times 5 \quad [1]$$

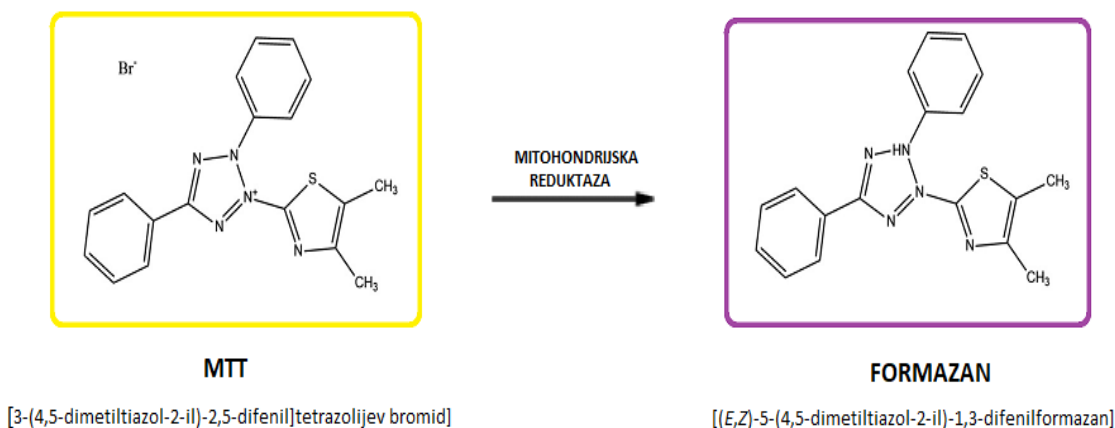
gdje je X- zbroj stanica u 4 kvadranta.



**Slika 7.** Prikaz kvadrata komorice za brojanje.

### 3.2.3. Određivanje citotoksične aktivnosti ( $\text{IC}_{50}$ ) MTT metodom

MTT test je kolorimetrijska metoda za praćenje metaboličke aktivnosti stanica koja se temelji na enzimskoj konverziji tetrazolijeve soli (MTT) u kristale formazana netopljivih u vodi (46). Drugim riječima, djelovanjem staničnih NAD(P)H-ovisnih oksidoreduktaza u živim stanicama dolazi do redukcije tetrazolijeve soli žute boje u ljubičasto obojene kristale formazana (slika 8) što se može pratiti spektrofotometrijski. U optimiziranim uvjetima, dobivena vrijednost apsorbancije direktno je proporcionalna broju živih stanica.



**Slika 8.** Mehanizam MTT metode

Priprema uzoraka za analizu:

Stanice HeLa ( $3 \times 10^3$  stanica/jažica), HepG2 ( $3 \times 10^3$  stanica/jažica) i MCF-7 ( $5 \times 10^3$  stanica/jažica) nacijepe se u mikrotitarske pločice s 96 jažica i stave u inkubator na  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  i 95 % vlage tijekom 24 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon prihvaćanja stanica za podlogu, kontrolnim stanicama dodaje se samo hranjivi medij, dok se ostale stanice tretiraju ispitivanim ferocenskim spojevima u rastućim koncentracijama od 5, 10, 50, 100 i  $350 \mu\text{M}$  te inkubiraju tijekom 72 sata. Nadalje, potrebno je očitati jednu od pločica s nacijepljenim stanicama tzv. nultog dana kako bi se dobila apsorbancija početnog broja stanica. Po završetku trodnevnog tretmana stanica ispitivanim spojevima, ukloni se hranjivi medij iz jažica i doda  $40 \mu\text{L}$   $0,5 \text{ mg/mL}$  MTT-a u mediju te vrati stanice u inkubator. Nakon 4 sata inkubacije, u sve jažice potrebno je dodati  $160 \mu\text{L}$  DMSO-a, a potom dobro promiješati sadržaj u jažicama kako bi se otopio ljubičasti formazanski produkt. Apsorbancija nastale obojane otopine kvantificira se mjerenjem pri valnoj duljini od 595 nm na Hidex Chameleon V čitaču mikrotitarskih pločica pri čemu je izmjerena apsorbancija proporcionalna broju živih stanica.

Vijabilnost stanica izračunava se relativno na kontrolne uzorke prema sljedećim izrazima:

- za  $(OD_{test} - OD_{tnula}) \geq 0$  slijedi:

$$preživljenje = 100 \times \frac{(OD_{test} - OD_{tnula})}{(OD_{kontrola} - OD_{nula})} \quad [2]$$

- za  $(OD_{test} - OD_{tnula}) < 0$  slijedi:



$$preživljenje = 100 \times \frac{(OD_{test} - OD_{tnula})}{OD_{tnula}} \quad [3]$$

( $OD_{tnula}$  – apsorbanacija stanica prije dodatka spojeva,  $OD_{test}$  – apsorbanacija nakon inkubacije sa spojevima,  $OD_{kontrola}$  – apsorbanacija netretiranih stanica nakon inkubacije od 72 h).

Svaki test je napravljen u četverplikatu, a pokus je ponovljen najmanje dva puta.

#### 3.2.4. Određivanje učinaka ferocenskih peptidomimetika na stanične procese protočnom citometrijom

Protočna citometrija omogućuje istodobno mjerenje nekoliko različitih fizičkih karakteristika velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu što je čini jednom od najzastupljenijih metoda za karakterizaciju i analizu bioloških sustava. Osim razlikovanja stanica na temelju izgleda i volumena, ovom metodom moguće je provoditi i analizu mehanizama djelovanja tvari na stanične procese poput stanične smrti i staničnog ciklusa, ali i istraživanje staničnih komponenti (stanične jezgre i organela, DNA, RNA, citokina i sl.) što je potpomognuto osjetljivim i specifičnim fluorescentnim sondama tj. antitijelima (47). Protočni citometri rade na principu raspršivanja svjetla i fluorescencije tvari kojom su obilježene ispitivane stanice pri čemu je detektirano raspršivanje povezano sa strukturnim i morfološkim značajkama stanice, dok je fluorescirajuće zračenje proporcionalno količini fluorescirajuće tvari vezane za određenu staničnu komponentu (47, 48). Stanice suspendirane u otopini injektiranjem se unose u fluidni sustav, hidrodinamički fokusiraju te pojedinačno analiziraju fokusiranim laserskim snopom zraka koji prolazi okomito na fluidni kanal. Tijekom analize, citometrijski sustav za svaku stanicu prikuplja informacije o intenzitetu raspršenja, odnosno reflektiranoj prednjoj i bočnoj svjetlosti. Pri tom, prednja reflektirana svjetlost daje podatke karakterizaciju veličina čestica i indeks loma, dok se podaci o bočnoj reflektiranoj svjetlosti omogućuju ispitivanje unutarnje strukture stanice (49). Izoliranje boje za pojedinačnu fluorescentnu sondu omogućeno je različitim filterima smještenim ispred svakog pojedinačnog detektora.

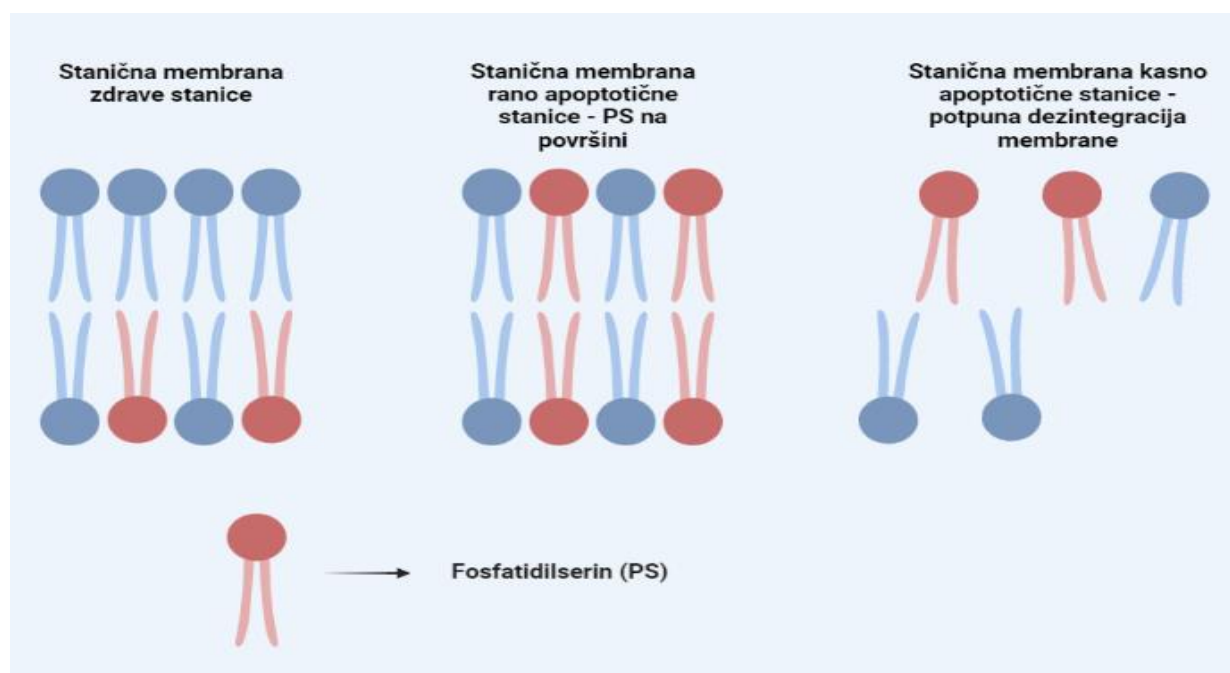
##### 3.2.4.1. Određivanje stanične smrti protočnom citometrijom

Praćenje odumiranja stanica nekim od mehanizama stanične smrti i međusobno razlikovanje stanica protočnom citometrijom temelji se između ostalog na razlici u veličini stanica, njihovom

obilježavanju specifičnom fluorescentnom bojom i sl. U ovom radu provedena je kvantitativna analiza živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi pomoću FACSVerse (Becton-Dickinson) protočnog citometra pri čemu je razlikovanje navedenih staničnih populacija potpomognuto fluorescentno obilježenim rekombinantnim proteinom Annexin V i propidij-jodidom (PI). Naime, u ranoj fazi apoptoze dolazi do translociranja fosfolipida fosfatidilserina (PS) na vanjsku stranu stanične membrane pri čemu se protein Annexin V specifično veže na PS i tako omogućuje detekciju ranih apoptotičkih promjena (slika 9) (50).

Dodatnim bojanjem s PI, fluorescentnom molekulom visokog afiniteta prema nukleinskim kiselinama koja ulazi u oštećene mrtve stanice te veže za DNA i fluorescira, moguće je pratiti narušavanje ukupne funkcionalnosti u kasnijoj fazi apoptoze kao posljedice narušavanja integriteta stanične membrane (50).

Stoga se razlikuju tri populacije stanica: (i) žive i zdrave stanice (Annexin V (-) i PI (-)); (ii) rano apoptotične stanice (Annexin V (+) i PI (-)); (iii) kasno apoptotične stanice (Annexin V (+) i PI (+)).



**Slika 9.** Razlike u očuvanja integriteta stanične membrane zdrave i apoptotične stanice

#### Priprema uzoraka za analizu:

U testne ploče sa 6 jažica nacijepi se  $2 \times 10^5$  stanica/jažica i to za tri stanične linije (HeLa, HepG2, MCF-7), a potom stavi inkubirati tijekom 24 sata. Sljedećeg dana stanice se tretiraju s

ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima i to u koncentracijama približnim IC<sub>50</sub>-vrijednostima prethodno određenim MTT metodom pri čemu je vrijeme ekspozicije za jedan dio uzoraka stanica 24 sata, a za drugi 48 sati. U oba slučaja, po završetku tretmana, stanice se tripsiniziraju, jedanput ispiru PBS-om i Annexin V vezujućim puferom, a zatim inkubiraju 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi u 50 µL AnnV pufera s 3 µL Annexin V Alexa-fluor 647 i 1 µg/mL propidijeva jodida. Nakon inkubacije, u svaki uzorak dodaje se 300 µL PBS-a, a zatim nježno resuspendira kako agregati stanica ne bi nepovoljno utjecali na tijek analize u uređaju. Analiza se provodi prema uputama proizvođača pomoću FACSVerse (Becton-Dickinson) protočnog citometra i to pri ekscitaciji od 488 nm dok se fluorescencija prikuplja na 586/42 nm filteru (za propidij-jodid) te pri ekscitaciji od 633 nm dok se fluorescencija prikuplja na 660/10 nm filteru (Annexin V AlexaFluor 647). U svakom uzorku analizira se po 10000 stanica.

#### *3.2.4.2. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom*

Praćenje promjena u staničnom ciklusu omogućeno je mjerenjem količine DNA pri čemu je vizualizacija stanica potpomognuta fluorescentnim propidijevim jodidom (PI) koji interkalira u DNA i fluorescira uslijed pobuđivanja laserom. Protočnim citometrom izmjereni intenzitet fluorescencije direktno je proporcionalan količini DNA u stanici čime se stanice klasificiraju unutar G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub>/M faza staničnog ciklusa.

#### Priprema uzoraka za analizu:

U testne ploče sa 6 jažica nacijepi se  $2 \times 10^5$  stanica/jažica i to za tri stanične linije (HeLa, HepG2, MCF-7), a potom stavi inkubirati tijekom 24 sata. Sljedećeg dana stanice se tretiraju s ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima i to u koncentracijama približnim IC<sub>50</sub>-vrijednostima. Nakon 48 sati tretmana stanice se tripsiniziraju, skupe u prethodno označene epruvete, centrifugiraju te ispiru dva puta s PBS-om. Nadalje, stanice je potrebno fiksirati u ledeno hladnom 70 % - tnom etanolu i pohraniti u zamrzivaču na -20 °C do dana analize. Neposredno prije analize, stanice se ispiru dva puta s PBS-om, a zatim inkubiraju 20 minuta pri 37 °C s 0,1 µg/µL RNase A. Stanicama se potom dodaje 150 µL propidij-jodida konačne koncentracije 50 µg/mL nakon čega slijedi inkubacija na ledu tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, 20000 stanica analizira se na FACSVerse protočnom citometru pri ekscitaciji od 488 nm dok se fluorescencija prikuplja na 586/42 nm filteru. Postotak stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa određuje se pomoću FlowJo softvera.

### 3.2.5. Obrada podataka

Dobiveni rezultati prezentirani su kao prosječne vrijednosti ( $\bar{x}$ ) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [4]$$

iskazani zajedno s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [5]$$

pri čemu je  $n$  ukupan broj uzoraka u skupini, a  $x_i$  pojedinačna vrijednost uzoraka. Dobiveni histogrami analizirani su u FlowJo programskom paketu (TreeStar Inc.).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Obzirom na ograničenu terapijsku primjenu prirodnih proteina i peptida, posebnu pozornost pri pronalasku novih potencijalnih antitumorskih lijekova privlače peptidomimetici kod kojih strukturalna svojstva i visoka specifičnost znatno doprinose njihovoj citotoksičnosti. Pri tom, ranije je utvrđeno da se antitumorski peptidomimetici mogu vezati na ciljane proteine te oponašati ključne interakcije u aktivaciji apoptotične smrti stanica, a djeluju i kao inhibitori PPI u stanicama raka (1, 2).

Pravilno nabiranje peptidnih lanaca ključno je za kontrolirano usmjerenje PPI i biološku aktivnost peptida. Ograničavanje fleksibilnosti i povećanje stabilnosti, odnosno „zaključavanje“ peptida u bioaktivnu konformaciju, omogućeno je umetanjem rigidnih kalupa poput ferocena unutar peptidne sekvencije. Uz to, redoks-potencijal organometalnih spojeva mogao bi omogućiti otkrivanje manje toksičnih kandidata za lijekove protiv raka na bazi metala s potencijalno novim načinima djelovanja i prevladavanjem rezistencije na platinu (10). Također, prilikom dizajna potencijalnih terapijskih peptida ne treba zanemariti važnost utjecaja drugih strukturalnih komponenti (npr. aminokiselina) na njihovu biološku aktivnost.

Shodno tome, dvanaest homo- i heterokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D-Val, Leu i Phe podvrgnuti su *in vitro* biološkoj evaluaciji s ciljem ispitivanja utjecaja postignute konformacije peptida na njihov antitumorski učinak. Drugim riječima, ispitan je utjecaj kemijske strukture peptida, kiralnosti, voluminoznosti i lipofilnosti konstitutivnih aminokiselinskih sekvenci te N-terminalne zaštitne skupine na inhibiciju rasta stanica adenokarcinoma vrata maternice (stanična linija HeLa), stanica adenokarcinoma dojke (stanična linija MCF-7) te stanica hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Citotoksičnost ispitivanih peptida određena je MTT-testom uz izračunavanje pripadajućih IC<sub>50</sub>-vrijednosti pri čemu su svakodnevno u nativnim uvjetima praćene i morfološke promjene stanica tretiranih ispitivanim peptidima. Obzirom da antitumorski terapeutici mogu uzrokovati poremećaje u staničnom ciklusu u vidu zastoja u pojedinim fazama, narušiti integritet stanične membrane, ali i inducirati staničnu smrt, antitumorski potencijal ferocenskih peptidomimetika dodatno je ispitan protočnom citometrijom kojom je provedena analiza vezanja Annexina V i PI tijekom 24- i 48-satnog tretmana stanica.

Ovakvo sustavno provođenje *in vitro* testova prvi je korak u ispitivanju biološki aktivnih spojeva i služi kao preliminarna smjernica u procesu dizajna novih lijekova.

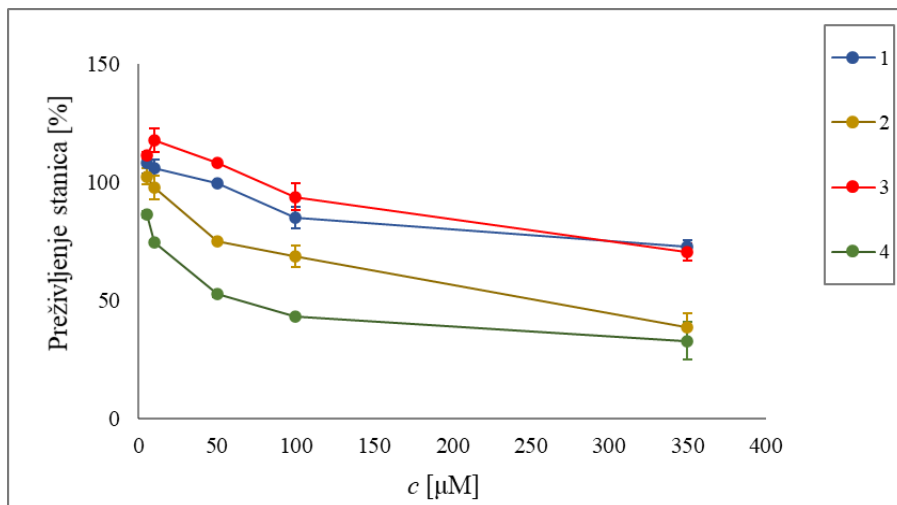
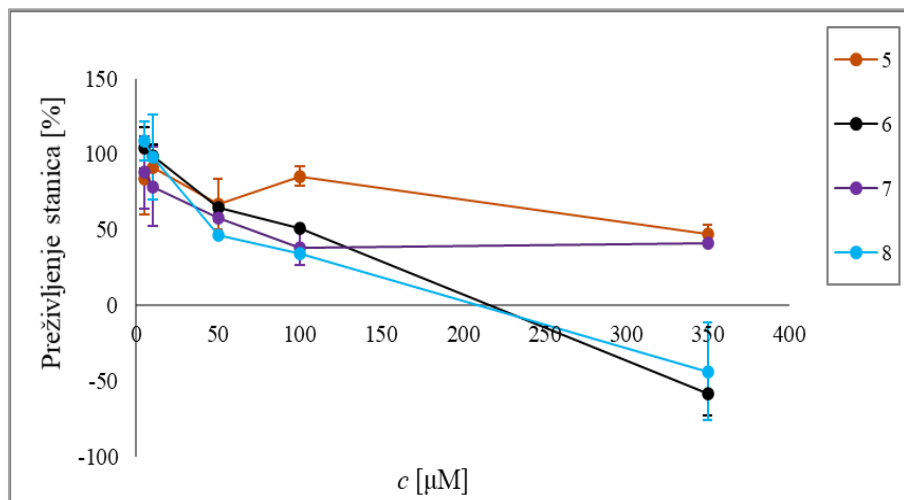
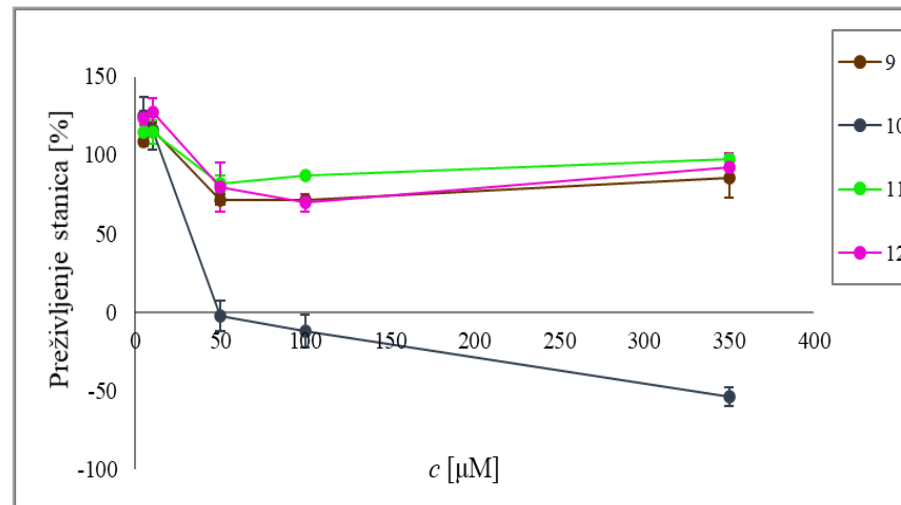
#### 4.1. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA 1-12 NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HeLa, MCF-7 I HepG2

Biološka aktivnost homo- i heterokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D-Val (1-4), L- i D-Leu (5-8) i L- i D-Phe (9-12) (tablica 1) ispitana je *in vitro* na trima tumorskim staničnim linijama: HeLa, MCF-7 i HepG2.

**Tablica 1.** Ispitivani homo- (1, 3, 5, 7, 9 i 11) i heterokiralni (2, 4, 6, 8, 10 i 12) ferocenski peptidomimetici

<b>Spoj</b>	<b>Struktura</b>
<b>1</b>	Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc
<b>2</b>	Ac-L-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc
<b>3</b>	Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc
<b>4</b>	Ac-D-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc
<b>5</b>	Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc
<b>6</b>	Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc
<b>7</b>	Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc
<b>8</b>	Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc
<b>9</b>	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc
<b>10</b>	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc
<b>11</b>	Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc
<b>12</b>	Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc

Citotoksičnost testiranih peptida (1-12) određena je pomoću MTT metode i primjenom Hidex Chameleon V čitača mikrotitarskih pločica nakon tretmana stanica ispitivanim spojevima u rastućim koncentracijama od 5, 10, 50, 100 i 350  $\mu\text{M}$  tijekom 72 sata. Dobiveni rezultati, prikazani na slikama 1-3, izraženi su grafički kao ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji spojeva ( $\mu\text{M}$ ) kojima su tretirane u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Rezultati *in vitro* istraživanja citotoksičnosti poslužili su probiranju spojeva za daljnja ispitivanja njihovog antitumorskog djelovanja pri čemu je niži postotak preživljenja ukazivao na veći citotoksični potencijal.

**(a)****(b)****(c)**

**Slika 10.** Utjecaj homo-i heterokiralnih ferocenskih konjugata s L- i D -aminokiselinama [(a) Val (1-4), (b) Leu (5-8), (c) Phe (9-12)] u koncentracijama 5-350 μM na preživljenje HeLa stanica kroz 72-satni tretman. Za svaku točku prikazana je srednja vrijednost ± S.D. od n=2 biološka eksperimenta

Prema rezultatima prikazanim na slici 10, svi ispitivani spojevi pokazuju inhibični učinak na rast stanične linije HeLa. Osim toga, rezultati upućuju na postojanje odnosa doza-učinak gdje je inhibični učinak ispitivanih spojeva na rast stanica ovisan o primijenjenoj koncentraciji pojedinog spoja, odnosno povećanje koncentracije spoja rezultira manjim % preživljenja HeLa stanica. Izuzetak su oba homokiralna Phe-konjugata **9** i **11** te heterokiralni Phe-konjugat **12** koji pokazuju slabije antiproliferativno djelovanje prema HeLa stanicama pri čemu maksimalni inhibični učinak na stanični rast dosežu već pri koncentraciji iznad 50  $\mu\text{M}$  (slika 10(c)).

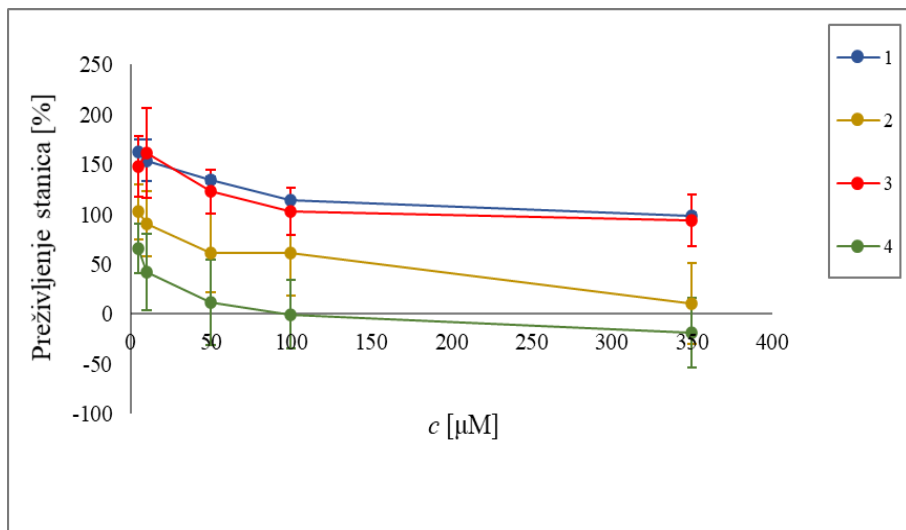
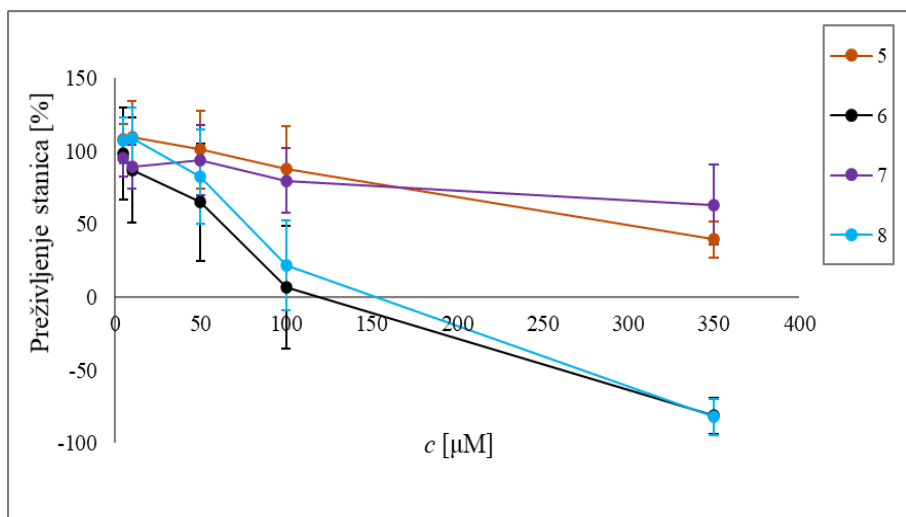
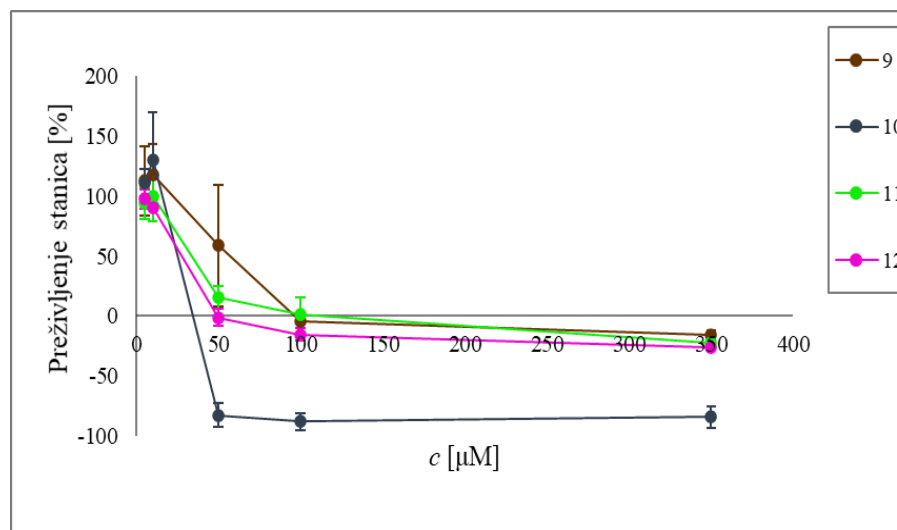
Kod peptidomimetika s Val-bočnim ograncima (**1-4**) prikazanih na slici 10(a), vidljivo je kako oni heterokiralni (**2** i **4**) pokazuju veći inhibični učinak u odnosu na homokiralne (**1** i **3**). Pri tome, postotak preživljenja stanica tretiranih najvišom koncentracijom (350  $\mu\text{M}$ ) iznosi 38,66 % za spoj **2**, odnosno 32,92 % za spoj **4**, dok je preživljenje stanica tretiranih homokiralnim peptidima **1** i **3** pri istoj koncentraciji iznad 50 %.

Nadalje, peptidomimetici s Leu-bočnim ograncima (**5-8**) također pokazuju različit inhibični učinak ovisno o kiralnosti peptidne okosnice pri čemu su najveći utjecaj na preživljenje HeLa stanica pokazali heterokiralni peptidi **6** i **8** (slika 10(b)). Naime, spojevi **6** i **8** osim inhibičnog učinka na rast stanične linije HeLa, pokazali su i toksičnost pri koncentracijama većim od 100  $\mu\text{M}$  pa je tako pri najvišoj koncentraciji od 350  $\mu\text{M}$  spoj **6** bio letalan prema 57,85 %, odnosno spoj **8** prema 43,6 % početne kulture stanica. Homokiralni spojevi **5** i **7** pri najvišoj koncentraciji pokazuju inhibični učinak na preživljenje stanica od 47,3 % odnosno 41,36 %.

Drastično smanjenje postotka preživljenja HeLa stanica tretiranih peptidomimetici s Phe-bočnim ograncima primjetno je samo za heterokiralni konjugat **10** koji već pri koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  postaje toksičan dok pri 350  $\mu\text{M}$  ubija 54,07 % početne kulture stanica (slika 10(c)). Spojevi **9**, **11** i **12** pri koncentraciji od 350  $\mu\text{M}$  ne pokazuju značajan inhibični učinak, odnosno postotak preživljenja stanica nije manji od 85 %.

Općenito, dobiveni rezultati citotoksičnosti spojeva **1-12** prema staničnoj liniji HeLa ukazuju na njezinu podložnost ponajviše djelovanju heterokiralnih ferocenskih konjugata s Val i Leu bočnim ogrankom, dok se pojedinačno najučinkovitijim spojem u inhibiciji rasta HeLa stanica u odnosu na sve ispitivane spojeve, pokazao heterokiralni Phe-konjugat **10**.



**(a)****(b)****(c)**

**Slika 11.** Utjecaj homo-i heterokiralnih ferocenskih konjugata s L- i D-aminokiselinama [(a) Val (1-4), (b) Leu (5-8), (c) Phe (9-12)] u koncentracijama 5-350  $\mu\text{M}$  na preživljenje MCF-7 stanica kroz 72-satni tretman. Za svaku točku prikazana je srednja vrijednost  $\pm$  S.D. od  $n=2$  biološka eksperimenta

Iz prikazane ovisnosti postotka preživljenja stanica o primijenjenoj koncentraciji pojedinog spoja na slici 11(a) vidljivo je kako najveći inhibitorni učinak prema MCF-7 stanicama iz skupine ferocenskih konjugata s Val pokazuju heterokiralni spojevi **2** i **4**. Pri najvišoj koncentraciji (350  $\mu$ M) preživljenje stanica uslijed tretiranja spojem **2** iznosi 10,52 %, dok za spoj **4** već pri koncentraciji od 50  $\mu$ M ono iznosi 11,54 % što daljnjim povećanjem koncentracije rezultira toksičnošću spoja **4** te on ubija 18,74 % početne kulture stanica pri 350  $\mu$ M.

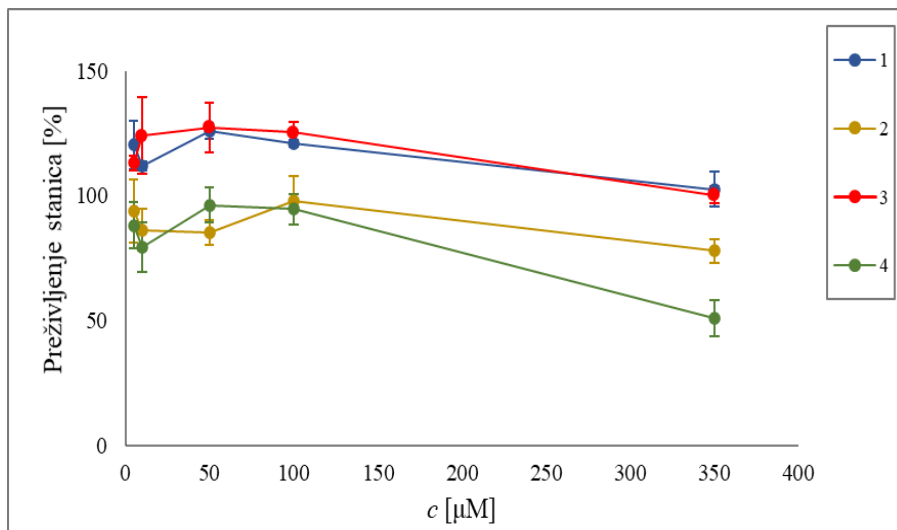
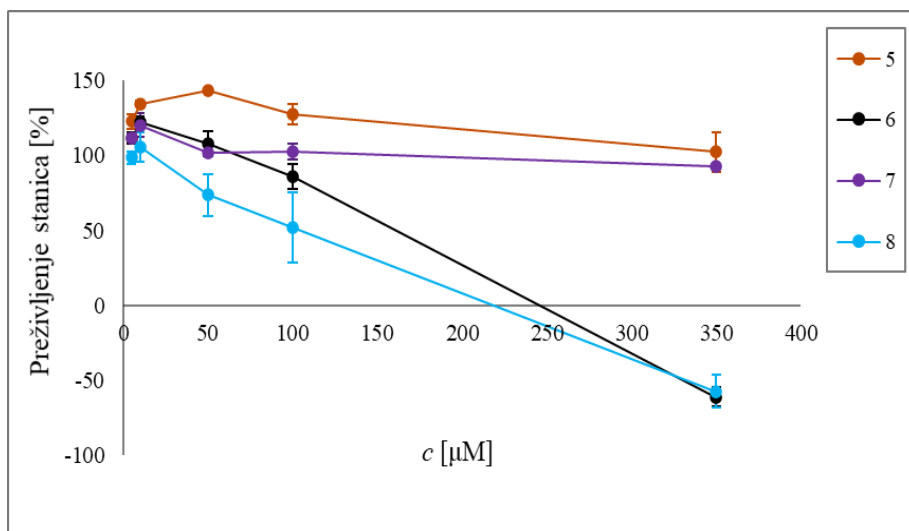
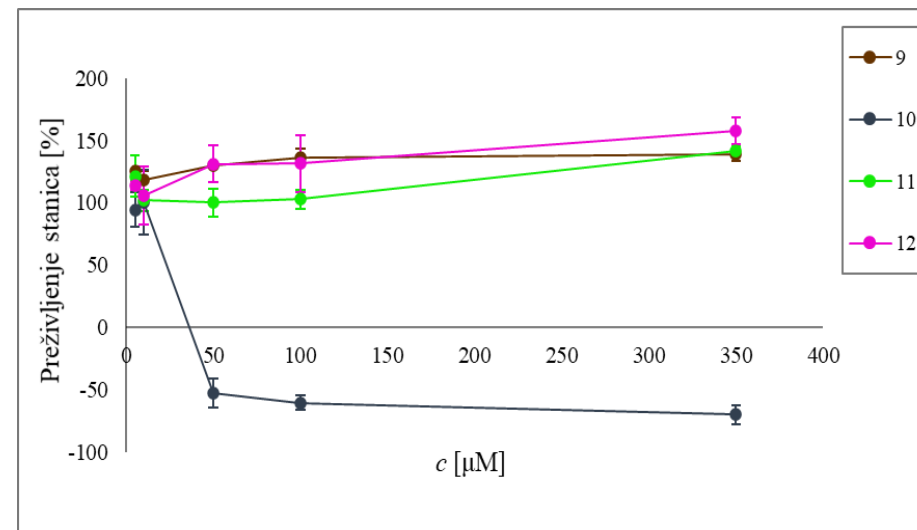
Nadalje, najveći inhibitorni utjecaj homokiralnih ferocenskih peptidomimetika s Leu-bočnim ograncima na rast stanične linije MCF-7 postiže se tretmanom stanica spojem **5** gdje je za koncentraciju od 350  $\mu$ M preživljenje stanica 39,73 % (slika 11(b)). Za razliku od homokiralnih, heterokiralni spojevi iz ove skupine (**6** i **8**) pokazuju i toksičnost pri koncentraciji od 350  $\mu$ M i pri tome djeluju letalno na približno 82 % početne kulture stanica (slika 11(b)).

Najveću osjetljivost MCF-7 stanice pokazuju prilikom tretmana ferocenskim konjugatima s Phe (**9-12**) kao što je i vidljivo na slici 11(c). U ovome slučaju nije utvrđena drastična razlika u citotoksičnom djelovanju na preživljenje stanica između homokiralnih i heterokiralnih peptida kao što je to bilo za spojeve s Val- i Leu-ostacima gdje su se najaktivnijim pokazali heterokiralni spojevi.

Također, na slici 11(c) primjetno je kako osim najvećeg inhibitornog učinka kojeg Phe-konjugati **9-12** postižu u odnosu na druge dvije skupine ferocenskih konjugata s Val i Leu, oni djeluju i letalno na staničnu liniju MCF-7.

Međutim, heterokiralni spoj **10** se, kao i u slučaju ispitivanja njegovog utjecaja na preživljenje stanične linije HeLa, i ovoga puta pokazao najučinkovitijim u odnosu na ostale ispitivane spojeve. Naime, pri koncentraciji od 50  $\mu$ M ovaj spoj naglo postaje toksičan pri čemu odumire 82,32 % početne kulture MCF-7 stanica.

Ispitivanje utjecaja nosintetiziranih ferocenskih peptidomimetika na proliferaciju stanica provedeno je i na staničnoj liniji HepG2. Iz grafičkog prikaza rezultata citotoksičnosti ferocenskih peptidomimetika (**1-12**) prema staničnoj liniji HepG2 (slika 12) vidljivo je kako inhibitorni učinak na preživljenje stanica pokazuje samo 5 od 12 ispitivanih peptidomimetika, što predstavlja znatno manju osjetljivost ove stanične linije prema ispitivanim peptidomimeticima u odnosu na HeLa i MCF-7 stanične linije prema kojima su gotovo svi ispitivani peptidomimeticima pokazali manji ili veći antiproliferativni učinak.

**(a)****(b)****(c)**

**Slika 12.** Utjecaj homo-i heterokiralnih ferocenskih konjugata s L- i D -aminokiselinama [(a) Val (1-4), (b) Leu (5-8), (c) Phe (9-12)] u koncentracijama 5-350 μM na preživljenje HepG2 stanica kroz 72-satni tretman. Za svaku točku prikazana je srednja vrijednost ± S.D. od n=2 biološka eksperimenta

Primjetno je kako su samo heterokiralni ferocenski peptidomimetici **2**, **4**, **6**, **8** i **10** djelovali inhibitorno, dok tretiranjem ostalim spojevima i pri najvišoj koncentraciji (350  $\mu\text{M}$ ) nije postignut antiproliferativni učinak (slika 12). Pri tome, najveći inhibitorni učinak postigli su Leu-konjugati **6** i **8** kod kojih povećanjem koncentracije iznad 100  $\mu\text{M}$  dolazi do toksičnog učinka na tretirane HepG2 stanice gdje tretiranjem stanica spojem **6** u koncentraciji od 350  $\mu\text{M}$  odumire 67 %, dok u slučaju konjugata **8** odumire 57 % početne kulture stanica (slika 12(b)). Spoj **10** postaje toksičan već pri koncentraciji manjoj od 50  $\mu\text{M}$ , dok je daljnje povećanje koncentracije ovog ferocenskog peptidomimetika rezultiralo odumiranjem 69,90 % početne kulture stanica (slika 12(c)).

Ovakvi rezultati, prema kojima se stanična linija HepG2 pokazala najotpornijom na djelovanje ferocenskih biokonjugata **1–12**, koreliraju s prethodno provedenim ispitivanjima citotoksičnosti ferocenskih derivata poput onoga provedenog od strane Kovač i sur. (2016). Naime, ferocenski peptidomimetik kod kojeg je peptidna veza modificirana oksalamidnom podjedinicom podvrgnut je biološkoj evaluaciji, odnosno određivanju citotoksičnosti prema staničnim linijama HEK293T, HeLa i HepG2 u rasponu koncentracija 1-350  $\mu\text{M}$ . Negativan utjecaj ispitivanog peptidomimetika na proliferaciju stanica utvrđen je prema staničnim linijama HEK293T i HeLa i to pri koncentracijama  $\geq 100 \mu\text{M}$ , dok je antiproliferativno djelovanje spoja prema HepG2 stanicama izostalo čak i prilikom tretiranja stanica maksimalnom koncentracijom (350  $\mu\text{M}$ ). Osim toga, isti peptidomimetik je istovremeno inhibirao rast tumorskih stanica *in vitro* i stimulirao rast normalne stanične linije HEK293T te je prvi put opažen dvojak učinak peptidomimetika, tzv. hormetički efekt kojim se opisuje povoljni učinak niskih koncentracija ispitivane tvari i inhibitorni učinak viših koncentracija (51).

Iako u recentnim istraživanjima novi modeli ferocenskih peptidomimetika s modificiranom peptidnom vezom i oni izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina pokazuju inhibitorni učinak na rast stanične linije HepG2, ona i dalje ne pokazuje veću osjetljivost u odnosu na druge stanične linije, što je potvrđeno i u ovome radu (52, 53). Međutim, valja istaknuti kako su do sada najniže  $\text{IC}_{50}$ -vrijednosti ferocenskih spojeva prema HepG2 stanicama izračunate upravo u ovome istraživanju, što ukazuje na opravdanost optimizacije ispitivanih nosintetiziranih ferocenskih peptidomimetika u cilju pripreme konjugata s antiproliferativnom aktivnošću prema staničnoj liniji HepG2.

Iz dobivenih krivulja ovisnosti preživljenja stanica o dozi testiranog spoja određena je  $\text{IC}_{50}$ -vrijednost (engl. *Half-maximal Inhibitory Concentration*) definirana kao koncentracija

testiranog spoja kojom se postiže 50 %-tna inhibicija staničnog rasta. Za peptide koji u rasponu ispitivanih koncentracija (5–350  $\mu\text{M}$ ) tijekom 72-satnog tretmana nisu postigli 50 %-tnu inhibiciju staničnog rasta, izračunate  $\text{IC}_{50}$ - vrijednosti prelaze 350  $\mu\text{M}$  te se smatra kako ne djeluju inhibitory na stanični rast tretiranih tumorskih stanica (tablica 2).

**Tablica 2.**  $\text{IC}_{50}$ -vrijednosti ferocenskih konjugata (**1-12**) izračunate iz krivulja preživljenja za stanične linije HeLa, HepG2 i MCF-7

		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Spoj	<i>HeLa</i>	<i>HepG2</i>	<i>MCF-7</i>
	<b>1</b>	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Val-konjugati</b>	<b>2</b>	262 $\pm$ 19	n.d.	219 $\pm$ 132
	<b>3</b>	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>4</b>	64,4 $\pm$ 4,9	n.d.	33,9 $\pm$ 41
	<b>5</b>	331 $\pm$ 39	n.d.	261 $\pm$ 97
<b>Leu-konjugati</b>	<b>6</b>	102 $\pm$ 2,2	161 $\pm$ 13	64,2 $\pm$ 34,9
	<b>7</b>	80,8 $\pm$ 15	n.d.	n.d.
	<b>8</b>	45,7 $\pm$ 2,6	109 $\pm$ 44	77,7 $\pm$ 28
<b>Phe-konjugati</b>	<b>9</b>	n.d.	n.d.	53,1 $\pm$ 23
	<b>10</b>	<b>32,2 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>22,2 <math>\pm</math> 3,8</b>	<b>24,3 <math>\pm</math> 5</b>
	<b>11</b>	n.d.	n.d.	32,7 $\pm$ 6,89
	<b>12</b>	n.d.	n.d.	27,7 $\pm$ 1,4
	<b>Cisplatin</b>	97,86**	15,9*	46,14**

n.d.. = ne djeluje; \* izvor Pascal F. i sur (2015), \*\* izvor Genomics of Drug Sensitivity in Cancer<sup>55</sup>

Prema izračunatim  $\text{IC}_{50}$ -vrijednostima prikazanim u tablici 2, najveću citotoksičnost prema tretiranim staničnim linijama (HeLa, MCF-7, HepG2) uglavnom pokazuju heterokiralni peptidi i to posebice **4**, **8** i **10**, u odnosu na homokiralne peptide među kojima je veća antiproliferativna aktivnost utvrđena samo kod spoja **7** prema staničnoj liniji HeLa te peptide **9** i **11** prema staničnoj liniji MCF-7. Dobivene  $\text{IC}_{50}$ -vrijednosti za najaktivnije spojeve uspoređene su s dostupnim literaturnim podacima o  $\text{IC}_{50}$ -vrijednostima referentnog lijeka (cisplatina) u antitumorskim istraživanjima prema staničnim linijama HeLa, MCF-7 i HepG2 (54, 55). Vidljivo je kako su  $\text{IC}_{50}$ -vrijednosti za prethodno spomenute spojeve manje od  $\text{IC}_{50}$ -vrijednosti

za cisplatin, što ukazuje na njihov antitumorski potencijal. Općenito, može se zaključiti kako su HeLa i MCF-7 stanična linije pokazale veliku osjetljivost budući da su gotovo svi ispitivani peptidi prema njima pokazali određeni antiproliferativni učinak. Također, prema  $IC_{50}$ -vrijednostima može se zaključiti kako je stanična linija HepG2 najotpornija na ispitivane peptide, dok su MCF-7 stanice pokazale najveću osjetljivost prema Phe-konjugatima **9-12**, neovisno o njihovoj kiralnosti. Dobiveni rezultati ukazuju na moguću preferenciju i specifičnost u djelovanju peptidomimetika te skupine prema točno određenoj staničnoj liniji shodno njezinoj prirodi, odnosno različita osjetljivost staničnih linija na djelovanje ksenobiotika može biti i posljedica različitosti tkiva ili organa iz kojeg linija potječe.

U ovom radu najučinkovitijima pokazali su se heterokiralni peptidomimetici, što ide u prilog tezi o utjecaju kiralnog uređenja na biološku aktivnost (bio)molekula; za sve aminokiseline izuzev glicina, apsolutna konfiguracija  $C\alpha$ -atoma izravno utječe na sekundarnu i tercijarnu strukturu izvedenih peptida (56). Osim toga, heterokiralni peptidi također su potencijalno korisni kao terapeutici jer su otporni na proteolitičku razgradnju i općenito nisu toksični, što poboljšava njihova farmakološka svojstva (56). Uloga kiralnosti, ali i redosljeda aminokiselina u peptidnom lancu za povećanje biološke aktivnosti, predmet je mnogih istraživanja (57-59). Primjerice, cilj istraživanja Corry i sur. (2016) bila je sinteza biokonjugata ferocena s prirodnim aminokiselinama Ala i Gly i ispitivanje njihove antitumorske aktivnosti. Upravo se položaj i stereokemija glicinskog ostatka pokazao presudnim za antitumorsku aktivnost dipeptida što se očitovalo u njegovom antiproliferativnom djelovanju prema karboplatin rezistentnoj staničnoj liniji H1299 (stanice karcinoma pluća) u odnosu na ostale ispitivane peptide (59, 60).

Na biološku aktivnost ferocenskih peptidomimetika prethodno sintetiziranih i testiranih na Prehrambeno-biotehnoškog fakultetu, presudno je utjecala lipofilnost samih konjugata pa su najveći antiproliferativni učinak pokazivali oni lipofilniji, odnosno konjugati s višim retencijskim faktorom ( $R_f$ ) (60, 61). Tako su u recentnom radu Kovačević i sur. (2021) bolji antiproliferativni učinak prema staničnim linijama HeLa i MCF-7 pokazivali Boc-zaštićeni peptidi s višim  $R_f$ -vrijednostima ( $\sim 0.55$ ) u usporedbi s polarnijim Ac-zaštićenim peptidima za koje su karakteristične niže  $R_f$ -vrijednosti ( $\sim 0.3$ ). (57) Međutim, u predmetnom istraživanju veći antiproliferativni učinak pokazuju heterokiralni i polarniji peptidi (tablica 3).

**Tablica 3.** Vrijednosti retencijskih faktora ( $R_f$ ) ispitivanih ferocenskih peptidomimetika

Spoj	Retencijski faktor ( $R_f$ )
1	0,58
2	0,49
3	0,57
4	0,50
5	0,44
6	0,40
7	0,45
8	0,43
9	0,83
10	0,50
11	0,80
12	0,51

Peptidi **4** ( $R_f = 0.50$ ), **8** ( $R_f = 0.43$ ) i **10** ( $R_f = 0.50$ ), koji su pokazali veći inhibitorski učinak na preživljenje sve tri stanične linije, imaju znatno niže  $R_f$ -vrijednosti od drugih ispitivanih peptida, primjerice peptida **9** koji se pokazao najlipofilnijim ( $R_f = 0.83$ ), ali i slabije citotoksičnim u usporedbi s gore spomenutim peptidima. Dakle, lipofilnost testiranih peptida **1-12** ipak nije bila presudan faktor u povećanju njihove biološke aktivnosti.

Imajući na umu navedenu tezu o neznatnom utjecaju lipofilnosti na biološku aktivnost ispitivanih peptida te izračunatu  $IC_{50}$ -vrijednost heterokiralnog konjugata **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc) s najizraženijim antitumorskim učinkom prema sve trima staničnim linijama (tablica 2), može zaključiti kako ipak heterokiralnost peptidne okosnice te voluminoznost hidrofobnog bočnog ogranka iz Phe ponajviše doprinose antiproliferativnom učinku.

Do sličnog zaključka došli su i Saint Jean KD i sur. (2018) u čijem je znanstvenom radu ispitivan utjecaj hidrofobnih aminokiselina Phe, Val i Leu na sveukupni doprinos hidrofobnosti

pripadajućih peptida te posljedično povećanje antimikrobne i citotoksične aktivnosti (62). Dobivenim rezultatima utvrđena je poveznica prostornog uređenja peptida, odnosno njegove sekundarne strukture, prisutnih aminokiselinskih ostataka i hidrofobnosti na biološku aktivnost. Osim toga, uočeno je kako se radi o osjetljivoj ravnoteži između spomenutih parametara pa i najmanja promjena u odabiru nekog od njih može rezultirati nespecifičnim vezanjem ili potpunim gubitkom aktivnosti peptida. Peptidi s Leu- i osobito Phe-ostacima pokazali su se najučinkovitijim u inhibiciji staničnog rasta i antimikrobnog djelovanja, tj. imali su veću sposobnost u narušavanju integriteta stanične membrane, dok su peptidi s Val-bočnim ogrankom pokazali manju aktivnost uslijed nemogućnosti dovoljnog prodiranja i raspodjele u staničnu membranu u odnosu na gore spomenute bočne ogranke (62).

Dakle, osim hidrofobnosti koja olakšava prolazak peptida kroz lipidni dvosloj, dodatan doprinos učinkovitosti ispitivanih peptida može biti i duljina i prostorna orijentacija bočnih lanaca, odnosno sposobnost inkorporiranja peptidne uzvojnice unutar lipidnog dvosloja. Lipidni dvosloj predstavlja gusto zbijenu okolinu makromolekula koje različitim međusobnim interakcijama kontroliraju permeabilnost membrane i time održavaju stabilan stanični integritet. Stoga, što je veća sposobnost peptida u ostvarivanju interakcija s membranskim sastavnicama i inkorporiranja unutar dvosloja, to je i veći stupanj poremećaja uređenja stanične membrane i cjelokupne funkcionalnosti stanice. Umetanje glomaznih bočnih lanaca uzrokovalo bi i veću nestabilnost uređenja stanične membrane i posljedično povećanje propusnosti, stoga bi i ovo svojstvo moglo dodatno doprinijeti utvrđenoj najvećoj aktivnosti peptida **10** koji u svojoj strukturi sadrži Phe kao najkrupniji bočni ogranak. Tome u prilog idu i druga znanstvena istraživanja u kojima je upravo Phe-ostatak bio ključan u ispitivanju interakcija peptida s dvoslojem i pakiranja u šupljine stanične membrane, a često je pokazivao najveću ili gotovo najveću aktivnost uočenu u eksperimentima (63-65).

Također, prisutna Boc-zaštitna skupina unutar peptida **1-12** je voluminozna i sterički zahtjevna skupina i često se koristi za dodatnu stabilizaciju peptida, a njezin utjecaj na povećanje biološke aktivnosti ferocenskih peptidomimetika utvrđen je u nekoliko istraživanja (60, 61). Primjerice, u istraživanju Kovačević i sur. (2021) svi ispitivani Boc-zaštićeni peptidi pokazali su veći inhibitorni učinak na preživljenje staničnih linija HeLa i MCF-7. Također, u istraživanju arilamidnih peptidomimetika s glomaznim *t*-butilnim skupinama vezanim na aromatski prsten uočena je njihova raspodjela i ukopavanje *t*-butilne skupine unutar lipidnog dvosloja što je rezultiralo povećanjem propusnosti stanične membrane i curenjem staničnog sadržaja (62).

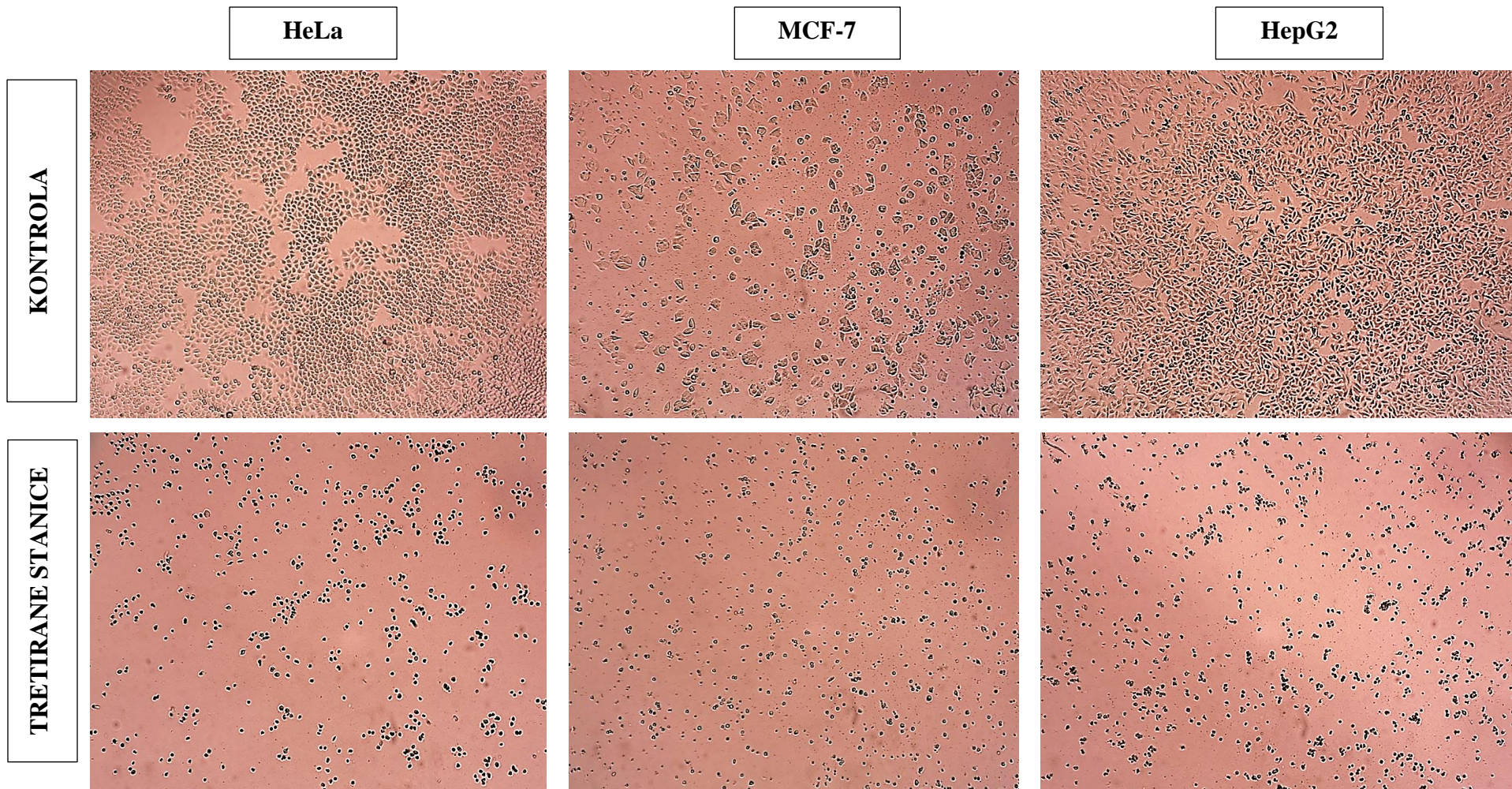


## 4.2. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA MORFOLOGIJU HeLa, MCF-7 I HepG2 STANICA

Najučinkovitiji ferocenski peptidomimetici, shodno prethodno provedenom MTT testu (poglavlje 4.1., tablica 2), podvrgnuti su dodatnom ispitivanju citotoksičnog djelovanja na rast stanica HeLa, MCF-7 i HepG2. Dodatno ispitivanje citotoksičnosti uključivalo je praćenje izgleda stanica inverznim mikroskopom u nativnim uvjetima te naknadno testiranje peptida na aktivaciju programirane stanične smrti (apoptoza) uslijed 24- i 48-satnog tretmana stanica.

Proučavanje morfologije i brojnosti stanica omogućuje uočavanje promjena nastalih uslijed tretmana ksenobioticima u određenom rasponu koncentracija, između ostalog i prepoznavanje mrtvih stanica. Utjecaj ksenobiotika na izgled stanica vidljiv je na primjeru prikaza inhibitornog djelovanja najučinkovitijeg testiranog peptida, heterokiralnog Phe-konjugata **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc) na rast staničnih linija HeLa, MCF-7 i HepG2 pri koncentraciji od 25  $\mu$ M tijekom 48-satnog tretmana (slika 13).

Na slici 13 jasno su vidljive značajne razlike u izgledu kontrolnih i tretiranih stanica za sve tri stanične linije promatrane svjetlosnom mikroskopijom u nativnim uvjetima. Netretirane stanice su dobro prihvaćene za podlogu, karakteristične epitelne morfologije u formiranom gustom i pravilnom monosloju. U odnosu na kontrolne, kod tretiranih stanica vidljivo je znatno smanjenje brojnosti stanica i gustoće monosloja. Uočene promjene posljedice su toksičnog djelovanja ispitivanog peptida zbog kojeg stanice gube epitelni oblik, zaokružuju se i odvajaju od podloge što ukazuje na aktivaciju stanične smrti. Ovakav utjecaj peptida heterokiralnog Phe-konjugata **10** na tretirane stanice u skladu je s rezultatima prethodno provedenog određivanja citotoksičnosti MTT testom i izračunatim  $IC_{50}$ -vrijednostima (poglavlje 4.1, tablica 2) prema kojima je peptid **10** pokazao najveću antiproliferativnu aktivnost u usporedbi s ostalim testiranim peptidima, koji su posljedično imali i manji utjecaj na morfologiju i brojnost stanica.



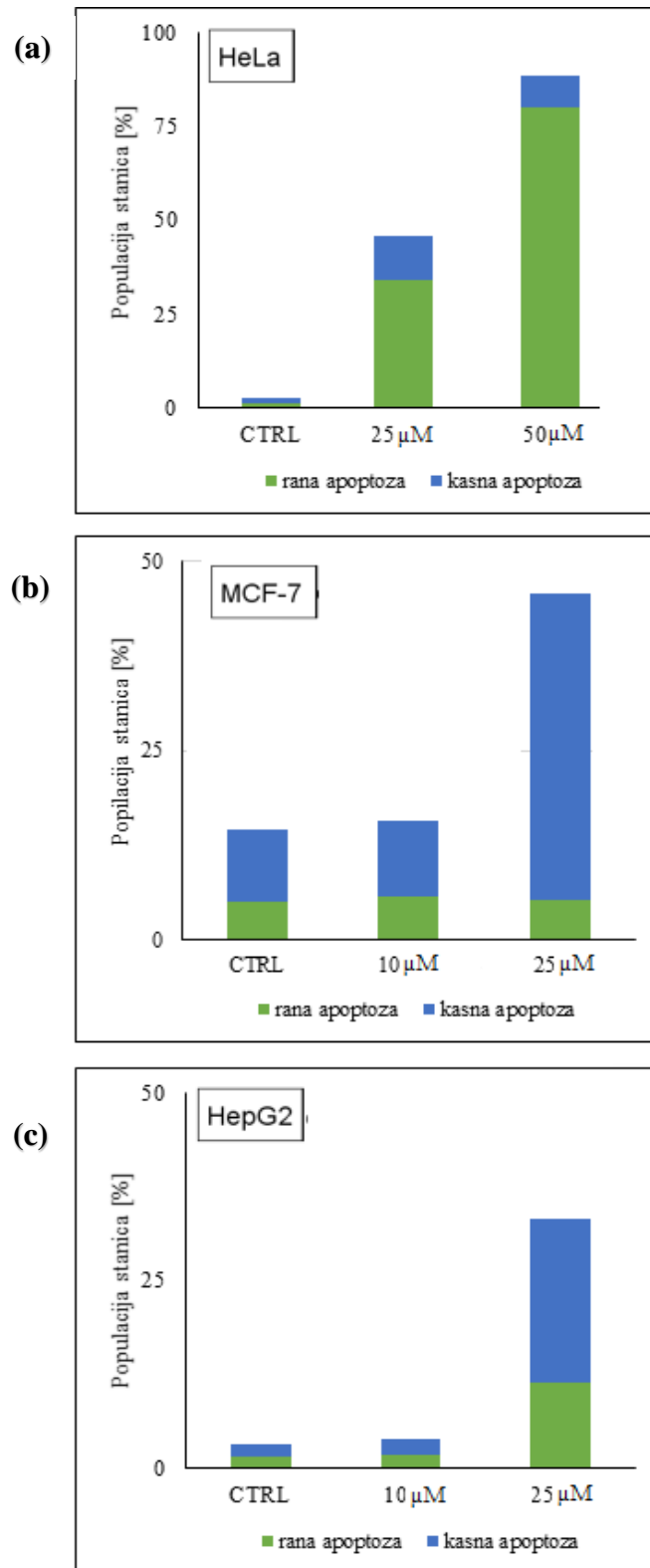
**Slika 13.** Morfologija HeLa, MCF-7 i HepG2 kontrolnih i tretiranih stanica peptidom **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc), tijekom 48 sati pri koncentraciji od 25  $\mu$ M, praćena i slikana inverznim mikroskopom u nativnim uvjetima

### **4.3. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA AKTIVACIJU STANIČNE SMRTI HeLa, MCF-7 I HepG2 STANICA**

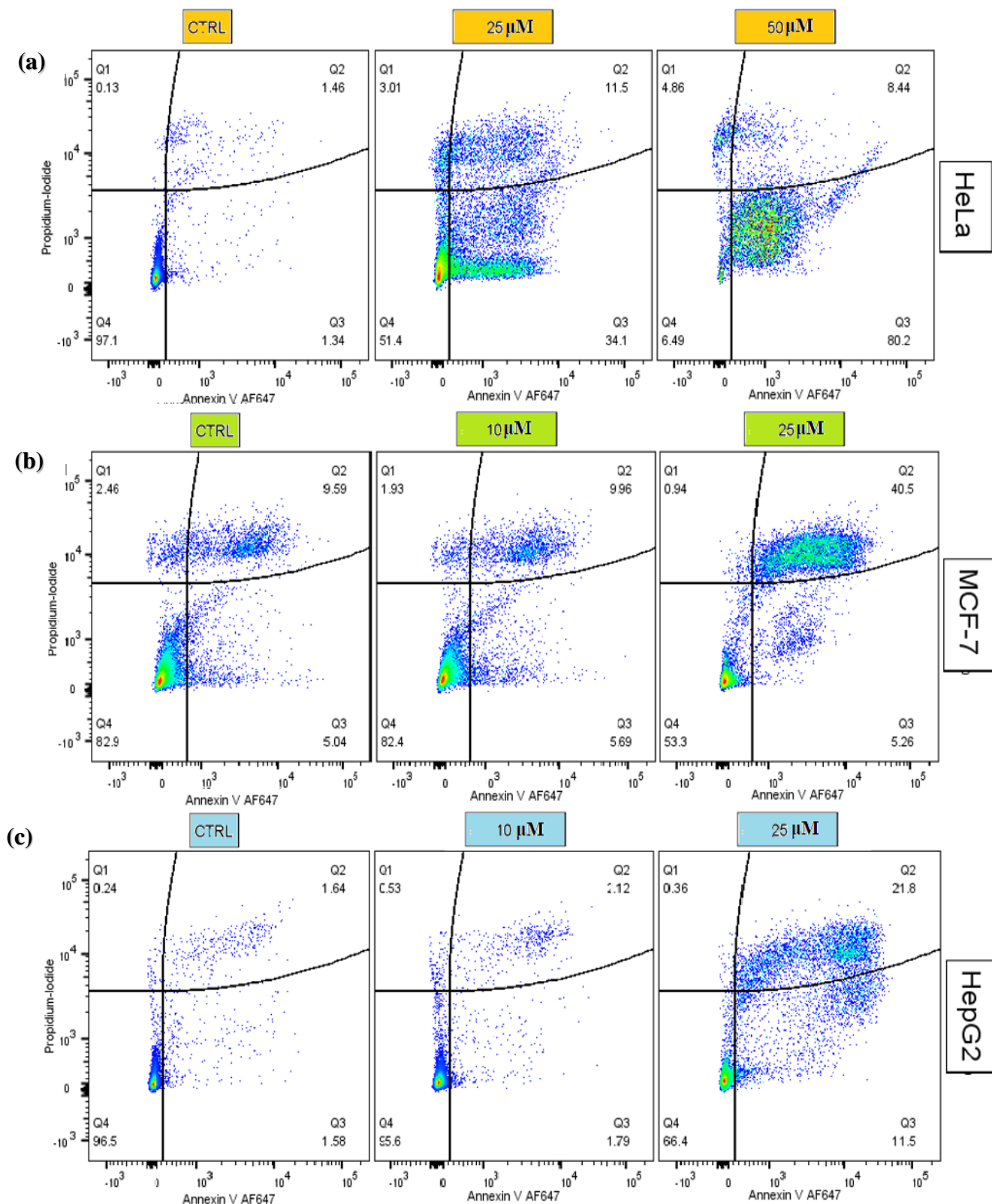
Kako bi se opažene morfološke promjene, koje ukazuju na indukciju stanične smrti prilikom tretmana ispitivanim ferocenskim peptidomimeticima (**4**, **8** i **10**) kroz 24 i 48 sati, potvrdile i kvantificirale, provedena je kvantitativna analiza živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi pomoću FACSVerse (Becton-Dickinson) protočnog citometra prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.1.

Razlikovanje navedenih staničnih populacija potpomognuto je fluorescentno obilježenim membranski vezujućim proteinom Annexin-om V, indikatorom započetog procesa apoptoze, te propidijevim jodidom (PI), indikatorom kasnoapoptotičkih promjena nastalih uslijed značajnog narušavanja integriteta stanične membrane.

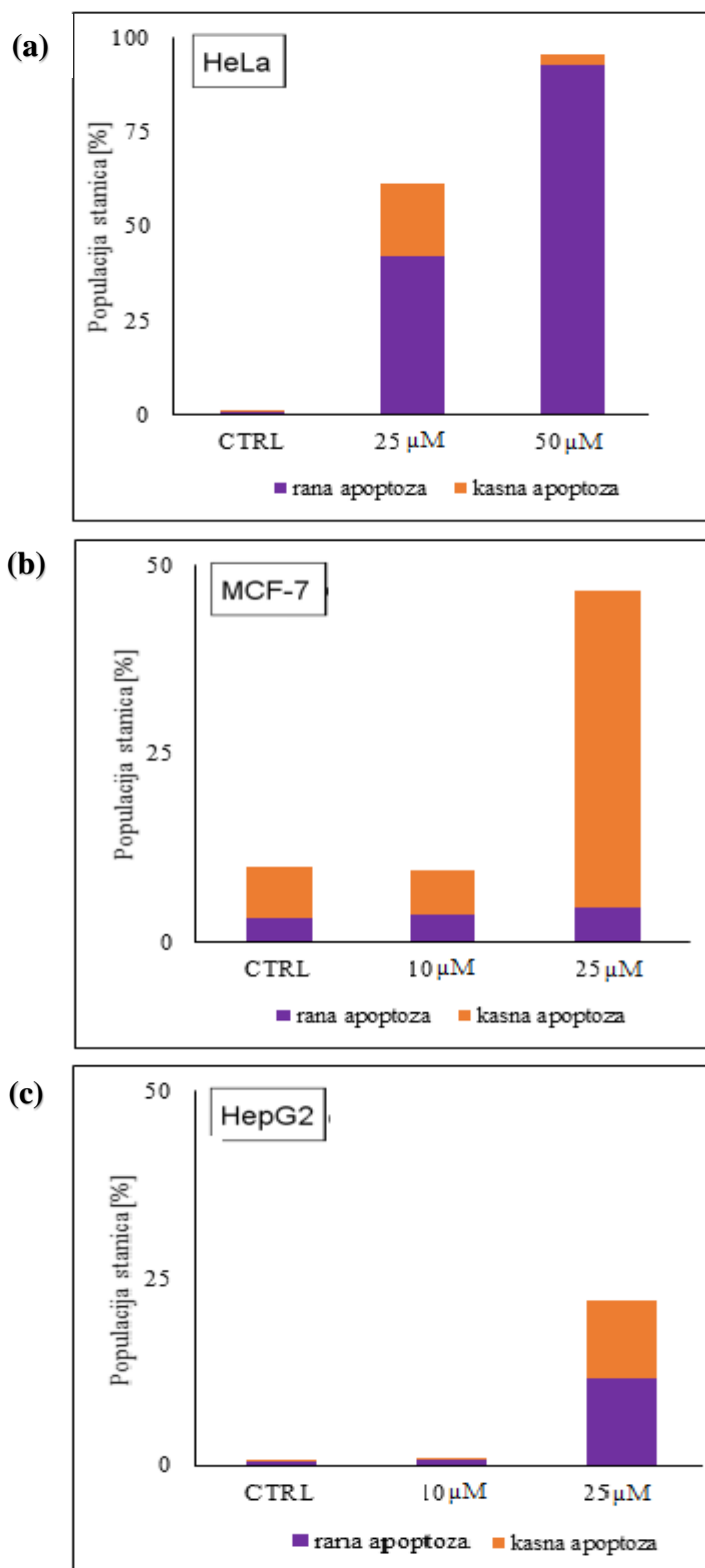
Shodno tome, rezultati provedene analize prikazani su u vidu reprezentativnih grafikona i kvantifikacije populacija (rana apoptoza – Annexin V+/PI-; kasna apoptoza – Annexin V+/PI+) i to za peptid **10** koji se pokazao najučinkovitijim induktorom apoptoze u testiranim koncentracijama (10, 25 i 50  $\mu$ M) (slika 14-17).



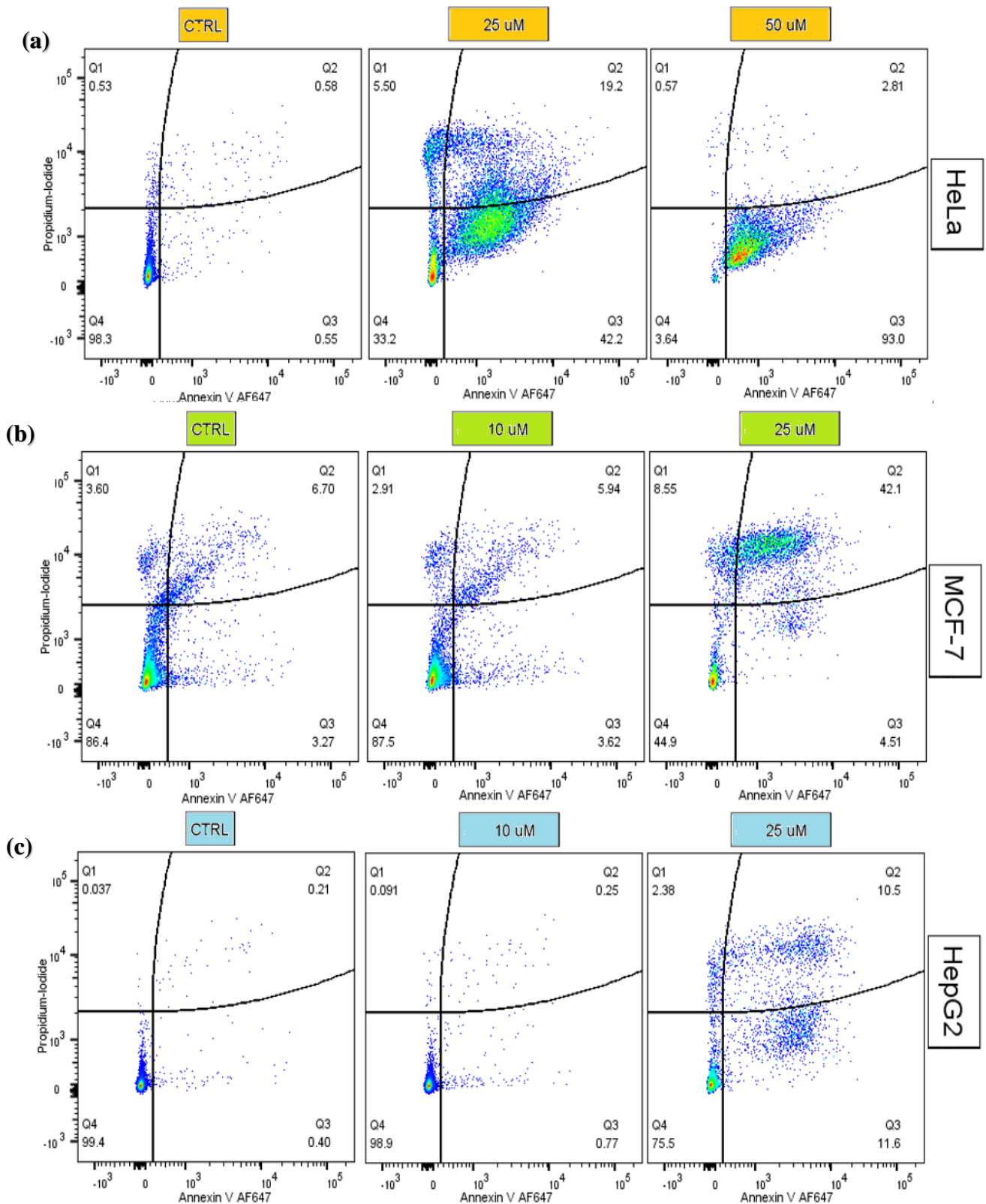
**Slika 14.** Distribucija staničnih populacija (rano- i kasno- apoptotične) nakon 24-satnog tretmana heterokiralnim Phe-peptidom **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc), određena protočnom citometrijom, vezanjem Annexina V i propidijevim jodidom za tri stanične linije (HeLa, HepG2, MCF7)



**Slika 15.** Reprezentivni histogrami analize vezanja Annexina V i PI nakon 24-satnog tretmana u uzorcima stanica: **(a)** HeLa (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 25 i 50 μM peptida **10**); **(b)** MCF-7 (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 10 i 25 μM peptida **10**); **(c)** HepG2 (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 10 i 25 μM peptida **10**)



**Slika 16.** Distribucija staničnih populacija (rano- i kasno- apoptotične) nakon 48-satnog tretmana heterokiralnim Phe-peptidom **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc), određena protočnom citometrijom, vezanjem Annexina V i propidijeva jodida za tri stanične linije (HeLa, HepG2, MCF7)



**Slika 17.** Reprezentivni histogrami analize vezanja Annexina V i PI nakon 48-satnog tretmana u uzorcima stanica: **(a)** HeLa (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 25 i 50 μM peptida **10**); **(b)** MCF-7 (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 10 i 25 μM peptida **10**); **(c)** HepG2 (CTRL- kontrolne stanice; stanice tretirane s 10 i 25 μM peptida **10**)

Prema rezultatima provedene analize (slika 14-17), vidljivo je kako već 24-satni tretman peptidom **10** pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  rezultira blagim povećanjem udjela apoptotičnih stanica u odnosu na kontrolne uzorke kod kojih je najzastupljenija populacija živih stanica uz neznatan postotak apoptotičnih stanica. Osim toga, primjetno je kako razina stanične smrti u tretiranim uzorcima raste proporcionalno s porastom koncentracije peptida i vremena izlaganja istom, što korelira s rezultatima citotoksičnosti prema kojima je također utvrđena ovisnost učinka i doze te trajanja tretmana.

Tijekom 24-satnog tretmana stanične linije HeLa dolazi do smanjenja udjela živih i povećanja ranoapoptotičnih stanica u odnosu na kontrolne uzorke, tj. pri koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$  udio živih stanica iznosi 51,4 % te ranoapoptotičnih 34,1 %, dok povećanje koncentracije na 50  $\mu\text{M}$  rezultira smanjenjem udjela živih stanica na 6,49 % i povećanjem udjela ranoapoptotičnih stanica na čak 80,2 % (slika 14(a) i 15(a)). Produljenjem tretmana na 48 sati udio dominantne ranoapoptotične populacije raste do maksimalnih 93,0 % te je živo tek 3,64 % stanične populacije uslijed djelovanja 50  $\mu\text{M}$  peptida **10** (slika 16(a) i 17(a)).

Praćenjem dinamike procesa odumiranja stanica, može se primijetiti kako je kod stanica MCF-7 i HepG2 dominantna populacija kasnoapoptotičkih stanica u odnosu na staničnu liniju HeLa pri jednako visokim koncentracijama i vremenskim okvirima tretiranja. Prema rezultatima za 24-satni tretman pri primijenjenoj koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$ , udio kasnoapoptotičnih stanica za MCF-7 staničnu liniju iznosio je 40,5 % (slika 14(b) i 15(b)) te 21,8 % za HepG2 (slika 14(c) i 15(c)), dok je u jednakim uvjetima udio kasnoapoptotičnih HeLa stanica iznosio tek 11,5 % (slika 14(a) i 15(a)). Prilikom 48-satnog tretmana, prisutnost kasnoapoptotičnih stanica najizraženija je kod MCF-7 stanica tretiranih 25  $\mu\text{M}$  peptidom **10** i iznosi 42,1 % (slika 16(b) i 17(b)). Dakle, vidljivo je kako peptid **10** u uskom rasponu koncentracija postaje toksičan prema stanicama te one naglo odumiru, što može biti posljedica utjecaja testiranog peptida na cjelovitost stanične membrane, odnosno njezinog značajnog oštećenja koje se odrazilo na cjelokupni integritet, funkcionalnost i vijabilnost tretiranih stanica. Navedena opažanja također su u skladu s eksperimentalnim podacima dobivenim tijekom provedbe MTT testa gdje je na krivuljama preživljenja stanica izražen nagli pad obzirom na primijenjenu koncentraciju testiranog peptida kao i izračunatim  $\text{IC}_{50}$ -vrijednostima.

Ranije je utvrđeno kako katalitička uloga redoks-aktivnih metalnih kompleksa u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta u fiziološkim uvjetima često korelira s njihovom citotoksičnošću (66). Općenito, citotoksična aktivnost ferocenskih derivata i njihova sposobnost indukcije stanične smrti često se pripisuje stvaranju ROS-a koji mogu: oksidativno



modificirati stanične komponente, uzrokovati promjene u potencijalu mitohondrijske membrane čija je propusnost ključna u indukciji staničnog intrinzičnog apoptotičkog puta, poremetiti redoks-ravnotežu u stanici i/ili ometati stanične signalne puteve i sl. (66). Jedan od primjera takvog mehanizma djelovanja predstavlja Fentonova oksidacija ferocena u kojoj nastaje izrazito reaktivni hidroksilni radikal što može dovesti do prethodno spomenutih oštećenja u stanici.

Obzirom na tendenciju vezanja iona metala na mnoge važne biološke molekule, induciranje stanične smrti može nastati i izravnim interakcijama ferocenskih derivata s drugim staničnim komponentama poput proteina što je i utvrđeno prilikom istraživanjem mehanizma djelovanja ferocifena gdje je uočeno kako su njihove biološke mete, za razliku od antitumorskih lijekova na bazi platine, najčešće proteini, a manje DNA (11, 67, 68).

U prilog navedenoj tezi ide i ispitivanje mehanizma citotoksičnog djelovanja ferocenskih derivata pripremljenih od strane Hodik i sur (2017). Naime, derivati ferocena s piperidinom i morfolinom pokazali su usporediv ili veći antiproliferativni učinak prema stanicama karcinoma jajnika (A2780, A2780cis, SK-OV-3) u odnosu na cisplatin. Daljnjom analizom mehanizma djelovanja ispitivanih organometalnih derivata, utvrđeno je kako je antikancerogena učinkovitost posljedica njihove intracelularne akumulacije uslijed transferinskog receptora posredovane endocitoze. Transferinski receptori identificirani su kao ključni posrednici intracelularne akumulacije ferocena koji postaje redoks aktivan u biološkom okruženju i stvara reaktivne entitete poput slobodnih radikala koji doprinose sveukupnom farmakodinamičkom učinku, odnosno intrinzičkom pokretanju apoptoze (67).

Nadalje, osim svojstava metala, aktivaciji stanične smrti doprinose i njegovi koordinacijski ligandi poput aminokiselina, što su tijekom sinteze i *in vitro* istraživanja antiproliferativnog učinka konjugata ferocena s prirodnim aminokiselinama i peptidima utvrdili Corry i sur. Naime, od svih testiranih *N-orto*-(ferrocenil)-benzoildipeptidnih estera, najučinkovitijim induktorom stanične smrti pokazao se etilni ester *N-[orto*-(ferrocenil)-benzoil]-glicil-L-alanina pri čemu je kao jedan od mogućih mehanizama apoptotičkog djelovanja pretpostavljena interakcija glicina s unutarstaničnim proteinima (59).

Također, ranije provedena istraživanja ukazuju na indukciju apoptoze posredovanjem peptidomimetika s izraženom antitumorskom aktivnošću pri čemu njihovo vezanje na ciljne proteine, aktiviranje kaspaza i oponašanje ključnih interakcija u aktivaciji apoptotičkog puta rezultira odumiranjem stanica programiranom staničnom smrću (3, 67). Tome u prilogu idu i istraživanja prema kojima, shodno tradicionalnoj klasifikaciji, peptidomimetici tipa I i klase A

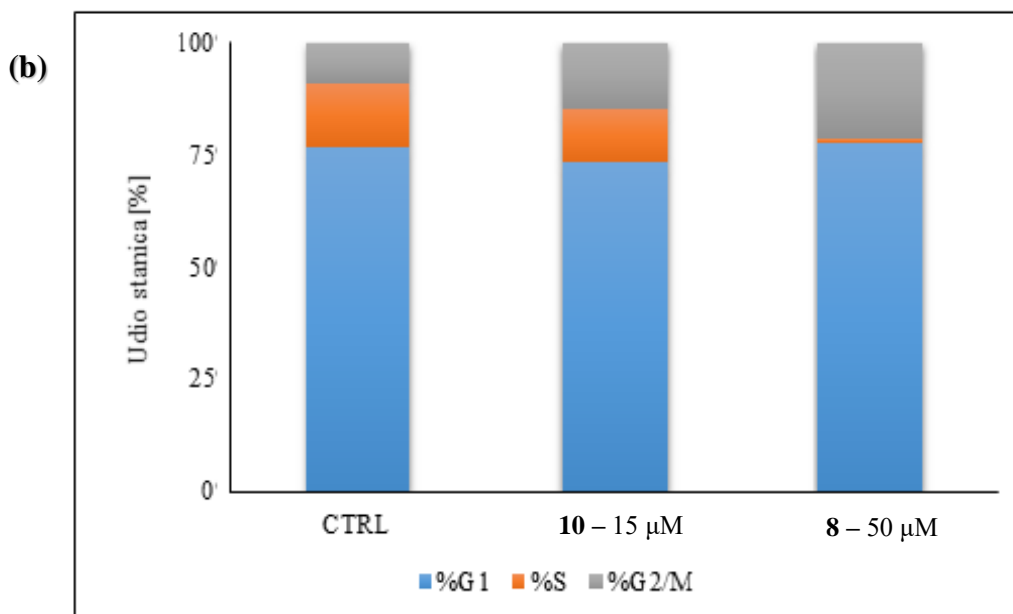
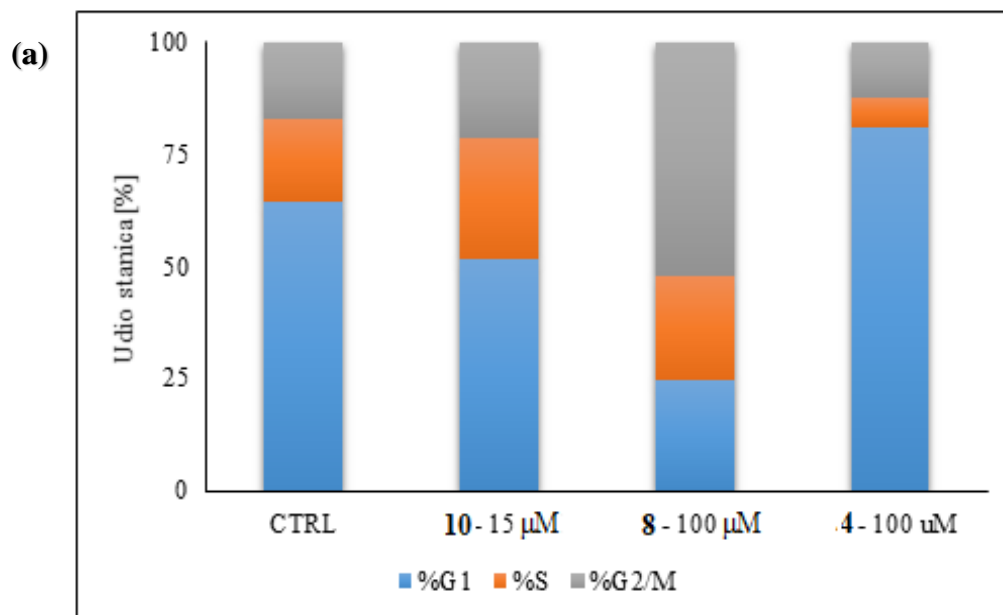
kojima pripadaju i peptidomimetici testirani u ovome radu, sudjeluju u regulaciji apoptoze, između ostalog i putem inhibitornih učinaka na p53–MDM2 i p53–MDMX komplekse (6-8).

Osim toga, posebnu pozornost privlače peptidi i peptidomimetici čiji se terapijski potencijal ostvaruje narušavanjem stabilnosti stanične membrane (engl. *Membrane-disruptive Peptides/Peptidomimetics, MDPs*). Ovi peptidi/peptidomimetici mogu djelovati posjedovati antimikrobnu ili antitumorsku aktivnost pa razlikujemo prirodne antimikrobne peptide i njihove sintetičke mimetike (engl. *Synthetic Antimicrobial Peptides, SAMPs*) te antitumorske peptide (engl. *Anticancer Peptides, ACPs*). Budući da je biološka meta ovih antitumorskih peptida stanična membrana, a ne DNA ili specifični enzimi kao u slučaju konvencionalnih kemoterapijskih lijekova, smatra se kako bi njihov razvoj mogao doprinijeti prevazilaženju rezistencije na postojeća terapijska rješenja u liječenju karcinoma i antimikrobne rezistencije (70).

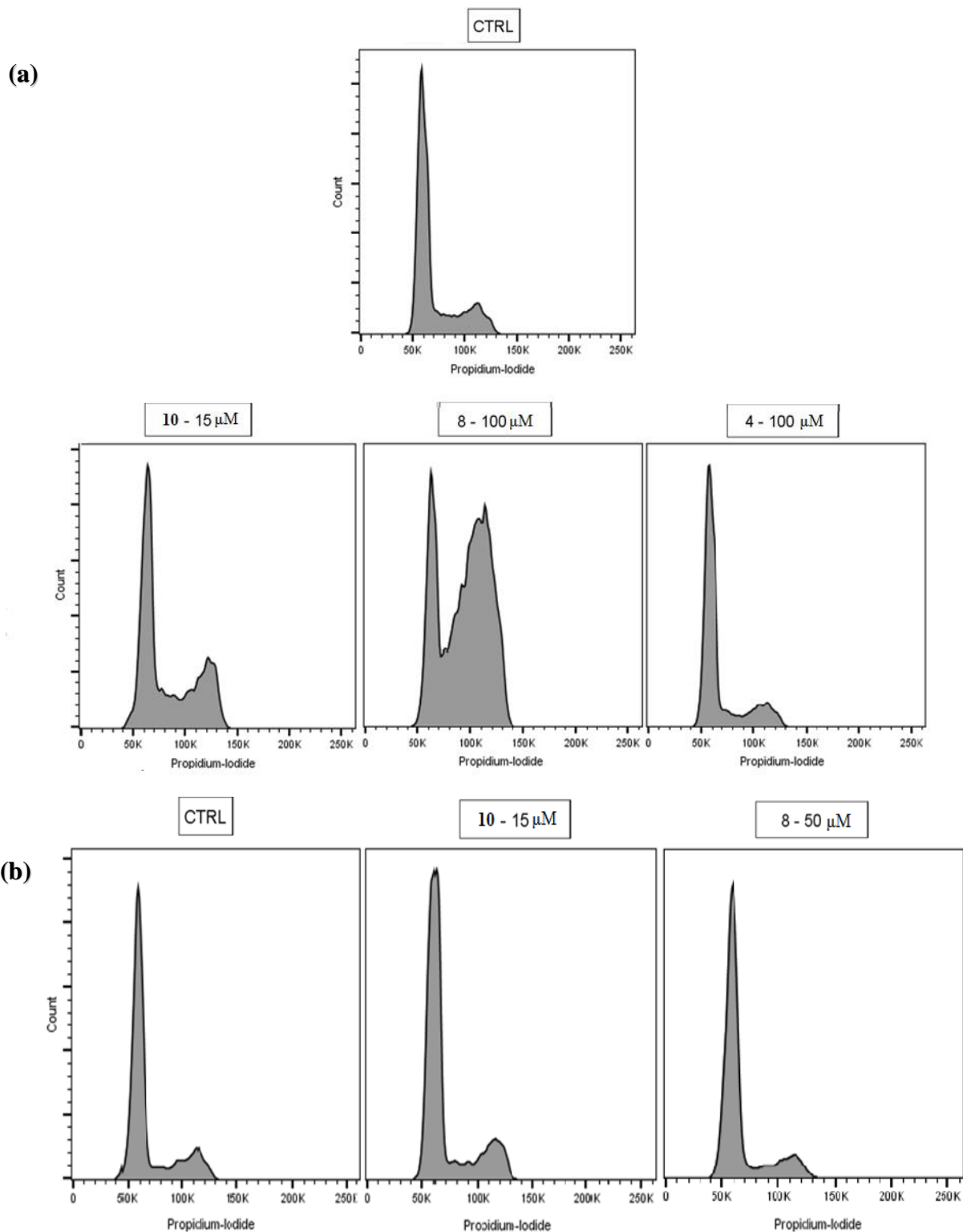
#### **4.3. UČINAK HOMO- I HETEROKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA STANIČNI CIKLUS HeLa I HepG2 STANICA**

Osim oštećenja i narušavanja cjelokupne funkcionalnosti stanice i induciranja stanične smrti, tretiranje stanica ksenobiotičima može utjecati i na proces diobe stanica uzrokujući zastoje u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Stoga, u cilju boljeg razumijevanja uočene citotoksičnosti ispitivanih ferocenskih peptidomimetika i njihovog djelovanja na proliferaciju tumorskih stanica, provedena je analiza njihovog utjecaja i mehanizma djelovanja na stanični ciklus dviju staničnih linija (HeLa i HepG2) prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.2.

Analizi su podvrgnuti peptidomimetici s prethodno utvrđenom najvećom antiproliferativnom aktivnošću (poglavlje 4.1., tablica 2), dok su rezultati provedene analize prikazani samo za peptidomimetike **4** (Ac-**D-Val**-NH-Fn-NH-**L-Val**-Boc), **8** (Ac-**D-Leu**-NH-Fn-NH-**L-Leu**-Boc) i **10** (Ac-**L-Phe**-NH-Fn-NH-**D-Phe**-Boc) koji su uzrokovali promjene u staničnom ciklusu tretiranih staničnih linija u odnosu na kontrolu pri testiranim koncentracijama. Njihov utjecaj predstavljen je u vidu grafičkog prikaza nastalih promjena u distribuciji stanica unutar faza staničnog ciklusa (slika 18) i reprezentativnog histograma po završetku 48-satnog tretmana (slika 19). Kako je intenzitet fluorescencije PI, određen protočnom citometrijom, direktno proporcionalan količini DNA u stanici, na prikazanim rezultatima analize predočena je klasifikacija stanica unutar G0/G1, S i G2/M faza staničnog ciklusa.



**Slika 18.** Udio stanica (%) po fazama staničnog ciklusa nakon 48-satnog tretmana peptidima **4** (Ac-D-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc), **8** (Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc) i **10** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc) pri koncentracijama označenim na slici u odnosu na kontrolu (CTRL) za stanične linije: **(a)** HeLa, **(b)** HepG2



**Slika 19.** Analiza staničnog ciklusa HeLa **(a)** i HepG2 **(b)** stanica protočnim citometrom nakon 48-satnog tretmana ferocenskim peptidomimeticima **4** (Ac-**D-Val**-NH-Fn-NH-**L-Val**-Boc), **8** (Ac-**D-Leu**-NH-Fn-NH-**L-Leu**-Boc) i **10** (Ac-**L-Phe**-NH-Fn-NH-**D-Phe**-Boc). Histogrami prikazuju raspodjelu tretiranih stanica u G1, S i G2/M fazi ciklusa u odnosu na kontrolu (CTRL)

Prema rezultatima analize, kontrolne stanice za obje stanične linije raspoređene su između tri faze ciklusa gdje najveći udio stanica pripada G1 fazi staničnog ciklusa, a potom S i G2/M fazi što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima o trajanju pojedinih faza i zakonitostima staničnog ciklusa. Shodno tome, kontrolne HeLa stanice su najvećim udjelom (64,4 %) u G1 fazi, zatim s 18,6 % u S i najmanje zastupljene u G2/M fazi (17 %) (slika 18 (a), 19 (a)). Djelovanje ispitivanih peptidomimetika na tretirane stanice očituje se zastojem u pojedinim fazama staničnog ciklusa, tj. izraženo je porastom broja stanica u određenoj fazi u odnosu na kontrolu. Na slikama 18 (a) i 19 (a) primjetno je kako peptid **10** pri koncentraciji od 15  $\mu\text{M}$  uzrokuje porast broja stanica u S (26,6 %) i G2/M fazi (21,4 %) u odnosu na kontrolu. Najveći zastoj i povećanje udjela HeLa stanica u G2/M fazi (52,3 %), s posljedičnim smanjenjem broja stanica u ostale dvije faze, nastaje djelovanjem 100  $\mu\text{M}$  peptida **8**. Za razliku od peptida **8** i **10**, testirani peptid **4** pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  nije posredovao zastoju u G2/M fazi, već je značajan porast broja tretiranih stanica ovim peptidom uočeno u G1 fazi i iznosi čak 81,3 %.

Nadalje, testirani peptidi pokazuju identičan utjecaj i na tretirane HepG2 stanice (slika 18(b) i 19 (b)) pri čemu peptid **10** pri koncentraciji 15  $\mu\text{M}$  dovodi do povećanja broja stanica u G2/M fazi (14,9 %) u odnosu na kontrolu gdje se u navedenoj fazi nalazi 9,06 % stanica. Također, peptid **8** se i kod HepG2 stanica pokazao najučinkovitijim u zastoju G2/M faze gdje nakon 48-satnog tretmana peptidom **8** (50  $\mu\text{M}$ ), udio stanica u ovoj fazi raste do 21,2 % uz drastično smanjenje brojnosti stanica u S fazi (1,31 %) u odnosu na kontrolu s 13,9 % stanica u istoj fazi. Ovakvi rezultati u skladu su s prethodno utvrđenom citotoksičnošću ovih peptida i mogućnošću indukcije stanične smrti. Naime, uočeni zastoj u G2/M fazi onemogućuje pripremu za mitozu ili pak samu mitozu stanice, dok povećanje udjela stanica u G1 fazi staničnog ciklusa upućuje na potencijalno sprječavanje priprema za replikaciju DNA, što rezultira induciranjem stanične smrti. Osim toga, postignuti zastoji u različitim fazama staničnog ciklusa uslijed tretmana ispitivanim peptidima, mogu ukazivati i na vrlo vjerojatno različite mehanizme njihovog djelovanja.

Utjecaj ferocenskih derivata na stanični ciklus tumorskih stanica privukao je pozornost znanstvene zajednice. Prema rezultatima istraživanja provedenog od strane Zhou i sur., ferocenski konjugati s Arg-Gly-Asp (RGD) doveli su do zastoja u G1 i S fazi staničnog ciklusa stanične linije B16 koja se koristi kao model u istraživanju karcinoma kože u ljudi (71). Osim toga, peptidi koji sadrže RGD aminokiselinsku sekvencu, uslijed selektivnog vezanja na integrine koji su visoko eksprimirani u tumorskoj angiogenezi, igraju ključnu ulogu u razvoju

ciljane terapije protiv karcinoma. Stoga je konjugiranjem biološki važnog RGD aminokiselinske sekvence s ferocenom utvrđena uloga ferocena u unapređenju biološke aktivnosti nastalog organometalnog konjugata (71).

Nadalje, rezultati istraživanja antiproliferativnog učinka ferocetil-olefina na stanice hepatocelularnog karcinoma (HepG-2, SMMC-7721 i HuH-7) i normalne ljudske jetrene stanice (L02) ukazali su na njihov antitumorski potencijal praćen visokom selektivnošću u djelovanju prema tumorskim stanicama (72). Istraživanjem mehanizma djelovanja utvrđeno je da je njihov antiproliferativni učinak posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa u G0/G1 fazi i smanjenja razine ekspresije ciklin-ovisnih kinaza (CDK4) i ciklina D1, čija se povećana ekspresija povezuje s hormonskom rezistencijom karcinoma dojke pozitivnom na ER pa bi razvoj njihovih inhibitora u terapijske svrhe mogao dovesti do „utišavanja stanice“ i prestanka njezina umnožavanja. Primjeri provedenih analiza staničnog ciklusa kao i rezultati dobiveni u ovome radu upućuju na izraziti antitumorski potencijal ferocenskih derivata i mogućnost daljnjeg unaprijeđenja njihove biološke aktivnosti.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata biološke evaluacije može se zaključiti sljedeće:

1. Ispitivani ferocenski peptidomimetici pokazuju antiproliferativni učinak ovisan o dozi i trajanju tretmana pri čemu je inhibicija rasta stanica proporcionalna povećanju primijenjene koncentracije pojedinog peptida kao i produljenju vremena izlaganja.
2. Najveći inhibitorski učinak na stanični rast, ali i toksičnost prema svim staničnim linijama (HeLa, MCF-7, HepG2) pokazuju heterokiralni i polarniji peptidi (**2**, **4**, **6**, **8**, **10**), osobito Phe-peptid **10**.
3. Stanična linija HepG2 pokazala se najotpornijom na djelovanje ispitivanih ferocenskih peptidomimetika budući da je veći inhibitorski učinak na njezin rast utvrđen samo za 3 od 12 ispitivanih spojeva i to heterokiralnih peptida **6**, **8** i **10**. Za razliku od HepG2 stanične linije, MCF-7 stanična linija pokazala je osjetljivost na 10 testiranih spojeva, osobito na Phe-konjugate **9-12** što ukazuje na moguću preferenciju i specifičnost u djelovanju konjugata s aromatskim bočnim ogrankom prema specifičnoj staničnoj liniji.
4. Najočitiije morfološke promjene (smanjenje gustoće monosloja i brojnosti stanica, promjena oblika, odvajanje od podloge za rast) kod stanica HeLa, MCF-7 i HepG2 u odnosu na kontrolu, utvrđene su tijekom 24- i 48-satnog tretmana heterokiralnim Phe-peptidom **10** što upućuje na indukciju stanične smrti.
5. Analizom vezanja Annexina V i PI, provedenom protočnom citometrijom, potvrđena je pretpostavka o indukciji stanične smrti tijekom 24- i 48-satnog tretmana svih triju staničnih linija Phe-peptidom **10**. Uz to, uočeno je kako spoj **10** u uskom rasponu koncentracija postaje toksičan prema stanicama te one naglo odumiru što može biti rezultat narušavanja integriteta stanične membrane te posljedično cjelokupne funkcionalnosti i vijabilnosti tretiranih stanica uslijed djelovanja ispitivanog peptida.
6. Analizom staničnog ciklusa, provedenom protočnom citometrijom, nakon 48-satnog tretmana stanica HeLa i HepG2 heterokiralnim konjugatima s Val (**4**), Leu (**8**) i Phe (**10**) utvrđeni su zastoji u fazama: G1 (za Val-peptid **4**) te G2/M (za Leu- i Phe-peptide **8** i **10**). Navedeni rezultati ukazuju na antitumorski potencijal ispitivanih peptida te moguće različite mehanizme djelovanja.

## 6. LITERATURA

1. Del Gatto A, Cobb Steven L, Zhang J, Zaccaro L (2021) Editorial: Peptidomimetics: Synthetic Tools for Drug Discovery and Development. *Frontiers in Chemistry* **9**, 2296-2646. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.802120>
2. Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
3. Li Petri G, Di Martino S, De Rosa M (2022) Peptidomimetics: An Overview of Recent Medicinal Chemistry Efforts toward the Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors. *J Med Chem* **65**, 7438–7475. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00123>
4. Larik FA, Saeed, A, Fattah TA, Muqadar U, Channarn PA (2016) Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *Applied Organometallic Chemistry* **31**, 3664. <https://doi.org/10.1002/aoc.3664>
5. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2015) Biochemistry, 8. izd., W.H. Freeman, New York.
6. Rabbanil G, Hassan M, Ahmad K, Ihno Choi (2018) Protein-protein Interactions and their Role in Various Diseases and their Prediction Techniques. *Current Protein and Peptide Science* **19**, 948-957. <https://doi.org/10.2174/1389203718666170828122927>
7. Del Gatto A, Cobb SL, Zhang J, Zaccaro L (2021) Editorial: Peptidomimetics: Synthetic Tools for Drug Discovery and Development. *Front Chem* **9**, 3521. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.802120>
8. Mabonga, L, Kappo AP (2020) Peptidomimetics: A Synthetic Tool for Inhibiting Protein–Protein Interactions in Cancer. *Int J Pept Res Ther* **26**, 225–241. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09831-5>
9. Fosgerau, K, Hoffmann T (2015) Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov Today* **20**, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
10. Anthony EJ, Bolitho EM, Bridgewater HE, Carter OWL, Donnelly JM, Imberti C, i sur. (2020) Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science* **11**, 12888–12917. <https://doi.org/10.1039/d0sc04082g>
11. Ong YC, Gasser G (2020) Organometallic compounds in drug discovery: Past, present and future. *Drug Discovery Today Technologies* **37**, 117-124.



<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.06.001>

12. Astruc D (2016) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, 6–29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>
13. Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**, 0066. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>
14. Jawaria R, Khan MU, Hussain M (2022) Synthesis and characterization of ferrocene-based thiosemicarbazones along with their computational studies for potential as inhibitors for SARS-CoV-2. *J Iran Chem Soc* **19**, 839–846. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02346-1>
15. Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
16. Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferrocenski peptidi. *Kem u industriji* **61**, 71–120.
17. Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Barišić L, i sur. (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene-1,1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Chemistry: a European journal* **23**, 1037-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>
18. Kovačević M, Kodrin I, Cetina I, Kmetič I, Murati T, Barišić L, i sur (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>
19. Čakić Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90**, 537– 569.
20. Green DR, Llambi F (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
21. Chen Y, Hua Y, Li X, Arslan IM, Zhang W, Meng G (2020) Distinct Types of Cell Death and the Implication in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 0068. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>
22. Tang D, Kang R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* **29**, 347-364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>

23. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D (2018) Molecular mechanisms of cell death - recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **25**, 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
24. Tait SWG, Ichim G, Green DR (2014) Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science* **127**, 2135-2144. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>
25. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer* **14**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
26. Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J (2017) Cancer's achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijms18010023>
27. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology* **89**, 289-317. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7>.
28. Zhang L, Lu Z, Zhao X (2021) Targeting Bcl-2 for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1876**, 18856. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188569>
29. Derakhshan A, Chen Z, Van Waes C (2016) Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clinical Cancer Research* **23**, 1379-1387. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2172>.
30. Ventura E, Giordano A (2019) Cell Cycle. *Reference Module in Life Sciences* **1**, 3352. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.90189-4>
31. Yang N, Sheridan AM (2014) Cell Cycle. *Encyclopedia of Toxicology* **1**, 753–758. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00273-6>
32. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M (2013) Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **138**, 255–271. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>
33. Schwartz GK, Shah MA (2005) Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 9408–9421. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.01.5594>

34. Derakhshan A, Chen Z, Van Waes C (2016) Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Deregulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways. *Clinical Cancer Research* **23**, 1379–1387. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-2172>
35. 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* **11**, 169-175. <https://hrcak.srce.hr/file/261274>. Pristupljeno 6. svibnja 2022.
36. Arango MT, Quintero-Ronderos P, Castiblanco J (2013) Cell culture and cell analysis. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* **45**, 225. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464>. Pristupljeno 6. svibnja 2022.
37. Ghallab A (2013) In vitro test systems and their limitations. *EXCLI J* **12**,1024-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4803002/>. Pristupljeno 7. svibnja 2022.
38. Fröhlich E, Salar-Behzadi S (2014) Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 4795–4822. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>
39. ATCC (2022) <https://www.atcc.org/products/ccl-2>. Pristupljeno 2. travnja 2022.
40. Xavier Faussadier (2017) HeLa cells: Origin of this important cell line in life science research. <https://www.tebu-bio.com/blog/hela-cells-the-first-cell-line/>. Pristupljeno 2. travnja 2022.
41. ATCC (2022) <https://www.atcc.org/products/hb-8065>. Pristupljeno 3. travnja 2022.
42. Arzumanian VA, Kiseleva I, Poverennaya EV (2021) The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
43. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE (2015) MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **107**, 1254. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>
44. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* **35**, 3147-3154.
45. ATCC (2022) <https://www.atcc.org/products/htb-22>. Pristupljeno 5. travnja 2022.
46. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture* **731**, 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)

47. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2016) Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**, 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
48. McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **201**, 510–521. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
49. Yang RJ, Fu LM, Hou HH (2018) Review and perspectives on microfluidic flowcytometers. *Sensor Actuat B-Chem* **266**, 26-45. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.091>
50. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011) Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J Vis Exp* **50**, 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
51. Kovač V, Radošević K, Bebek A, Makarević J, Štefanić Z, Barišić, L, i sur. (2016) The first oxalamide-bridged ferrocene: Facile synthesis, preliminary conformational analysis and biological evaluation. *Applied Organometallic Chemistry* **31**, e3653. <https://doi.org/10.1002/aoc.3653>
52. Kovač V, Kodrin I, Radošević K, Molčanov K, Adhikari B, Barišić L, i sur. (2022) Oxalamide-Bridged Ferrocenes: Conformational and Gelation Properties and In Vitro Antitumor Activity. *Organometallics* <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.1c00661>.
53. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Semenčić MČ, Barišić L, i sur. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/c5dt01610j>
54. Pascal F, Bedouet L, Baylatry M, Namur J, Laurent A (2015) Comparative Chemosensitivity of VX2 and HCC Cell Lines to Drugs Used in TACE. *Anticancer Res* **35**, 6497-503.
55. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. <https://www.cancerrxgene.org/compound/Cisplatin/1005/overview/ic50?>. Pristupljeno 18. svibnja 2022.
56. Nanda V, Narayanan C (2007) The role of protein homochirality in shaping the energy landscape of folding. *Protein Science* **16**, 1667–1675. <https://doi.org/10.1110/ps.07286700>
57. Schifano NP, Caputo GA (2021) Investigation of the Role of Hydrophobic Amino Acids on the Structure–Activity Relationship in the Antimicrobial Venom Peptide Ponericin

- L1. *J Membrane Biol* **30**, 1127. <https://doi.org/10.1007/s00232-021-00204-y>
58. Frederiksen N, Hansen PR, Björkling F, Franzyk H (2019) Peptide/Peptoid Hybrid Oligomers: The Influence of Hydrophobicity and Relative Side-Chain Length on Antibacterial Activity and Cell Selectivity. *Molecules* **24**, 4429. <https://doi.org/10.3390/molecules24244429>
59. Larik FA, Saeed A, Fattah TA, Muqadar U, Channar PA (2016) Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *Applied Organometallic Chemistry* **31**, 3664. <https://doi.org/10.1002/aoc.3664>
60. Kovačević M, Molčanov K, Radošević K, Srček V, Roca S, Barišić L, i sur. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19**, 12852–12880. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>
61. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Roca S, Kodrin I, Barišić L (2021) Conformational Preferences and Antiproliferative Activity of Peptidomimetics Containing Methyl 10-Aminoferrocene-1-carboxylate and Turn-Forming Homo- and Heterochiral Pro-Ala Motifs. *Int J Mol Sci* **22**, 13532. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>
62. Saint Jean KD, Henderson KD, Chrom CL, Abiuso LE, Renn LM, Caputo GA (2018) Effects of Hydrophobic Amino Acid Substitutions on Antimicrobial Peptide Behavior. *Probiotics Antimicrob Proteins* **10**, 408–419. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9345-z>
63. Morton LA, Yang H, Saludes JP, Fiorini Z, Beninson L, Chapman ER, i sur. (2013) MARCKS-ED peptide as a curvature and lipid sensor. *ACS Chem Biol* **8**, 218–225. <https://doi.org/10.1021/cb300429e>
64. Vanni S, Vamparys L, Gautier R, Drin G, Etchebest C, Fuchs PF, i sur. (2013) Amphipathic lipid packing sensor motifs: probing bilayer defects with hydrophobic residues. *Biophys J* **104**, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3837>
65. White OR, Flynn AD, Yin H (2016) Determinants of curvature-sensing behavior for MARCKS-fragment peptides. *Biophys J* **110**, 1980–1992. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.007>
66. Idlas P, Lepeltier E, Jaouen G, Passirani C (2021) Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. *Cancers* **13**, 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>

67. Skoupilova H, Bartosik M, Sommerova L, Pinkas J, Vaculovic T, Kanicky V, i sur. (2019) Ferrocenes as new anticancer drug candidates: Determination of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* 172825. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172825>
68. Buriez O, Labbé E, Top S, Amatore C, Jaouen G. (2013). Synthesis, Characterization, and Antiproliferative Activities of Novel Ferrocenophanic Suberamides against Human Triple-Negative MDA-MB-231 and Hormone-Dependent MCF-7 Breast Cancer Cells. *Organometallics* **32**, 5926–5934. <https://doi.org/10.1021/om400490a>
69. Hodík T, Lamač M, Červenková Šťastná L, Cuřínová P, Karban J, Skoupilová H, i sur. (2017) Improving cytotoxic properties of ferrocenes by incorporation of saturated N-heterocycles. *Journal of Organometallic Chemistry* **846**, 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.06.005>
70. Liming L, Jiaying C, Yilang Y, Rui L, Xiaoqian F, Yuwei Z, i sur. (2021) Membrane-disruptive peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **11**, 2609-2644. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.014>
71. Zhou B, Li J, Feng BJ, Ouyang Y, Liu YN, Zhou F (2012) Syntheses and in vitro antitumor activities of ferrocene-conjugated Arg-Gly-Asp peptides. *J Inorg Biochem* **116**, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.014>.
72. Zheng J, Zeng L, Tang M, Lin H, Pi C, Xu R, i sur. (2021) Novel Ferrocene Derivatives Induce G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis through the Mitochondrial Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* **22**, 3097. <https://doi.org/10.3390/ijms22063097>.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MARINA IVANČIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis