

Djelovanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na HeLa staničnu liniju

Logarušić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:375783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023.

Iva Logarušić

**DJELOVANJE BIOKONJUGATA
FEROCENA I DERIVATA 2-
TIOURACILA NA
HeLa STANIČNU LINIJU**

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

Željela bih se zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na iznimnoj ljubaznosti, stečenim znanjima, brojnim profesionalnim, ali i prijateljskim savjetima, pomoći i vodstvu tijekom cijelog procesa izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se i mag.ing. Martini Bagović na uloženom vremenu, strpljenju i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te prof.dr.sc. Senki Djaković na stručnoj pomoći. Također se želim zahvaliti i svim profesorima i asistentima u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija na suradnji i srdačnosti.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su mi uljepšali ovo razdoblje života i učinili ga punim radosti i veselja.

Posebno se zahvaljujem roditeljima i braći na bezuvjetnoj ljubavi te što su me naučili pravim vrijednostima života. Hvala i cijeloj široj obitelji na podršci i osloncu.

I na kraju, dragom Bogu hvala za sve.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

DJELOVANJE BIOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA NA HeLa STANIČNU LINIJU

Iva Logarušić, univ. bacc.ing. biotechn., 0058212257

Sažetak: Ferocenski konjugati su organometalni spojevi koji posjeduju različita elektrokemijska i biološka svojstva zbog čega se istražuju i primjenjuju kao novi biološki aktivni spojevi u procesu istraživanja i razvoja lijekova. Budući da veliki broj ferocenskih konjugata pokazuje antitumorski učinak, u ovom radu je ispitana *in vitro* biološka aktivnost četiri različita biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na humanoj tumorskoj staničnoj liniji HeLa određivanjem stanične vijabilnosti i klonogenom analizom. Nadalje, protočnom citometrijom određeno je s kojim se staničnim procesom može povezati zapažena citotoksičnost. Sva četiri ispitana biokonjugata pokazala su inhibitorni učinak na rast i proliferaciju HeLa stanične linije, pri čemu su spojevi 3 i 4 pokazali najizraženiji citotoksični učinak. Inhibitorno djelovanje spojeva 3 i 4 na rast HeLa stanica može se povezati s poticanjem stanične smrti procesom apoptoze. Dobiveni rezultati ukazuju da biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila imaju potencijal kao antitumorski agensi.

Ključne riječi: biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila, *in vitro* biološka aktivnost, tumorska stanična linija HeLa, klonogena analiza, protočna citometrija

Rad sadrži: 44 stranice, 21 sliku, 2 tablice, 66 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Martina Bagović, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 28. travnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ACTIVITY OF FERROCENE BIOCONJUGATES WITH 2-THIOURACIL DERIVATIVES ON HeLa CELL LINE

Iva Logarušić, univ. bacc.ing. biotechn., 0058212257

Abstract: Ferrocene conjugates are organometallic compounds that have different electrochemical and biological properties, therefore they have been investigated and used as new biologically active compounds in the process of drug research and development. A large number of ferrocene conjugates show antitumor activity, therefore in this work the *in vitro* biological activity of four different bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivatives was assessed on human tumor cell line HeLa by determination of cell viability and clonogenic analysis. Furthermore, flow cytometry was used to determine which cellular process could be associated with the observed cytotoxicity. All tested bioconjugates showed an inhibitory effect on the growth and proliferation of HeLa cell line and compounds 3 and 4 showed the greatest cytotoxic effect. The inhibitory effect of compounds 3 and 4 on the growth of HeLa cells can be associated with the stimulation of cell death by the process of apoptosis. The obtained results indicate that bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivatives have potential as antitumor agents.

Keywords: bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivatives, *in vitro* biological activity, tumor cell line HeLa, clonogenic analysis, flow cytometry

Thesis contains: 44 pages, 21 figures, 2 tables, 66 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Kristina Radošević, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Martina Bagović, mag. ing.

Reviewers:

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

Thesis defended: April 28th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN	2
2.1.1. Biološka aktivnost ferocenskih konjugata.....	2
2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOBAZE	5
2.2.1. Pirimidinske nukleobaze.....	6
2.2.2. Derivati uracila.....	7
2.2.3. Derivati 2-tiouracila.....	9
2.3. BOKONJUGATI FEROCENA I NUKLEOBAZA	10
2.4. PRIMJENA KULTURE STANICA U IN VITRO ISPITIVANJIMA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1 MATERIJALI	16
3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila.....	16
3.1.2. Kemikalije.....	17
3.1.3. Pufferi i otopine.....	17
3.1.4. HeLa stanična linija.....	18
3.1.5. Uređaji i oprema.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Uzgoj stanica.....	19
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	19
3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom.....	20
3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica bojom kristal violet.....	21
3.2.5. Analiza stanične smrti primjenom Muse TM analizatora staničnog zdravlja.....	22
3.2.6. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse TM Annexin V & Dead Cell Kit-a	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. UČINAK BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA NA HeLa STANIČNU LINIJU.....	26
4.2. KLONOGENI POTENCIJAL BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA NA HeLa STANIČNU LINIJU.....	29

4.3. STANIČNA SMRT POTAKNUTA DJELOVANJEM BIOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA	31
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA.....	37

1. UVOD

Ferocenski konjugati su organometalni spojevi u kojima je ferocen, metalocenski spoj, povezan s različitim biološkim molekulama ili se uvodi u strukturu već poznatih lijekova. Ferocenski konjugati posjeduju različita biološka i elektrokemijska svojstva zbog čega se istražuju i primjenjuju u području kemije materijala i biosenzora te u farmaceutskoj kemiji kao novi biološki aktivni spojevi u procesu istraživanja i razvoja lijekova. Uz različite biološke aktivnosti, ferocenski derivati pokazuju antitumorsku aktivnost koja se pripisuje redoks aktivnosti ferocena i sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih radikala.

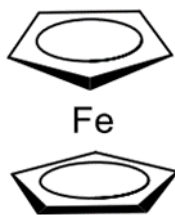
Karcinom je jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu te postoji velika potreba za pronalaskom i razvojem novih antitumorskih lijekova. Nukleobaze, osnovne strukturne jedinice nukleinskih kiselina, i njihovi analozi poznati su kao kemoterapeutske agensi te čine sastavni dio mnogih komercijalnih lijekova. Stoga sinteza novih biokonjugata ferocena i nukleobaza te ispitivanje njihovog citotoksičnog i antiproliferativnog učinka *in vitro* na različitim tumorskim staničnim linijama postaju atraktivno područje farmaceutske kemije.

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

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FEROCEN

Ferocen je organometalni spoj molekulske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ koji pripada skupini metalocena. Građen je od dva ciklopentadienilna prstena koja okružuju centralni atom željeza (slika 1). Kemijski je stabilan i netoksičan, dolazi u obliku narančastih kristala, netopljiv u vodi, a topljiv u većini organskih otapala (NCBI, 2005; Čakić-Semenčić i Barišić, 2017). Ferocen predstavlja prvi takozvani „sendvič“ spoj koji je otkriven 1951. (Kealy i Pauson, 1951), a strukturno karakteriziran 1952. godine (Wilkinson i sur., 1952). Stabilan je na zraku i u vodi, prolazi reverzibilnu oksidaciju, stoga predstavlja idealan interni standard u elektrokemiji. Robusnost ferocena omogućuje derivatizaciju njegovih prstena reakcijama uobičajenim u organskoj kemiji, što rezultira sintezom velikog broja ferocenskih konjugata koji pokrivaju različita područja znanstvenog istraživanja, od katalize, dizajna optičkih materijala i biosenzora (Bayly i sur., 2008) do novih biološki aktivnih spojeva u procesu istraživanja lijekova (Fouda i sur., 2007; Gasser i sur., 2011; Braga i sur., 2013). Zahvaljujući svojim iznimnim karakteristikama kao što su stabilnost u biološkim medijima, redoks aktivnost, lako prodiranje kroz staničnu membranu zbog njihove lipofilnosti, niska toksičnost, mogućnost kemijskih modifikacija te komercijalna dostupnost, ferocenski spojevi su privukli veliku pozornost na području medicinske organometalne kemije kao potencijalni terapijski spojevi (Čakić-Semenčić i Barišić, 2017).



Slika 1. Struktura ferocena (Wang i sur., 2020)

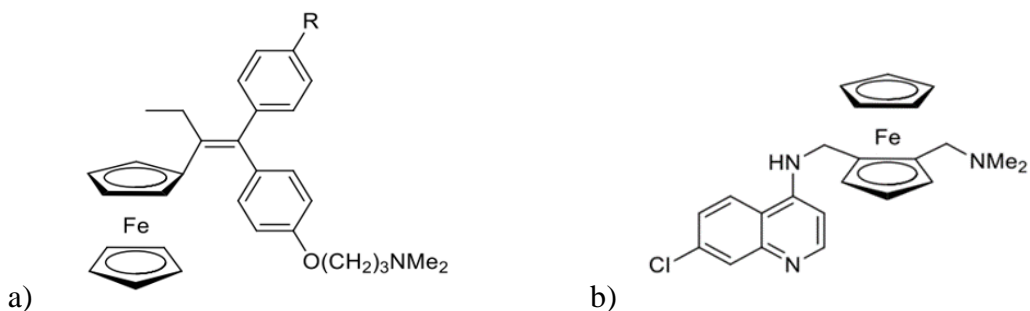
2.1.1. Biološka aktivnost ferocenskih konjugata

Ferocen je posebno zanimljiv spoj u medicinskoj kemiji pošto se veliki broj ferocenskih derivata pokazao dobrim antitumorskim, antibakterijskim, antimalarijski ili antiparazitskim kandidatima za lijekove (Kowalski i sur., 2013; Nguyen i sur., 2014; Peter i Aderibigbe, 2019). Uobičajena strategija za dobivanje biološki aktivnih derivata ferocena temelji se na povezivanju

ferocetilne skupine s biološki važnim molekulama. Nastajanje biokonjugata može se podijeliti u dvije glavne skupine. U prvoj skupini, ferocen se uvodi u strukturu lijeka, odnosno spoja već poznatog farmakološkog značaja. U takvim slučajevima, ferocetilna skupina je namijenjena za poboljšanje biološke aktivnosti konjugiranog farmakofora. Tako se uvođenjem ferocena u strukturu klorokina dobiva ferokin, koji pokazuje antimalarični učinak, a zamjenom jedne fenilne skupine s ferocenom u tamoksifenu dobiva se potencijalni antitumorski lijek ferocifen. U drugoj skupini, ferocen se povezuje s biološkim molekulama, s ciljem sinteze biokonjugata s potencijalnim terapijskim svojstvima. Terapijske učinke također pokazuju konjugati ferocena i spojeva koji samostalno ne ostvaruju biološke učinke, ali koji, nakon vezanja ferocena, postaju biološki aktivni (Kowalski i sur., 2013).

Željezo je najzastupljeniji metal u ljudskom tijelu i esencijalni element za održavanje normalne funkcije tijela. Smatra se netoksičnim za ljude pa su metalocenski farmaceutici s atomom željeza prihvatljiviji od onih koji sadrže teške metale poput platine (npr. cisplatin). Atom željeza u ferocenu nalazi se u obliku Fe^{2+} te se lako može oksidirati do Fe^{3+} stanja i povratno reducirati uslijed razlike potencijala. Iako mehanizam antitumorskog djelovanja ferocenskih konjugata nije do kraja razjašnjen, on se pripisuje redoks-aktivnosti ferocena, odnosno sposobnosti generiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Djelovanjem ROS-a u stanicama dolazi do oksidativnog stresa i oštećenja stanica te posljedično stanične smrti (Patra i Gasser, 2017).

Među brojnim ferocenskim spojevima kao potencijalnim terapeutima, posebno se ističe ferocifen (slika 2a) koji pokazuje antiproliferativni učinak na stanice raka dojke. Uz ferocifen, najpoznatiji derivat ferocena je ferokin (slika 2b) koji pokazuje antimalarijski učinak. Ferokin zahvaljujući redoks aktivnosti ferocenskog dijela molekule i sposobnosti generiranja hidroksilnih radikala, pokazuje pozitivan učinak protiv klorokin-rezistentnih *Plasmodium falciparum* vrsta (Biot i sur., 2011). Ferokin je trenutno u fazi II kliničkih ispitivanja, a ferocifen u pretkliničkoj procjeni, no unatoč velikom potencijalu nijedan drugi derivat ferocena, odnosno ne-radioaktivni organometalni spoj bilo koje vrste, nije napredovao do kliničkih ispitivanja (Patra i Gasser, 2017).



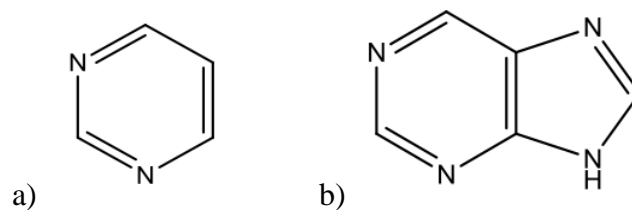
Slika 2. Struktura a) ferocifena; b) ferokina (Toma i Vrček, 2020)

Zadnjih godina provedena su brojna istraživanja antitumorskog djelovanja raznih ferocenskih derivata kao što su ferocen-indoli, ferocen-steroidi, ferocen-fenoli, ferocetil-alkil nukleobaze, azalalaktin feroceni, konjugati ferocena sa solima *N*-alkilpiridina i ugljikohidratni ferocenski konjugati (Simenel i sur., 2009; Nguyen i sur., 2014; Čakić-Semenčić i Barišić, 2017; Peter i Aderibigbe 2019). Duljina nepolarnog ugljikovog lanca, položaj ferocetilne skupine, priroda i položaj supstituenata u konjugatima i doza spojeva korištenih u testovima citotoksičnosti su jedni od glavnih čimbenika koji utječu na citotoksični učinak navedenih biokonjugata (Peter i Aderibigbe, 2019).

Antimalarijski učinak derivata ferocena također je opsežno proučavan. Već spomenuti ferokin, konjugat klorokina i ferocena pokazuje pojačani inhibicijski učinak prema *Plasmodium falciparum* vrstama što ga čini učinkovitijim antimalarikom od klorokina. Faktori kao što su izbor i duljina poveznice između matičnih lijekova i ferocena značajno utječu na antimalarijski učinak konjugata. Konjugati ferocena s novobiocinom, pirolom, izatinom, pirimidinom također pokazuju dobru antimalarijsku aktivnost, a čimbenici kao što su duljina lanca, priroda i položaj supstituenta utječu na biološku aktivnost navedenih konjugata u *in vitro* ispitivanjima (Peter i Aderibigbe, 2019). Uz antitumorsku i antimalarijsku aktivnost, konjugati ferocena pokazuju značajni antimikrobni učinak. Početna istraživanja započela su s ferocenom modificiranim penicilinima, cefalosporinima i rifamicinom (Scutaru i sur., 1991), a nastavljena s derivatima koji sadrže različite farmakoforne skupine i strukturne fragmente biomolekula, kao što su aminokiseline, peptidi, šećeri, nukleobaze i steroidi (Kraatz 2005; Čakić-Semenčić i Barišić, 2017).

2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOBAZE

Nukleozidi su glikozamini koji se sastoje od heterocikličke dušične baze koja je preko *N*-glikozidne veze vezana na šećer ribozu ili deoksiribozu. Osnovna građevna jedinica nukleinskih kiselina je nukleotid koji se sastoji od molekule šećera (bilo riboze u RNA ili deoksiriboze u DNA) vezane na fosfatnu skupinu i dušične baze. Dušične baze (nukleobaze) se dijele u dvije skupine, purine i pirimidine, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi (Makishima, 2019). Pirimidini se sastoje od šesteročlanog prstena koji sadrži dva dušikova atoma dok se purini sastoje od prstenaste strukture pirimidina s dodatkom fuzioniranog 5-eročlanog imidazolnog prstena (slika 3). Pirimidine čine citozin, timin i uracil, a purine adenin i gvanin (Hess i Greenberg, 2012).



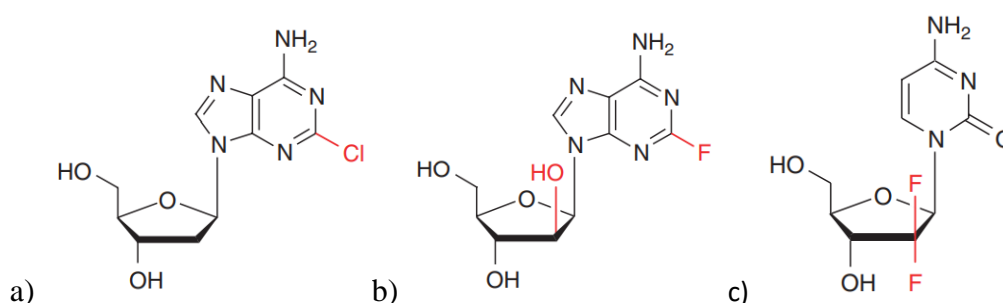
Slika 3. Struktura: a) pirimidinskog prstena, b) purinskog prstena (Makishima, 2019)

Nukleozidi su bitni za odvijanje genetskih i evolucijskih procesa, međutim, njihova biološka aktivnost nije ograničena samo na ulogu sastavnih dijelova DNA i RNA, nego su uz to uključeni u još nekoliko staničnih procesa kao što su stanična signalizacija, regulacija enzima i metabolizam. Tako su, fosforilirani nukleozidi poput adenozin 5'-trifosfata (ATP) i adenozin 5'-difosfata (ADP) važni jer djeluju kao prijenosnici energije u stanicama. Nadalje, ciklički adenozin monofosfat (cAMP) je sekundarni glasnik koji sudjeluje u putu prijenosa signala unutar stanice potaknutog djelovanjem hormona glukagona i adrenalina. Ostali derivati nukleotida kao što su nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), flavin adenin dinukleotid (FAD) i koenzim A igraju važnu ulogu u metabolizmu (Kowalski, 2021).

Nukleozidi su molekule koje utječu na mnoštvo fizioloških procesa i stoga predstavljaju potencijalne mete za modifikaciju. Nukleozidni analozi su grupa spojeva čija se struktura temelji na modifikaciji postojeće dušične baze ili šećerne skupine prirodnog nukleozida. Nukleozidni analozi su antimetaboliti nukleozida koji oponašaju fiziološke nukleozide u smislu unosa i metabolizma, ali ometaju sintezu nukleinskih kiselina izravnom ugradnjom u novosintetizirajući DNA i RNA lanac ili ometajući razne enzime (npr. DNA polimeraza ili ribonukleotid reduktaza) uključene u sintezu nukleinskih kiselina (Ewald i sur., 2008). Lijekovi

koji sadrže nukleozidne analoge sa sličnim strukturama često imaju različite mehanizme djelovanja i pokazuju raznolikost u njihovim kliničkim aktivnostima (Galmarini i sur., 2002).

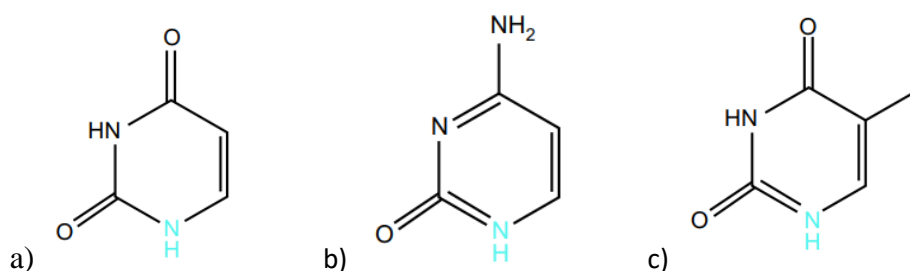
Nukleozidni analozi su farmakološki raznolika skupina, koja uključuje citotoksične spojeve, antivirusne agense i imunosupresivne molekule. Antikancerogeni nukleozidi (slika 4) uključuju nekoliko analoga pirimidinskih i purinskih nukleozida. Dva primarna purinska analoga su kladribin i fludarabin koji se koriste liječenju leukemije. Među trenutno dostupnim analogima pirimidina, citarabin se intenzivno koristi u liječenju akutne leukemije, dok se gemcitabin koristi u liječenju solidnih tumora (rak gušterače, pluća, dojke, mokraćnog mjehura) i nekih malignih hematoloških bolesti (Galmarini i sur., 2002).



Slika 4. Struktura antikancerogenih nukleozida: a) kladribin, b) fludarabin i c) gemcitabin (Ramesh i sur., 2020)

2.2.1. Pirimidinske nukleobaze

Pirimidin je aromatski, heterociklički spoj koji uz atome ugljika sadrži dva atoma dušika na pozicijama 1 i 3 šesteročlanog prstena. Izraz pirimidin također se koristi za označavanje derivata pirimidina, ponajprije tri dušične baze: timin (T), citozin (C) i uracil (U) (slika 5), koje su, zajedno s dva purina, građevni blokovi nukleinskih kiselina. Pirimidinska jezgra je također prisutna u mnogim drugim prirodnim tvarima kao što su vitamin B, koenzimi, purini, pterini i mokraćna kiselina (Mahapatra i sur., 2017).



Slika 5. Struktura pirimidinskih baza: a) uracil, b) citozin, c) timin (Makishima, 2019)

Istraživanja pokazuju da spojevi koji sadrže pirimidinsku jezgru posjeduju širok raspon bioloških i farmakoloških aktivnosti što se može objasniti njihovom prisutnošću u strukturi DNA i RNA molekula. Zadnjih nekoliko desetljeća dizajnirani su i razvijeni mnogi novi pirimidinski derivati koji pokazuju antitumorske (Baraldi i sur., 2002), antibakterijske (Kumar i sur., 2001), antivirusne (Nasr i Gineinah, 2002), antiHIV, antimalarijske i antiinflamatorne učinke (Gangjee i sur., 2001). 5-halogenirani derivati pirimidina bili su među prvim derivatima testiranim na biološku aktivnost (Lindhahl, 1993). U medicinskoj kemiji derivati pirimidina su vrlo dobro poznati po svojim terapijskim primjenama te čine sastavni dio mnogih lijekova poput 5-fluorouracila koji ima antikancerogeno djelovanje, idoksuridina i trifluoridina s antivirusnim učinkom, zidovudina i stavudina koji djeluje na virus HIV-a te trimetoprima, sulfametiazina i sulfadiazina koji imaju antibakterijski učinak (Amir i sur., 2007).

Dizajniranje novih pirimidinskih derivata temelji se na proučavanju odnosa između kemijske strukture i biološke aktivnosti ispitivanih derivata (SAR, eng. *structure activity relationship*). Mahapatra i suradnici (2017) proveli su istraživanje antiproliferativnog učinka pirimidina supstituiranog različitim skupinama na različitim pozicijama. Supstitucije na C2, C4 i C6 položaju pokazale su značajan utjecaj na antitumorsku aktivnost, posebice tio ili amino skupina supstituirana na C2 te fenilna skupina supstituirana na C4 položaju. Pirimidin vezan peteročlanim prstenovima poput pirazola, pirola, triazola, imidazola, oksazola, tiazola i tiena pokazuje značajniji antiproliferativni učinak u usporedbi sa šesteročlanim prstenovima poput piridona i kinazolina čime se pokazao utjecaj strukture ispitivanih derivata na njihovu biološku aktivnost. Analogi pirimidina djeluju antitumorsko različitim mehanizmima djelovanja uključujući inhibiciju kinaza (erbB2, raf, CDK, Src), zaustavljanje staničnog ciklusa, smanjenje potencijala mitohondrijske membrane, povećanje ROS-a i indukciju apoptoze (Mahapatra i sur., 2017).

2.2.2. Derivati uracila

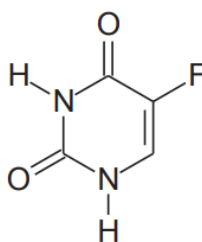
Uracil ($C_4H_4N_2O_2$) je derivat pirimidina čiju strukturu čini heterociklički aromatski prsten s dvije keto skupine na položajima C2 i C4 te je glavna komponenta pirimidinskog sastava u ribonukleinskoj kiselini. Bazni parovi s adeninom u molekuli DNA zamijenjeni su s timinom koji nastaje metiliranjem uracila (NCBI, 2004a).

Uracil je jedan od najznačajnijih farmakofora u medicinskoj kemiji te kao pirimidinska nukleobaza čini sastavni dio mnogih komercijalnih lijekova. Uracil i njegovi derivati imaju

važnu ulogu razvoju lijekova koje karakterizira široki spektar biološkog djelovanja i sintetska dostupnost. Derivati uracila pokazuju antivirusni i antitumorski učinak (Parker, 2009), a također imaju herbicidno, insekticidno i baktericidno djelovanje (Zhi i sur., 2005; Jain i sur., 2006). Iako se obično povezuje s lijekovima za kemoterapiju, uracil i njegovih derivati koriste se u liječenju različitih bolesti, kao što su virusne infekcije, dijabetes, bolesti štitnjače i autosomno recesivni poremećaji. Modifikacijom strukture uracila dobivaju se derivati s poboljšanim farmakološkim i farmakokinetičkim svojstvima, uključujući povećanu bioaktivnost, selektivnost, metaboličku stabilnost, apsorpciju i manju toksičnost. Razvoj novih derivata uracila kao bioaktivnih tvari vezan je uz modifikacije supstituenata na N1, N3, C5 i C6 položaju pirimidinskog prstena (Ramesh i sur., 2020; Pałasz i Ciez, 2014).

Analozi uracila s halogenim atomom na položaju 5 predstavljaju važnu klasu spojeva zbog svoje mutagene i antiviralne aktivnosti (Lindahl, 1993). 5-fluorouracil i 5-klorouracil bili su prvi sintetizirani farmakološki aktivni derivati uracila. Razvoj fluoropirimidina kao lijekova je započeo 1950-ih godina kad je primijećeno da tumorske stanice jetre štakora metaboliziraju uracil brže nego normalna tkiva. Stoga je zaključeno da je metabolizam uracila važan terapijski cilj na području kemoterapije (Longley i sur., 2003).

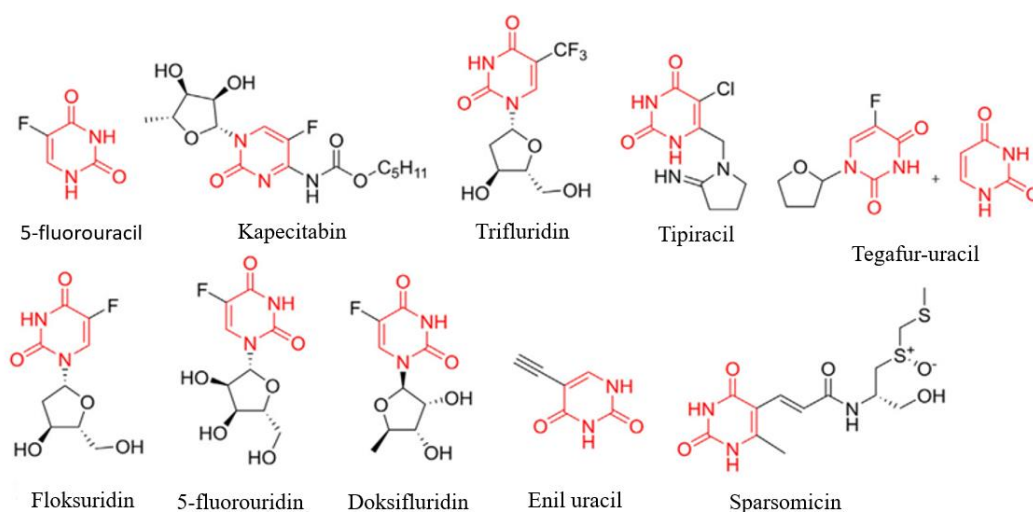
5-fluorouracil (5-FU) (slika 6) je antimetabolit uracila i jedan od najčešće korištenih antitumorskih agenasa za liječenje oboljelih od karcinoma dojke i debelog crijeva. 5-FU se intracelularno pretvara u nekoliko aktivnih metabolita (fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) i fluorouridin trifosfat (FUTP)) koji ometaju aktivnost timidilat sintaze te sintezu RNA i time zaustavljaju rast tumorskih stanica (Longley i sur., 2003).



Slika 6. Struktura 5-fluorouracila (Longley i sur., 2003)

Nažalost, kratko vrijeme poluraspada, široka distribucija, niska selektivnost i razne nuspojave kao što su mijelosupresija, mukozitis, stomatitis, neuro- i kardiotoksičnost, ograničavaju primjenu 5-fluorouracila. Njegovim modifikacijama dobivaju se različiti derivati s poboljšanim terapijskim učinkom koji se intracelularno metaboliziraju u 5-fluorouracil

slijedeći isti mehanizam djelovanja. Derivati, čije su strukture prikazane na slici 7, odobreni za kemoterapiju su kapecitabin, tegafur-uracil i trifluridin-tipiracil za kolorektalni karcinom, uramustin (uracil-mustard) za leukemiju i floksuridin za gastrointestinalni adenokarcinom. Analози uracila poput 5-fluorouridina, doksifluridina, enil uracila nalaze se u fazi I ispitivanja za liječenje raka gušterače (Ramesh i sur., 2020).

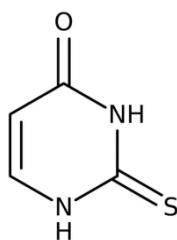


Slika 7. Kemijske strukture raznih uracilnih kemoterapeutika (prema Ramesh i sur., 2020)

Osim antitumorskog učinka, derivati uracila pokazuju značajan antivirusni potencijal koji se temelji se na inhibiciji ključnog koraka u replikaciji virusa kao što su HIV, hepatitis B i C te virus herpesa (Ramesh i sur., 2020). Alkinilna skupina na položaju C5 je povoljna za kemijske transformacije, a selektivnost antivirusnog djelovanja ovih spojeva raste s povećanjem veličine supstituenta (Blewett i sur., 2001).

2.2.3. Derivati 2-tiouracila

Tiouracil ($C_4H_4N_2OS$) je sumporni analog uracila (slika 8) te predstavlja prvi tioamidni antitireoidni lijek. Tio-derivati pirimidinskih baza uključujući 2-tiouracil, 6-metil-2-tiouracil i 2-tiocitozin manje su komponente t-RNA, a osim toga, značajno pridonose biološkoj, farmakološkoj i medicinskoj kemiji zbog svojih bioloških, farmakoloških i spektroskopskih aktivnosti. Njihovi *S*-, *N*- ili *S,N*-disupstituirani analozi pokazali su terapijska svojstva, posebno antivirusno (Tanaka i sur., 1995), antitireoidno i antitumorsko djelovanje (Tjarks i Gabel, 1991). Također se istražuju kao biosenzori te radioprotektori (Pospieszny i sur., 2010).



Slika 8. Struktura 2-tiouracila (Mohamed i sur., 2015)

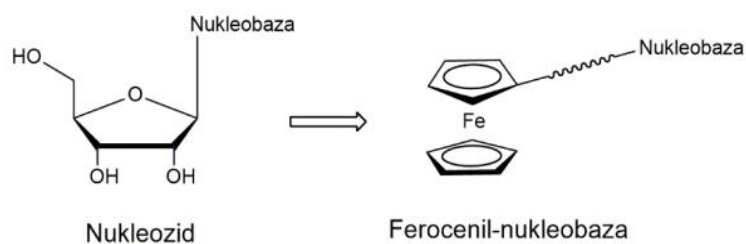
Analozi 5- i 5,6-supstituiranog 2-tiouracila u literaturi su opisani kao antikancerogena, antimikrobna i antivirusna sredstva (Awad i sur., 2018; Prachayasittikul i sur., 2009). Derivati 5-cijano-2-tiouracila i njihovi kondenzirani heterocikli pokazali su antikancerogeno djelovanje prema tumorskim humanim staničnim linijama, kao što su stanice tumora dojke (MCF7), debelog crijeva (HCT-116), jetre (HEPG-2), leukemije (MOLT4), raka vrata maternice (HeLa) i raka bubrega (Mohamed i sur., 2015).

2-tiouracilni analozi supstituirani u položaju C6 također se ističu dobrim biološkim djelovanjem pa se u taj položaj uvode različiti supstituenti za dizajniranje molekula željene aktivnosti. Tako je 6-metil-2-tiouracil antitireoidni spoj koji inducira modifikacije u štitnjači. Koristi se u liječenju hipertireoze, stanja povećane aktivnosti štitnjače, tako što inhibira sintezu njezinih hormona. Može djelovati kao stresor zbog sposobnosti suzbijanja aktivnosti štitnjače te posljedično ima inhibitorske učinke na rast i reprodukciju organizma (Peebles i sur., 1997). 6-Propil-2-tiouracil je najpoznatiji antitireoidni lijek koji se također koristi u liječenju hipertireoze te Gravesove bolesti, autoimune bolesti posredovane imunoglobulinima koji stimuliraju rad štitnjače što rezultira hipertireozom. Djeluje na način da inhibira aktivnost tiroidne peroksidaze i blokira konverziju tiroksina (T4) u trijodtironin (T3) (NCBI, 2004b).

2.3. BOKONJUGATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

Organometalni derivati nukleobaza nova su generacija konjugata u kojima su metaloceni povezani s pirimidinima i purinima. Do sada je ferocen konjugiran s mnoštvom bioloških molekula kao što su biotin, antibiotici, peptidi, šećeri, steroidni hormoni, auroi i nukleozidi. U tom smislu, nukleobaze, koje imaju ključnu ulogu u biologiji i farmakologiji, atraktivna su meta za konjugaciju s ferocenom. Chen i suradnici su 1980. godine po prvi put pripravili ferocenske derivate nukleobaza odnosno pripravili su *N*-supstituirani ferocenilmetiladenin za koji se pokazalo da može ostvariti interakcije s DNA molekulom preko vodikove veze.

Osnovna struktura biokonjugata ferocena i nukleobaza prikazana je na slici 9 iz koje je vidljivo kako ferocen zamjenjuje šećerni fragment u nukleozidu te je različitim skupinama, odnosno molekulskim mostom, kovalentno vezan na nukleobazu. Vezanje supstituenata na molekulu ferocena omogućeno je rotacijom ciklopentadienilnih prstenova ferocena koji poprima biološke karakteristike kada se na njega veže neka biološka molekula poput nukleobaze. Ferocen se veže na dušičnu bazu kao *N*-supstituent, a mjesto na kojem se veže određuje biološka svojstva samog spoja (Kowalski i sur., 2013). Osim što kemijske modifikacije ferocenskog dijela derivata ili same nukleobaze mogu rezultirati različitom aktivnošću derivata, molekulski most (linker) koji spaja navedene dijelove također može utjecati na svojstva navedenih konjugata. Uz alkilne, metilenske i metinske linkere, sintetizirani su konjugati s karbonilnom skupinom u mostu koji oponašaju prirodne nukleozide gdje je, kao što je već navedeno, šećerna komponenta zamijenjena ferocenom i preko amidne veze vezana na nukleobazu (Lapić i sur., 2015).

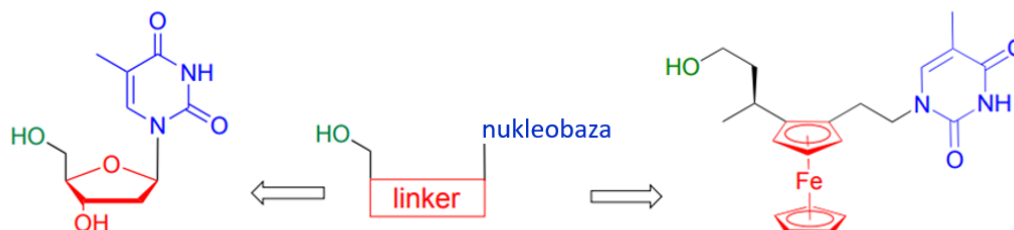


Slika 9. Osnovna struktura konjugata ferocena i nukleobaza (prema Kowalski, 2016)

Provedena *in vitro* biološka ispitivanja različitih ferocenskih nukleobaza pokazuju njihovo citotoksično djelovanje na različite tumorske stanice (Nguyen i sur., 2014; Djaković i sur. 2020), antiparazitsku, antitripanosomsku (Kowalski i sur., 2017) i antibakterijsku aktivnost (Kowalski i sur., 2013), te mogućnost stvaranja ROS vrsta (Djaković i sur., 2020), dok su neki pokazali i antitumorsku aktivnost *in vivo* (Simenel i sur., 2009). Tako primjerice, sintetizirani *N1*-feroceniimetil derivat timina pokazuje aktivnost prema adenokarcinomu dojke i dobar sinergijski učinak s ciklofosfamidom prema Lewisovom karcinomu pluća *in vivo* (Simenel i sur., 2009), a derivat ferocena i timina s nezasićenim mostom pokazuje dobru antitumorsku aktivnost *in vitro* na MCF-7 staničnim linijama s niskom vrijednošću IC50 u odnosu na cisplatin, široko poznati kemoterapeutski agens koji se koristi kao referentni lijek s dobro poznatom antitumorskom aktivnošću (Kowalski i sur., 2013).

Uz istraživanja antitumorske aktivnosti konjugata ferocena i nukleobaza, ispituje se i učinak ferocenskih nukleozidnih analoga na tumorske stanice. U strukturi navedenih analoga,

šećerna komponenta je zamijenjena linkerom, odnosno ferocenom, koji je bis-supstituiran, odnosno supstituiran nukleobazom s jedne strane i hidroksialkilnom skupinom s druge (slika 10) (Nguyen i sur., 2014).



Slika 10. Struktura timidina; nukleozidnog analoga; ferocenskog nukleozidnog analoga (prema Ismail i sur., 2020)

Nguyen i suradnici (2014) ispitali su antitumorsko djelovanje ferocenskih nukleozidnih analoga koji su sadržavali nukleobazu (timin ili adenin) i hidroksialkilnu skupinu vezane na ferocen. Uz to, određivana je aktivnost ferocetil nukleobaza te hidroksialkil ferocena. Antitumorska aktivnost ferocenskih spojeva se uspoređivala s aktivnošću već poznatih antikancerogenih lijekova, cisplatinom i 5-fluorouracilom. Test proliferacije proveden na tri tumorske stanične linije: stanice mišje limfocitne leukemije (L1210), HeLa i ljudske T-limfocitne stanice (CEM). Dobiveni rezultati pokazuju da je prisutnost hidroksialkilne i nukleobazne komponente potrebna za optimalnu aktivnost usporedivu s cisplatinom. Naknadnim istraživanjem SAR, odnosa strukture i aktivnosti, pokazalo se da postoji odnos između aktivnosti i duljine hidroksialkilne komponentne u ispitivanim analogima te da je ona veća što je veća duljina hidroksialkilnog lanca. Uz to, Ismail i suradnici (2020) kako bi ispitali ulogu metalocena u navedenim analogima, su sintetizirali nukleozide u kojima je ferocen zamijenjen rutenocenom. Rutenocen je stabilan metalocen, podložan funkcionalizaciji, drugačijih redoks svojstava od ferocena, s pozitivnijim oksidacijskim potencijalom te manje reverzibilnom elektrokemijom. Antitumorska aktivnost rutenocenskih nukleozida prema stanicama raka gušterače bila je znatno niža u odnosu na ferocenske nukleozide što ukazuje da izbor metalocena je ključan za antikancerogenu aktivnost nukleozidnih analoga.

Uz navedene biološke aktivnosti ferocetil nukleobaza, zbog samoorganizirajuće prirode nukleobaza (formiranje parova baza preko vodikove veze, π - π interakcija te hidrofobnih interakcija u DNA/RNA molekulama) i elektrokemijske aktivnosti ferocena, ovi se biokonjugati također istražuju u kemiji materijala te u bioanalitičkoj kemiji kao biosenzori u

kojima ferocenski derivati posreduju prijenosu elektrona između elektrode i aktivnog mjesta enzima (Takahashi i Anzai, 2013). Uz to, ferocenski konjugati nukleinskih baza se koriste u istraživanju ksenonukleinskih kiselina (XNA). XNA označava sintetski modificirane nukleinske kiseline čiji su uobičajeni šećeri zamijenjeni alternativnom šećernom komponentom ili nekim spojem koji nije šećer. Ferocen je, zbog njegove redoks aktivnosti, jedna od najzanimljivijih organometalnih komponenata u XNA. Studije XNA su važne za temeljno razumijevanje fenomena pohrane i obrade genetskih informacija, ali i za terapijske primjene (Kowalski, 2016).

2.4. PRIMJENA KULTURE STANICA U IN VITRO ISPITIVANJIMA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva te novosintetiziranih spojeva, provodi se izvođenjem niza testova u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) ili na različitim pokusnim organizmima (*in vivo*) kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov učinak na ljudski organizam. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. *In vitro* testovi zasnivaju na činjenici da se pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva i organa mogu održavati u umjetnom okolišu i smatrati se zasebnim organizmom u uvjetima *in vitro*. Uzgoj stanica izvan živog organizma omogućen je upotrebom odgovarajućeg medija za uzgoj koji sadrži sve potrebne hranjive tvari za rast stanica te osiguravanjem odgovarajućih fizikalno-kemijskih uvjeta (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Kultura životinjskih stanica je uzgoj stanica izoliranih iz različitih tkiva i organa životinja u umjetnom hranjivom mediju. Danas je glavna grana moderne biotehnologije čiji je napredak ostvaren povezivanjem istraživanja u područjima medicine, biologije, proteinske kemije i inženjerstva. Kulture stanica pripravljene iz tkiva ili organa uzetih neposredno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama. Subkultiviranjem primarne kulture dovodi do razvoja stanične linije koja nakon nekoliko subkultiviranja može odumrijeti pa se naziva konačna stanična linija ili se transformiranjem može prevesti u kontinuiranu staničnu liniju koja se očituje u neograničenom broju dioba koje stanica može ostvariti. Glavna prednost primjene kulture životinjskih stanica je dobivanje ponovljivih rezultata zbog mogućnosti korištenja istog tipa stanica ili homogene populacije, bolja mogućnost kontrole staničnog okoliša, manji troškovi, visok stupanj standardizacije, brzina izvođenja, manja količina toksičnog otpada te smanjen broj pokusnih životinja. Nedostaci primjene *in vitro* testova su nedovoljna ili potpuna odsutnost metaboličke aktivacije u staničnim sustavima, izmijenjena

svojstva stanica u *in vitro* sustavima te nedostatak validacije ili službenog vrednovanja (Slivac i sur., 2016). Unatoč navedenim nedostacima, primjena kultura stanica u ispitivanju novosintetiziranih spojeva je neizostavan dio istraživanja i razvoja novih lijekova.

U svakodnevnom znanstveno-istraživačkom radu najčešće se koriste kontinuirane, besmrtnne stanične linije. Pri *in vitro* ispitivanju biološke aktivnosti prirodnih spojeva najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije koje su dostupne putem banka stanica. Dvije najveće kolekcije stanica koje obuhvaćaju preko 3000 različitih linija su *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Među znanstvenicima je najpoznatija humana stanična linija HeLa, epitelne morfologije i izolirana iz adenokarcinoma grlića maternice 1952., dok se u biotehnološkim procesima najčešće upotrebljava stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-K1 (engl. *Chinese Hamster Ovary*).

Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se odnosi na sposobnost ispitivane tvari da ošteti žive stanice međudjelovanjem ispitivane tvari i procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Navedeni testovi se koriste za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja. Također, ovi testovi mogu pripomoći u određivanju mehanizma djelovanja određene tvari. Podaci osnovne citotoksičnosti izražavaju se kao IC50 vrijednost (koncentracija ispitivane tvari koja inhibira rast 50% stanica u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama). IC50 se može matematički izračunati iz krivulje odnosa koncentracija-učinak. Osim inhibitornog djelovanja, *in vitro* testovima, također se može odrediti stimulatorni, odnosno, pozitivan učinak na rast stanica u kulturi.

Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti spojeva primjenom kultura stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). Bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan pomoću enzima sukcinat-dehidrogenaze. Postoje i novije izvedbe te metode u kojima se kao supstrati koriste WST-1 i MTS, koji se metaboliziraju u produkt topiv u mediju za uzgoj stanica pa takav protokol ima jedan korak manje nego klasična metoda. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije uzorka i kontrole, odnosno tretiranih i netretiranih stanica. Uz MTT metodu, citotoksičnost se može odrediti Neutral Red metodom, Kenacid Blue metodom i Trypan Blue, bojanje bojom kristal-ljubičastom, testom proliferacije stanica i smanjenjem razine ATP-a. Budući da se metode temelje na različitim principima, korištenjem više različitih metoda, može se doći do ideje mehanizma djelovanja ispitivanog

spoja, odnosno mehanizma toksičnosti, dok korištenje različitih staničnih linija može ukazati na ciljne stanice za ispitivanu tvar (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

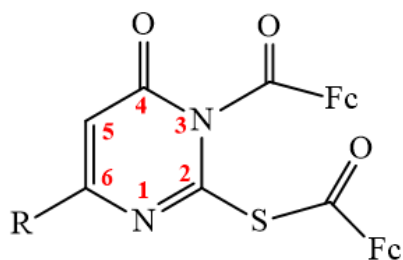
Najčešće ispitivana svojstva biološki aktivnih tvari su antitumorski i antioksidacijski učinak, ali također i antimikrobno, antihiperглиkemijsko, antiinflatorno, analgetsko, antikoagulantno, antihipertenzivno djelovanje (Barba-Ostria i sur., 2022). Veliki broj prirodnih i novosintetiziranih spojeva, pokazuju *in vitro* antitumorsku aktivnost te predstavljaju potencijalni izvor farmakološki aktivnih spojeva u procesu istraživanja i razvoja lijekova. Nacionalni institut za rak (NCI, eng. *National Cancer Institute*) je predložio primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija. Cilj ovakog pristupa je ustvrditi relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju. Ispitivanje tvari od interesa pomoću panela NCI60 uključuje primjenu dvodimenzionalnih (2D) kultura tumorskih stanica koje se uzgajaju u jednom sloju na ravnoj površini. Tijekom prve faze probira, testiranje se provodi na tri stanične linije, najčešće MCF7 (adenokarcinom dojke), NCI-H460 (karcinom pluća) i SF-268 (gliom), koje su među najosjetljivijima na terapiju lijekovima. Ako ispitivana tvar inhibira rast najmanje jednu staničnu liniju, testiranje prelazi na sljedeću fazu koja uključuje 60 staničnih linija (Kitaeva i sur., 2020). Ovaj i slični *in vitro* testovi služe kao sredstvo za odabir spojeva koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja.

3. ESKPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila

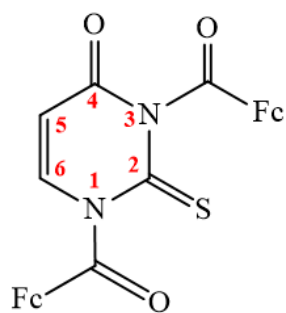
U ovom diplomskom radu provedeno je ispitivanje biološke aktivnosti četiri biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (slika 11), sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Pripravljene biokonjugate (**1**, **2**, **3**) razlikuju se u strukturi po supstituentu na C6: **1** R=H (2-tiouracil), **2** R= -CH₃ (6-metil-2-tiouracil), **3** R= -CH₂CH₂CH₃ (6-propil-2-tiouracil). Spojevi **1**, **2**, **3** sadrže ferocenični dio vezan karbonylnim mostom na S2 i N3, dok spoj **4** sadrži ferocenični dio vezan karbonylnim mostom na položajima N1 i N3.



1 R=H

2 R= CH₃

3 R= CH₂CH₂CH₃



4

Slika 11. Kemijska struktura ispitivanih biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila

3.1.2. Kemikalije

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

3.1.3. Puferi i otopine

PBS pufer (pH=7,4):

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

Otopina tripan plavo (0,4 %):

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

Otopina kristal violet (0,2 %):

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

3.1.4. HeLa stanična linija

U ovom istraživanju korištena je tumorska stanična linija HeLa. Stanična linija HeLa potječe od karcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks, po kojoj je i dobila ime. HeLa stanice su prve ljudske stanice uspješno uzgojene u kulturi 1951. godine (Gey i sur., 1952) te je pomoću njih usavršen uzgoj stanica i tkiva. HeLa stanična linija predstavlja najčešće korištenu staničnu liniju u biološkim istraživanjima zaslužnu za karakterizaciju važnih bioloških procesa, kao i za brojna dostignuća u biomedicini. Jedna od najranijih primjena stanica HeLa je bila razvoj cjepiva protiv polio virusa (Scherer i sur., 1953.), a posljednjih godina HeLa stanična linija ima važnu ulogu u razvijanju omičkih tehnologija, kao što su genomika, transkriptomika i proteomika.

3.1.5. Uređaji i oprema

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

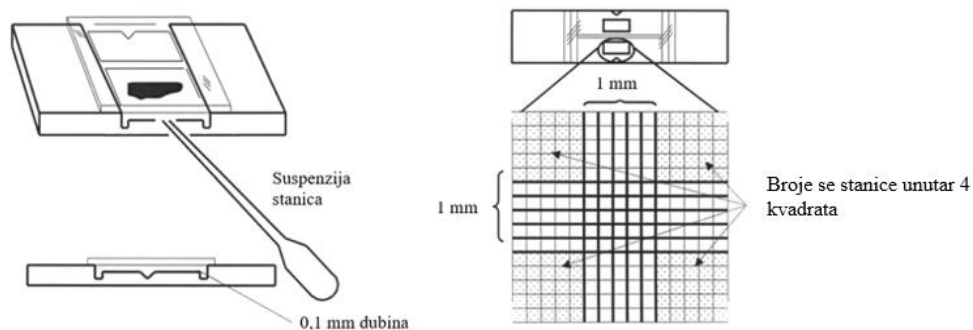
3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Nakon odmrzavanja, stanice se uzgajaju u DMEM mediju uz dodatak 5 % (v/v) FBS-a u Petrijevim zdjelicama ili T bocama za održavanje biomase. Uzgoj stanica provodi se u kontroliranim uvjetima u inkubatoru s atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ pri temperaturi od 37 °C. Uzgoj se svakodnevno kontrolira inverznim mikroskopom kako bi se pratila brojnost stanica, morfologija i prihvaćanje na podlogu za uzgoj. Kako bi se provelo ispitivanje biološke aktivnosti biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila, stanice se uzgajaju u pločama s jažicama u kojima se postavljaju pojedinačni pokusi.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Za određivanje broja stanica koristi se metoda bojanja otopinom tripan-plavo. Mrtve stanice, čija je membrana propusna, obojat će se plavo, dok će žive stanice ostati nebojene i svjetlije. Da bi se stanice pripremile za bojanje, prvo je potrebno ukloniti medij i isprati stanice PBS puferom. Nakon uklanjanja PBS-a, dodaje se tripsin kako bi se stanice odvojile od podloge. Da bi tripsin djelovao, stanice se inkubiraju na 37 °C oko 5 minuta. Odvajanje stanica povremeno se prati inverznim mikroskopom, a postupak odvajanja stanica od podloge je završio kada se stanice zaokruže. Kad su stanice odvojene dodaje se medij sa serumom kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina. Stanice se resuspendiraju te se uzima alikvot 20 μL suspenzije koja se pomiješa sa 20 μL boje tripan-plavo. Alikvot od 20 μL pripremljene otopine nanosi se u Neubauerovu komoricu za brojanje. Neubaureova kmorica sadrži 4 velika kvadrata od kojih se svaki sastoji od 16 manjih kvadratića (slika 12).



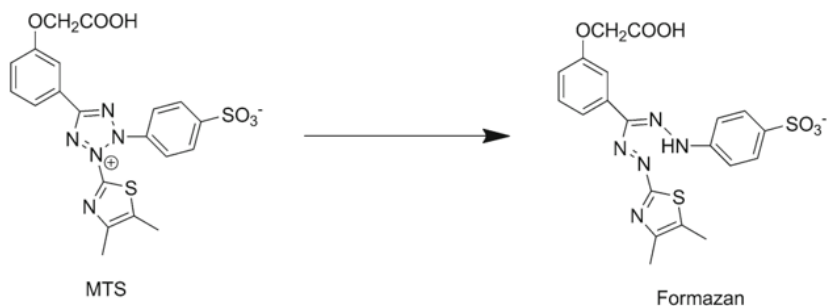
Slika 12. Prikaz Neubauerove komorice (prema NIOS, 2022)

Brojanje stanica se vrši u 4 velika kvadratića te se broj stanica po mL suspenzije određuje iz izraza:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} = \text{zbroj stanica u 4 kvadratića} \times 5000 \quad [1]$$

3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Za određivanje vijabilnosti stanica korišten je MTS test, odnosno The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, kolorimetrijska metoda za određivanje broja živih stanica u testovima citotoksičnosti i proliferacije. MTS metoda temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u ljubičasto obojeni produkt, formazan, koji je topljiv u staničnom mediju (slika 13). Pretvorba tetrazolijeve soli u formazan se odvija u metabolički aktivnim stanicama pomoću enzima dehidrogenaze, pri čemu dolazi do oksidacije koenzima NADPH ili NADH u NADP+ ili NAD+. Intenzitet obojenja medija direktno je proporcionalan broju živih stanica.



Slika 13. Redukcija tetrazolijeve soli (MTS) u formazan (*prema McCauley i sur., 2013*)

Nakon brojanja stanica u Neubaerovoj komorici izračunat je potreban volumen za naciepljivanje stanica u ploču s 96 jažica. U svaku jažicu naciepljeno je 100 μL suspenzije stanica, u početnoj koncentraciji od oko 3×10^4 stanica mL^{-1} . Stanice se inkubiraju na 37 °C te nakon 24 sata, kada su se stanice prihvatile za podlogu za rast i nastavile proliferirati, dodaju se ispitivani biokonjugati ferocena i 2-tiouracila u koncentracijama 7,81 mg L^{-1} , 15,62 mg L^{-1} , 31,25 mg L^{-1} , 62,5 mg L^{-1} i 125 mg L^{-1} . Nakon željenog vremena tretmana (24, 48 ili 72 sata), u svaku jažicu dodaje se po 10 μL MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija te se stanice inkubiraju naredna 3 do 4 sata na 37 °C. Potom se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča

pri valnoj duljini od 490 nm mjeri intenzitet razvijene boje, a izmjerena apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u jažici.

Preživljenje stanica (%) se izražava kao omjer apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju netretiranih kontrolnih stanica:

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

3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica bojom kristal-violet

Test formiranja kolonija ili klonogena analiza je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica koja se temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da formira koloniju. Klongenom analizom se ispituje sposobnost neograničenog rasta svake stanice u kulturi, što je glavno obilježje tumorskih stanica. Ovom metodom najčešće se mjeri utjecaj ionizirajućeg zračenja ili citotoksičnih agenasa na proliferaciju stanica i sposobnost formiranja kolonija.

Postupak klonogene analize započinje naciepljivanjem prethodno uzgojenih HeLa stanica u dvije ploče sa 6 jažica, u početnoj koncentraciji od 100 stanica u 2 mL medija po jažici. Stanice su inkubirane pri optimalnim uvjetima temperature i tlaka, a nakon 24 sata tretirane su sa ispitivanim ferocenskim biokonjugatima u koncentracijama 7,81 mg L⁻¹, 15,62 mg L⁻¹, 31,25 mg L⁻¹ i 62,5 mg L⁻¹. Uz to, u pločama je potrebno imati kontrolne stanice koje nisu tretirane ispitivanim spojevima. Tri dana nakon tretiranja stanica uklanja se hranjivi medij i zamjenjuje svježim medijom te se nastavlja uzgoj stanica u kulturi.

Preživjelim stanicama potrebno je određeno vrijeme za formiranje kolonija, najčešće oko 2-3 tjedana. Kada kolonije postanu vidljive, slijedi bojanje stanica bojom kristal ljubičasto. Postupak započinje uklanjanjem medija i ispiranjem stanica sa PBS puferom. Nakon toga, dodaje se metanol za fiksaciju stanica, koji se uklanja nakon 10 minuta. Ploča se ostavlja na zraku kako bi se potpuno osušila, a kako bi se proces sušenja ubrzao, ploče se mogu na kratko staviti i u laminar. Nakon sušenja dodaje se boja kristal ljubičasto koju je potrebno ravnomjerno rasporediti u jažicama i inkubirati 10 minuta. Završni korak uključuje uklanjanje boje i ispiranje jažica PBS-om i deioniziranom vodom nakon čega slijedi brojanje poraslih kolonija.

Na temelju broja poraslih kolonija računa se učinkovitost naciepljivanja (PE, eng. *plating efficiency*) tj. omjer broja poraslih kolonija u odnosu na broj stanica koje smo naciepili.

Potom se računa frakcija preživljenja (SF, eng. *surviving fraction*), odnosno udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima.

Učinkovitost naciepljivanja (PE)

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

Frakcija preživljenja (SF)

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

3.2.5. Analiza stanične smrti primjenom *Muse*TM analizatora staničnog zdravlja

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

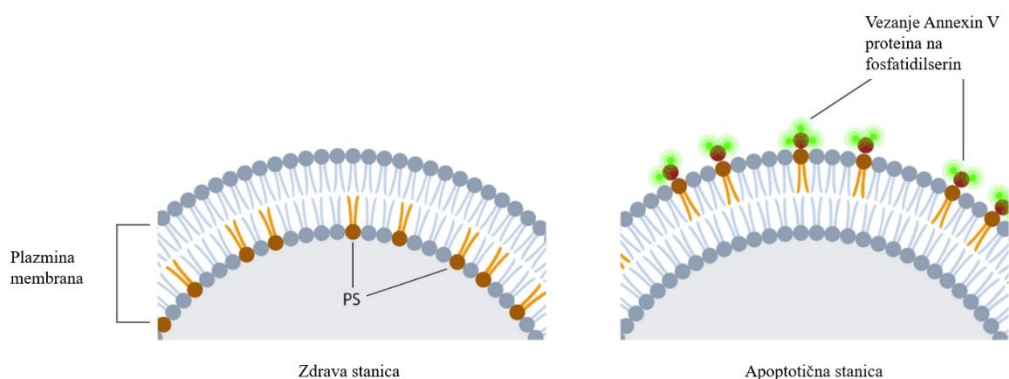
Tijekom ispitivanja biološke aktivnosti različitih spojeva *in vitro*, zapažena citotoksičnost je najčešće posljedica učinka tih tvari na dva osnovna stanična procesa, staničnu diobu i staničnu smrt. Navedeni procesi mogu se pratiti primjenom protočne citometrije, koja omogućuje analizu velikog broja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

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

*Muse*TM Annexin V & Dead Cell Kit omogućuje kvantitativnu analizu živih stanica, stanica u ranoj i u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica pomoću *Muse*TM analizatora staničnog zdravlja, bilo da se radi s adherentnim ili suspenzijskim staničnim linijama. Dobiveni rezultati

se izražavaju kao koncentracija (stanica mL⁻¹) te postotak živih, stanica u ranoj, kasnoj ili ukupnoj apoptozi te mrtvih stanica.

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagens sadrži Annexin V, protein ovisan o kalciju, koji ima visoki afinitet za vezanje na fosfatidilserin (PS). PS je lipid koji se u zdravim stanicama nalazi na unutarnjoj strani membrane stanice, dok se u stanicama u kojima je potaknuta stanična smrt procesom apoptoze translocira na vanjsku stranu membrane. Već u ranoj fazi apoptoze, molekule fosfatidilserina se premještaju na vanjsku površinu stanične membrane gdje se Annexin V veže na njih. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagens također sadrži 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), fluorescentni interkalator koji ima spektralni pomak nakon vezanja na DNA. Kompleks 7-AAD/DNA pobuđuje energija pri 488 nm dok mu je maksimum emisije pri 647 nm, što se primjenjuje pri analizi uzoraka. 7-AAD se uglavnom učinkovito izlučuje iz živih stanica, ali se može koristiti za obilježavanje stanica koje imaju oštećenu staničnu membranu ili su prethodno fiksirane i permeabilizirane, odnosno služi kao marker za mrtve stanice te neće obilježiti žive, zdrave te rano apoptotične stanice. Ova metoda omogućuje raniju detekciju apoptoze u odnosu metode kojima se određuje fragmentacija DNA ili aktivacija kaspaza budući da je jedna od prvih promjena u ranoj apoptozi premještanje PS s unutarnje na vanjsku stranu membrane (slika 14).



Slika 14. Translokacija fosfatidilserina na vanjsku stranu membrane i vezanje Annexin V proteina (*prema AAT Bioquest, 2021*)

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

- žive i zdrave stanice: annexin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: annexin V (+) i 7-AAD (-)
- kasna faza apoptoze i mrtve stanice: annexin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: annexin V (-) i 7-AAD (+)

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

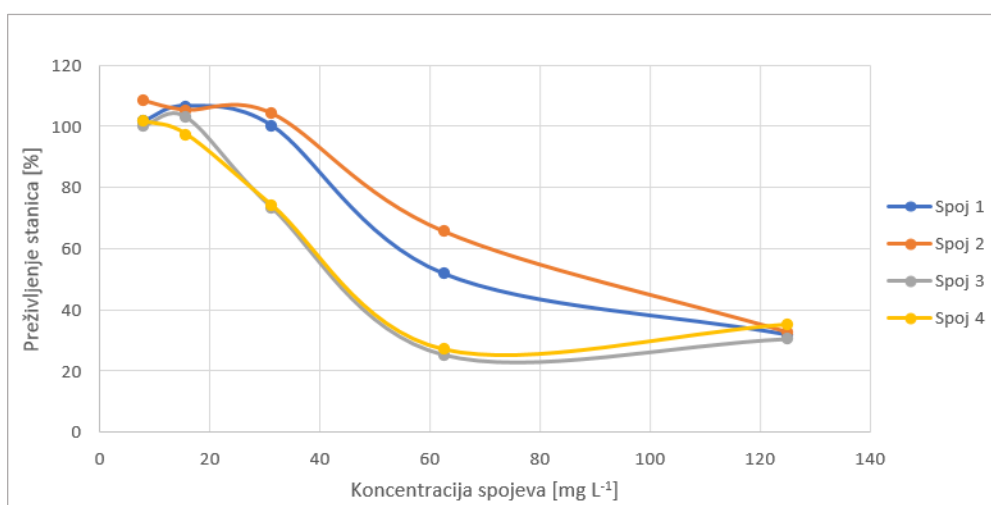
Tumor, koji nastaje kao posljedica nekontrolirane proliferacije stanica u organizmu, je jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu. U 2021. godini je u svijetu od tumora umrlo više od 10 milijuna ljudi. Stoga je velika potreba za razvojem novih, ali i učinkovitijih i selektivnijih antitumorskih lijekova, što predstavlja vrlo atraktivno područje u medicinskoj kemiji. Istraživanja i razvoj novih lijekova dugotrajan je i skup proces pa je vrlo važan i nužan korak isključivanja nedjelotvornih spojeva preliminarnim *in vitro* ispitivanjima.

Mnogi ferocenski derivati u kojima je ferocen uveden u strukture već poznatih lijekova ili je povezan s drugim biološki važnim molekulama, pokazuju različite biološke aktivnosti poput antitumorskog, antibakterijskog, antifungalnog i antiparazitskog učinka, a nukleobaze i njihovi analozi su poznati kemoterapeutici. Mehanizam tumorske aktivnosti ferocenskih derivata pripisuje se redoks-aktivnosti ferocena, odnosno sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Razvoj novih ferocenskih derivata usmjeren je prema sintezi novih spojeva s poboljšanim biološkim svojstvima, kao i otkrivanju njihovih drugih mogućih primjena.

Stoga su u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, pripremljeni konjugati koji uključuju ferocen kao elektrokemijski aktivni fragment i nukleobaze kao osnovne strukturne jedinice nukleinskih kiselina. U ovom radu je ispitano biološko djelovanje četiri biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na *in vitro* rast i proliferaciju humanih stanica karcinoma grlića maternice (stanična linija HeLa) te njihov učinak na osnovne stanične procese.

4.1. UČINAK BIOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA NA HeLa STANIČNU LINIJU

Prethodno uzgojene HeLa stanice nacjepljene su na mikrotitarsku ploču s 96 jažica te nakon 24 sata tretirane biokonjugatima ferocena i derivata 2-tiouracila u rasponu koncentracija od 7,81 do 125 mg L⁻¹, kako bi se ispitaio njihov učinak na rast i proliferaciju stanica. 72 sata nakon tretmana, MTS metodom te primjenom čitača mikrotitarskih ploča određena je vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja prikazani su grafički kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji spojeva kojima su stanice tretirane (slika 15).



Slika 15. Utjecaj spojeva 1-4 u koncentracijama 7,81-125 mg L⁻¹ na preživljenje HeLa stanične linije

Uvidom u dobivene rezultate vidljiv je inhibitorni učinak sva četiri spoja na rast HeLa stanične linije. Spojevi 1 i 2 u koncentracijama od 7,81; 15,62 i 31,25 mg L⁻¹ ne pokazuju inhibitorni učinak na rast stanica. Tek pri većim koncentracijama spojeva 1 i 2 (62,5 i 125 mg L⁻¹) vidljiv je inhibitorni učinak na rast stanica, pri čemu je on veći što je veća koncentracija spojeva. Pri najvećoj koncentraciji preživljenje HeLa stanica je 32,09 % za spoj 1 te 32,80 % za spoj 2. Kod spojeva 3 i 4, koji u koncentracijama od 7,81 i 15,62 mg L⁻¹ ne pokazuju inhibitorni učinak, uočen je izraziti pad preživljena stanica između koncentracija 15,62 i 62,5 mg L⁻¹, pri čemu je pri koncentraciji od 62,5 mg L⁻¹ uočen najveći inhibitorni učinak, odnosno preživljenje stanica iznosi 25,31 % za spoj 3 te 27,19 % za spoj 4.

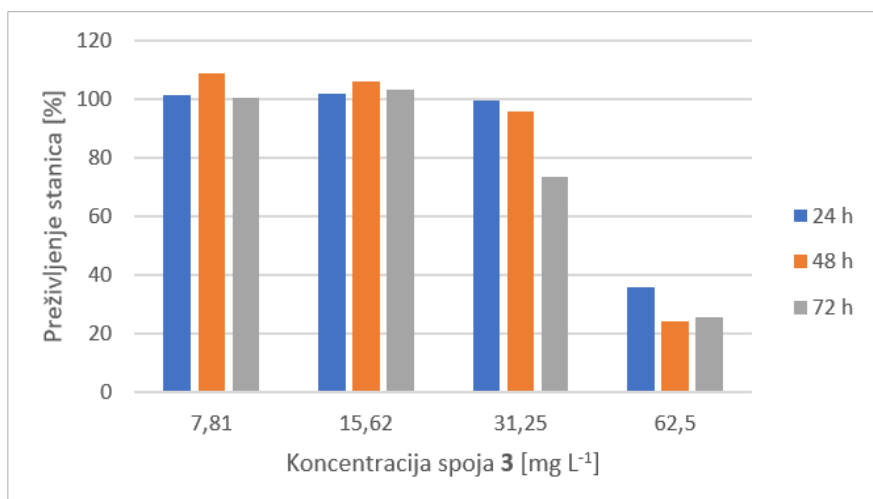
IC₅₀ vrijednost (eng. *Inhibitory concentration*) je koncentracija ispitivanog spoja pri kojoj dolazi do 50%-tne inhibicije staničnog rasta. Računa se iz jednadžbi krivulja ovisnosti

preživljenja stanica o dozi ispitivanog spoja primjenom one krivulje koja ju najbolje opisuje ($R^2 \sim 1$). Iz grafa na slici vidljivo je da najveću citotoksičnost naspram HeLa stanica pokazuju spojevi **3** i **4**. Izračunata IC50 vrijednost za spoj **3** je 43,90 mg L⁻¹, dok za spoj **4** iznosi 44,23 mg L⁻¹. Za spojeve **1** i **2**, koji pokazuju slabiji učinak, izračunata IC50 vrijednost iznosi 79,78 mg L⁻¹ odnosno 96,02 mg L⁻¹. Radi lakše usporedbe dobivenih rezultata sa rezultatima istraživanja zabilježenih u literaturi, IC50 vrijednosti izražene su u masenoj i molarnoj koncentraciji što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. IC50 vrijednosti za spojeve **1-4** izražene u masenoj i molarnoj koncentraciji.

	IC50 (mg L ⁻¹)	IC50 (μM)
Spoj 1	79,78	144,48
Spoj 2	96,02	169,58
Spoj 3	43,90	73,87
Spoj 4	44,23	80,10

U provedenim testovima citotoksičnosti zapažen je izraziti pad preživljenja stanica, odnosno povećanje inhibitornog učinka između koncentracija 15,62 i 62,5 mg L⁻¹ te je za daljnja ispitivanja uzet uži raspon koncentracija (od 7,81 do 62,5 mg L⁻¹), tj. isključena je najveća koncentracija od 125 mg L⁻¹. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da spoj **3** ima najizraženiji inhibitorni učinak te najnižu IC50 vrijednost. Uz to, ispitivano je ovisi li citotoksični učinak o vremenu izloženosti (24 h, 48 h i 72 h) HeLa stanica navedenim spojevima. Na slici 16 prikazan je samo učinak ovisan o dozi i vremenu za spoj **3**. Učinak ovisan o dozi vidljiv je samo pri koncentracijama višim od 31,25 mg L⁻¹ pri čemu je citotoksični učinak razmjernan povećanju koncentracije spoja, dok je učinak ovisan o vremenu tretmana vidljiv samo pri koncentraciji od 31,25 mg L⁻¹ gdje se inhibitorni učinak povećava s povećanjem vremena inkubacije, odnosno izloženosti stanica ispitivanom spoju.



Slika 16. Učinak spoja **3** na preživljenje HeLa stanične linije ovisan o koncentraciji i vremenu izloženosti

Učinak o dozi i vremenu izlaganja ispitan je i za ostale spojeve gdje je za spojeve **1** i **2** vidljiv je samo kod najveće koncentracije 62,5 mg L⁻¹, dok je za spoj **4** vidljiv kod koncentracija 31,25 i 62,5 mg L⁻¹ pri čemu se inhibitorni učinak povećava s povećanjem koncentracije i vremena izloženosti stanica navedenim spojevima.

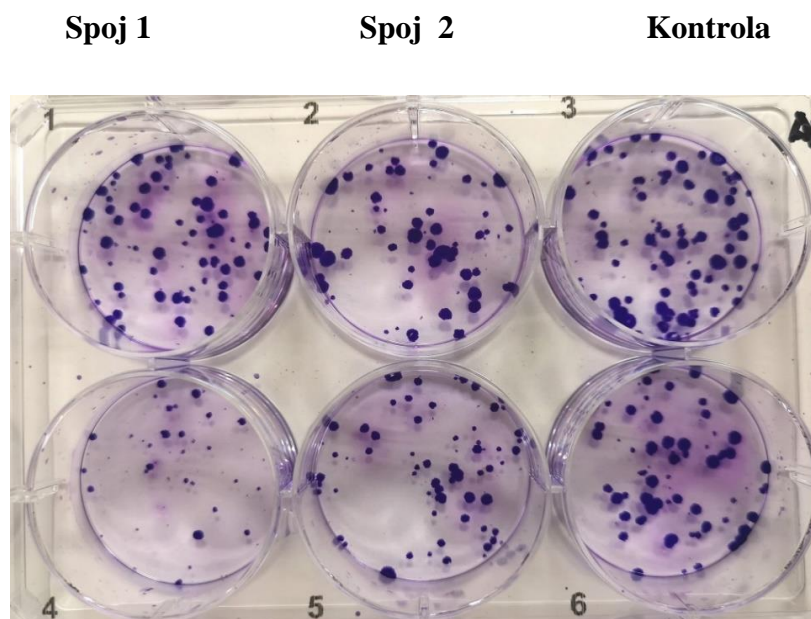
Djaković i suradnici (2020) u svome radu sintetizirali su mono- i bis-ferocenske konjugate vezane triazolnim linkerom na N1 i N3 položaj 5-supstituiranih derivata uracila te su ispitali njihovu aktivnost na različitim tumorskim staničnim linijama, učinak na stvaranje ROS-ova, disfunkciju membranskog potencijala mitohondrija te indukciju apoptoze. Ispitivanje citotoksičnog učinka provelo se na različitim humanim tumorskim staničnim linijama: HeLa, CaCo-2, K562, Raji, CCRF-CEM, HL-60, THP te na normalnim humanim MDCK stanicama (eng. *Madin-Darby canine kidney*). Bis-ferocenski derivati uracila pokazali su značajnije antiproliferativno djelovanje u odnosu na njihove mono-analoge. Bis-ferocenil metil- i halogeni derivati uracila pokazali su izraženu i selektivnu citotoksičnu aktivnost na stanice adenokarcinoma debelog crijeva (CaCo-2) i Burkittovog limfoma (Raji) (raspon IC₅₀ od 3,7 do 13 μM ovisno o ispitivanom konjugatu i tipu stanice) s većim učinkom i selektivnošću u odnosu na referentni lijek 5-fluorouracil (IC₅₀ = 8 μM). Uz to, bis-ferocenil-5-klorouracil pokazao je izrazitu antitumorsku aktivnost prema HeLa staničnoj liniji pri čemu je IC₅₀ iznosio 5,6 μM, što je značajno manje u odnosu na dobivene IC₅₀ vrijednosti spojeva ispitivanih u ovom radu. Navedeni spoj također je pokazao antitumorsku aktivnost prema CaCo-2 i Raji stanicama, s izraženijim citotoksičnim učinkom i selektivnošću u odnosu na 5-fluorouracil.

Navedeni biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila, čija se biološka aktivnost ispitivala u ovom radu, su tek u početnoj fazi istraživanja kao potencijalni terapijski agensi te u nama dostupnoj literaturi nema znanstvenih radova o njihovom biološkom učinku.

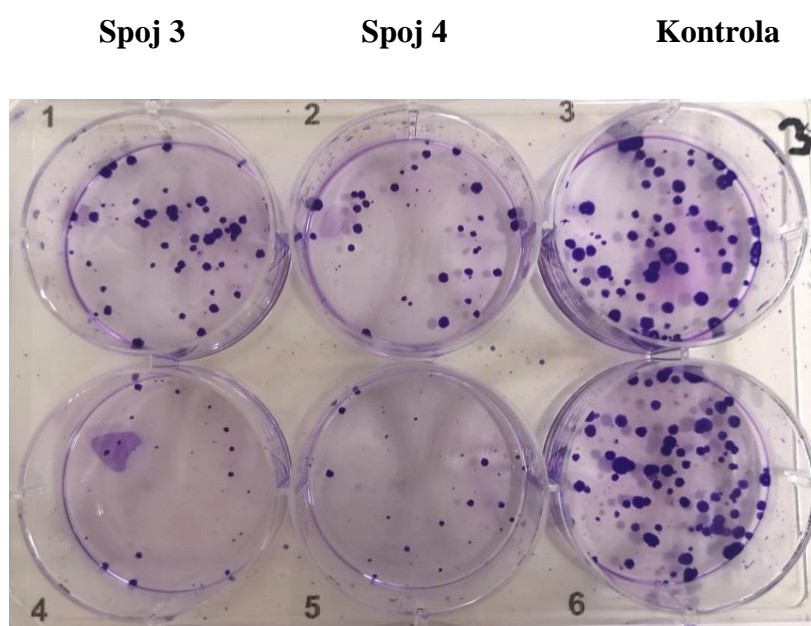
Stoga se rezultati dobiveni u ovom radu mogu uspoređivati s referentnim lijekovima s dobro poznatom antitumorskom aktivnošću, kao što su doksorubicin i cisplatin. Prema literaturi, IC₅₀ vrijednosti za doksorubicin i cisplatin određene na različitim humanim tumorskim staničnim linijama variraju uglavnom od 0,1 μM do 15 μM, ovisno o tipu stanice. IC₅₀ vrijednost cisplatina za HeLa staničnu liniju iznosi 6,87 μM (Cancerrxgene, 2022). Također, u radu Becit i suradnici (2020) ispitan je citotoksični učinak cisplatina na HeLa staničnu liniju pri čemu su IC₅₀ vrijednosti cisplatina iznosile 22,4 μM nakon 24h, odnosno 12,3 μM nakon 48 h. Prema tome, spojevi **1** i **2**, koji pokazuju slabiji učinak na inhibiciju rasta HeLa stanične linije i čije IC₅₀ vrijednosti iznose 144,48 μM, odnosno 169,58 μM, imaju izrazito slab antitumorski potencijal u odnosu na cisplatin. Za spojeve **3** i **4**, koji su u ovom radu pokazali izrazitiji citotoksični učinak, IC₅₀ vrijednost iznose 73,87 μM, odnosno 80,10 μM, što je znatno manje u odnosu na spojeve **1** i **2**. Iako su IC₅₀ vrijednosti spojeva **3** i **4** i dalje veće u odnosu na cisplatin, ovi spojevi posjeduju potencijal kao antitumorski lijekovi. Svakako su potrebna daljnja istraživanja, ali dobiveni rezultati su dobra smjernica za sintezu i razvoj novih, sličnih antitumorskih agenasa.

4.2. KLONOGENI POTENCIJAL BIOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA NA HeLa STANIČNU LINIJU

Stanice su naciepljene na ploče sa 6 jažica, a nakon 24 sata su tretirane ispitivanim biokonjugatima u koncentracijama 7,81 i 62,5 mg L⁻¹ te 15,62 i 31,25 mg L⁻¹ kako bismo ispitali njihovo djelovanje na sposobnost stanica da stvaraju kolonije. Nakon 18-19 dana uzgoja HeLa stanica došlo je do porasta vidljivih kolonija koje su zatim obojane bojom kristal violet te izbrojane. Na temelju dobivenih rezultata, izračunate su frakcije preživljenja što je prikazano u Tablici 2.



Slika 17. Rezultati klonogene analize nakon tretmana spojem 1 i 2; $15,62 \text{ mg L}^{-1}$ gornje jažice i $31,25 \text{ mg L}^{-1}$ donje jažice (*vlastita fotografija*)



Slika 18. Rezultati klonogene analize nakon tretmana spojem 3 i 4; $15,62 \text{ mg L}^{-1}$ gornje jažice i $31,25 \text{ mg L}^{-1}$ donje jažice (*vlastita fotografija*)

Tablica 2. Frakcije preživljenja (SF) za spojeve **1-4**.

Koncentracija (mg L⁻¹)	SF (Spoj 1)	SF (Spoj 2)	SF (Spoj 3)	SF (Spoj 4)
7,81	1	1,0612	0,8571	0,7551
15,62	1,0034	0,7973	0,5636	0,3711
31,25	0,3986	0,6460	0,2062	0,1787
62,5	0	0	0	0

U tablici 2 prikazane su vrijednosti frakcije preživljenja (SF) stanica tretiranih ispitivanim spojeva. Veća vrijednost frakcije preživljenja (~1) označava veću sposobnost stvaranja kolonija nakon tretmana ispitivanom tvari. Iz rezultata prikazanih u tablici 2, vidljivo je smanjenje SF vrijednosti s porastom koncentracije kod svih spojeva, odnosno sposobnost stvaranja kolonija smanjuje se s povećanjem koncentracije ispitivanih spojeva, dok pri najvećoj koncentraciji (62,5 mg L⁻¹) SF vrijednost za sve spojeve iznosi nula. Za spojeve **1 i 2** izračunate SF vrijednosti su veće u odnosu na spojeve **3 i 4**, što je u skladu s njihovim slabijim inhibicijskim djelovanjem u testovima citotoksičnosti. Iz navedenog može se zaključiti da su rezultati klonogene analize u skladu s testovima citotoksičnosti navedenih spojeva te da ispitani spojevi djeluju na klonogeni rast HeLa stanica.

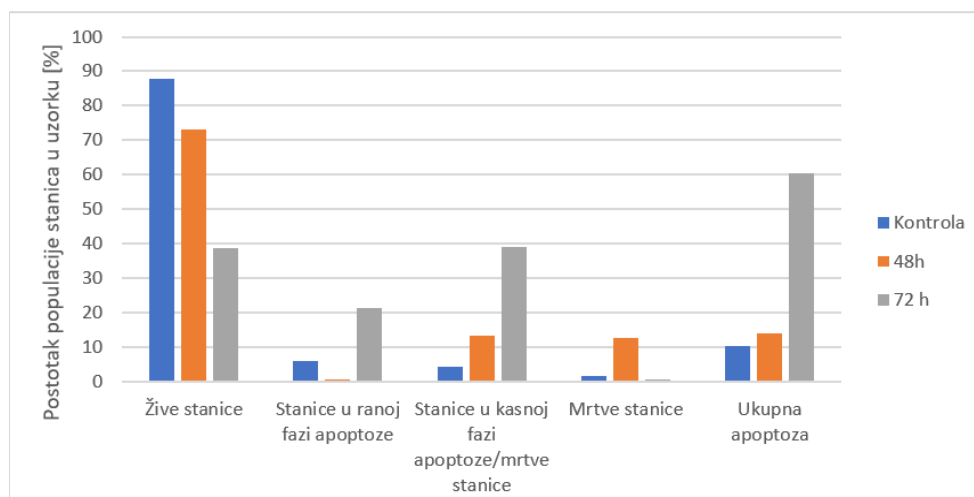
4.3. STANIČNA SMRT POTAKNUTA DJELOVANJEM BIKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA

Zapažena citotoksičnost ispitivanih biokonjugata može biti rezultat njihovog djelovanja na dva osnovna stanična procesa: staničnu diobu i/ili staničnu smrt. Apoptoza ili programirana stanična smrt je sastavni dio fiziološkog razvoja organizma te je nužna za održavanje stanične homeostaze, tj. ravnoteže između stvaranja i umiranja stanica normalnog tkiva tijekom života počevši od programiranog uništavanja stanica tijekom embriogeneze. Stanice pokreću apoptozu u sklopu različitih fizioloških procesa ili zbog patoloških oštećenja stanica uzrokovanih različitim vanjskim i unutrašnjim čimbenicima zbog čega postaju opasne i/ili nekorisne za organizam. Apoptoza može započeti zbog slabljenja ili izostanka pozitivnih signala potrebnih

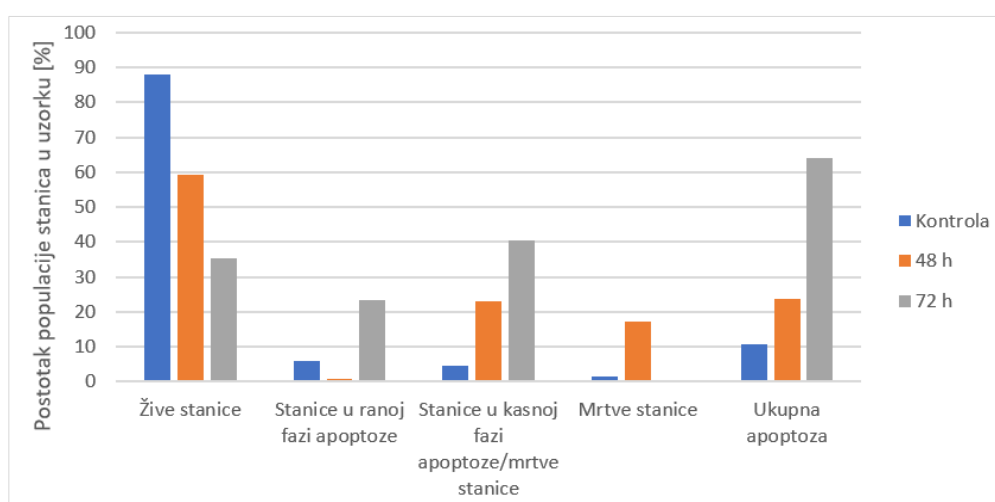
za preživljavanje stanica (citokini, faktori rasta i neki hormoni) ili zbog primanja negativnih signala kao što je oštećenje DNA. Niz čimbenika, uključujući ionizirajuća zračenja (UV, X-zrake), kemoterapeutike, lijekove te neki mikotoksini, dovode do oštećenja DNA što pokreće apoptozu same stanice. Nadalje štetni čimbenici, lijekovi poput analoga nukleozida i toksini mogu izazvati stres stanice te potaknuti apoptotski odgovor. Reaktivni spojevi kisika koji nastaju kao produkti aerobnog metabolizma u ljudskim stanicama mogu također aktivirati apoptozu djelujući na promjenu permeabilnosti membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c (Žlender, 2003).

Jedna od metoda za detekciju apoptoze je obilježavanje apoptotičnih stanica Annexin-V proteinom, koji se specifično i reverzibilno veže za fosfatidilserin (PS). Fosfatidilserin je lipid koji se u zdravim stanicama nalazi na unutarnjoj strani plazmine membrane, dok se u stanicama u kojima je potaknuta stanična smrt procesom apoptoze translocira na vanjsku stranu membrane čime se gubi asimetrija same membrane. Za utvrđivanje translociranog, odnosno vanjskog PS-a koristi se Annexin V protein konjugiran s nekim markerom za detekciju npr. fluorescentnom bojom. U ovom radu korišten je Muse™ analizator staničnog zdravlja koji omogućuje analizu živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica.

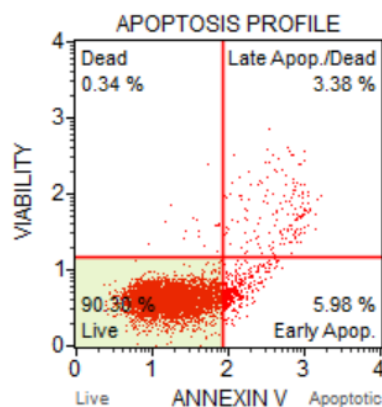
U provedenim testovima citotoksičnosti spojevi **3** i **4** pokazali su izraženiji citotoksični učinak u odnosu na spojeve **1** i **2**, što je dodatno potvrđeno klonogenom analizom. Najizraženiji inhibitorni učinak navedeni spojevi pokazali su pri najvećoj koncentraciji od $62,5 \text{ mg L}^{-1}$, a pri istoj koncentraciji u testovima klonogene analize nije narasla ni jedna kolonija. Iz navedenih razloga, provedena je analiza stanične smrti za spojeve **3** i **4**. Uz to, kako bi vidjeli postoji li utjecaj vremena izloženosti stanica na postotak apoptotičnih stanica, mjerenje je provedeno 48 i 72 sata nakon tretmana stanica navedenim spojevima. Rezultati analize prikazani su na slikama 19 i 20.



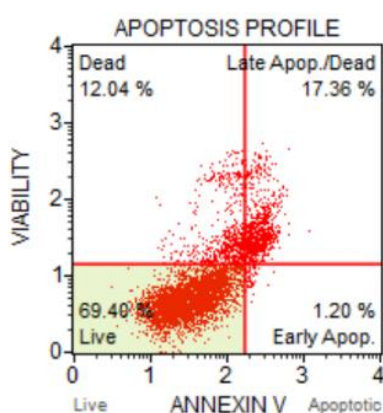
Slika 19. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasno apoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih HeLa stanica nakon 48-satnog i 72-satnog tretmana spojem **3** u koncentraciji od $62,5 \text{ mg L}^{-1}$



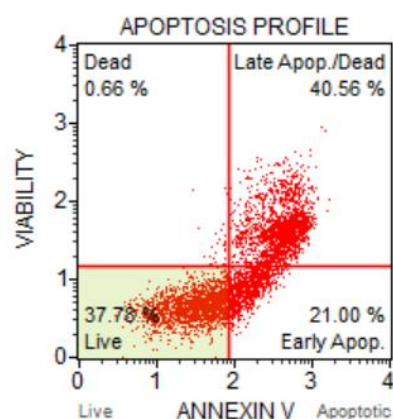
Slika 20. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, kasno apoptotičkih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih HeLa stanica nakon 48-satnog i 72-satnog tretmana spojem **4** u koncentraciji od $62,5 \text{ mg L}^{-1}$



a)



b)



c)

Slika 21. Reprezentativni histogrami analize tipa stanične smrti u uzorcima stanica HeLa: a) kontrolne stanice; b) nakon 48-satnog tretmana spojem **3**; c) nakon 72-satnog tretmana spojem **3**

Kao što se može vidjeti iz priloženih grafičkih prikaza rezultata na slikama 19 i 20, djelovanje spoja **3** i **4** može se povezati s aktiviranjem apoptotične smrti stanica. U uzorku, koji je tretiran spojem **3** u koncentraciji od $62,5 \text{ mg L}^{-1}$, izmjereno je ukupno 60,46 % apoptotičnih stanica od kojih je 21,32 % rano apoptotičnih stanica, a 39,14 % kasno apoptotičnih stanica. U uzorku tretiranom spojem **4**, u istoj koncentraciji od $62,5 \text{ mg L}^{-1}$, određeno je 64,06 % ukupno apoptotičnih stanica, od kojih je 23,45 % u ranoj fazi, a 40,61 % u kasnoj fazi apoptoze. Povećanjem vremena izloženosti stanica ispitivanim konjugatima, povećava se i udio apoptotičnih stanica. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom potvrdili su i u skladu su s rezultatima *in vitro* testova citotoksičnosti ferocenskih konjugata te s rezultatima klonogene analize. Spojevi **3** i **4** imaju veći potencijal kao mogući antitumorski agensi nego spojevi **1** i **2**, budući da su značajno inhibirali rast tumorske HeLa stanične linije

pri čemu se smanjenje preživljenja stanica uslijed djelovanja ispitivanih spojeva može povezati s poticanjem stanične smrti procesom apoptoze.

Na kraju, na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, možemo zaključiti da biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila imaju potencijal u razvoju antitumorskih lijekova, posebice spojevi **3** i **4** koji su pokazali najjače djelovanje na HeLa stanice. Svakako su potrebna daljnja istraživanja, ali dobiveni rezultati su bitna smjernica budućim istraživanjima za sintezu i razvoj novih, strukturno sličnih derivata ferocena i nukleobaza, poboljšanih bioloških svojstava.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitani biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila imaju inhibitorni učinak na rast i proliferaciju humane tumorske HeLa stanične linije. Njihov inhibitorni učinak ovisi o dozi te je inhibicija rasta stanica proporcionalna povećanju njihove koncentracije. Najizraženiji citotoksični učinak pokazuju spojevi **3** i **4**.
2. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila utječu na klonogeni rast HeLa stanica, pri čemu se sposobnost stvaranja kolonija smanjuje se s povećanjem koncentracije ispitivanih spojeva što je u skladu s testovima citotoksičnosti.
3. Inhibitorno djelovanje spojeva **3** i **4** na rast HeLa stanica može se povezati s poticanjem stanične smrti procesom apoptoze.
4. Na temelju citotoksičnog učinka, klonogene analize te sposobnosti indukcije apoptoze u tumorskim stanicama, može se zaključiti da ispitani biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila imaju potencijal kao antitumorski agensi.

6. LITERATURA

AAT Bioquest (2021) Annexin V <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/annexin-v>. Pristupljeno 22. veljače 2023.

Amir M, Javed SA, Kumar H (2007) Pyrimidine as antiinflammatory agent: A review. *Indian J Pharm Sci* **69** (3), 337-343. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.34540>

Awad SM, Youns MM, Ahmed NM (2018) Design, synthesis and biological evaluation of novel 2-thiouracil-5-sulfonamide isosteres as anticancer agents. *Pharmacophore* **9** (3), 13-24. <https://pharmacophorejournal.com/G2aDV8V>

Baraldi PG, Pavani MG, Nunez M, Brigidi P, Vitali B, Gambari R, Romagnoli R (2002) Antimicrobial and antitumor activity of N-heteroimine-1,2,3-dithiazoles and their transformation in triazolo- imidazo- and pyrazolopyrimidines. *Bioorg Med Chem* **10** (2), 449-456. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00294-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00294-2)

Barba-Ostria C, Carrera-Pacheco SE, Gonzalez-Pastor R, Heredia-Moya J, Mayorga-Ramos A, Rodríguez-Pólit C, Zúñiga-Miranda J, Arias-Almeida B, Guamán LP (2022) Evaluation of biological activity of natural compounds: Current trends and methods. *Molecules* **27**(14). <https://doi.org/10.3390/molecules27144490>

Bayly SR, Beer PD, Chen GZ (2008) Ferrocene Sensors. U: Štěpnička P (ured.) Ligands, Materials and Biomolecules, 1.izd. [online], John Wiley & Sons, Hoboken, str. 281-319. <https://doi.org/10.1002/9780470985663>

Becit M, Dilsiz SA, Basaran N (2020) Interaction of curcumin on cisplatin cytotoxicity in HeLa and HepG2 carcinoma cells. *Istanbul J Pharm* **50** (3), 202-210. <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2020.0039>

Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife J, Dive D (2011) The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite* **3**, 207–214. <https://doi.org/10.1051/parasite/2011183207>

Blewett S, McGuigan C, Barucki H, Andrei G, Snoeck R, De Clerq E, Balzarini J (2001) Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side

chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 1063–1066. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002492>

Braga SS, Silva AMS (2013) A new age for iron: antitumoral ferrocenes. *Organometallics* **32**, 5626–5639. <https://doi.org/10.1021/om400446y>

Cancerrxgene (2022) Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. https://www.cancerrxgene.org/compound/Cisplatin/1005/overview/ic50?screening_set=G_DSC1. Pristupljeno 27. ožujka 2023.

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

Čakić-Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90** (4), 537–569. <https://doi.org/10.5562/cca3246>

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

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522–6537. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.316>

Fouda MFR, Abd-Elzaher MM, Abdelsamaia RA, Labib AA (2007) On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl Organomet Chem* **21**, 613–625. <https://doi.org/10.1002/aoc.1202>

Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* **3**(7), 415-24. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00788-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00788-X)

Gangjee A, Vidwans A, Elzein E, McGuire JJ, Queener SF, Kisliuk RL (2001) Synthesis, antifolate and antitumor activities of classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-substitutedpyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *J Med Chem* **44**, 1993-2003. <https://doi.org/10.1021/jm0100382>

Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* **54**, 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>

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

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **12**, 264-265. <https://aacrjournals.org/cancerres/issue/12/4>

Ismail M, Khan Z, Rana M, Horswell S, Male L, Perotti A, Romero-Canelón I, Wilkinson EA, Hodges NJ, Tucker JHR (2020) Effect of regiochemistry and methylation on the anticancer activity of a ferrocene-containing organometallic nucleoside analogue. *ChemBioChem* **21** (17), 2487-2494. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000124>

Jain KS, Chitre TS, Miniyar PB, Kathiravan MK, Bendre VS, Veer VS, Shahane SR, Shishoo CJ (2006) Biological and medicinal significance of pyrimidines. *Curr Sci* **90**, 793-803. <https://www.jstor.org/stable/24089191>

Kealy, TJ, Pauson PL (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **168** (4285), 1039–1040. <https://doi.org/10.1038/1681039b0>

Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV (2020) Cell Culture Based *in vitro* Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol* **8** <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00322>

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

Kowalski K (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and application. *Coord Chem Rev* **317**, 132–156. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.008>

Kowalski K, Szczupak L, Saloman S, Steverding DJA, Vrček V, Hildebrandt A, Lang H, Rybarczyk-Pirek A (2017) Cymantrene, cyrhetrene and ferrocene nucleobase conjugates:

Synthesis, structure, computational study, electrochemistry and antitrypanosomal activity. *ChemPlusChem* **82**, 303-14. <https://doi.org/10.1002/cplu.201600462>

Kowalski K (2021) Organometallic nucleosides—Synthesis, transformations, and applications. *Coord Chem Rev* **432**. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213705>

Kraatz HB (2005) Ferrocene-conjugates of amino acids, peptides and nucleic acids. *J Inorg Organomet Polym Materials* **15**, 83-106. <https://doi.org/10.1007/s10904-004-2380-8>

Kumar N, Singh G, Yadav AK (2001) Synthesis of some new pyrido [2,3-d]pyrimidines and their ribofuranosides as possible antimicrobial agents. *Heteroat Chem* **12**, 52-56. [https://doi.org/10.1002/1098-1071\(2001\)12:1<52::AID-HC11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-1071(2001)12:1<52::AID-HC11>3.0.CO;2-0)

Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stutz AMM, Anna J, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Hauber W, Steinmetz LM (2013) The Genomic and Transcriptomic Landscape of HeLa Cell line. *G3: Genes, Genomes, Genet.* 1213-1224. <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>

Lapić J, Havaić V, Šakić D, Sanković K, Djaković S, Vrček V (2015) Ferrocenoyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An experimental and computational study of regioselective acylation of uracil, thymine, and 5-Fluorouracil. *Eur J Org Chem* 5424–5431. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500647>

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

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>

Mahapatra A, Prasad T, Sharma T (2017) Pyrimidine: a review on anticancer activity with key emphasis on SAR. *Future J Pharm Sci* **7** <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00274-8>

Makishima A (2019) Fundamental Knowledges and Techniques in Biochemistry. U: Biochemistry for Materials Science: Catalysts, Complexes and Proteins, 1. izd. [online], Elsevier Inc., Amsterdam, str. 35-51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817054-0.00002-3>

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

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

Nasr MN, Gineinah MM (2002) Pyrido [2,3-d]pyrimidines and pyrimido[5',4':5,6]pyrido[2,3-d] pyrimidines as new antiviral agents: synthesis and biological activity. *Arch Pharm* **335**, 289-295. [https://doi.org/10.1002/1521-4184\(200208\)335:6<289::AID-ARDP289>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4184(200208)335:6<289::AID-ARDP289>3.0.CO;2-Z)

NCBI (2004a) PubChem Compound Database. NCBI - National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>. Pristupljeno 12. prosinca 2022.

NCBI (2004b) PubChem Compound Database. NCBI - National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylthiouracil>. Pristupljeno 8. siječnja 2023.

NCBI (2005) PubChem Compound Database. NCBI - National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7611>. Pristupljeno 3. prosinca 2022.

Nguyen HV, Sallustrau A, Balzarini J, Bedford MR, Eden JC, Georgousi N, Hodges NJ, Kedge J, Mehellou Y, Tselepis C, Tucker JHR (2014) Organometallic nucleoside analogues with ferrocenyl linker groups: Synthesis and cancer cell line studies. *J Med Chem* **57**, 5817–5822. <https://doi.org/10.1021/jm500246h>

NIOS (2022) Maturation and development of leucocytes. NIOS - National Institute of Open Schooling, <https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/hbbt/Lesson-10.pdf>. Pristupljeno 20. prosinca 2022.

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

Parker WB (2009) Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev* **109**, 2880-2893. <https://doi.org/10.1021/cr900028p>

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

Peebles ED, Miller EH, Boyle CR, Brake JD, Latour MA, Thaxton JP (1997) Effects of consecutive thiouracil exposures in the juvenile and adult single comb White Leghorn chicken on body weight and reproductive performance. *Poult Sci* **76**, 236–243. <https://doi.org/10.1093/ps/76.2.236>

Peter S, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene-Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity. *Molecules* **24(19)**. <https://doi.org/10.3390/molecules24193604>

Pospieszny T, Małecka I, Paryzek Z (2010) A practical synthesis and spectroscopic study of new potentially biologically active S-lithocholic acid-substituted derivatives of 2-thiouracil. *Tetrahedron Lett* **51**, 4166-4169. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.05.094>

Prachayasittikul S, Sornsongkhram N, Pingaew R, Techatanachai S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2009) Synthesis and novel bioactivities of substituted 6-propylthiouracils. *Eur J Sci Res* **36**, 236-245. https://www.researchgate.net/publication/237347869_Synthesis_and_Novel_Bioactivities_of_Substituted_6-Propylthiouracils

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

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

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *J Exp Med* **97**, 695-710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>

Scutaru D, Mazilu I, Vata M, , Tataru L, Vlase A , Lixandru T, Simionescu C (1991) Monosubstituted derivatives of ferrocene. Ferrocene-containing penicillins and

cephalosporins. *J Organomet. Chem* **401**, 81-85. [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(91\)86197-X](https://doi.org/10.1016/0022-328X(91)86197-X)

Simenel AA, Morozova EA, Snegur LV, Zykova SI, Kachala VV, Ostrovskaya LA, Bluchterova NV, Fomina MM (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity *in vivo*. *Appl Organomet Chem* **23(6)**, 219–224. <https://doi.org/10.1002/aoc.1500>

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

Takahashi S, Anzai J (2013) Recent progress in ferrocene-modified thin films and nanoparticles for biosensors. *Materials* **6(12)**, 5742-5762. <https://doi.org/10.3390/ma6125742>

Tanaka H, Takashima H, Ubasawa M, Sekiya K, Inouye K, Baba M, Shigeta S, Walker RT, De Clercq E, Miyasaka T (1995) Synthesis and antiviral activity of 6-benzyl analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-5-(phenylthio)thymine (HEPT) as potent and selective anti-HIV-1 agents. *J Med Chem* **38**, 2860-2865. <https://doi.org/10.1021/jm00015a008>

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

Wang R, Chen H, Yan W, Zheng M, Zhang T, Zhang Y (2020) Ferrocene-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, mechanisms of action and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem* **190**, 112109. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112109>

Tjarks W, Gabel D (1991) Boron-containing thiouracil derivatives for neutron-capture therapy of melanoma. *J Med Chem* **34(1)**, 315–319. <https://doi.org/10.1021/jm00105a049>

Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc* **74(8)**, 2125–2126. <https://doi.org/10.1021/ja01128a527>

Zhi C, Long ZY, Manikowski A, Brown NC, Tarantino PM, Holm K, Dix EJ, Wright GE, Foster KA, Butler MM, LaMarr WA, Skow DJ, Motorina I, Lamothe S, Storer R (2005)

Synthesis Antibacterial Activity of 3-Substituted-6-(3-ethyl-4-methylanilino) uracils. *J Med Chem* **48**, 7063–7074. <https://doi.org/10.1021/jm050517r>

Žlender V (2003) Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol* **54**, 267-274. <https://hrcak.srce.hr/344>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja IVA LOGARUŠIĆ 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.

Logarušić

Vlastoručni potpis