

Biološka aktivnost ferocenskih konjugata s aminokiselinama

Nikolić, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:406257>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Andrea Nikolić
0058222687

**BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH KONJUGATA S AMINOKISELINAMA
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Organska kemija

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2024.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Lidije Barišić (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u BICRO BIOCentar d.o.o. pod voditeljstvom dr. sc. Marije Lovrić i uz pomoć dr. sc. Marte Žužić pri izradi rada.



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.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH KONJUGATA S AMINOKISELINAMA

Andrea Nikolić, 0058222687

Sažetak: Modifikacija strukture nativnih peptida s ferocenskim kalupom rezultira povećanom stabilnošću i aktivnošću rezultirajućih peptidomimetika. U ovom je radu provedena *in vitro* biološka evaluacija homokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D- Val (**1, 4**), Leu (**2, 5**) i Phe (**3, 6**) pri čemu je ispitan njihov utjecaj na morfologiju staničnih kultura HFF-1 i HepG2. Rezultati MTT testa pokazali su najveće antiproliferativno djelovanje ferocenskih konjugata s Phe (**3, 6**), koje je dovelo do vidnog narušavanja morfologije tumorske stanične linije HepG2 i njezinog odumiranja. Nadalje, jače inhibicijsko djelovanje konjugata **6** na tumorsku staničnu liniju HepG2 u odnosu na zdravu staničnu liniju HFF-1 indicira njegov terapijski potencijal.

Ključne riječi: *ferocen, peptidomimetici, in vitro biološka evaluacija, antiproliferativni učinak, MTT test*

Rad sadrži: 26 stranica, 10 slika, 1 tablica, 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehno-
loškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Komentor: dr. sc. Marija Lovrić, direktorica, BICRO BIOCentar d.o.o.

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marta Žužić, viša stručna suradnica, BICRO BIOCentar d.o.o.

Datum obrane: 8. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF FERROCENE CONJUGATES WITH AMINO ACIDS

Andrea Nikolić, 0058222687

Abstract: Modification of the structure of native peptides with a ferrocene template leads to increased stability and activity of the resulting peptidomimetics. In this study, an *in vitro* biological evaluation of the homochiral conjugates of ferrocene-1,1'-diamine with L- i D- Val (**1, 4**), Leu (**2, 5**) and Phe (**3, 6**) was performed to investigate their effect on the morphology of HFF-1 and HepG2 cell cultures. The results of MTT assay showed the highest antiproliferative activity of the ferrocene conjugates with Phe (**3, 6**), which caused visible disruption of the morphology and death of the HepG2 tumor cell line. The stronger inhibitory effect of conjugate **6** on the HepG2 tumor cell line compared to the healthy HFF-1 cell line also indicates its therapeutic potential.

Keywords: *ferrocene, peptidomimetics, in vitro biological evaluation, antiproliferative activity, MTT assay*

Thesis contains: 26 pages, 10 figures, 1 table, 30 references.

Original in: Croatian

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

Mentor: Lidija Barišić, PhD, Full Professor

Co-mentor: Marija Lovrić, PhD, Director, BICRO BIOCentre Ltd.

Technical support and assistance: Marta Žužić, PhD, senior associate, BICRO BIOCentre Ltd.

Thesis defended: July 8th, 2024.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PEPTIDOMIMETICI.....	2
2.2. FEROCEN.....	3
2.2.1. Potencijal lijekova na bazi metala	3
2.3. FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI.....	4
2.4. TESTOVI STANIČNE VIJABILNOSTI	5
2.4.1. <i>MTT test</i>	5
2.5. LJUDSKE STANIČNE LINIJE.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Ferocenski peptidi.....	9
3.1.2. Humane stanične linije.....	10
3.1.2.1. <i>Stanična linija HFF-1</i>	10
3.1.2.2. <i>Stanična linija HepG2</i>	10
3.1.3. Kemikalije	10
3.1.4. Uređaji	11
3.1.5. Potrošni materijal	11
3.1.6. Programi	11
3.2. METODE	11
3.2.1. Precjepeljivanje i određivanje broja stanica.....	11
3.2.2. Određivanje citotoksičnosti spojeva MTT metodom	12
3.2.3. Statistička obrada podataka	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4.1. UČINAK FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA 1-6 NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 I HEPG2	14
4.2. UČINAK STANDARDNOG KEMOTERAPEUTIKA ADRIAMYCINA NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 I HEPG2.....	20
4.3. UČINAK HOMOKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA	

MORFOLOGIJU HFF-1 I HEPG2 STANICA	21
5. ZAKLJUČCI.....	23
6. POPIS LITERATURE.....	24

1. UVOD

Cilj današnjih istraživanja novih peptidnih terapeutika usmjeren je na prevladavanje ograničenja već odobrenih peptidnih lijekova, a koja se odnose na njihovu metaboličku nestabilnost, nisku biodostupnost, izazivanje neželjenog biološkog odgovora i slabo ciljano djelovanje. Dizajn i razvoj novih biološki aktivnih peptidnih analoga kao inhibitora protein-protein interakcija pokazao se povoljnom strategijom, uzimajući u obzir da su proteini sveprisutni u biološkim procesima. Proteini predstavljaju najvažnije biološke makromolekule i ključni su za održavanje normalne funkcije organizma, kataliziraju metaboličke reakcije, odgovorni su za prijenos živčanih impulsa i imunološki odgovor (1). Povezanost s metabolizmom i biološkim sustavima omogućuje im terapijsku primjenu, no velika konformacijska fleksibilnost i nedovoljna biodostupnost ograničavaju njihovu kliničku primjenu.

Kako bi se prevladala navedena ograničenja proteina, osmišljeni su mali peptidni analozi koji sadrže farmakoforne elemente pomoću kojih oponašaju trodimenzijsku bioaktivnu konformaciju prirodnih peptida, a nazvani su peptidomimeticima. Peptidomimetici se odlikuju manjom fleksibilnošću i većom proteolitičkom stabilnošću zbog prisutnosti neprirodnog rigidnog kalupa, a njihova terapijska primjena moguća je ako uz to imaju velik afinitet i selektivnost prema receptorima što posljedično rezultira smanjenom pojavom neželjenih nuspojava (1).

S ciljem postizanja boljeg farmakološkog profila te pojačanih antiproliferativnih i antitumorskih svojstava, u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u male dipeptide ugrađuje se lipofilni ferocenski kalup koji ima ulogu začetnika elemenata sekundarne strukture u tako pripremljenim mimeticima (2).

U ovom radu proveden je MTT test u *in vitro* uvjetima na ferocenskim peptidomimeticima **1-6**, prethodno sintetiziranim u Laboratoriju za organsku kemiju, s ciljem određivanja njihove citotoksičnosti. Osim toga, cilj ovog istraživanja bio je i povezivanje kemijske strukture konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D- Val (**1, 4**), Leu (**2, 5**) i Phe (**3, 6**) s njihovim potencijalnim terapijskim djelovanjem i utjecajem na morfologiju staničnih linija HFF-1 i HepG2.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PEPTIDOMIMETICI

Peptidomimetici su spojevi koji oponašaju trodimenzijsku strukturu farmakofornih regija iz prirodnih proteina, a pri tome se odlikuju povećanom konformacijskom i proteolitičkom stabilnošću te poboljšanim biološkim učinkom prilikom interakcija s biološkim meta (1). Počeli su se razvijati zbog potrebe za unaprijeđenjem farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava proteina poput selektivnosti, metaboličke stabilnosti i biorasploživosti (1).

Proteini su biološke makromolekule čija je struktura određena slijedom aminokiselina unutar polipeptidnih lanaca kao i nekovalentnim interakcijama unutar istog ili između susjednih lanaca. Njihova biološka aktivnost ovisi o načinu nabiranja proteinskih lanaca što je, osim uspostavljenim nekovalentnim reakcijama, regulirano polarnošću aminokiselinskih bočnih ogranaka, a biološki aktivna konformacija proteina naziva se nativnom konformacijom (1). Uslijed pogrešnog nabiranja proteinskih lanaca uspostavljaju se neželjene konformacije proteina koje mogu dovesti do pojave različitih infekcija i bolesti poput Alzheimerove, Huntingtonove i Parkinsonove bolesti (3).

Iako su proteini zastupljeni u brojnim metaboličkim procesima, nisu idealan alat za terapijske svrhe. Naime, odlikuju se velikom fleksibilnošću koja im omogućava interakciju s neželjenim receptorima što posljedično rezultira negativnim nuspojavama (1). Osim toga, podliježu proteolitičkom djelovanju metaboličkih enzima, a zbog svoje polarnosti teško se transportiraju kroz krvno-moždanu barijeru što su velik nedostaci kada govorimo o potencijalnoj terapijskoj primjeni (1). Međutim, njihova ograničena primjena potakla je razvoj strategija za modifikaciju prirodnih peptida u njihove peptidomimetičke analoge (4).

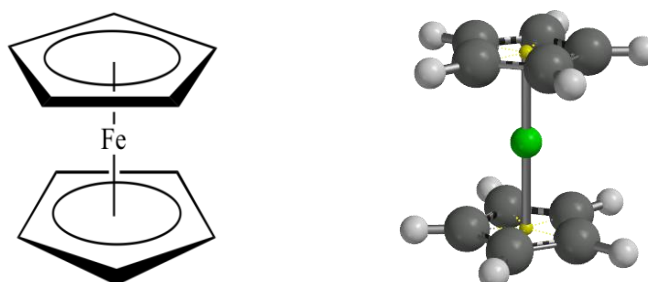
Dizajn peptidomimetika temelji se na oponašanju proteinskih sekundarnih strukturnih elemenata α -uzvojnice, β -nabrane ploče te okreta, odnosno malih „hot-spot“ regija uključenih u protein-protein interakcije (PPI), a u cilju njihove inhibicije (2). Sinteza peptidomimetika uključuje ugradnju nepeptidnih kalupa u peptidni lanac, konjugaciju bočnih ogranaka aminokiselina s malim molekulama, zamjenu peptidne veze s nepeptidnim analogima ili ciklizaciju glavnog lanca (5,6). Optimizacija dizajna i sinteze peptidomimetika očituje se u sve većem broju kako odobrenih peptidnih lijekova, tako i onih u fazi razvoja na farmaceutskom tržištu.

Danas je sve veći fokus biotehnoloških i farmaceutskih kompanija na pronalaženju alternativnih zamjena za antibiotike, pa se stoga istražuju mali antimikrobni peptidi kao i načini njihovog metaboliziranja u svrhu potencijalne terapijske primjene (5). Također, neki se peptidomimetici odlikuju i antivirusnim svojstvima zbog čega se primjenjuju kao inhibitori enzima koji su odgovorni za replikaciju virusa poput HIV-1, hepatitisa C, SARS CoV-2 i MERS-

CoV virusa (7). Trenutno stanje na tržištu očituje se u konstantnom porastu odobrenih peptidnih lijekova, a neki primjeri su glatiramer za terapiju relapsno-remitentne multiple skleroze, skupina agonista GLP-1 za terapiju dijabetesa tipa 2 te relugolix koji je antagonist receptora gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) za liječenje metastatskog raka prostate (1,7).

2.2. FEROCEN

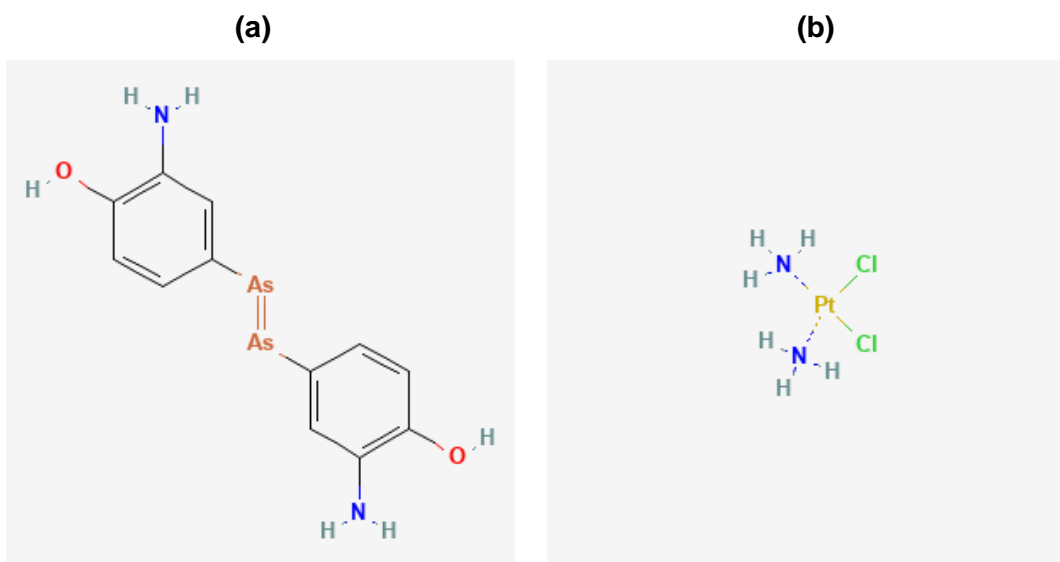
Ferocen je metalocenski spoj kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, a njegova ga „sendvič struktura“ čini pogodnim supstratom za različite kemijske derivatizacije (8). Sastoji se iz dva ciklopentadienilna prstena između kojih se nalazi željezov kation (Fe^{2+}) (slika 1), a aromatičnost njegove strukture osigurava mu izrazitu stabilnost u fiziološkim uvjetima. Otpornost na zrak i toplinu te fotokemijska stabilnost karakteristike su koje pridonose i omogućavaju prilagodbu kemijske reaktivnosti i svojstava njegovih derivata (8). Također, ferocen se odlikuje niskom toksičnošću i dobrom topljivošću u organskim otapalima te poželjnim elektrokemijskim svojstvima, odnosno sposobnošću lake oksidacije željeza koja omogućava sintezu različitih derivata ferocena čija je primjena značajna u elektrokemiji, biokemiji, te dizajnu lijekova i biosenzora (8).



Slika 1. Struktura ferocena (9).

2.2.1. Potencijal lijekova na bazi metala

Lijekovi na bazi metala uvijek su bili predmet interesa, ali u posljednjih nekoliko desetljeća interes znanstvenika za medicinsku primjenu organometalnih spojeva (koji sadrže najmanje jednu vezu između ugljika i metala) znatno je porastao. Poznati su, primjerice organometalni lijekovi poput salvarsana (slika 2a) i cisplatin (slika 2b) koji se već duže vrijeme koriste u terapijske svrhe zbog svojih protuupalnih, antivirusnih, antibakterijskih i antikancerogenih svojstava (10). Međutim, iako je cisplatin jedan od najčešćih korištenih tumorskih agenasa, uz njega se vežu brojne neželjene nuspojave zato što ne djeluje ciljano samo na DNA tumorskih stanica, već ulazi u interakcije s proteinima, peptidima i metabolitima o čemu ovisi njegov transport i način djelovanja (10).



Slika 2. Prikaz kemijskih struktura metalnih lijekova (a) salvarsana i (b) cisplatina (11).

Cjelokupni potencijal metalnih lijekova i njihove terapijske primjene još je uvijek u povoju, no radi se na optimizaciji i razvoju novih lijekova s platinom ili drugim metalima uključujući i ferocenske derivate koji pokazuju dobar kemoterapeutske učinak uz smanjenje nuspojava i citotoksičnosti (12,13). Derivati ferocena pokazali su se kao nova klasa lijekova s visokom učinkovitošću u liječenju različitih bolesti poput bakterijskih, parazitskih i fungalnih infekcija, a najvažnije je njihovo značajno antitumorsko djelovanje koje predstavlja budućnost razvoja kemoterapeutika (10).

2.3. FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI

Ferocenski peptidomimetici su bioorganometalni spojevi u kojima su ferocenski prstenovi supstituirani s aminokiselinama i kratkim peptidima (14). Ferocen je pogodan kalup za dizajn bioorganometalnih peptidomimetika jer posjeduje svojstvo reverzibilne oksidoredukcije, a osim toga udaljenost između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å omogućava stvaranje intramolekulskih vodikovih veza (engl. *Intramolecular Hydrogen Bonds, IHBs*) koje su ključne u tvorbi okreta i struktura nalik β-nabranim pločama čiji je začetnik ferocenski kalup (1,14).

Okreti su mjesta u polipeptidnom lancu na kojima on naglo mijenja svoj smjer zbog tvorbe IHBs između udaljenih aminokiselinskih ostataka, najčešće Asn, Gly i Pro (1). Daleko najveći interes usmjeren je prema razvoju malih spregnutih mimetika β-okreta kao terapijskih agenasa jer β-okreti, najčešće locirani na površini proteina, sudjeluju u njihovim interakcijama s biološkim sustavima, a jedan od primjera je interakcija hormona i njihovih

receptora (1). Oponašanje β -okreta postiže se umetanjem malih, rigidnih molekulskih kalupa (začetnika okreta, engl. *turn-inducer*) u peptidnu sekvenciju koji omogućavaju tvorbu intralančanih vodikovih veza kojima se zatvaraju 10-člani prstenovi, odnosno β -okreti. Tako modificirani peptidomimetici odlikuju se povećanom konformacijskom i proteolitičkom stabilnošću (1,4).

Funkcionalizirani ferocenski kalupi kao začetnici okreta, $-\text{OC}-\text{Fn}-\text{CO}-$, $-\text{OC}-\text{Fn}-\text{NH}-$ i $-\text{HN}-\text{Fn}-\text{NH}-$ (Fn = ferocenilen), mogu biti donori ili akceptori vodikovih veza u 1,1'-disupstituiranim ferocenskim peptidima tipa I-III: $\text{Fn}-[\text{CO}-(\text{AA})_m-\text{OMe}]_2$, $\text{OMe}-(\text{AA})_n-\text{OC}-\text{Fn}-\text{NH}-(\text{AA})_m-\text{Y}$, $\text{Fn}-[\text{NH}-(\text{AA})_m-\text{Y}]_2$ (AA = aminokiselina, eng. *amino acid*, Y = N-zaštitna skupina) u kojima se uspostavljaju IHB-prstenovi različitih veličina (15). Prethodno opisani ferocenski peptidomimetici III podvrgnuti su biološkoj evaluaciji radi ispitivanja mogućeg antitumorskog potencijala te utvrđivanja odnosa strukture i aktivnosti (SAR, eng. *Structural-Activity Relationship*) (16).

U ovom radu provedena je antiproliferativna analiza odnosno ispitan je antitumorski potencijal šest novih ferocenskih konjugata tipa III: $\text{Y}-\text{Ala}-\text{NH}-\text{Fn}-\text{NH}-\text{Val}-\text{Y}$ (1, 4), $\text{Y}-\text{Ala}-\text{NH}-\text{Fn}-\text{NH}-\text{Leu}-\text{Y}$ (2, 5) te $\text{Y}-\text{Ala}-\text{NH}-\text{Fn}-\text{NH}-\text{Phe}-\text{Y}$ (3, 6) stabiliziranih dvama simultanim β -okretima (15).

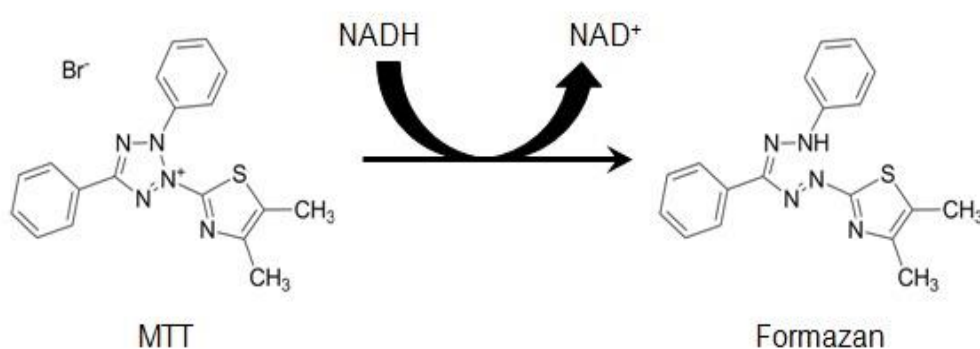
2.4. TESTOVI STANIČNE VIJABILNOSTI

Testovima stanične vijabilnosti određuje se broj živih stanica u uzorku, a koriste se za provjeru odgovora stanica na ispitivani lijek ili kemijski agens te u medicini i farmaciji kako bi se procijenili rezultati razvijenih terapeutika na tumorskim stanicama (17). Postoji nekoliko vrsta testova vijabilnosti koji se temelje na različitim funkcijama stanica poput aktivnosti enzima, propusnosti stanične membrane, adherentnosti stanica, proizvodnji ATP-a i koenzima itd., a možemo ih svrstati u nekoliko različitih skupina: testovi eliminacije bojom, kolorimetrijski testovi, flourometrijski testovi, luminometrijski testovi i testovi protočne citometrije (17). Važnost testova vijabilnosti očituje se u potrebi za novim antitumorskim lijekovima jer mnogi trenutno dostupni kemoterapeutici imaju smanjeno terapijsko djelovanje zbog problema otpornosti na lijekove, ali i negativnog učinka na normalne zdrave stanice organizma što potencijalno uzrokuje neželjene nuspojave prilikom primjene terapije kod pacijenata (18). Jedan od najčešće korištenih testova stanične vijabilnosti je MTT test.

2.4.1. MTT test

MTT test smatra se prvim konvencionalnim *in vitro* testom kojeg je kreirao Mossman

(1983.) i prilagodio Cole (1986.) za određivanje citotoksičnosti spojeva i preživljenja stanica (15,17). Ubrajamo ga u skupinu kolorimetrijskih metoda jer se zasniva na sposobnosti živih stanica da reduciraju žutu tetrazolijevu MTT sol, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), pomoću staničnih NAD(P)H-ovisnih reduktaza u ljubičasti formazanski produkt što potvrđuje mitohondrijsku aktivnost (19). Tetrazolijeva sol MTT sadrži kvaternu pozitivno nabijenu tetrazolnu prstenastu strukturu koja uključuje četiri dušikova atoma ograđena s tri aromatska prstena, dva fenilna i jednim tiazolnim, kao što je prikazano na slici 3 (20). Reakcija redukcije tetrazolijeve soli MTT uključuje razaranje jezgre tetrazolnog prstena i nastajanje ljubičastog netopljivog produkta formazana (20).



Slika 3. Temeljna reakcija redukcije MTT metode (21).

MTT test provodi se nakon višesatne inkubacije stanica s MTT-om (19). Nastali kristali formazanskog produkta ne mogu proći kroz staničnu membranu, pa ih je stoga prije spektrofotometrijske analize potrebno otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO) ili nekom drugom pogodnom otapalu (17,19). Spektrofotometrijska mjerenja provode se na mikrotitarskom čitaču ploča gdje je izmjerena apsorbancija na 595 nm proporcionalna broju živih odnosno vijabilnih stanica (19,20).

Prednosti MTT testa su u tome što zamjenjuje tradicionalne metode brojanja stanica kao i formiranja mnogobrojnih staničnih kultura kad se istraživanje vrši s nekoliko stotina uzoraka te se može primjenjivati i na pripravcima staničnih suspenzija. Osim toga omogućava detekciju stanica u kojima je proces stanične diobe zaustavljen, a još uvijek se smatraju metabolički aktivnima, s velikom osjetljivošću (22). Međutim, nakon provođenja MTT testa nije moguće održati žive stanice u kulturi, niti odrediti i kvantificirati vrstu stanične smrti dok se također ovom metodom ne može utvrditi razlika između ne-proliferativnih stanica i mrtvih stanica, što su nedostaci ove kolorimetrijske metode (22).

2.5. LJUDSKE STANIČNE LINIJE

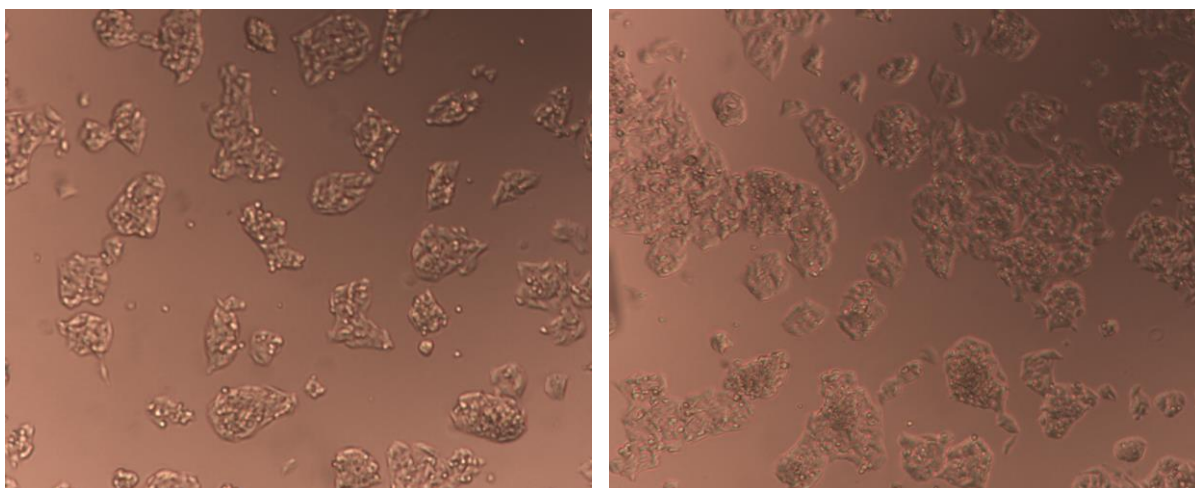
In vitro uspostavljanje ljudskih staničnih linija predstavlja jedno od najvažnijih otkrića molekularne biologije jer su one neizostavan alat u proizvodnji visokovrijednih biotehnoloških proizvoda. Pogodne su za primjenu zbog mogućnosti neograničenog dijeljenja i rasta u suspenziji, te veće vjerojatnosti da će sintetizirani stanični proteini imati usklađene posttranslacijske modifikacije s endogenim ljudskim proteinima što smanjuje rizik od nepoželjnog biološkog odgovora (23). Optimalan način uspostavljanja humane kulture stanica je izolacija stanica koje se neograničeno dijele *in vivo*, nakon čega se podvrgavaju selekciji, lizi, te morfološkoj i biološkoj karakterizaciji (24). Stanice u kulturi potrebno je čuvati u optimalnim uvjetima za rast kako bi se kultura stanica održala, što uključuje redovitu promjenu medija, podešavanje sastava zraka, održavanje odgovarajuće gustoće stanica kao i periodično zamrzavanje stanica (25). Stanične linije mogu biti izolirane iz zdravog humanog tkiva, ali i iz tkiva oboljele osobe (najčešće tumorsko tkivo) uslijed čega takva stanična linija posjeduje odgovarajuće mutacije.

Tumorske stanične linije jedan su od najvažnijih *in vitro* modelnih sustava za razvoj antitumorskih lijekova zbog svoje osobite sposobnosti da pruže neograničen izvor biološkog materijala te zadrže genetička svojstva tumora što ih čini pogodnim za eksperimentalne svrhe (26). Primjenjuju se u proizvodnji cjepiva, testovima citotoksičnosti, identifikaciji metaboličkih puteva lijeka, stvaranju umjetnih tkiva, sintezi terapijskih proteina i dr. (27). Uspostavljanje tumorske stanične linije vrlo je kompleksan i zahtjevan proces zbog bitnih razlika u *in vivo* i *in vitro* mikrookolini koje se očituju u parametrima poput postotka otopljenog kisika, dostupnosti i koncentraciji faktora rasta te utjecaju unutarstaničnih interakcija, ali i mogućnosti rasta na plastičnim nosačima, uslijed čega ponašanje stanične linije postaje nepredvidivo (26). Važno je uzeti u obzir da komercijalne stanične linije nisu dostupne za sve stadije bolesti ili tipove tumora zbog čega se teži na uspostavi novih staničnih linija. Danas je sve veći fokus na personaliziranim tretmanima u medicini zbog čega su istraživanja u kojima se koriste tumorske stanične linije usmjerena na genetičku manipulaciju stanica s ciljem otkrivanja odgovarajućih markera visoke osjetljivosti koji bi omogućili grupiranje pacijenata za ciljane klinička istraživanja (24).

U ovom radu korištena je tumorska stanična linija hepatocelularnog karcinoma (HepG2) koju čine morfologijom nalik epitelne stanice (slika 4), a izolirane su iz dobro diferenciranog hepatocelularnog karcinoma jetre 15-godišnjeg dječaka (28). Široka primjena HepG2 stanične linije posljedica je visoke zastupljenosti hepatocelularnog raka jetre koji je treći vodeći uzrok smrti u svijetu, dok je 70 % slučajeva zloćudnog tumora jetre kod djece hepatoblastom (27).

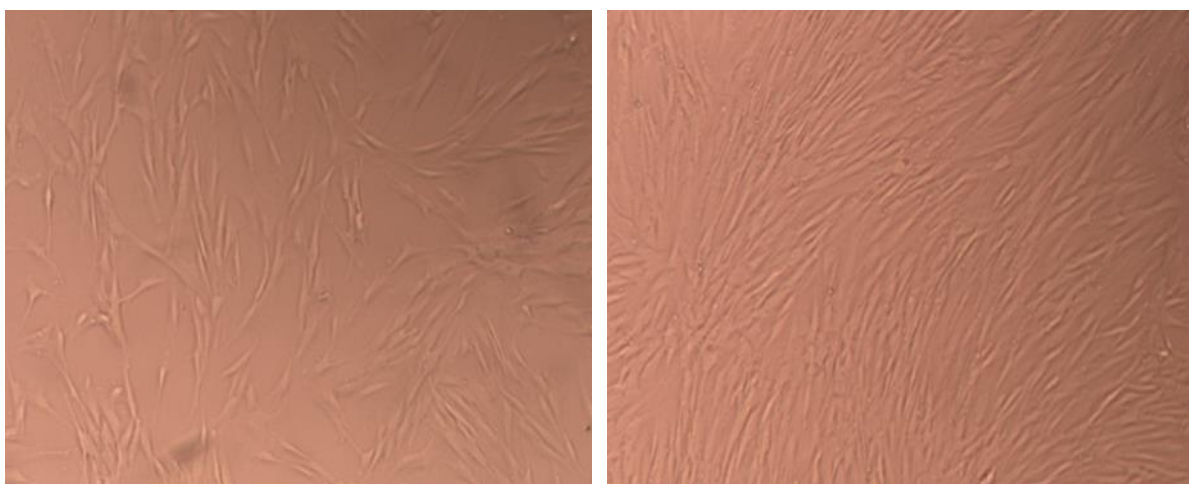
Cilj korištenja tumorskih staničnih linija jest razvoj novih terapijskih molekula kao terapija za oboljele od raka jer trenutačni kemoterapeutici nisu učinkoviti kod uznapredovalih

stadija karcinoma te se odlikuju brojnim nuspojavama, a osim toga njihovo terapijsko djelovanje nije usmjereno samo na tumorske stanice već utječe i na zdrave stanice i tkiva (29).



Slika 4. Tumorska stanična linija HepG2 (vlastita fotografija).

Osim tumorske stanične linije korištena je i zdrava stanična linija fibroblasta kožnog tkiva (HFF-1) (slika 5) (30). Stanice fibroblasta pogodne su za analizu potencijalnih antitumorskih lijekova u razvoju jer pokazuju koliko je zapravo djelovanje novog terapeutika ciljano. Zdrave stanične linije također imaju karakteristiku „besmrtnosti“ odnosno neograničenog dijeljenja kao i tumorske stanične linije, a najčešće se u eksperimentalne svrhe koriste kao kontrola za određivanje potencijala novog terapeutika i njegovog daljnjeg istraživanja.



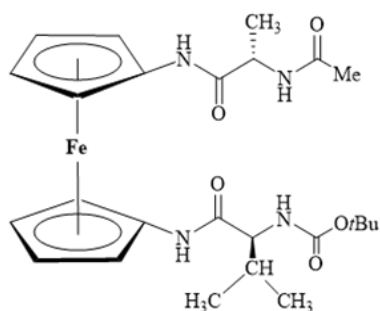
Slika 5. Zdrava humana stanična linija HFF-1 (vlastita fotografija).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

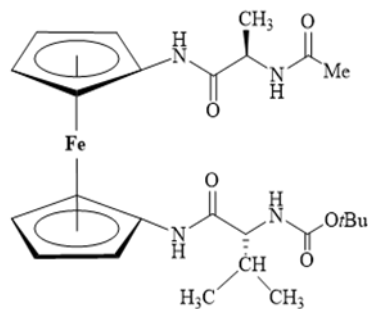
3.1. Materijali

3.1.1. Ferocenski peptidi

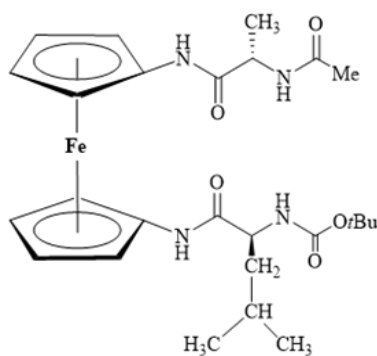
U ovom je radu ispitivano antiproliferativno djelovanje ferocenskih peptida **1-6** čije su kemijske strukture prikazane su na slici 6.



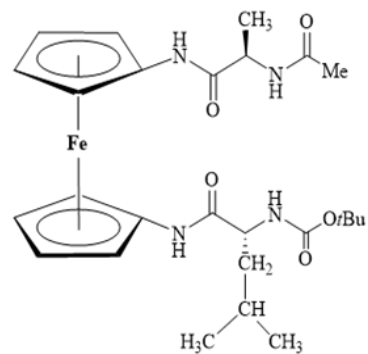
Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (1)



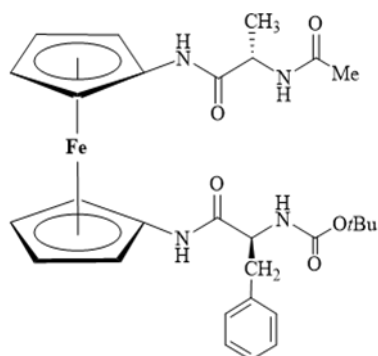
Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (4)



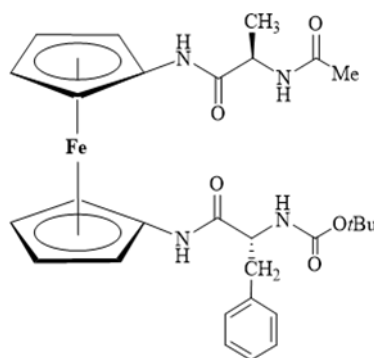
Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (2)



Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (5)



Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (3)



Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6)

Slika 6. Strukture enantiomernih ferocenskih peptida **1/4**, **2/5** i **3/6** (ChemDraw).

Prikazani konjugati ferocen-1,1'-diamina s L- i D-Val (**1, 4**), L- i D-Leu (**2, 5**) te L- i D-Phe (**3, 6**) sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a. Prije upotrebe spojevi su otopljeni u etanolu, u koncentraciji koja ne utječe na preživljenje tretiranih staničnih linija, te su čuvani na +4 °C do primjene u pojedinačnim eksperimentima. Spojevi su otopljeni u ultrazvučnoj kupelji kako bi se dobile homogene otopine nedugo prije njihove upotrebe u zasebnim eksperimentima.

3.1.2. Humane stanične linije

3.1.2.1. Stanična linija HFF-1

Staničnu liniju HFF-1 čine stanice fibroblasta izolirane iz humanog kožnog tkiva (27), a dobivena je iz ATCC radne banke stanica. Stanice su uzgajane u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) uz dodatak 15 % seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal Bovine Serum, FBS*) 1 % Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep) otopine. Uzgoj se provodi u inkubatoru u pločama s 96 jažica i T-bocama pri temperaturi od 37 °C pri čemu atmosferu čine 95 % zraka i 5 % CO₂.

3.1.2.2. Stanična linija HepG2

Humana stanična linija HepG2 uspostavljena je iz morfologijom sličnih epitelnih stanica izoliranih iz hepatocelularnog karcinoma jetre (25), a dobivena je iz ATCC radne banke stanica. Uzgoj HepG2 stanica provodi se u pločama s 96 jažica ili u T-bocama u inkubatoru pri čemu atmosferu čine 95 % zraka i 5 % CO₂ uz temperaturu od 37 °C. Za uzgoj je također korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10 % FBS i 1 % Pen/Strep otopine.

3.1.3. Kemikalije

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma-Aldrich, Njemačka
- FBS (fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), pripremljeno u matičnom laboratoriju
- Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- DMSO (dimetilsulfoksid), Gram-Mol, RH
- MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil]tetrazolijev bromid}, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pen/Strep solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Doxorubicin hidroklorid (Adriamycin), Sigma-Aldrich, Njemačka

- Trypan blue stain, Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Etanol 70 %, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.4. Uređaji

- Laminar za sterilni rad (BIOAIR Safemate 1.2), Italija
- CO2 Inkubator za uzgoj stanica (BINDER CB 170), Njemačka
- Inverzni mikroskop, Micros, Austrija
- Centrifuga (Thermo Scientific Sorvall Contifuge Stratos), Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Automatizirani brojač stanica (Countess 3), Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica (PlateChameleon V), Hidex, Finska
- Ultrazvučna sonična kupelj, Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Automatski pipetor, Hirschmann, Njemačka
- Multichannel pipeta, Eppendorf, Njemačka

3.1.5. Potrošni materijal

- T-boce od 75 cm² za uzgoj staničnih kultura, TPP
- Komora za brojanje stanica, Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Testne ploče s jažicama (96) za uzgoj staničnih kultura, TPP
- Laboratorijski pribor (serološke pipete, nastavci za pipete, Falkon epruvete 50 i 15 mL, plastične Eppendorf epruvete 1,5 mL)
- Posuda za multichannel pipetu, 50mL

3.1.6. Programi

- Microwin 2000
- Graphpad Prism

3.2. Metode

3.2.1. Precjepljivanje i određivanje broja stanica

Stanice su uzgajane u T-bocama u inkubatoru pri optimalnim uvjetima za rast stanica

(37 °C i 5 % CO₂) te su kontrolirane s inverznim mikroskopom pri čemu se pratila njihova morfologija, brojnost i prihvaćanje za podlogu. Stanice je bilo potrebno precijepiti kada pokrivenost podloge dostigne 80 % kako ne bi ušle u stacionarnu fazu rasta uslijed pojave kontaktne inhibicije. Precijepijvanje se provodi u sterilnim uvjetima tako da se najprije iz T-boce pomoću aspiratora ukloni medij u kojem su stanice rasle, potom je potrebno stanice isprati s 5 mL PBS pufera nakon čijeg uklanjanja se dodaje 2 mL tripsina. Proteolitički enzim tripsin dodajemo kako bismo odvojili adherentne stanice od podloge, pri čemu je nužno izvršiti inkubaciju stanica s enzimom 5 minuta u inkubatoru. Nakon inkubacije potrebno je pomoću inverznog mikroskopa provjeriti jesu li se stanice odvojile od podloge za uzgoj. Stanice poprimaju kružni oblik i postaju plutajuće kada na njih djeluje enzim tripsin. Enzimska reakcija zaustavlja se dodatkom medija (10 mL) koji sadrži inhibitore proteaza, a sadržaj T-boce potrebno je nakon dodatka medija resuspendirati. U T-bocu se vraća 2 mL resuspendiranog medija sa stanicama i doda se 10 mL svježeg hranjivog medija kako bismo dobili 1:6 pasažu stanica koje se mogu eksperimentalno tretirati kada dosegnu pokrivenost površine podloge 80 % (otprilike nakon 3-4 dana inkubacije). Ostatak resuspendiranih stanica (10 mL) stavlja se u Falcon epruvetu od 15 mL i centrifugira pri 270 × g kroz 4 minute. Nakon centrifugiranja potrebno je ukloniti supernatant iz Falcon epruvete jer se stanice nalaze na dnu epruvete u talogu i resuspendirati ga u 1 mL svježeg hranjivog medija te odrediti broj stanica.

Broj stanica određen je pomoću automatiziranog brojača stanica. Kako bismo mogli odrediti broj stanica, potrebno je pripremiti komoricu koja se sastoji od dva utora volumena 10 µL u koje je potrebno dodati prethodno pomiješanih 5 µL tripanskog modrila i 5 µL stanične suspenzije, nakon čega možemo pristupiti brojanju. Nakon što uređaj očita broj stanica potrebno je izračunati njihovu srednju vrijednost kako bismo odredili odgovarajući volumen stanične suspenzije kojeg je potrebo nasaditi u testne ploče s 96 jažica tako da za HFF-1 staničnu liniju imamo 5 × 10³ stanica po jažici, a za HepG2 staničnu liniju 3 × 10³ stanica po jažici.

3.2.2. Određivanje citotoksičnosti spojeva MTT metodom

U mikrotitarske pločice s 96 jažica nacijspe se HFF-1 (5 × 10³) i HepG2 (3 × 10³) stanice u tetraplikatu i doda stanični medij kao slijepa proba te se inkubiraju na 37 °C i 5 % CO₂ kroz 24 sata. Nakon inkubacije stanice su se prihvale za podlogu pa se tretiraju s pet različitih koncentracija ispitivanih ferocenskih spojeva **1-6** (5, 10, 50, 100 i 350 µM), dok se slijepoj probi i kontrolnim stanicama dodaje samo medij. Stanice se inkubiraju 72 sata nakon tretmana kako bi se mogao detektirati učinak testiranih peptidomimetika. Nakon završetka trodnevnog tretmana stanica ispitivanim spojevima, ukloni se hranjivi medij iz jažica pomoću vakuum

pumpe, stanice se isperu s 200 μL PBS pufera i doda se 40 μL 0,5 mg mL^{-1} MTT razrijeđenog u staničnom mediju. Vršiti se inkubacija mikrotitarskih ploča sa stanicama 4 sata. Po završetku inkubacije s MTT doda se 160 μL DMSO u svaku jažicu te se resuspendira s ciljem otapanja ljubičastog formazanskog produkta. Ljubičasto obojenje kristala formazana analiziramo spektrofotometrijski na Hidex Chameleon V (software: MicroWin 2000) čitaču mikrotitarskih pločica mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 595 nm koja je proporcionalna broju živih stanica. Postotak preživljenja stanica određen je prema sljedećoj formuli:

$$\text{preživljenje stanica} = \frac{[A(\text{test}) - A(\text{sljepa proba})]}{[A(\text{kontrola}) - A(\text{sljepa proba})]} \times 100 \text{ [\%]} \quad [1]$$

3.2.3. Statistička obrada podataka

Rezultati pojedinačnih eksperimenata prikazani su kao prosječne vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini (n) sa pripadajućim standardnim devijacijama S.D. (jednadžbe 2 i 3). Podaci su analizirani u programskom paketu GraphPad Prism.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [2]$$

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [3]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

PPI, kao glavni posrednici bioloških procesa, odgovorne su za nastanak i progresiju mnogih malignih bolesti, zbog čega su se ciljevi razvoja novih lijekova usmjerili na njihovu inhibiciju. Mali peptidni analozi, odnosno peptidomimetici, koje odlikuje pogodna struktura i visoka specifičnost postali su zanimljiv predmet istraživanja zbog mogućnosti inhibicijskog djelovanja unutar tzv. „hot-spot“ regija proteina koje su odgovorne za usmjeravanje bioloških puteva. Peptidomimetici se dizajniraju tako da im je opseg djelovanja širok u smislu dijagnostike i terapije karcinoma, sukladno tome primjenjuju se u regulaciji apoptoze i transkripcije te inhibiciji PPI reakcija (7).

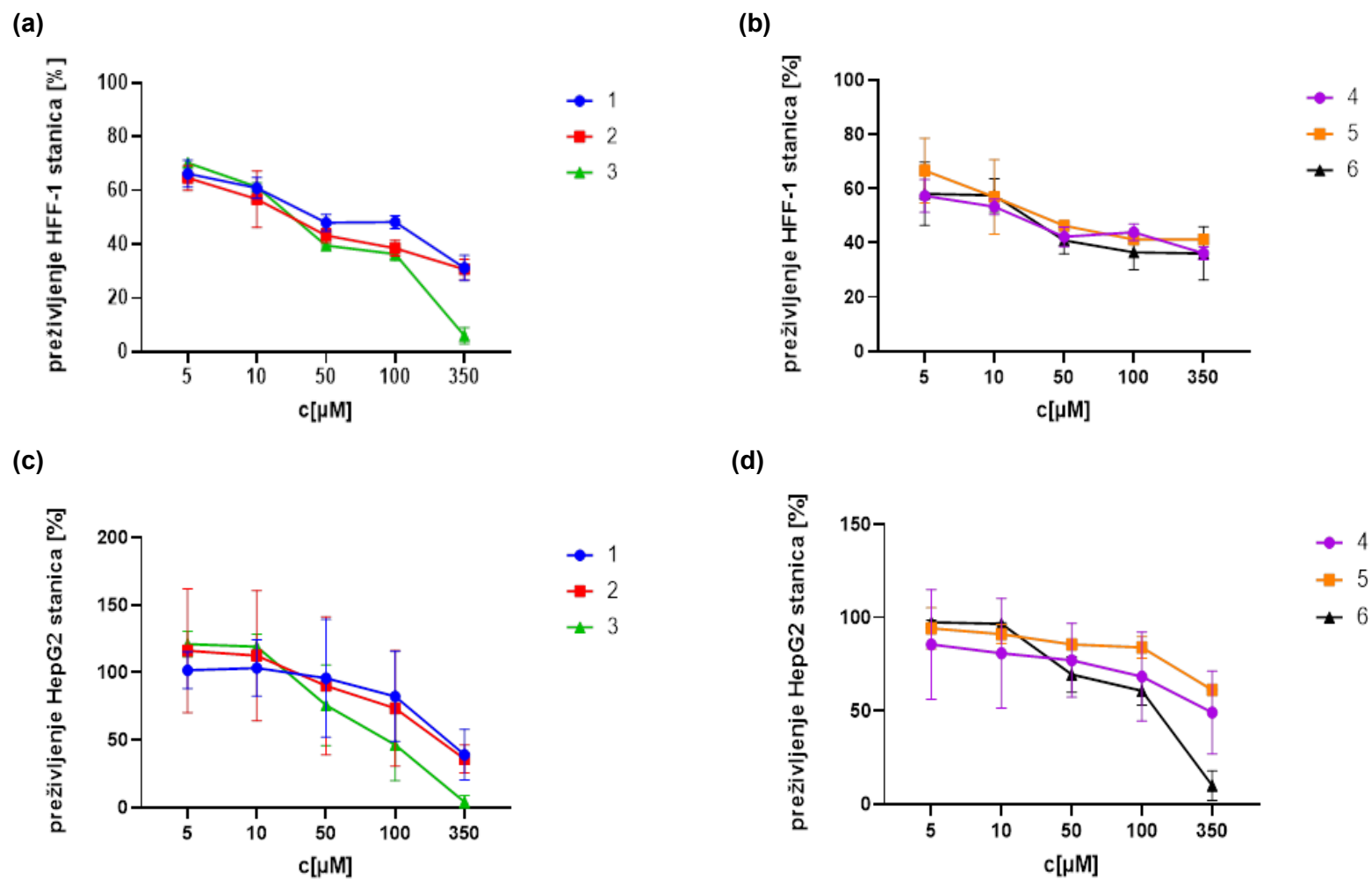
Iako peptidomimetici kao zasebne male molekule imaju velik potencijal, teži se k poboljšanju njihove proteolitičke stabilnosti i permeabilnosti kroz staničnu membranu što se postiže umetanjem lipofilnog rigidnog kalupa poput ferocena u peptidni lanac, a koji uz to osigurava održavanje biološki aktivne konformacije proteina (3). Razvoj takvih organometalnih terapeutika omogućio bi nove puteve djelovanja i olakšan transport lijekova uz smanjenu pojavu nuspojava.

Sukladno s tim, u *in vitro* uvjetima testiran je učinak šest homokiralnih konjugata ferocen-1,1'-diamina s L- i D- Val (**1, 4**), Leu (**2, 5**) i Phe (**3, 6**) na preživljenje i morfologiju tumorske stanične linije HepG2 i zdravih stanica HFF-1. MTT testom određena je citotoksičnost konjugata koja je različita za svaki spoj zbog varijacija strukture ovisno o prisutnosti odgovarajućih aminokiselinskih ostataka što posljedično utječe na kiralnost i hidrofobnost spojeva. Za svaki peptidni konjugat određen je i postotak preživljenja (vijabilnost) staničnih linija koji daje jasnu sliku ovisnosti koncentracije ispitivanih spojeva o njihovoj toksičnosti.

Ovakav pristup analize sintetiziranih peptidnih konjugata predstavlja drugu fazu u procesu razvoja lijekova i stavljanja na tržište, a bazira se na nekliničkom ispitivanju s ciljem utvrđivanja toksičnosti potencijalnog terapeutika i njegove specifičnosti za tumorske stanice, o čemu ovisi sigurnost njegove primjene.

4.1. UČINAK FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA 1-6 NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 i HepG2

U *in vitro* uvjetima određena je biološka aktivnost ferocenskih peptida **1-6** (slika 6) na stanične linije HFF-1 i HepG2. MTT testom utvrđena je citotoksičnost testiranih peptida kojima su stanice tretirane u rastućim koncentracijama od 5, 10, 50, 100 i 350 μM . Rezultati trodnevnog tretmana stanica s ispitivanim spojevima prikazani su grafički na slici 7 (a-d) kao ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji spojeva (μM), te u tablici 1. Dobiveni rezultati omogućuju izdvajanje potencijalnih spojeva za daljnje istraživanje i primjenu, gdje se odabir temelji na citotoksičnom potencijalu spoja odnosno utjecaju na preživljenje ispitivanih staničnih linija.



Slika 7. Utjecaj ferocenskih konjugata Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (1), Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (4), Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (2), Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (5), Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (3) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6) na preživljenje staničnih linija HFF-1 [(a) i (b)] i HepG2 [(c) i (d)] u koncentracijama od 5 do 350 μM. Svaka točka prikazana je kao srednja vrijednost ± S.D. dvije biološke replike (N=2, n=4).

Iz rezultata prikazanih na slici 7. možemo zaključiti da svi ispitivani ferocenski peptidomimetici utječu na preživljenje staničnih linija HFF-1 i HepG2. Njihov inhibični učinak povećava se s povećanjem koncentracije u svim slučajevima, uz manja odstupanja kod Val-konjugata (**1**, **4**) gdje je veće preživljenje stanica zapaženo pri 50 μM koncentraciji u odnosu na 100 μM pri tretmanu HFF-1 stanične linije (slika 7a,b; tablica 1).

Među ispitivanim spojevima, najviše se ističu Phe-konjugati (**3**, **6**) koji su pokazali najjače inhibično djelovanje na rast obje ispitivane stanične linije. Tretiranje HFF-1 stanica s Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) u koncentraciji 350 μM dovelo je do odumiranja 93,96 % početne kulture stanica (slika 7a), odnosno postotak preživljenja iznosio je $6,04 \pm 2,58$ %. Toksično djelovanje L-peptida **3** prisutno je i kod HepG2 stanica gdje pri 350 μM koncentraciji postotak preživljenja iznosi $4,03 \pm 3,91$ % odnosno odumrlo je 95,97 % početne kulture stanica (slika 7c), što je ujedno i najjače izmjereno toksično djelovanje (tablica 1). Navedeni rezultati ukazuju na antiproliferativni učinak homokiralnog konjugata Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) koji u visokoj mjeri utječe na smrt tumorskih stanica HepG2. Tumorska stanična linija se pokazala se nešto osjetljivijom od zdrave stanične linije, čije se preživljenje također drastično smanjilo nakon tretmana, što ukazuje da djelovanje spoja nije specifično samo za tumorsku staničnu liniju.

Učinak Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) na ispitivane stanične linije rezultirao je većom osjetljivošću tumorske stanične linije jer je pri koncentraciji od 350 μM postotak preživljenja HepG2 stanica iznosio $9,88 \pm 6,95$ % (slika 7d, tablica 1), a ista koncentracija spoja utjecala je na HFF-1 stanice tako da je postotak preživljenja stanica iznosio $36,08 \pm 7,88$ % (slika 7b, tablica 1). Ovakvi rezultati ukazuju na terapijski potencijal homokiralnog konjugata Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) jer je njegovo djelovanje jače usmjereno na tumorske stanice u odnosu na zdrave stanice, dok valja naglasiti da navedeno odumiranje zdravih stanica nije zanemarivo. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da jače antiproliferativno djelovanje ima L-peptid **3**, ali je potencijal D-peptida **6** veći zbog boljeg ciljanog djelovanja na tumorske stanice. Potrebno je testirati djelovanje konjugata u više koncentracija te provjeriti hoće li to dovesti do potpune inhibicije tumorskih stanica, a se da pritom ne inhibira rast zdravih stanica.

Val-konjugati Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (**1**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (**4**) pokazuju jače toksično djelovanje prema zdravim HFF-1 stanicama. Postotak preživljenja stanica prilikom tretmana s L-peptidom **1** pri koncentracijama od 5 do 100 μM je ispod 70 %, dok je za iste vrijednosti koncentracija peptida postotak preživljenja tumorskih HepG2 stanica veći od 80 %. Tretmanom u maksimalnoj koncentraciji L-peptida **1** od 350 μM dolazi do naglog pada postotka preživljenja HepG2 stanica s $82,20 \pm 25,70$ % pri 100 μM na $39,08 \pm 15,07$ % pri 350 μM . Konjugat **1** pokazuje značajnije antiproliferativno djelovanje tek pri višim

koncentracijama. Nepoželjno je što su zdrave stanice osjetljivije na tretman s konjugatom **1** u odnosu na tumorske stanice, što je vidljivo iz postotka preživljenja HFF-1 stanica koji pri najvišoj koncentraciji L-peptida **1** iznosi $31,22 \pm 4,70$ % (tablica 1).

Naime, slabiji inhibitorni utjecaj zapažen je kod peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (**4**) gdje je uočen slabiji pad postotka preživljenja tumorskih, ali i zdravih stanica prilikom tretmana u rastućim koncentracijama od $5 \mu\text{M}$ do $350 \mu\text{M}$ u odnosu na njegov L-enantiomer **1**. Preživljenje zdravih stanica pri maksimalnoj koncentraciji ($350 \mu\text{M}$) iznosilo je $36,10 \pm 2,38$ %, dok je preživljenje tumorskih stanica bilo ispod 50 %, točnije $49,06 \pm 18,08$ % (tablica 1). Ovakvi rezultati indiciraju da se L-enantiomer **1** odlikuje povoljnijom konformacijom, koja potiče bolje biološko djelovanje prilikom tretmana HepG2 stanica što je ključno u daljnjem dizajnu novih ferocenskih peptida.

Ispitivani enantiomerni Leu-konjugati Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**2**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**5**) pokazali su značajno toksično djelovanje tek pri tretmanu s najvišom koncentracijom peptida ($350 \mu\text{M}$), a uočen je nagli pad postotka preživljenja stanica između tretmana s L-enantiomerom **2** u koncentracijama od 100 i $350 \mu\text{M}$ kod tumorskih HepG2 stanica. Učinak L-enantiomera **2** uzrokovao je odumiranje 69,32 % HFF-1 stanica odnosno postotak preživljenja pri koncentraciji od $350 \mu\text{M}$ iznosio je $30,68 \pm 3,78$ %. Iako je kod HepG2 stanica uočeno veće preživljenje stanica pri maksimalnoj koncentraciji peptida, značajan je pad preživljenja stanica s $73,37 \pm 36,33$ % pri $100 \mu\text{M}$ na $35,95 \pm 8,35$ % pri $350 \mu\text{M}$ (tablica 1).

Takav nagli pad u preživljenju stanica možemo usporediti s onim kod Phe-konjugata **3** i **6** gdje je postotak preživljenja tumorskih stanica pri tretmanu s D-enantiomerom **6** u $100 \mu\text{M}$ koncentraciji iznosio $60,68 \pm 12,75$ %, a $9,88 \pm 6,95$ u $350 \mu\text{M}$ koncentraciji. L-enantiomer **3** jedini je od ispitivanih konjugata koji je pokazao nagli pad u preživljenju stanica kod obje stanične linije i njegovom primjenom zabilježeno je najjače toksično djelovanje. Povećanjem koncentracije peptida **3** sa 100 na $350 \mu\text{M}$ kod zdravih stanica došlo je do snižavanja postotka preživljenja s $36,34 \pm 3,96$ % na $6,04 \pm 2,58$ %, a kod tumorskih stanica s $46,47 \pm 21,00$ % na $4,03 \pm 3,91$ % (tablica 1). Također, utjecaj konjugata **2** usporediv je s konjugatom **1** zbog nagle pojave povećanja odumiranja stanica prelaskom s upotrebe $100 \mu\text{M}$ na $350 \mu\text{M}$ koncentraciju peptida, što ukazuje da L-enantiomeri Val- i Leu-konjugata imaju veću biološku aktivnost u odnosu na svoje D-enantiomere. HFF-1 stanična linija pokazala se za nijansu osjetljivijom na djelovanje Leu-konjugata **2** i Val-konjugata **1** u odnosu na D-Phe-konjugat **6**, dok je najveća osjetljivost zdravih stanica uočena kod viših koncentracija L-Phe-konjugata **3**.

Potencijal konjugata **1** i **2** očituje se u toksičnom djelovanju na HepG2 stanice gdje je potrebno istražiti učinak viših koncentracija peptida i uvidjeti hoće li postotak preživljenja tumorskih stanica nastaviti naglo opadati, a da pritom pad preživljenja zdravih stanica bude

blaži. D-enantiomer **5** pokazao je slabije antiproliferativno djelovanje u odnosu na njegov L-enantiomer **2**. Konjugat **5** ostvario je najslabiji utjecaj na tumorske HepG2 stanice u usporedbi s ostalim ispitivanim konjugatima **1-6**, gdje je postotak preživljenja stanica pri 350 μM koncentraciji iznosio $61,23 \pm 4,85$ %. Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**5**) imao je najslabiji utjecaj na zdrave HFF-1 stanice zbog čega je pri maksimalnoj koncentraciji od 350 μM ostvario najveći postotak preživljenja $49,62 \pm 11,92$ % iz čega možemo zaključiti da ima najslabije toksično djelovanje (tablica 1).

Val- i Leu-konjugati **4** i **5** pokazali su inhibicijsko djelovanje, ali u znatno manjoj mjeri u usporedbi s Phe-konjugatima (**3** i **6**), te se njihov učinak na tumorske i zdrave stanice očituje u većoj osjetljivosti HFF-1 stanica na ispitivane spojeve u odnosu na HepG2 stanice, zbog čega ih ne bismo izdvojili kao predmet daljnjeg istraživanja. L-enantiomeri Val-, Leu- i Phe-konjugata **1-3** pokazuju značajno povećanje toksičnog djelovanja primjenom viših koncentracija, ali HFF-1 stanice su ipak osjetljivije na njihovo djelovanje.

D-Phe-konjugat **6** je jedini među testiranim spojevima koji je uzrokovao odumiranje više od 90 % tumorskih stanica, a da je pritom postotak preživljenja zdravih stanica ostao iznad 35 %.

Rezultate možemo usporediti s istraživanjem prethodno provedenim u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a (Ivančić, 2022), u kojem je ispitivano djelovanje homo- i heterokiralnih konjugata istog ferocenskog kalupa -NH-Fn-NH- simetrično disupstituiranog s Val, Leu odnosno Phe na preživljenje staničnih linija HeLa, MCF-7, HepG2. HepG2 stanice pokazale su se najotpornijima odnosno nijedan spoj nije pokazao inhibicijsko djelovanje prema staničnoj liniji HepG2. Najboljim se pokazao L-Leu konjugat (Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc) uz preživljenje 39,73 % MCF-7 stanica. Homo- i heterokiralni Phe-konjugati djeluju letalno, a valja istaknuti heterokiralni konjugat (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc) koji pri 50 μM koncentraciji uzrokuje smrt 82,32 % tumorskih stanica (4).

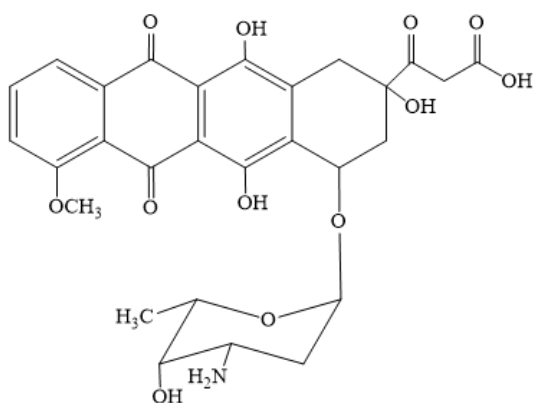
Dakle, iako se stanična linija HepG2 pokazala najotpornijom na djelovanje prethodno testiranih ferocenskih peptidomimetika, istraživanjem provedenim u sklopu ovog Završnog rada pokazan je potencijal novih biokonjugata koji su pri visokim koncentracijama uzrokovali skoro potpunu inhibiciju rasta tumorskih stanica što ukazuje na uspješnost optimizacije sinteze navedenih spojeva.

Tablica 1. Prikaz postotka preživljenja (%) HFF-1 i HepG2 staničnih linija u ovisnosti o koncentraciji peptida **1-6** (crveno označene vrijednosti se spominju u tekstu).

Ferocenski peptidi	Postotak preživljenja HFF-1 stanične linije (%)					Postotak preživljenja HepG2 stanične linije (%)				
	Koncentracija peptida (μM)	5	10	50	100	350	5	10	50	100
Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (1)	66,27	60,96	48,03	48,26	31,22	101,63	103,32	95,69	82,20	39,08
Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (2)	64,70	56,75	43,30	38,57	30,68	116,01	112,45	90,14	73,37	35,95
Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (3)	70,29	61,35	39,54	36,34	6,04	120,90	119,12	75,75	46,47	4,03
Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (4)	57,25	53,26	42,20	43,89	36,10	85,55	80,78	77,03	68,36	49,06
Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (5)	66,59	56,09	46,30	41,17	49,62	94,21	91,10	85,56	83,90	61,23
Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6)	58,07	57,46	40,89	36,48	36,08	97,49	96,61	69,47	60,68	9,88

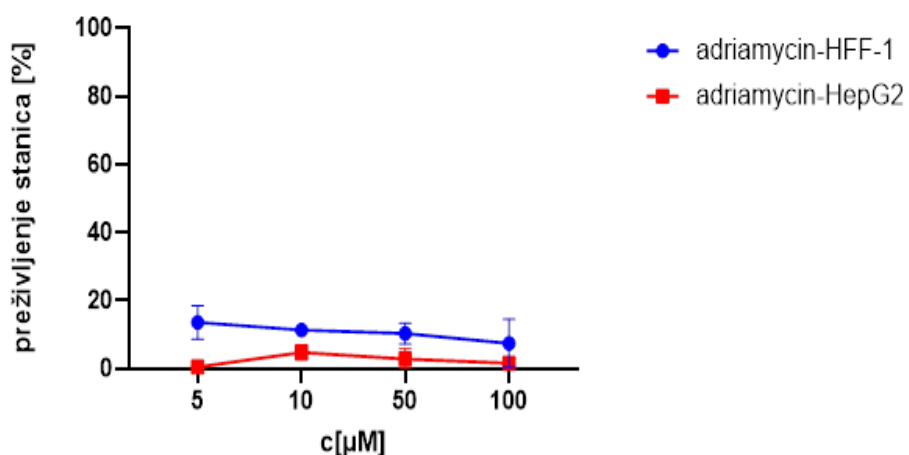
4.2. UČINAK STANDARDNOG KEMOTERAPEUTIKA ADRIAMYCINA NA PREŽIVLJENJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 I HepG2

Standardni kemoterapeutik adriamycin (slika 8) koristili smo kako bismo usporedili antiproliferativno djelovanje novosintetiziranih peptidomimetika **1-6** s lijekom koji je već u širokoj primjeni za liječenje karcinoma.



Slika 8. Prikaz strukture adriamycina (ChemDraw).

HFF-1 i HepG2 stanice tretirali smo s adriamycinom u četiri koncentracije (5, 10, 50, 100 μM) tijekom 72 sata. MTT metodom odredili smo citotoksičnost ispitivanog kemoterapeutika, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 9. kao ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji kemoterapeutika (μM).



Slika 9. Utjecaj standardnog kemoterapeutika adriamycina na preživljenje HFF-1 ili HepG2 stanica. Svaka točka prikazana je kao srednja vrijednost \pm S.D. dvije biološke replike (N=2, n=4).

Prema rezultatima prikazanim na slici 9. možemo zaključiti da je inhibitorno djelovanje adriamycina znatno jače utječe na preživljenje HFF-1 i HepG2 stanica već pri nižim koncentracijama u odnosu na utjecaj ferocenskih peptida **1-6**. Postotak preživljenja za HepG2 staničnu liniju iznosi 0,5-4,8 %, a za HFF-1 staničnu liniju 7,47-13,65 %. Prednost adriamycina u odnosu na ferocenske konjugate **1-6** je što već pri manjim dozama ima značajno citotoksično djelovanje. Cilj daljnjeg istraživanja ferocenskih konjugata trebao bi se usmjeriti na optimizaciju djelotvornosti pri nižim koncentracijama spoja kako bi mogli konkurirati standardnim kemoterapeutcima.

4.3. UČINAK HOMOKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA MORFOLOGIJU HFF-1 I HepG2 STANICA

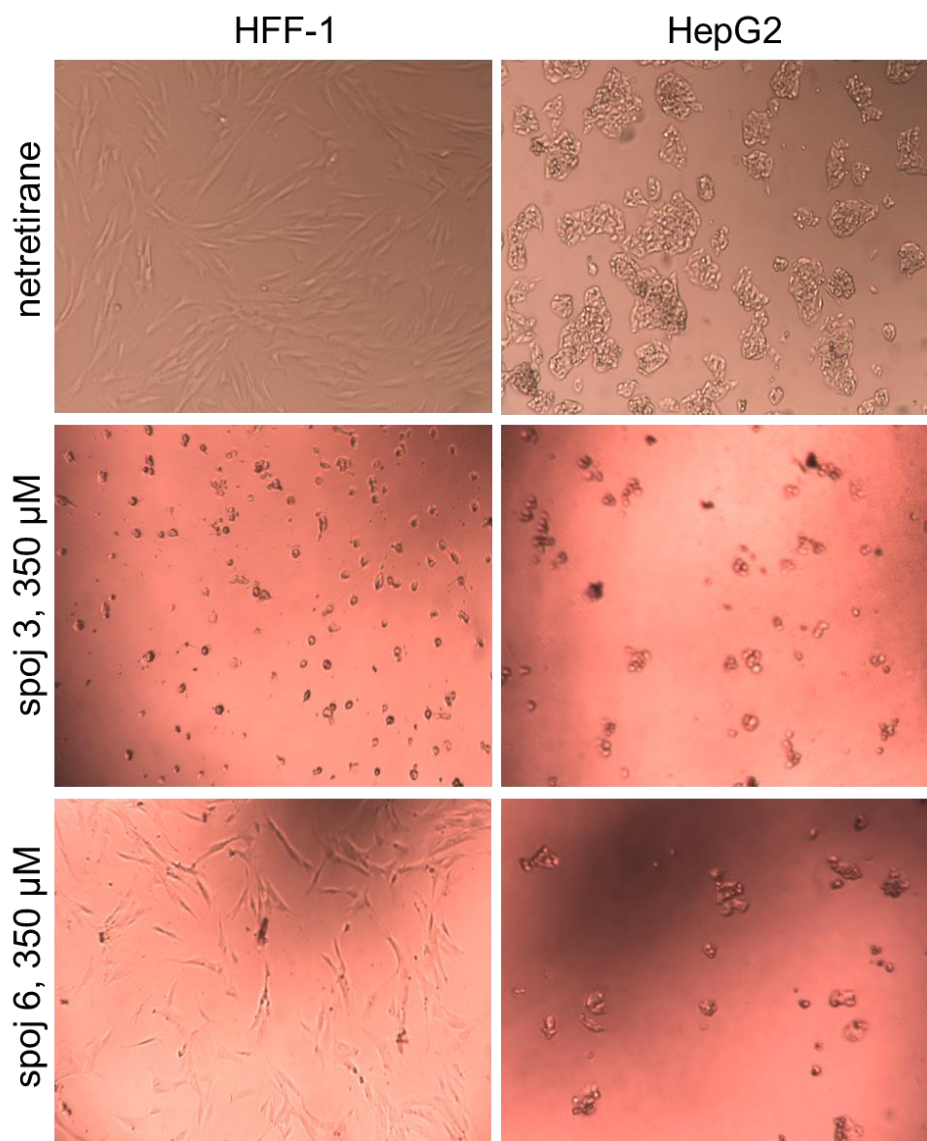
Za najučinkovitije Phe-peptide **3** i **6** razjašnjen je učinak na morfologiju HFF-1 i HepG2 stanica. Izgled stanica i njihova brojnost praćeni su inverznim mikroskopom prije i nakon trodnevnog tretmana s ispitivanim spojevima kao što je prikazano na slici 10.

HFF-1 stanice odlikuju se karakterističnom morfologijom fibroblasta, gusto prekrivaju podlogu i čvrsto su pričvršćene za nju, kao što je prikazano na slici 10. netretiranih stanica.

Utjecaj Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) na fibroblaste očituje se u potpunom gubitku karakterističnog oblika i morfologije stanica fibroblasta iz čega zaključujemo da je većina stanica odumrla. Takvi rezultati ukazuju nam da spoj **3** ima velik antiproliferativan učinak na zdrave stanice što je nepoželjno.

Konjugat Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) povoljnije utječe na morfologiju a time i na preživljenje stanica fibroblasta u odnosu na njegov L-enantiomer **3** jer oblik stanica ostaje očuvan i manje je mrtvih stanica. Prikazani rezultati u korelaciji su s rezultatima MTT testa iz čega se može zaključiti da je antitumorski potencijal D-konjugata **6** veći zbog smanjenog utjecaja na preživljenje i morfologiju zdravih HFF-1 stanica.

Razlike u izgledu između tretiranih i netretiranih HepG2 stanica jasno su vidljive na slici 10. Kod netretiranih stanica prisutna je karakteristična epitelna morfologija, stanice su grupirane u nakupine i čvrsto pričvršćene uz podlogu. Morfologija tretiranih stanica očituje se u gubitku epitelnog oblika uz razbijanje staničnih nakupina dok je brojnost stanica vidno narušena. Ovakav utjecaj ferocenskih peptidomimetika na morfologiju ukazuje da je došlo do odumiranja stanica. Usporedbom djelovanja enantiomernih konjugata **3** i **6** možemo zaključiti da spoj **3** ima jaču antiproliferativnu aktivnost protiv tumorskih stanica jer je imao veći utjecaj na morfologiju i brojnost stanica što je u skladu s rezultatima MTT testa.



Slika 10. Morfologija HFF-1 i HepG2 netretiranih stanica i stanica tretiranih peptidima Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) u 350 μM koncentraciji, praćena inverznim mikroskopom (vlastita fotografija).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu objedinjenih rezultata biološke evaluacije može se zaključiti sljedeće:

1. Antiproliferativni učinak ispitivanih ferocenskih peptidomimetika na stanične linije HFF-1 i HepG2 ovisi o primijenjenoj koncentraciji odnosno dozi spoja, pri čemu se preživljenje stanica smanjuje proporcionalno povećanju koncentracije spoja.
2. L-enantiomeri Val- i Leu-konjugata (**1**, **2**) odlikuju se većim toksičnim djelovanjem u odnosu na svoje D-enantiomere (**4**, **5**) pri koncentraciji od 350 μ M.
3. Leu-konjugat **5** pokazao je najslabiji inhibitorski utjecaj na rast stanica te u usporedbi s ostalim ispitivanim peptidima ima najslabije antiproliferativno djelovanje.
4. Enantiomerni peptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) s hidrofobnim i voluminoznim benzilnim bočnim ograncima pokazali su najjači inhibitorski utjecaj na rast zdravih i tumorskih stanica. Pri tom je L-enantiomer **3** pokazao najjače toksično djelovanje, dok je D-enantiomer **6** jedini bio-konjugat koji dovodi gotovo do potpune inhibicije rasta tumorskih stanica, a da pritom ima blaži toksični utjecaj na zdrave stanice.
5. Najprimjetnije morfološke promjene koje podrazumijevaju smanjenje brojnosti stanica i promjenu oblika stanica zapažene su kod L-Phe-peptida **3**, što je u korelaciji s rezultatima MTT testa.
6. Optimizacijom sinteze postignut je inhibitorski učinak ferocenskih peptidomimetika na rast HepG2 stanične linije, koja se u prethodnim istraživanjima pokazala otpornom na djelovanje ferocenskih peptida.

6. POPIS LITERATURE

1. Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Polančec D, Ivančić M, Mrvčić J i sur. (2022) Hydrogen Bonding Drives Helical Chirality via 10-Membered Rings in Dipeptide Conjugates of Ferrocene-1,10-Diamine. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12233. <https://doi.org/10.3390/ijms232012233>
3. 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>
4. Ivančić M (2022) *In vitro* biološka evaluacija ferrocenskih konjugata s aminokiselinama Val, Leu, Phe (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
5. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J i sur. (2023) Biological Evaluation and Conformational Preferences of Ferrocene Dipeptides with Hydrophobic Amino Acids. *Inorganics* **11**, 29. <https://doi.org/10.3390/inorganics11010029>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
9. Illustrated Glossary of Organic Chemistry (2024) <https://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/F/ferrocene.html>. Pristupljeno 6.lipnja 2024.
10. Kabir E, Noyon K, Hossain A (2023) Synthesis, biological and medicinal impacts of metallodrugs, Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Chittagong, Bangladesh. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100935>
11. PubChem (2024) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Pristupljeno 14.lipnja 2024.
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. Shoukat H, Altaf AA, Badshah A (2020) Ferrocene-Based Metallodrugs. *Advances in Metallodrugs* **4**, 115–136. <https://doi.org/10.1002/9781119640868.ch4>
15. Kovačević M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
16. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Močanov K, Roca S, Šimunović L i sur. (2021) Conformational Preferences and Antiproliferative Activity of Peptidomimetics Containing Methyl 1'-Aminoferrocene-1-carboxylate and Turn-Forming Homo- and Heterochiral Pro-Ala Motifs. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13532-13559. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>
17. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E (2020) Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* **1**, 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
18. Senthilraja P, Kathiresanb K (2015) In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. *J App Pharm Sci*, **5**, 80-84. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50313>
19. Mustać S, Kifer D, Domijan AM, Marjanović Čermak AM (2022) Ispitivanje toksičnosti na staničnim kulturama, *Farmaceutski glasnik* **78**, 1
20. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
21. AAT Bioquest (2024) <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-are-the-differences-between-MTT-and-WST-assays>. Pristupljeno 13.svibnja 2024.
22. Da Silva Gasque KC, Polioni Al-Ahj L, Cardoso Oliveira R, Magalhães AC (2014) Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000007>
23. Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**, 1110-1122, <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
24. Iorio F, Knijnenburg TA, Vis DA, Bignell GR, Menden MP, Schubert M i sur. (2016) A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>
25. Mather JP, Roberts PE (1998) *Introductory Cell and Molecular Biology Techniques*, 1. izd., Springer New York, NY, str. 1-8.

26. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers* **11**, 1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>
27. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV (2021) The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
28. ATCC (2024) <https://www.atcc.org/products/hb-8065>. Pristupljeno 7. travnja 2024.
29. Hazrulrizawati Abd H, Izzah Hayati Y (2016) Cytotoxicity of *Clinacanthus nutans* extracts on human hepatoma (HepG2) cell line. *Int J Pharm Pharm Sci*, **8**, 293-295
30. ATCC (2024) <https://www.atcc.org/products/scrc-1041>. Pristupljeno 7. travnja 2024.

Izjava o izvornosti

Ja _____Andrea Nikolić_____izjavljujem da je ovaj završni 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