

Biološka aktivnost ferocenskih spojeva

Petrović, Ema

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:458229>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

Ema Petrović
7905/PT

BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA

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 uz pomoć pri izradi rada dr. sc. Marte Žužić.



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 Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za Organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Biološka aktivnost ferocenskih spojeva

Ema Petrović, 0058216950

Sažetak: Peptidomimetici su spojevi koji svojom trodimenzijskom strukturom oponašaju sekundarne strukturne elemente prirodnih peptida i proteina, a odlikuju se boljom biodostupnošću i proteolitičkom stabilnošću. Umetanjem 1,1'-disupstituiranih ferocenskih kalupa u peptidni lanac inducira se tvorba strukture okreta kao i struktura nalik β -nabranim pločama. Ferocen-1,1'-diamin kao rigidni kalup omogućava tvorbu intralančanih vodikovih veza kojima se zatvara 14-člani prsten karakterističan za prirodne β -nabrane ploče. Konjugati ferocen-1,1'-diamina s hidrofobnim aminokiselinama valinom (**1,4**), leucinom (**2,5**) te fenilalaninom (**3, 6**) podvrgnuti su testiranju biološke aktivnosti na zdravoj HFF-1 i tumorskoj MCF-7 staničnoj liniji. Testovi su provedeni u *in vitro* uvjetima pomoću standardizirane MTT metode. Najviši stupanj toksičnosti i sposobnost raspoznavanja tumorskih od zdravih stanica pokazali su L-konjugati ferocen-1,1'-diamina s leucinom (**2**) i fenilalaninom (**3**).

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, biološka aktivnost, MTT metoda, *in vitro* uvjeti

Rad sadrži: 27 stranica, 13 slika, 1 tablicu, 21 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

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

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

Datum obrane: 10. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Biological activity of ferrocene compounds

Ema Petrović, 0058216950

Abstract: Peptidomimetics are compounds whose three-dimensional structure mimics the secondary structural elements of natural peptides and proteins. They are characterized by better bioavailability and proteolytic stability. The insertion of a 1,1-disubstituted ferrocene scaffold into a peptide chain induces the formation of a turn and β -sheet-like structure. Ferrocene-1,1'-diamine as a rigid scaffold enables the formation of intrachain hydrogen bonds that allow the formation of 14-membered ring common to native β -sheets. The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine with the hydrophobic amino acids valine (**1,4**), leucine (**2,5**), and phenylalanine (**3,6**) were tested for their biological activity on healthy HFF-1 and tumor MCF-7 cell lines. The tests were performed under *in vitro* conditions using the standardized MTT method. The L-conjugates of ferrocene-1,1'-diamine with the leucine (**2**) and phenylalanine (**3**) showed the highest degree of toxicity and the ability to differentiate between tumor and healthy cells.

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

Thesis contains: 27 pages, 13 figures, 1 table, 21 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, BICRO BIOCentar d.o.o.

Technical support and assistance: Marta Žužić, PhD, BICRO BIOCentar d.o.o.

Thesis defended: July 10th 2024

Sadržaj

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | UVOD | 3 |
| 2 | TEORIJSKI DIO | 4 |
| 2.1 | PROTEINI | 4 |
| 2.2 | PEPTIDOMIMETICI | 4 |
| 2.3 | FEROCEN I FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI | 5 |
| 2.4 | TUMORI I NJIHOVO LIJEČENJE | 7 |
| 2.5 | STANIČNE LINIJE I UZGOJ <i>IN VITRO</i> | 7 |
| 2.5.1 | STANIČNA LINIJA HFF-1 | 8 |
| 2.5.2 | STANIČNA LINIJA MCF-7 | 8 |
| 2.6 | MTT METODA | 9 |
| 3 | EKSPERIMENTALNI DIO | 9 |
| 3.1 | MATERIJALI | 9 |
| 3.1.1 | FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI | 9 |
| 3.1.2 | HUMANE STANIČNE LINIJE | 10 |
| 3.1.3 | KEMIKALIJE | 11 |
| 3.1.4 | POTROŠNI MATERIJAL | 12 |
| 3.1.5 | UREĐAJI I OPREMA | 12 |
| 3.2 | METODE | 12 |
| 3.2.1 | UZGOJ STANICA | 12 |
| 3.2.2 | ODREĐIVANJE BROJA STANICA TRIPANSKIM MODRILOM U BÜRKER – TÜRKVOJ KOMORICI | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3 MTT TEST | 13 |
| 4 REZULTATI I RASPRAVA | 16 |
| 4.1 UČINAK HOMOKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA MORFOLOGIJU HFF-1 I MCF-7 STANIČNIH LINIJA | 16 |
| 4.2 UČINAK DJELOVANJA FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA 1 - 6 NA PREŽIVLJAVANJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 I MCF-7 | 17 |
| 5 ZAKLJUČCI | 24 |
| 6 POPIS LITERATURE | 25 |

1 UVOD

Rast i razvoj organizma temelji se na diobi stanica i povećanju njihovog volumena. Uslijed egzogenih ili endogenih čimbenika započinju mutacije na razini DNA koje organizam ispravlja različitim mehanizmima. Poremećajem tih mehanizama dolazi do porasta broja mutacija koje su odgovorne za abnormalno povećanje broja stanica u određenom tkivu ili organu što dovodi do nastanka tumora. Prema posljednjim podacima iz 2021. godine u Republici Hrvatskoj zabilježeno je 24834 novih dijagnoza malignih tumora, od čega 53 % kod muškaraca i 47 % kod žena. Pri tom je najčešći tip tumora kod muškaraca bio rak prostate (18 %), a kod žena rak dojke (25 %) [1].

Zbog kompleksnosti tumora kao bolesti, univerzalan lijek ne postoji te se neprekidno traže i razvijaju bolje terapije od dosadašnjih. Nova klasa molekula s terapijskim potencijalom su peptidomimetici.

Peptidomimetici su male molekule dizajnirane tako da oponašaju peptidne i proteinske sekundarne strukturne elemente uključene u biološke interakcije, pri čemu često ostvaruju bolji biološki učinak u odnosu na prirodne peptide i proteine. Osim toga, odlikuju se i većom konformacijskom i proteolitičkom stabilnošću čime se onemogućuju interakcije s neželjenim receptorima i enzimima, a što ih čini dobrim kandidatima za istraživanje terapijskog potencijala.

Posljednjih nekoliko godina raste učestalost primjene peptidomimetika u svrhu razvoja lijekova za metabolička i onkološka oboljenja. Prema podacima Agencije za hranu i lijekove SAD-a (USFDA, eng. *U. S. Food and Drug Administration*), u 2020. godini odobrena su tri lijeka na bazi peptidomimetika. Riječ je o relugolixu za liječenje raka prostate, tirbanibulinu za liječenje keratoze lica i vlasišta te galij 68 PSMA-11 koji je ujedno i prvi radioaktivni lijek, a s kojim se uz pomoć pozitronske emisijske tomografije otkriva prisutnost raka prostate [2].

Zahvaljujući svojoj lipofilnosti i redoks-svojstvima, ferocen se koristi za izosternu modifikaciju biološki aktivnih molekula u cilju daljnjeg unapređenja njihove biološke aktivnosti. Primjerice, ferocenom modificirani tamoksifen pokazao se djelotvornim prema estrogen-ovisnim kao i estrogen-neovisnim tumorima dojke, dok je modifikacija ferocenom omogućila djelotvornost klorokinskog analoga prema rezistentnim parazitskim sojevima [3]. Nadalje, ferocenski konjugati s peptidima pokazali su antitumorsko i antimikrobno djelovanje [4]. Prethodna istraživanja u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ukazala su na slabo do umjereno antitumorsko djelovanje ferocenskih peptida s alaninom [5] i prolil-alaninom [6]. Stoga je u ovom radu ispitana toksičnost konjugata ferocen-1,1'-diamina s aminokiselinama valinom (Val), leucinom (Leu) i fenilalaninom (Phe) na MCF-7 staničnu liniju tumora dojke i zdravu HFF-1 staničnu liniju fibroblasta.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 PROTEINI

Proteini su polipeptidi velike molekulske mase, a važni su za funkcioniranje složenih bioloških sustava poput ljudskog organizma. Peptidi su građeni iz 20 proteinogenih aminokiselina međusobno povezanih amidnim vezama što čini peptidnu okosnicu [7]. Na peptidnu okosnicu vezani su aminokiselinski bočni ogranci koji se međusobno razlikuju po veličini, obliku, naboju, sposobnosti tvorbe vodikovih veza, kemijskoj reaktivnosti te polarnosti. Sve esencijalne aminokiseline su L-konfiguracije te sudjeluju u vodikovim vezama s aminokiselinskim ostacima iz istog ili susjednih peptidnih lanaca tvoreći sekundarne konformacije poput α -uzvojnice, β -nabrane ploče ili okreta. Nadalje, tvorbom vodikovih i ionskih veza, hidrofobnih interakcija te disulfidnih mostova između udaljenih dijelova okosnice dolazi do tvorbe tercijarne strukture. Najviši stupanj uređenja predstavlja kvaterna struktura sastavljena od više polipeptidnih lanaca međusobno povezanih nekovalentnim interakcijama.

Proteini koji su uređeni tako da zauzimaju različite sekundarne strukturne elemente ujedno su i fiziološki aktivni [7]. Biološka aktivnost započinje interakcijom između proteinskog receptora i liganda, u čemu sudjeluju "hot-spot", ostaci smješteni unutar aktivnog mjesta proteina.

Unatoč sveprisutnosti proteina u biološkim reakcijama, oni ne predstavljaju idealne molekule za terapijske svrhe. Naime, velika molekulska masa i hidrofobni karakter nepovoljni su za njihovu biodostupnost. Velika fleksibilnost im omogućuje ulazak u nepovoljne interakcije s neželjenim metama što je uzrok nuspojava na lijekove. Također, nisu otporni na peptidaze iz gastrointestinalnog trakta koje narušavaju njihovu stabilnost [8].

2.2 PEPTIDOMIMETICI

Peptidomimetici su molekule koje oponašaju peptidne i proteinske sekundarne strukturne elemente uključene u interakcije s okolnim biološkim sustavima, nakon čega slijedi određeni biološki učinak. S druge strane, njihovo djelovanje može biti i antagonističke prirode pri čemu oponašanje trodimenzijske strukture veznog mjesta receptora inhibira interakciju s potencijalnim ligandima [8].

Prilikom dizajniranja peptidomimetičkih molekula za terapijske svrhe bitno je voditi računa o njihovim svojstvima. Korištenjem D-aminokiselina, eliminacijom amidne veze ili modifikacijom C- i N- terminalnih skupina smanjuje se podložnost peptidazama i osigurava stabilnost tako modificiranih peptida. Prolazak molekule kroz stanične membrane poboljšava se povećanjem ukupne hidrofobnosti uvođenjem aminokiselina s hidrofobnim bočnim ograncima dok povećanoj biodostupnosti doprinosi mala molekulska masa mimetika kao i

prisutnost polarnih skupina koje omogućuju topljivost u vodi [8]. Konformacijska fleksibilnost, odgovorna za interakciju s neželjenim biološkim metama, smanjuje se uvođenjem rigidnih kalupa za indukciju elemenata sekundarne strukture.

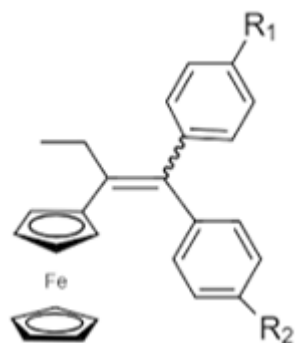
Glavni izazov u peptidomimetici jest oponašanje velikih i složenih proteinskih molekula. Međutim, kod bioloških reakcija ključne su "hot-spot", regije, odnosno aminokiselinski ostaci iz sekundarnih strukturnih elemenata ostvarenih na površini aktivnog mjesta proteina. Upravo tvorbom malih peptidomimetičkih struktura koje oponašaju sekundarne strukture, najčešće okrete, može se ostvariti jednaka ili slična funkcija proteina [8].

Klasifikacija peptidomimetika u četiri kategorije temelji se na njihovoj sposobnosti oponašanja prirodnih peptida i ostvarivanju biološkog učinka. Tip A su mimetici najbliži prirodnim peptidima s lokalnim modifikacijama koje služe kao stabilizatori konformacija čime se sprječava neželjena proteoliza. U tipu B zadržan je peptidni karakter, ali je okosnica potpuno modificirana, dok raspored bočnih ogranaka ostaje isti kao i kod prirodnih peptida. Tip C ima nepeptidni kostur čime se smanjuje peptidni karakter i proteolitička nestabilnost, dok mimetici tipa D najmanje slični prirodnim peptidima, ali oponašaju njihov način djelovanja [8].

2.3 FEROCEN I FEROCENSKI PEPTIDOMIMETICI

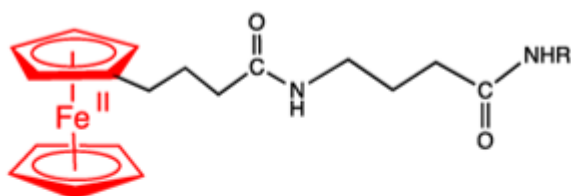
Ferocen je otkriven slučajno, kao rezultat neuspješnih pokušaja sinteze fulvalena. Dobiven je u obliku narančastog praha za kojeg je vrlo brzo utvrđena izrazita stabilnost koja proizlazi iz njegove aromatske strukture. Građen je iz metalnog središta s dvovalentnim željezovim kationom povezanim s dva ciklopentadienilna prstena [9].

Ferocen se zahvaljujući oksido-redukcijskim svojstvima primjenjuje kao katalizator te u elektrokemiji. Zahvaljujući lipofilnosti, niskoj toksičnosti i jednostavnosti kemijskih modifikacija primjenjuje se i u terapijske svrhe. Otkrićem ferocena počinje i razvoj organometalne kemije koja nastoji istražiti terapijski potencijal organometalnih spojeva (sadrže barem jednu vezu ugljik-metal), a pogotovo njihovo antitumorsko djelovanje. Reakcijski mehanizmi oksidacije i redukcije metalnih centara ili interakcije s biomolekulama narušavaju staničnu redoks-ravnotežu te uzrokuju porast slobodnih radikala zbog već spomenutih oksido-redukcijskih sposobnosti ferocenskih spojeva. Poznato je da su tumorske stanice osjetljive na slobodne radikale, stoga opisana redoks-svojstva imaju po njih nepovoljno djelovanje. Na temelju opisanog mehanizma ostvarena je pozitivna antitumorska aktivnost ferocenskog analoga tamoksifena, ferocifena (slika 1), na estrogen-ovisan i hormonski neovisan karcinom dojke (tamoksifen nije aktivan prema estrogen-neovisnim tumorima) [9].



Slika 1. Kemijska struktura ferocifena [10].

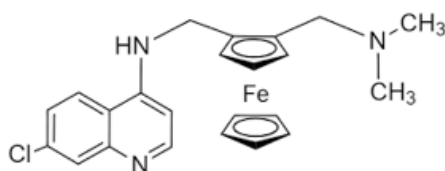
Prvi antitumorski lijek na bazi ferocena otkriven je 1978. (slika 2) od strane Brynesove istraživačke skupine kod kojeg su amino ili amidne skupine na ferocenu pozitivno utjecale protiv limfocitne leukemije P-388 [9].



Ferrocenil bi- i tri- (amid), niski aktivitet,
Brynes, 1978

Slika 2. Prvi antitumorski lijek na bazi ferocena [4].

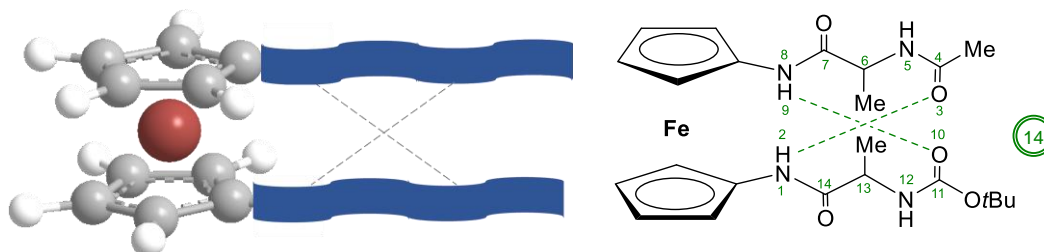
Ipak, najjača terapijska svojstva pokazuje ferokin (slika 3) korišten u liječenju malarije. Zahvaljujući redoks-aktivnom ferocenu umetnutom u strukturu klorokina, dolazi do oslobađanja slobodnih radikala koji pozitivno utječu na antimalarijsku aktivnost [9].



Slika 3. Kemijska struktura ferokina [10].

Nadalje, umetanjem 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvenciju nastaju peptidomimetici koji oponašaju sekundarne strukturne elemente i to najčešće okrete. Udaljenost ciklopentadienilnih prstenova iznosi 3,3 Å što omogućuje tvorbu unutarmolekulskih vodikovih veza (eng. *Intramolecular Hydrogen Bonds*, IHBs) kojima se zatvaraju prstenovi (eng. *IHB rings*) koji stabiliziraju ostvarenu konformaciju okreta. Veličina prstena ovisi o

korištenom ferocenskom kalupu, pa tako ferocen-1,1'-diamin omogućava tvorbu 14-članog IHB-prstena (slika 4). Veličina IHB-prstenova ovisi o kiralnosti i broju aminokiselina konjugiranih s ferocenskim kalupom kao i o strukturi ferocenskog kalupa. Za razliku od diaminskog peptida –NH–Fn–NH–, dikarboksilni –CO–Fn–CO– i aminokarboksilni –NH–Fn–CO– peptidi ostvaruju 10-, odnosno 12-člane prstenove [9].



Slika 4. Prikaz 14-članog prstena (ChemDraw).

2.4 TUMORI I NJIHOVO LIJEČENJE

Tumor je skup stanica mutiranih gena odgovornih za diobu i regulaciju rasta stanica zbog čega se one počinju nepravilno i nekontrolirano dijeliti. Mehanizmi popravka DNA uključuju brojne proteine, enzime i modifikacije kromatina. Ukoliko se pojavi greška na popravnim molekulama ili putevima za DNA doći će do pojave tumora ili drugih bolesti [11]. U posljednje vrijeme postignut je značajan napredak u razumijevanju nastanka i razvoja tumora, što je dovelo i do značajnog pomaka u razvoju terapija. Klasične terapije uključuju zračenje, operaciju, kemoterapiju i protonsko liječenje. Citostatici, koji se koriste u kemoterapiji, ciljaju stanice s visokim stupnjem proliferacije, ali neizbježno oštećuju i normalna tkiva, što uzrokuje visoku razinu toksičnosti. Uz ove tradicionalne metode, nove terapije poput imunoterapije i ciljane terapije postaju važnije jer nude preciznije i manje toksične opcije liječenja [12]. Općenito, cilj razvoja novih protutumorskih lijekova je pronaći što jednostavnije molekule koje će ciljano uništavati tumorske stanice uz što manje posljedica na zdrave stanice i samim time na cijeli organizam.

2.5 STANIČNE LINIJE I UZGOJ *IN VITRO*

Stanična kultura je naziv za pojedinačne i posebnim metodama izolirane stanice iz tkiva ili organa. Prilagodбом i praćenjem idealnih uvjeta u inkubatoru omogućuje se njihov rast i razmnožavanje što se naziva *in vitro* uzgojem. Postupkom izolacije pojedine stanice iz tumorskog tkiva te daljnjim razmnožavanjem u kontroliranim uvjetima dobiva se tumorska stanična linija. Provjerene tumorske stanične linije, ako se uzgajaju pod pravim uvjetima i uz odgovarajuće kontrole, zadržavaju većinu genetskih svojstava tumora iz kojeg dolaze. Upravo

zbog toga, te radi njihove sposobnosti da se neograničeno dijele, tumorske stanične linije su vrijedni *in vitro* sustavi koji se široko koriste u istraživanju raka i otkrivanju novih lijekova [13]. Korištenje tumorskih staničnih linija dodatno se potiče radi smanjivanja korištenja životinja u laboratorijske svrhe, što se naziva 3R pristup (eng. *Reduce, Refine, Replace*) [14].

Od uvođenja prve tumorske stanične linije u kulturu 1951. godine do danas razvijeni su mnogobrojni *in vitro* stanični testovi [15]. *In vitro* testovi omogućuju dobru reproducibilnost rezultata prilikom mjerenja toksičnosti, daju uvid u samu toksičnost spojeva, raspona koncentracija toksičnosti te odnos koncentracije i vremena djelovanja pojedinog spoja. Osim inhibitornog djelovanja, moguće je pratiti i stimulatorna svojstva ispitivanih spojeva koje omogućuju rast stanica kulture [14]. Nedostatak u odnosu na *in vivo* testove je nemogućnost ispitivanja farmakokinetike ispitivanih spojeva, odnosno put spoja od apsorpcije do eliminacije iz organizma [11].

2.5.1 Stanična linija HFF-1

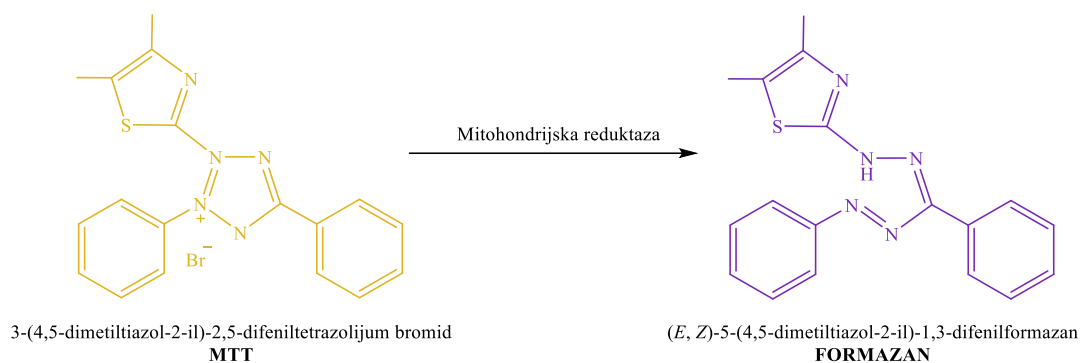
Fibroblasti su izdužene, vretenasto građene stanice kože sa visokom proliferacijskom aktivnošću. Temelj njihove visoke umreženosti i mogućnosti komunikacije sa susjednim stanicama i tkivima je u ekstracelularnom sekretornom matriksu molekula, faktoru rasta, citokinima i kemokinima [16]. Za svrhe istraživanja razlikuje se nekoliko vrsta HFF stanica, ovisno o dijelu tijela sa kojeg su uzete. HFF-1 stanična linija predstavlja stanice kože novorođenčeta te je ujedno najčešće korištena linija u istraživanjima. Često se primjenjuje u *in vitro* te *in vivo* istraživanjima, a njihovi se derivati poput egzosoma, vezivnih medija i kondicioniranog medija koriste u regenerativnoj medicini. Također, koriste se i kao aplicirajuće stanice za brže zacjeljivanje rana zahvaljujući brzom proliferaciji ili kao hranidbeni sloj u ko-kulturama različitih staničnih linija [16].

2.5.2 Stanična linija MCF-7

MCF-7 je humana stanična linija koja potječe iz pleularnog izljeva metastaziranog adenokarcinoma dojke 69-godišnje pacijentice. Naziv je dobila po institutu Michigan Cancer Foundation u Detroitu gdje je prvi puta izolirana. Istraživanja na staničnim linijama pokazuju da je proliferacija MCF-7 tumora hormonski ovisna. Drugim riječima, hormon estrogen potiče diobu tumorskih stanica adenokarcinoma dojke, dok antagonisti estrogena poput tamoksifena inhibiraju rast stanica. Stoga se oboljele pacijentice tijekom liječenja podvrgavaju i hormonskoj terapiji. MCF-7 stanična linija nije agresivna niti invazivna, te je stoga prikladna za *in vitro* uzgoj i eksperimentalna istraživanja. Specifičnost u morfologiji je sposobnost stvaranja kupola između adherentnih stanica [17].

2.6 MTT METODA

MTT test koristi se za određivanje metaboličke aktivnosti stanica, a pokazatelj je i prisutstva živih stanica. Riječ je o kolorimetrijskoj metodi koja se temelji na pretvorbi žuto obojenih tetrazolijevih soli (MTT) u netopljive, ljubičasto obojene formazanske kristale djelovanjem NADPH-ovisnih reduktaza [18]. Pošto su formazanski kristali netopljivi u vodi obavezno je dodavanje dimetilsulfoksida (DMSO) prije mjerenja apsorbancije (slika 5). Što je nijansa ljubičaste jače izražena unutar jažica, to je veća prisutnost metabolizirajućih i živih stanica. Apsorbancija se provodi sa svrhom određivanja postotka preživljenja stanica. Metabolizirajuće stanice, zahvaljujući redukciji MTT, sadrže više formazanskih kristala koji apsorbiraju svjetlost što se može poistovjetiti s brojem živih stanica na čemu se temelji postotak preživljenja [18]. Od ostalih metoda u uporabi su: Kenacid Blue metoda, Trypan Blue metoda, Neutral Red metoda, bojanje bojom kristal – ljubičasto, metoda otpuštanja laktat-dehidrogenaze, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a [14]. Optimizacija testova je nužna kako bi rezultati *in vitro* testova bili bolji pokazatelj *in vivo* učinka. Također, testiranjem kemikalija pomoću više ponuđenih metoda temeljenih na različitim principima moguće je predvidjeti ili odrediti mehanizam njihove toksičnosti [18]. U ovom radu korištena je MTT-metoda za određivanje biološke aktivnosti nosintetiziranih ferocenskih spojeva na HFF-1 i MCF-7 staničnim linijama u *in vitro* uvjetima.



Slika 5. Tvorba formazana djelovanjem NADPH-oksido-reduktaze (ChemDraw).

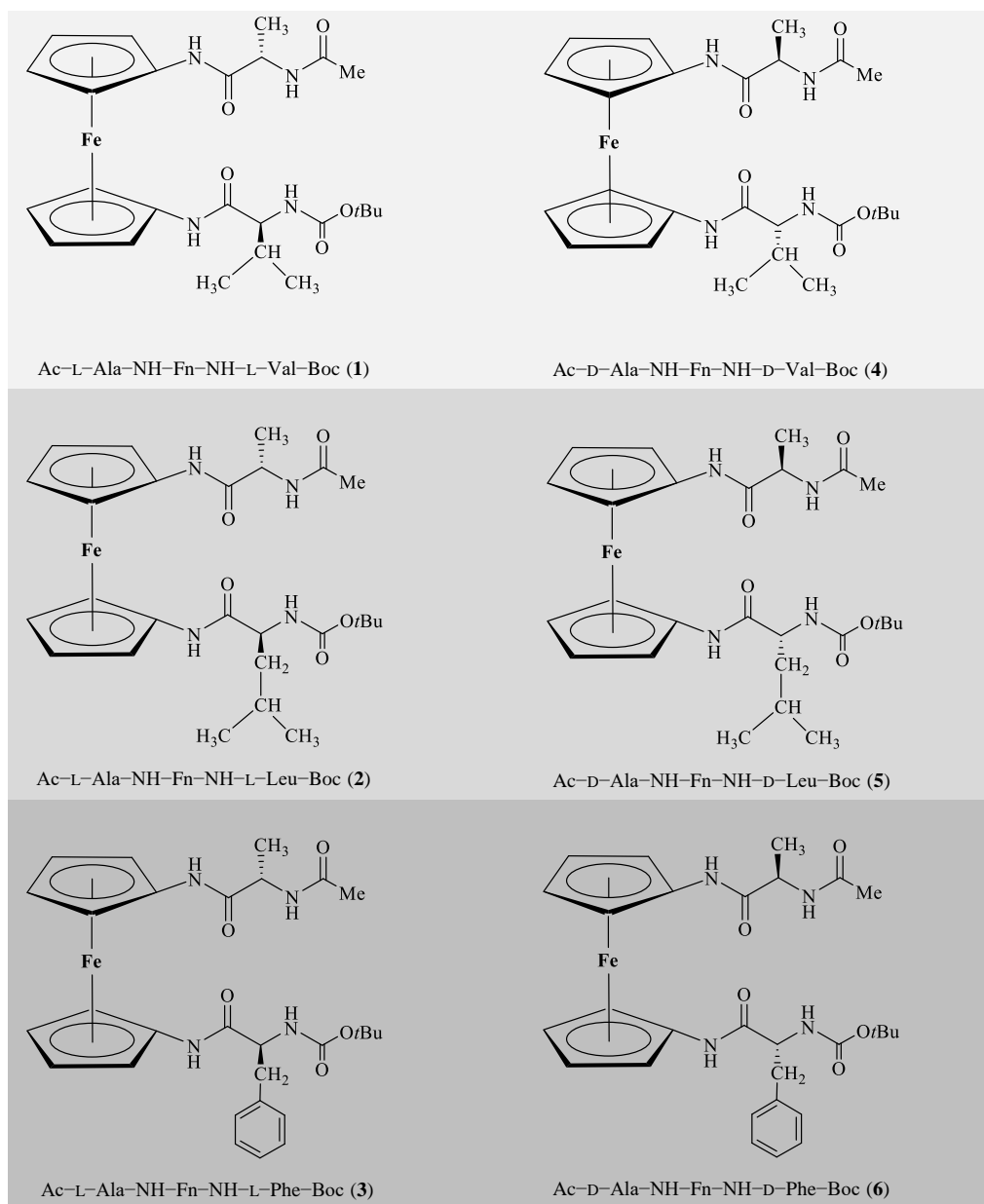
3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Ferocenski peptidomimetici

Na slici 6 prikazani su testirani ferocenski peptidomimetici **1-6**. Riječ je homokiralnim enantiomernim konjugatima ferocen-1,1'-diamina s Val (**1, 4**), Leu (**2, 5**) i Phe (**3, 6**). Spojevi su sintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a. Priprema etanolnih otopina testiranih

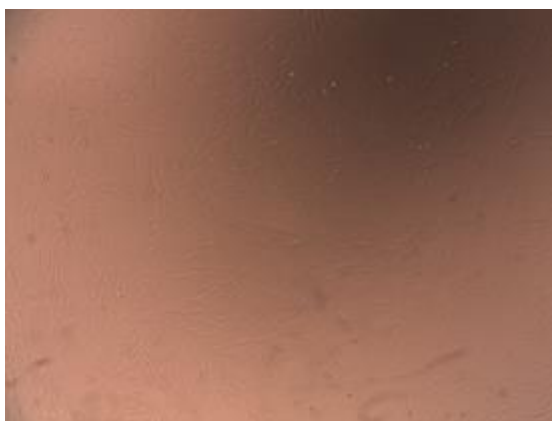
spojeva odgovarajućih koncentracija, skladištenje pri 4 °C te izvođenje eksperimenta provedeno je u Centralnom laboratoriju BICRO BIOCentra u Zagrebu. Prije korištenja otopine testiranih spojeva zagrijane su na 37 °C u termobloku.



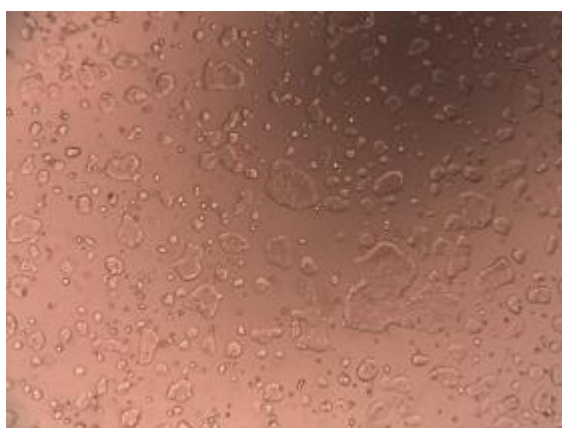
Slika 6. Kemijske strukture homokiralnih peptidomimetika (1-6) (ChemDraw).

3.1.2 Humane stanične linije

Eksperimenti su provedeni na HFF-1 (slika 7) i MCF-7 (slika 8) staničnim linijama dobivenim iz ATCC radne banke stanica. ATCC (American Type Culture Collection) je globalni centar za opskrbu i razvoj biološkog materijala poput staničnih linija za svrhe laboratorijskih istraživanja [19].



Slika 7. Stanična linija HFF-1 (Microvisible).



Slika 8. Stanična linija MCF-7 (Microvisible).

3.1.3 Kemikalije

- DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium), Sigma-Aldrich, Njemačka
- FBS (fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pen/Strep solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- 0,01 mg/mL insulin solution from bovine pancreas, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, Njemačka
- PBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline), pripremljeno u matičnom laboratoriju
- DMSO (dimetilsulfoksid), Thermo Scientific
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazolijev bromid), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Trypan blue, 0,4 % solution, Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Etanol 96 %, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.4 Potrošni materijal

- T-boce od 75 cm² za uzgoj staničnih kultura
- Testne ploče sa 96 jažica za uzgoj staničnih kultura
- Komorica za brojanje stanica, Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Laboratorijski pribor (serološke pipete od 5, 10 i 25 mL, vakuum cijev, plastične Ependorf epruvete, plastični tipsevi, plastične kivete sa poklopcem)

3.1.5 Uređaji i oprema

- Multichannel pipeta, Eppendorf, Austrija
- Laminar za sterilni rad (BIOAIR Safemate 1.2), Italija
- CO₂ Inkubator za uzgoj stanica (BINDER CB 170), Njemačka
- Inverzni mikroskop; (Micros), Austrija
- Automatski brojač stanica (Countess3), Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica (Hidex Chameleon V), Hidex Oy, Finska
- Vodena kupelj (Unitronic), JP Selecta, Španjolska
- Centrifuga (Sorvall Contifuge Stratos), Thermo Fisher Scientific, Njemačka
- Računalni program Microvisible za fotografiranje mikroskopskih slika
- Graphpad Prism program za izradu grafova
- ChemDraw program za crtanje kemijskih struktura
- Microsoft aplikacije za crtanje shema Paint 3D i Visio.

3.2 METODE

3.2.1 Uzgoj stanica

Stanične linije pohranjene su u ampulama u mediju za zamrzavanje u spremniku tekućeg dušika. Početak uzgoja je odmrzavanje stanica u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon odmrzavanja, stanice se prebace iz ampule za zamrzavanje u Falcon tubice te im se nadoda svježi hranjivi medij. HFF-1 stanice uzgajaju se u hranjivom mediju DMEM uz dodatak 15 % FBS, 1 % otopine Penicilin/Streptamicin (Pen/Strep) i 0,01 mg/mL inzulina. Za uzgoj MCF-7 stanica korišten je isti hranjivi medij uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 1 % Pen/Strep otopine i 0,01 mg/mL inzulina. Stanična suspenzija se centrifugira 4 minute pri 270 ×g, prilikom čega se supernatant odvaja od samih stanica koje zaostaju na dnu tubice. Supernatant se usiše vakuum cijevi pazeći da se ne usisaju i stanice koje se zatim prenose u T-boce za uzgoj uz dopunu hranjivim medijem do 12 mL. Stanice su inkubirane u inkubatoru na 37 °C, 5 % CO₂, a pasaže su rađene 2-3 puta tjedno u razrjeđenjima 1 : 5.

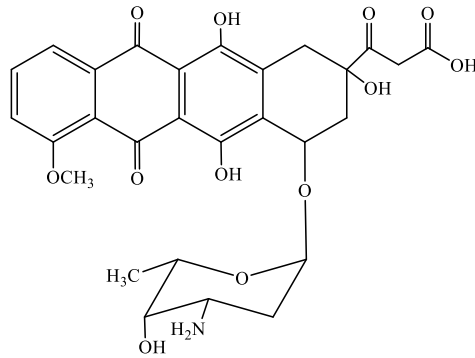
Stanične linije unutar T-boca svakodnevno su kontrolirane pomoću inverznog mikroskopa kojim se prvenstveno pratila brojnost i morfologija. Praćenje brojnosti stanica je važno kako bi se izbjeglo iscrpljivanje i kontaminacija staničnog medija produktima stanica što vodi do inhibicije rasta i posljedično odumiranja stanica. Kontrola uzgoja se vrši precjepljivanjem stanica kada im je zastupljenost veća od 80 %. Pasaža stanica započinje usisavanjem hranjivog medija te ispiranjem nasađenih stanica s 5 mL ugrijanog PBS-a. Dodavanjem 2 mL ugrijanog tripsina te petominutnom inkubacijom omogućuje se kidanje veza nasađenih stanica i plastične površine T-boce. Odvojene stanice su jasno okruglog oblika i plutaju po površini medija. Uspješnost odvajanja se provjerava pod mikroskopom. Tripsin se inhibira dodatkom svježeg hranjivog medija čiji volumen ovisi o razrjeđenju iduće pasaže. Za potrebe ovog rada razrjeđenja su rađena obično u omjerima 1 : 5 što za maksimalni volumen otopine u T-boci od 12 mL podrazumijeva dodavanje 2 mL stanične suspenzije i 10 mL hranjivog medija. Napunjene T-boce stavljene su u inkubator gdje su namješteni optimalni uvjeti za rast stanica: 37 °C, 5 % CO₂.

3.2.2 Određivanje broja stanica tripanskim modrilom u Bürker – Türkovoj komorici

Nakon tripsinizacije, stanice su sakupljene u 10 mL medija, centrifugirane 4 minute na 270 ×g i resuspendirane u 1 mL svježeg medija. Alikvot od 10 µL staničnog medija i 10 µL tripanskog modrila se pomiješa u Ependorf epruveti iz koje se 10 µL otpipetira na svaku Bürker-Türkovu komoricu na pločici. Pločica sa komoricama je stavljena u brojač na kojem su očitane vrijednosti broja stanica u obje komorice, a kao krajnja vrijednost je uzeta srednja vrijednost broja stanica koje ispisuje uređaj.

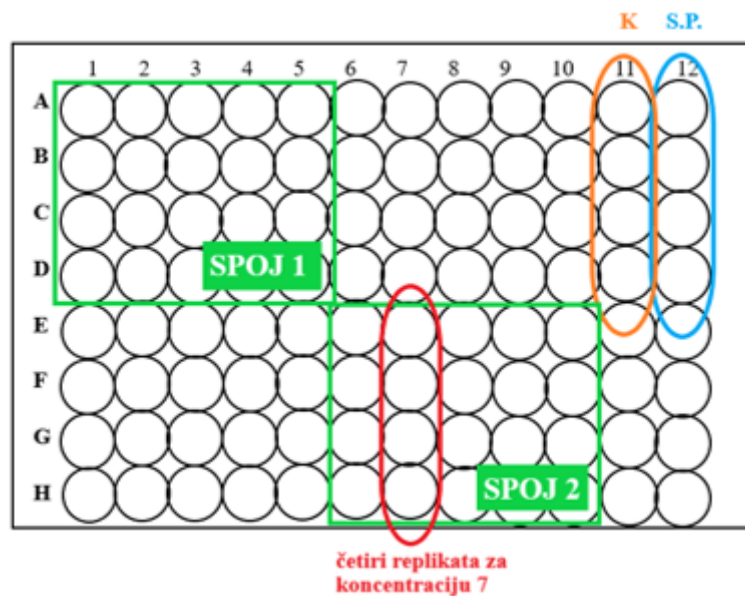
3.2.3 MTT test

Za MTT test, 150 µL stanične suspenzije HFF-1 (5000 stanica/jažici) i MCF-7 (5000 stanica/jažici) nacjepljuje se na mikrotitarske pločice s 96 jažica pomoću Multichannel pipete te se inkubiraju na 37 °C i 5 % CO₂ u inkubatoru 24 sata. Svih šest spojeva ispitivano je u pet koncentracija: 5, 10, 50, 100 i 350 µM. Na slici 9. prikazana je kemijska struktura kemoterapeutika adriamycina. Za potrebe ovog rada testiran je u prve četiri koncentracije. Svaka od navedenih koncentracija ima četiri replike, a za svaku staničnu liniju rađene su dvije biološke replike. Idućeg dana su pripremljena razrjeđenja ferocenskih spojeva i adriamycina u staničnom mediju.



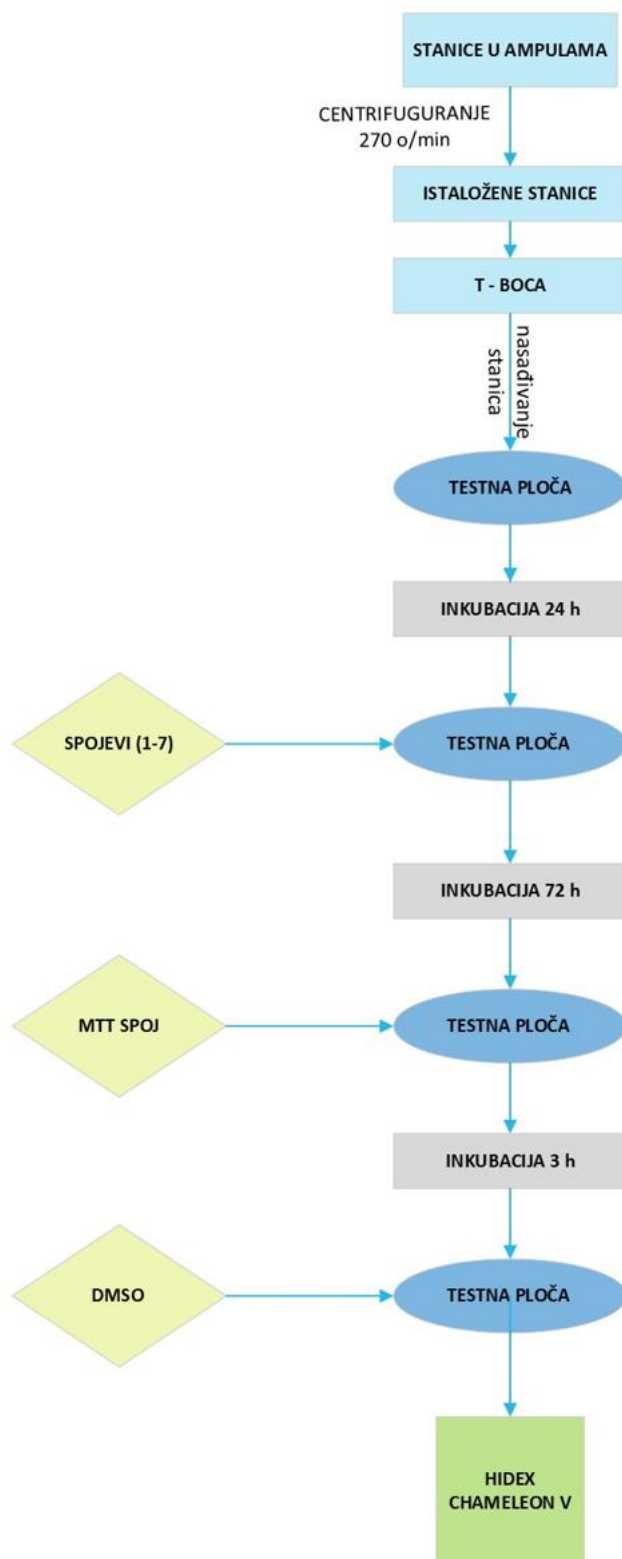
Slika 9. Kemijska struktura adriamycina (ChemDraw).

U svaku jažicu (slika 10) otpipetira se 50 μL razrjeđenja tako da su finalne koncentracije u jažicama 5, 10, 50, 100 i 350 μM . Također, otpipetirano je 50 μL hranjivog medija u svrhe slijepe probe i kontrole (slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz MTT-ploče (Radi lakšeg pipetiranja ploča je podijeljena na dva bloka s 20 jažica. K predstavlja kontrolne jažice, a S.P. slijepu probu) (Paint 3D).

Stanice su gledane pod Micros mikroskopom, a fotografirane u Microvisible programu. Nakon 72 sata inkubacije, odnosno vremena djelovanja spojeva na nasadene stanične linije potrebno je vakuum sisaljkom usisati sav medij te dodati Multichannel pipetom po 40 μL razrijeđenog MTT-a (0,5 mg/mL; 1 : 10) u staničnom mediju. Stanice se ponovno vraćaju na inkubaciju od 3 sata. Po završetku inkubacije, Multichannel pipetom dodaje se po 160 μL DMSO uz resuspendiranje sadržaja s ciljem potpunog otapanja ljubičastih kristala. Mjerenje apsorbancije se vrši na čitaču mikrotitarskih pločica Hidex Chameleon V pri valnoj duljini od 595 nm. Uz normalizaciju, dobiveni rezultati apsorbancije proporcionalni su broju živih stanica. Slika 11 prikazuje tijek cijelog postupka.



Slika 11. Shematski prikaz izvođenja eksperimenta (Visio).

Preživljenje stanica računato je prema sljedećoj formuli:

$$\text{preživljenje} = \frac{(A_{\text{test}} - A_{\text{S.P.}})}{(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{S.P.}})} \times 100 (\%)$$

(A_{test} =apsorbancija stanica nakon tretiranja sa spojevima, $A_{\text{S.P.}}$ =apsorbancija slijepe probe, A_{kontrola} =apsorbancija netretiranih stanica).

4 REZULTATI I RASPRAVA

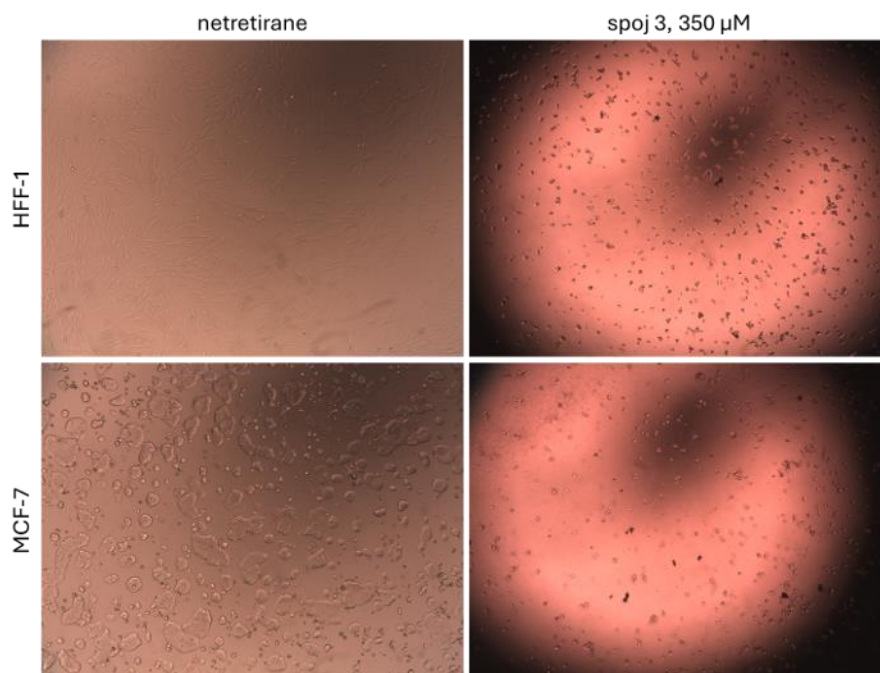
Ispitano je citotoksično djelovanje homokiralnih ferocenskih peptida **1-6** u *in vitro* uvjetima pomoću MTT metode na staničnim linijama HFF-1 (zdrave stanice kože, fibroblasti) i MCF-7 (stanice adenokarcinoma dojke) uz praćenje morfoloških promjena. Ovaj način ispitivanja je prvi korak u razvoju novih lijekova te omogućuje probir potencijalno djelotvornih spojeva. Testirani ferocenski konjugati međusobno se razlikuju u konstituirajućim dipeptidima vezanima na ferocenski kalup [Val-Ala (**1,4**), Leu-Ala (**2, 5**) i Phe-Ala (**3, 6**)], pri čemu su peptidi **1 i 4, 2 i 5** te **3 i 6** u enantiomernom odnosu.

Dobiveni rezultati postotka preživljenja stanica u ovisnosti o koncentraciji spoja upućuju na toksičnost testiranih spojeva. Tijekom tretmana ferocenskim spojevima, osim njihove anti-proliferativne aktivnosti praćene su morfološke razlike živih i mrtvih stanica. Različita učinkovitost djelovanja testiranih peptida pripisuje se konstitutivnim aminokiselinama čiji se bočni ogranci razlikuju po voluminoznosti i hidrofobnosti. Također, prisutnost *N*-zaštitnih skupina na krajevima lanaca [*tert*-butoksikarbonil (Boc) ili acetil (Ac)], kiralnost peptida i struktura ferocenskog kalupa odgovornog za indukciju okreta i IHB prstenova će utjecati na rezultate biološke aktivnosti. Spojevi su ispitivani u pet različitih koncentracija: 5, 10, 50, 100 i 350 μM , po četiri replikata u dvije biološke replike. Sedmi testirani spoj predstavlja komercijalno dostupan i dokazano djelotvoran lijek adriamycin korišten u svrhe kemoterapije.

4.1 UČINAK HOMOKIRALNIH FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA NA MORFOLOGIJU HFF-1 I MCF-7 STANIČNIH LINIJA

Praćenje morfologije stanica provođeno je na inverznom mikroskopu pri čemu su uočene morfološke promjene staničnih linija uslijed djelovanja ferocenskih peptida pri različitim koncentracijama. Vidljivo je kako su netretirane stanice prihvaćene za površinu i zadržavaju svoja karakteristična morfološka svojstva. Gust i ujednačen raspored odlikuje obje stanične linije. HFF-1 linija je prepoznatljiva po izduženim stanicama koje rastu zasebno, a MCF-7 po okruglim stanicama koje rastu u skupinama. Stanice tretirane spojevima **1-7** mijenjaju svoj morfološki izgled i gustoću što ovisi o korištenoj koncentraciji i vrsti spoja. Do najveće promjene u morfologiji MCF-7 i HFF-1 stanica u odnosu na netretirane stanice došlo je nakon 72-satne

inkubacije L-Phe-konjugatom **3** (slika 12). Najistaknutija promjena oblika vidljiva je kod HFF-1 stanične linije čije su netretirane stanice izduženog oblika, a nakon inkubacije spojevima poprimaju okrugli oblik (slika 12). Mrtve stanice odvojene od površine prilikom tretmana spojevima poprimaju karakterističan okrugli oblik te plutaju po površini medija.



Slika 12. Tretirane stanične linije HFF-1 i MCF-7 spojem **3**, koncentracije 350 μM .

4.2 UČINAK DJELOVANJA FEROCENSKIH PEPTIDOMIMETIKA 1-6 NA PREŽIVLJAVANJE STANIČNIH LINIJA HFF-1 I MCF-7

Sve korištene stanice podvrgnute su 72-satnom tretmanu spojevima **1-7** (tablica 1) uz povećanje koncentracija od 5 do 350 μM , nakon čega je citotoksična aktivnost evaluirana MTT metodom uz bilježenje apsorbancije pomoću Hidex Chameleon V uređaja. Rezultati su prikazani kao ovisnost postotka preživljenja stanica u ovisnosti o koncentraciji spoja. Poželjan odnos preživljenja i koncentracije je obrnuto proporcionalan što znači da će povećanje koncentracije spoja uzrokovati smanjenje preživljenja stanica, drugim riječima toksičnost spoja će rasti.

Kiralnost enantiomernih parova iste aminokiselinske sekvence može značajno utjecati na međumolekulske interakcije i međupovezivanje peptida što posljedično dovodi do razlika u njihovoj biološkoj aktivnosti [20].

Za enantiomerne Val-konjugate, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (**1**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (**4**), jasno je vidljiva veća toksičnost spojeva prema zdravim HFF-1 stanicama nego prema tumorskim MCF-7 (slika 13a). Raspon koncentracija od 5 μM do 100 μM prikazuje postotak preživljenja tumorskih stanica iznad 50 %, odnosno inhibicija rasta stanica

pri koncentraciji od 100 μM za spoj **1** iznosi $81,37 \pm 3,28 \%$, a za spoj **4** iznosi $79,37 \pm 10,19 \%$. Preživljenje zdravih stanica već pri 50 μM postaje niže od 50 % pa tako inhibicijski učinak spojeva **1** i **4** omogućava preživljenje $48,03 \pm 3,10 \%$ odnosno $42,20 \pm 3,60 \%$ tretiranih stanica. Na maksimalno upotrijebljenoj dozi spoj **1** inhibira rast stanica pri čemu preživljava $36,93 \pm 4,23 \%$ MCF-7 linije, a $31,22 \pm 4,70 \%$ HFF-1 linije, dok kod spoja **4** preživljava $42,33 \pm 5,81 \%$ MCF-7 i $36,10 \pm 2,38 \%$ HFF-1 linije (tablica 1). Rezultati sugeriraju da je toksičnost enantiomernih ferocenskih konjugata s valinom **1** i **4** veća za zdrave HFF-1 stanice nego za tumorske MCF-7 stanice. Osim što je najniži postotak preživljenja za spoj **1** na zdravoj staničnoj liniji vidljivo je i preklapanje rezultata pri koncentraciji od 350 μM spoja **1** na tumorskoj liniji te spoja **4** na zdravoj liniji što pokazuje kako ferocenski konjugati supstituirani valinom daju usporedive rezultate preživljenja stanica na obje stanične linije.

Cilj rada je provesti preliminarnu biološku evaluaciju ferocenskih peptidomimetika, s naglaskom na citotoksični potencijal prema tumorskim i zdravim stanicama kako bi se umanjile nepoželjne nuspojave lijekova.

Konjugati ferocen-1,1'-diamina s leucinom, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**2**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**5**), u rasponu koncentracija 5-100 μM imaju jače toksično djelovanje na HFF-1 staničnoj liniji nego MCF-7 (slika 13b). Značajna promjena preživljenja uočljiva je pri koncentraciji 350 μM za L-enantiomer **2**, pri čemu postotak preživjelih tumorskih stanica pada s $80,25 \pm 4,62 \%$ na $19,99 \pm 12,31 \%$ pri 100 μM koncentraciji (tablica 1). Pad postotka preživljenja je blaži kod zdravih stanica, odnosno s $38,57 \pm 2,95 \%$ na $30,68 \pm 3,78 \%$ pri istim koncentracijama, što daje naslutiti učinkovitiju djelotvornost spoja **2** na tumorskim stanicama. Dakle, spoj **2** s L-Leu pri koncentraciji od 350 μM djeluje kao jače toksično sredstvo na MCF-7 staničnu liniju u odnosu na HFF-1 liniju. Ovakav ishod nije zabilježen za njegov D-enantiomer **5** čija toksičnost za MCF-7 liniju proporcionalno s povećanjem koncentracije raste do $55,47 \pm 2,26 \%$ preživljenja, dok kod HFF-1 linije raste do $41,17 \pm 1,44 \%$, a pri 350 μM pada na $49,62 \pm 11,92 \%$ preživljenja stanica (tablica 1). Takav pad toksičnosti spoja **5** pri većoj koncentraciji mogući je rezultat pogrešaka ili nepreciznosti tokom mjerenja.

Najniži rezultat preživljenja stanica od svih šest testiranih ferocenskih peptida zabilježen je pri 350 μM koncentraciji Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) na tumorskoj staničnoj liniji, i to u iznosu od svega $1,92 \pm 2,21 \%$ (slika 13c i tablica 1). Visok citotoksični učinak spoja **3** koji sadrži L-fenilalanin također potvrđuje nizak postotak preživljenja HFF-1 stanične linije od $6,04 \pm 2,97 \%$. Iako u malom postotku, spoj **3**, osim svoje visoke toksičnosti, raspoznaje i tumorske od zdravih stanica. S druge strane, bez obzira na najniži krajnji rezultat, djelovanje spoja **3** bi trebalo još detaljnije ispitati jer veće primijenjene koncentracije dovode do veće smrtnosti zdravih stanica u odnosu na tumorske što je vidljivo na slici 13c. Već pri koncentraciji od 5 μM , spoj **3** snižava postotak preživljenja HFF-1 linije. Njegov D-enantiomer Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) djeluje slabijom toksičnošću na obje stanične linije pri koncentraciji

od 350 μ M gdje je preživljenje tumorskih stanica $39,59 \pm 28,54$ %, a zdravih $36,08 \pm 9,88$ % (tablica 1). Promatrajući preživljenja pri koncentracijama nižim od 350 μ M jasno je vidljiva veća toksičnost spoja **6** u odnosu na spoj **3** za MCF-7 staničnu liniju dok su za HFF-1 liniju rezultati usporedivi (slika 13c).

Tablica 1. Prikaz vrijednosti % preživljenja MCF-7 i HFF-1 staničnih linija ovisno o koncentraciji peptida **1-6** i adriamycina **7** (plavo i zeleno označene vrijednosti opisane su gornjem poglavlju).

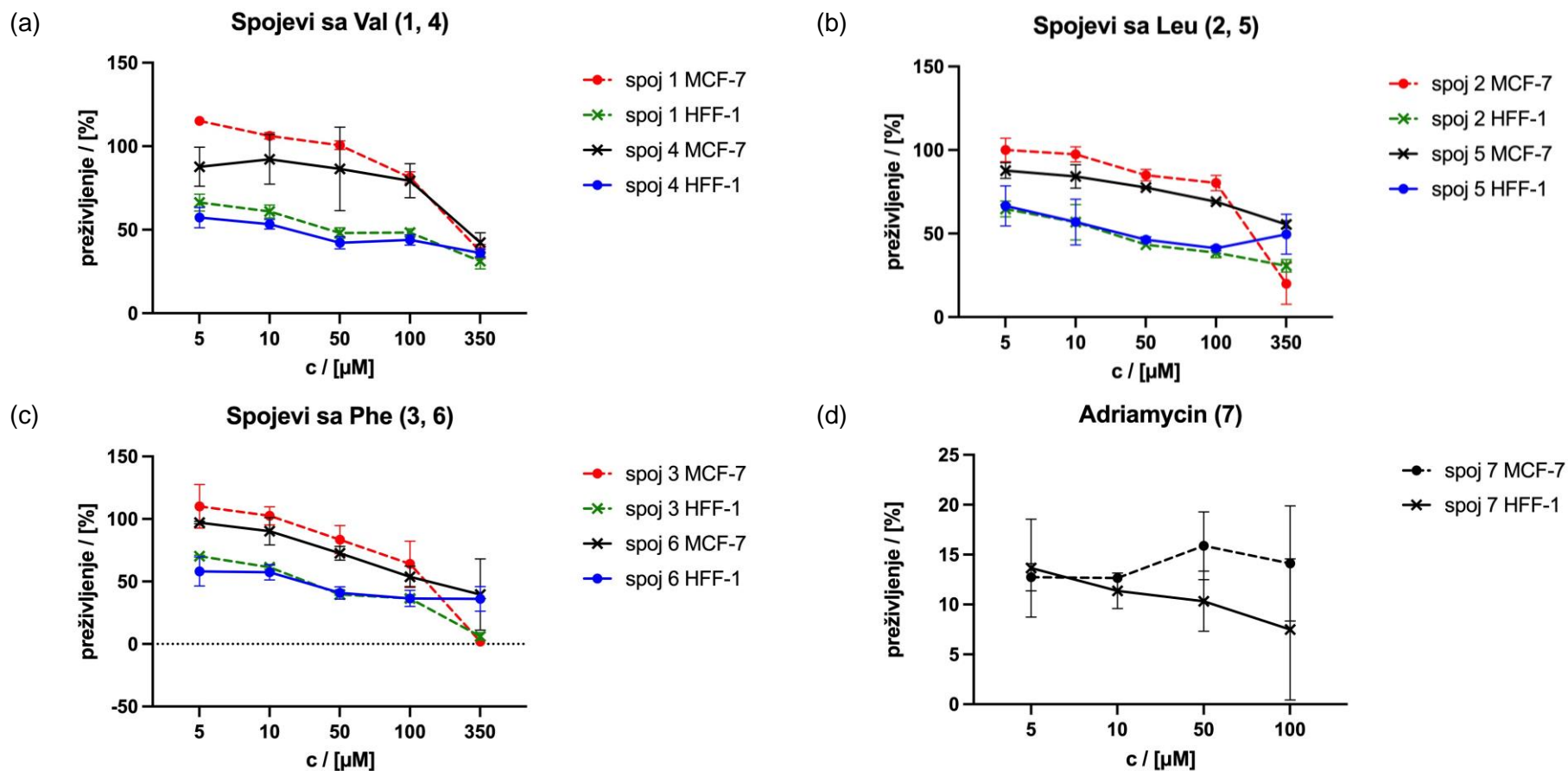
| Spoj | c/ μ m | Preživljenje / % | |
|---------------------------------|------------|------------------|--------------|
| | | MCF-7 | HFF-1 |
| Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (1) | 5 | 115,24 | 66,27 |
| | 10 | 106,22 | 60,96 |
| | 50 | 100,62 | 48,03 |
| | 100 | 81,37 | 48,26 |
| | 350 | 36,93 | 31,22 |
| Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (2) | 5 | 100,05 | 64,70 |
| | 10 | 97,48 | 56,75 |
| | 50 | 84,96 | 43,30 |
| | 100 | 80,25 | 38,57 |
| | 350 | 19,99 | 30,68 |
| Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (3) | 5 | 110,11 | 70,29 |
| | 10 | 102,52 | 61,35 |
| | 50 | 83,45 | 39,54 |
| | 100 | 64,15 | 36,34 |
| | 350 | 1,92 | 6,04 |
| Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (4) | 5 | 87,72 | 57,25 |
| | 10 | 92,21 | 53,26 |
| | 50 | 86,47 | 42,20 |
| | 100 | 79,37 | 43,89 |
| | 350 | 42,33 | 36,10 |
| Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (5) | 5 | 87,75 | 66,59 |
| | 10 | 84,19 | 56,09 |
| | 50 | 77,51 | 46,30 |
| | 100 | 69,09 | 41,17 |
| | 350 | 55,47 | 49,62 |

Tablica 1. Pregled vrijednosti % preživljenja MCF-7 i HFF-1 staničnih linija ovisno o koncentraciji peptida **1-6** i adriamycina **7** (plavo i zeleno označene vrijednosti opisane su gornjem poglavlju)-*nastavak*

| | | | |
|--|------------|--------------|--------------|
| Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6) | 5 | 97,11 | 58,07 |
| | 10 | 90,19 | 57,46 |
| | 50 | 72,61 | 40,89 |
| | 100 | 53,80 | 36,48 |
| | 350 | 39,59 | 36,08 |
| adriamycin (7) | 5 | 12,73 | 13,65 |
| | 10 | 12,66 | 11,37 |
| | 50 | 15,88 | 10,33 |
| | 100 | 14,11 | 7,50 |

Lijek adriamycin je u ovom radu korišten za usporedbu citotoksičnosti učinka na tumorsku staničnu liniju MCF-7 i zdravu liniju HFF-1 s analiziranim ferocenskim peptidomimeticima. Adriamycin dovodi do < 20 % preživljenja stanica pri 4 ispitane koncentracije 5, 10, 50 i 100 μM (slika 13d, tablica 1). Pri tim koncentracijama dovodi do veće smrtnosti zdravih i tumorskih staničnih linija u usporedbi s testiranim ferocenskim spojevima. Takav rezultat daje naslutiti da je adriamycin toksičniji za stanice od ferocenskih spojeva. Također, adriamycin je pri najmanjoj koncentraciji toksičniji za zdrave stanice za razliku od spoja **3**. Pri koncentriranim dozama lijeka toksičnost je izraženija za zdravu liniju stanica što je nepoželjno.

Dobiveni rezultati indiciraju jače antiproliferativno djelovanje L-enantiomera testiranih peptidomimetika, posebice konjugata Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**2**) i Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) pri korištenim maksimalnim koncentracijama od 350 μM . Međutim, D-enantiomeri testiranih biokonjugata (**4** i **5**) pokazuju veću toksičnost prilikom korištenja manjih koncentracija dok njihove maksimalne doze ne ostvaruju izraženo antiproliferativno djelovanje uočene za spojeve **2** i **3**.



Slika 13. Utjecaj ferrocenskih konjugata s L- ili D-aminokiselinama a) valinom (1,4), b) leucinom (2,5) ili c) fenilalaninom (3, 6) i d) adriamycina (7) na HFF-1 i MCF-7 stanične linije u koncentracijama 5, 10, 50, 10 i 350 μM unutar 72-satnog tretmana. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost dvije biološke replike srednjih vrijednosti postotka preživljenja \pm standardna devijacija (N=2, n=4).

Uspoređujući dobivene rezultate s ranije dobivenim rezultatima [17] uočeno je nekoliko zajedničkih značajki. Naime, spomenuto prethodno istraživanje provedeno je na homokiralnim i heterokiralnim peptidomimeticima izvedenima iz istog kalupa –NH–Fn–NH– koji su bili simetrično disupstituirani s Val, Leu odnosno Phe. Eksperiment je proveden na HeLa, MCF-7 i HepG2 staničnim linijama. Rezultati su pokazali kako na MCF-7 staničnim linijama heterokiralni spojevi supstituirani s Val djeluju toksično jedino pri koncentraciji od 350 μ M, a pri istoj koncentraciji spojevi sa Leu djeluju letalno. Što se tiče homokiralnih spojeva, 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 fenilalaninom disupstituirani ferocenski konjugati ne pokazuju značajne razlike zato što svi djeluju letalno, posebice heterokiralni konjugat (Ac–L-Phe–NH–Fn–NH–D-Phe–Boc) koji već pri 50 μ M koncentraciji uništava 82,32 % tumorskih stanica [17].

Prethodna istraživanja provedena u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a pokazala su da testirani ferocenski biokonjugati imaju različito antiproliferativno djelovanje na različitim tumorskim staničnim linijama zbog različitih modela prihvaćanja spojeva za površinu stanica. Tome doprinosi i lipofilnost spojeva čemu su uzrok hidrofobni i voluminozni aminokiselinski ogranci te zaštitne skupine na krajevima konjugata što uzrokuje remećenje membranske strukture i lakše prodiranje u stanicu.

Uspoređujući rezultate s literaturnim podacima [17], potvrđuje se kako Val-konjugati ne pokazuju antiproliferativno djelovanje u tolikoj mjeri kao Phe-konjugati. Također, L-enantiomerni konjugati daju bolje antiproliferativne rezultate od svojih D-enantiomera za MCF-7 staničnu liniju što je potvrđeno s Ac–L-Ala–NH–Fn–NH–L-Leu–Boc (**2**), kao i najbolje djelovanje Ac–L-Ala–NH–Fn–NH–L-Phe–Boc (**3**) čiji rezultat od svega 1,92 % preživljenja tumorske MCF-7 stanične linije djeluje gotovo potpuno letalno.

Općenito gledajući osjetljivost stanica, zdrave stanice HFF-1 osjetljivije su od MCF-7 tumorskih stanica što potvrđuje manje preživljenje pri nižim koncentracijama spojeva. Najveći potencijal kao antitumorski lijek imaju Ac–L-Ala–NH–Fn–NH–L-Leu–Boc (**2**) i Ac–L-Ala–NH–Fn–NH–L-Phe–Boc (**3**) čije maksimalne koncentracije rezultiraju manjim postotkom preživljenja MCF-7 stanične linije u usporedbi sa HFF-1 linijom. Dobiveni rezultat sugeriraju opravdanost nastavka istraživanja Leu- i Phe-konjugata s ferocenom za liječenje adenokarcinoma dojke koji osim svoje visoke djelotvornosti pri višim dozama omogućuju i prepoznavanje tumorskih od zdravih stanica. Mogućnost prepoznavanja od velike je koristi prilikom provedbe kemoterapije kako bi se u najvećoj mjeri smanjile nepoželjne i neugodne nuspojave.

Nadalje, rezultati istraživanja Kovačević i sur. (2022) pokazuju kako monosupstituirani konjugati s Val (Boc–L/D-Val–NH–Fn–COOMe) i Leu (Boc–L/D-Leu–NH–Fn–COOMe) zauzimaju stabilnije uređene strukture u odnosu na konjugate s Phe (Boc–L/D-Phe–NH–Fn–

COOMe), ali je njihov inhibitorni utjecaj na rast MCF-7 stanične linije veći od 50 % [21]. Ovakav rezultat je još jedan dokaz uspješnog učinka ferocenskih konjugata s Phe na rast tumorskih stanica MCF-7. Isto istraživanje potvrđuje kako kiralnost molekule nije toliko značajna kao hidrofobnost i voluminoznost aminokiselinskih bočnih ogranaka.

Ferocenski konjugati s Leu i Phe daju pozitivne rezultate za ispitanu biološku aktivnost. Toksičnost i mogućnost razlikovanja tumorskih od zdravih stanica čini spojeve Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**2**) i Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**3**) kandidatima za buduća terapijska istraživanja.

5 ZAKLJUČCI

1. Tretiranjem zdravih i tumorskih staničnih linija spojevima **1-7** dolazi do jasne promjene morfologije i gustoće što je posljedica vrste korištenog spoja i njegove koncentracije. Mrtve adherentne stanice se odvajaju od površine za koju su pričvršćene, zaobljuju se i počinju plutati po površini.
2. Najjasnije morfološke promjene nakon 24- i 72-satnog tretmana pokazuje spoj **3**.
3. Veću toksičnost te inhibitorna svojstva pokazuju L-enantiomeri ferocenskih konjugata (**1-3**) za razliku od njihovih D-enantiomera (**4-6**).
4. Tumorske stanice MCF-7 pokazuju veću otpornost na ispitivane spojeve u usporedbi sa zdravim stanicama HFF-1.
5. Spojevi ferocenskih konjugata 1,1'-diamina supstituiranih s L- i D-Val (**1, 4**) pokazuju veću toksičnost prema zdravim nego tumorskim staničnim linijama. Ujedno toksičnost oba spoja prema tumorskoj staničnoj liniji je najslabija uspoređujući je sa ostalim spojevima.
6. Leu-konjugati (**2, 5**) daju bolje rezultate od Val-konjugata (**1, 4**). Postotak preživljenja zdravih stanica manji je pri prve četiri koncentracije. Korištenjem maksimalne doze od 350 μ M postignuto je veće toksično djelovanje prema tumorskoj staničnoj liniji.
7. Phe-konjugati (**3, 6**) pokazuju slične rezultate toksičnosti kao Leu-konjugati (**2, 5**) u prve četiri koncentracije. Najveću citotoksičnost pokazuje spoj **3** u koncentraciji 350 μ M. U navedenim uvjetima spoj pokazuje manju toksičnost na HFF-1 stanice.
8. Gradacija toksičnosti ovisi o strukturnim svojstvima i hidrofobnosti bočnih aminokiselinskih ostataka konjugiranih s ferocen-1,1'-diaminom kao kalupom. Val, Leu i Phe su hidrofobne i nepolarne aminokiseline; Val i Leu sadrže alifatske, a Phe aromatski bočni ogranak. Rezultati pokazuju da voluminoznost i hidrofobnost bočnog ogranka pridonosi većoj toksičnosti.
9. MCF-7 stanice su najosjetljivije na L-enantiomer Phe-konjugata pri 350 μ M. Pri istoj koncentraciji je njegova toksičnost manje izražena na HFF-1 staničnoj liniji.

6 POPIS LITERATURE

1. HZJZ (2024) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/periodicne-publicacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/>. Pristupljeno 21. travnja 2024.
2. Fosgerau K, Hoffmann T (2015) Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discovery Today* **20**, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
3. Sharma B, Kumar V (2021) Has Ferrocene Really Delivered Its Role in Accentuating the Bioactivity of Organic Scaffolds?. *Journal of medicinal chemistry* **64** (23), 16865–16921. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00390>
4. Ornelas C, Astruc D (2023) Ferrocene-Based Drugs, Delivery Nanomaterials and Fenton Mechanism: State of the Art, Recent Developments and Prospects. *Pharmaceutics* **15**(8), 2044. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082044>
5. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, Roca S, Barišić L (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions* **44**, 16405-16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>
6. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Šimunović L, Kodrin I, Barišić L (2021) Conformational Preferences and Antiproliferative Activity of Peptidomimetics Containing Methyl 1'-Aminoferrocene-1-carboxylate and Turn-Forming Homo- and Heterochiral Pro-Ala Motifs. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 13532-13559. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>
7. Stryer L (1991) Biokemija, 2. izd., (preveli Vuk – Pavlović i sur.), Školska knjiga, Zagreb.
8. Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida (interna skripta), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
9. Balen L (2019) Ferocen i njegovi spojevi (završni rad), Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
10. Bićan K (2022) Elektrokemijsko i računalno određivanje redoks svojstava ferocenoliranih purinskih derivata (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
11. Joukhadar L (2018) Genotoksični učinak Irinotekana na ljudske tumorske stanice jetre i crijeva (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
12. Bidram E, Esmaeili Y, Ranji-Burachaloo H, Al-Zaubai N, Zarrabi A, Stewart A, Dunstan D. E (2019) A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **54**, 101350. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101350>

13. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)* **11**(8), 1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>
14. Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Radošević K (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **11** (3-4), 169 – 175. <https://hrcak.srce.hr/177252>
15. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A (2010) Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**, 227–238. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3933-z>
16. Hajizadeh-Tafti F, Golzadeh J, Farashahi-Yazd E, Heidarian-Meimandi H, Aflatoonian B (2022) Established Yazd human foreskin fibroblast lines (#8, #17, and #18) displaying similar characteristics to mesenchymal stromal cells: A lab resources report. *International Journal of Reproductive Biomedicine* **20** (7), 519 – 528. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v20i7.11554>
17. Ivančić, M (2022) In vitro biološka evaluacija ferocenskih konjugata s aminokiselinama Val, Leu i Phe (diplomski rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
18. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single – Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
19. ATCC <https://www.atcc.org/>. Pristupljeno 23. svibnja 2024.
20. Ye Z, Aparicio C (2021) Interactions of two enantiomers of a designer antimicrobial peptide with structural components of the bacterial cell envelope. *Journal of Peptide Science* **28**(1). [10.1002/psc.3299](https://doi.org/10.1002/psc.3299)
21. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Marjanović M, Lovrić M, Polančec D, Ivančić M, Mrvčić J, Molčanov K, Milašinović V, Roca S, Kordin I, Barišić L (2022) Hydrogen Bonding Drives Helical Chirality via 10-Membered Ring in Dipeptide Conjugates of Ferrocene-1,1-Diamine. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 12233. <https://doi.org/10.3390/ijms232012233>

Izjava o izvornosti

Ja Ema Petrović 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.

Ema Petrović

Vlastoručni potpis