

Biološka aktivnost ferocenskih konjugata s homo- i heterokiralnim Ala-Pro dipeptidima određena na HeLa staničnoj liniji

Ivić, Petra

Master's thesis / Diplomski 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:159:901822>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Petra Ivić

**BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH
KONJUGATA S HOMO- I HETEROKIRALNIM
ALA-PRO DIPEPTIDIMA ODREĐENA NA
HeLa STANIČNOJ LINIJI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta: „Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija“ (HRZZ IP-2020-02-9162) pod voditeljstvom prof. dr.sc. Lidije Barišić.

Izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost

Hvala mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na prenesenom znanju, uloženom vremenu i pomoći pri provođenju eksperimenata te izradi ovog rada. Hvala obitelji koja je od malih nogu poticala moju znatiželju prema prirodnim znanostima i jasno zacrtan put. Hvala prijateljima na svim lijepim uspomenama iz doba studiranja. Najviše hvala mom Toniju koji mi je bio oslonac u svim najtežim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH KONJUGATA S HOMO- I HETEROKIRALNIM ALA-PRO
DIPEPTIDIMA ODREĐENA NA HeLa STANIČNOJ LINIJI

Petra Ivić, univ. bacc. ing. biotechn.,0058212556

Sažetak: Konjugacijom organometalnog spoja ferocena s biomolekulama nastaju kemijski raznoliki spojevi koje odlikuje iznimna stabilnost, netoksičnost i povećana bioaktivnost. U ovom je radu ispitana *in vitro* biološka aktivnost osam ferocenskih konjugata s homo- i heterokiralnim dipeptidom pripremljenim iz alanina (Ala) i prolina (Pro) na humanoj tumorskoj staničnoj liniji HeLa. Antitumorski učinak je ispitan određivanjem stanične vijabilnosti te klonogenom analizom. Protočnom citometrijom određeno je dolazi li do aktivacije procesa stanične smrti. Ispitivani ferocenski peptidomimetici imaju inhibitorni učinak na rast HeLa stanične linije. Najjače citotoksično djelovanje pokazuju spojevi **1**, **2** i **5**. Inhibitorno djelovanje spojeva **1** i **2** može se povezati s poticanjem stanične smrti apoptozom. Najizraženiji antitumorski potencijal pokazuju spojevi koji sadrže *tert*-butoksikarbonilnu (Boc)-zaštitnu skupinu te L-Pro, odnosno spojevi **1** i **2**.

Ključne riječi: peptidomimetici, ferocenski konjugati, citotoksičnost, *in vitro* testovi, HeLa stanična linija

Rad sadrži: 43 stranice, 15 slika, 3 tablice, 56 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Pomoć pri izradi: mag.ing. Martina Bagović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (član)
4. prof. dr. sc. Lidija Barišić (zamjenski član)

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF FERROCENE CONJUGATES WITH HOMO- AND HETEROCHIRAL ALA-PRO DIPEPTIDES DETERMINED ON HeLa CELL LINE

Petra Ivić, univ. bacc. ing. biotechn.,0058212556

Abstract: By conjugating the organometallic compound ferrocene with biomolecules, chemically diverse compounds are formed, characterized by exceptional stability, non-toxicity, and increased bioactivity. This study examined the *in vitro* biological activity of eight ferrocene conjugates with homo- and heterochiral dipeptide formed of alanine (Ala) and proline (Pro) on the human tumor cell line HeLa. The antitumor effect was examined by determining cell viability and performing a clonogenic assay. Flow cytometry was used to determine whether the process of cell death is activated. The investigated ferrocene peptidomimetics have an inhibitory effect on the growth of the HeLa cell line. Compounds **1**, **2**, and **5** show the strongest cytotoxic activity. The inhibitory effect of compounds **1** and **2** can be linked to the induction of cell death by apoptosis. The compounds containing the tert-butoxycarbonyl (Boc)-protective group and L-Pro, specifically compounds **1** and **2**, show the most pronounced antitumor potential.

Keywords: peptidomimetics, ferrocene conjugates, cytotoxicity, *in vitro* tests, HeLa cell line

Thesis contains: 43 pages, 15 figures, 3 tables, 56 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Kristina Radošević, Associate professor

Technical support and assistance: Mag.ing. Martina Bagović

Reviewers:

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

Thesis defended: July 16th, 2024

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Peptidomimetici	2
2.1.1. Peptidomimetici kao terapeutici.....	4
2.2. Ferocen	5
2.2.1. Derivati ferocena kao terapeutici.....	6
2.3. Ferocenski peptidomimetici	9
2.4. Primjena kulture stanica u in vitro ispitivanjima biološke aktivnosti	11
3. Eksperimentalni dio	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Ferocenski peptidomimetici.....	16
3.1.2. HeLa stanična linija	17
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Pufferi i otopine	18
3.1.5. Uređaji i oprema	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Uzgoj stanica.....	19
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	19
3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom	20
3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica bojom kristal-violet	21
3.2.5. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a 22	
3.2.6. Obrada podataka.....	23
4. Rezultati i rasprava	25
4.1. Učinak ferocenskih peptidomimetika na preživljenje HeLa stanica	26
4.2. Učinak ferocenskih peptidomimetika na klonogeni rast HeLa stanica	30
4.3. Učinak ferocenskih peptidomimetika na poticanje stanične smrti u HeLa stanicama	31
5. Zaključci	37
6. Literatura	38

1. Uvod

Rak je kronična bolest koju karakterizira nekontrolirana dioba stanica. Iako je na tržištu za liječenje raka dostupno više od 200 antitumorskih lijekova, broj oboljelih te smrtnih slučajeva raste iz godine u godinu. Visokoj smrtnosti među ostalim pridonosi stvaranje rezistencije tumorskih stanica na lijekove te činjenica da mnogi postojeći terapeutici izazivaju brojne nuspojave zbog niske specifičnosti djelovanja (Liu i sur., 2017). Stoga se posebna važnost pridaje razvoju novih antitumorskih lijekova.

Ferocen je organometalni spoj kojeg odlikuju brojna povoljna svojstva, a njegovom konjugacijom s biomolekulama nastaju kemijski raznoliki spojevi koje odlikuje iznimna stabilnost, netoksičnost i povećana bioaktivnost (Rapić i Semenčić, 2011, Rapić i Kovačević, 2012). Derivati ferocena pokazuju različitu biološku aktivnosti kao što je: antimalarijsko, antitumorsko, antifungalno te antiviralno djelovanje (Peter i Aderibigbe, 2019). Peptidi također predstavljaju povoljno ishodište za razvoj terapeutika, i to ponajviše za bolesti uzrokovane poremećajima u međudjelovanju signalnih molekula s receptorima ili supstrata sa ciljnim enzimima. Međutim, brojna biokemijska svojstva ograničavaju njihovu primjenu u terapeutske svrhe (Gante, 1994 i Jerić, 2004). Kako bi se smanjili nedostaci, te poboljšale povoljne karakteristike prirodnih peptida, dizajniraju se peptidomimetici. To su spojevi čiji farmakorni elementi oponašaju strukturu peptida uz zadržavanje sposobnosti interakcije s ciljnim biološkim mjestom kao i željenog biološkog učinka (Vagner i sur., 2008). Konjugacijom ferocenske osnove s peptidima nastaju spojevi koji potencijalno mogu imati specifičnu i povećanu biološku aktivnost.

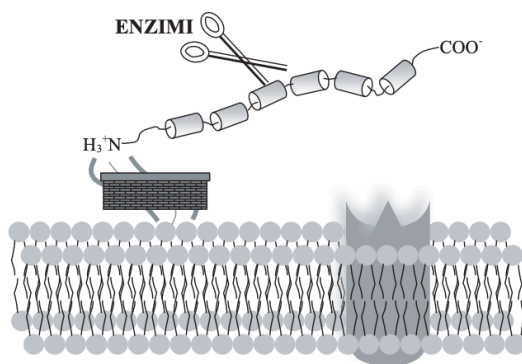
Cilj ovog rada je *in vitro* biološka evaluacija osam ferocenskih peptidomimetika sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Spojevi su pripremljeni konjugacijom 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline s različitim konfiguracijama L- i D- alanina (Ala) i prolina (Pro), kako bi se ispitao utjecaj različite kiralnosti aminokiseline iz dipeptida na antitumorsku aktivnost sintetiziranih ferocenskih peptidomimetika. Citotoksičan učinak spojeva ispitan je MTS metodom spram humane tumorske HeLa stanične linije te je ispitan učinak i na klonogeni rast HeLa stanica. Muse™ analizator staničnog zdravlja korišten je kako bi se utvrdio učinak ferocenskih peptidomimetika na poticanje stanične smrti u kulturi HeLa stanica.

2. Teorijski dio

2.1. Peptidomimetici

Peptidi su kemijski spojevi sastavljeni od dviju ili više aminokiselina povezanih peptidnom odnosno amidnom vezom. Amidnu vezu čine karboksilna skupina (C terminalni kraj jednog peptida) i amino skupina (N terminalni kraj drugog peptida). Nužni su za sve životno važne funkcije organizma u ulogama hormona, inhibitora enzima, neurotransmitera, neuromodulatora, antibiotika itd.

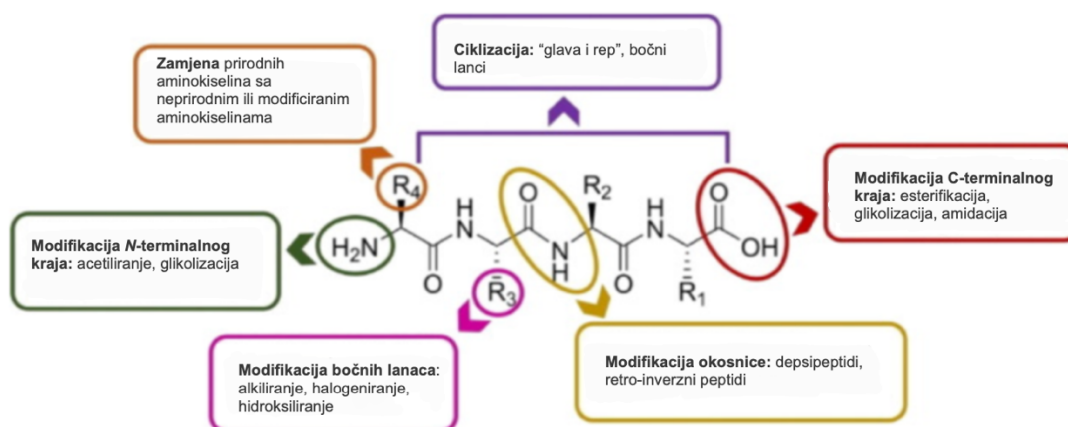
Peptidi predstavljaju povoljno ishodište za razvoj terapeutika, i to ponajviše za bolesti uzrokovane poremećajima u međudjelovanju signalnih molekula s receptorima ili supstrata sa ciljnim enzimima (Gante, 1994). Tijekom zadnja dva desetljeća izražen je porast u istraživanjima ove vrste lijekova, a trenutno je oko 170 lijekova na bazi peptida u fazi kliničkih ispitivanja (Jimmidi, 2023). Međutim, prirodni peptidi nailaze na brojne prepreke svojoj terapijskoj primjeni (slika 1). Jedan od nedostataka je polarnost i velika molekulska masa peptida, zbog kojih im je otežan transport kroz stanične membrane i krvno-moždanu barijeru. Nadalje, peptidi su podložni proteolizi peptidazama u gastrointestinalnom traktu kao i u serumu, zbog čega često ne dođu do ciljnog mjesta. Zbog fleksibilnosti konformacije, koja ovisi o vanjskim uvjetima, moguća je njihova interakcija sa raznim receptorima, ne samo sa ciljnim, što može rezultirati smanjenom učinkovitošću te pojavom neželjenih nuspojava terapeutika (Jerić, 2004).



Slika 1. Svojstva peptida koja im ograničavaju terapijsku primjenu (preuzeto iz Jerić, 2004.)

Kako bi se riješili navedeni farmakološki i biofarmaceutski nedostaci, razvijaju se spojevi s poboljšanim svojstvima, koji zadržavaju funkciju peptida. Skupina takvih spojeva su i peptidomimetici čiji farmakorni elementi oponašaju trodimenzionalnu strukturu prirodnih peptida, pri čemu zadržavaju sposobnost interakcije s ciljnim biološkim mjestom kao i željeni biološki učinak. Peptidomimetici se sintetiziraju kako bi se smanjili nedostaci te poboljšale povoljne karakteristike prirodnih peptida (Vagner i sur., 2008).

Prilikom dizajniranja peptidomimetika, potrebno je imati na umu navedene nedostatke i pokušati ih smanjiti ili u potpunosti ukloniti. Za potrebe prolaska peptidomimetika kroz crijevnu i krvno – moždanu barijeru, potrebno je prilagoditi svojstva bitna za pasivnu difuziju (veličina, lipofilnost, naboj, sposobnost stvaranja vodikovih veza) ili prilagoditi strukturu koja će im pomoći u aktivnom prijenosu transportnim molekulama. Polarnost peptida povezana je s lošom topljivosti u vodi. Ova se prepreka može riješiti uvođenjem polarnih i lako disocirajućih skupina. Otpornost na egzopeptidaze može se postići zaštitom aminoterminalnih te karboksiterminalnih skupina. S druge strane, otpornost na endopeptidaze postiže se modifikacijom određenih peptidnih veza ili uvođenjem D-aminokiselina. Prilikom ovakvih modifikacija potrebno je obratiti pažnju na mogućnost narušavanja primarne funkcije peptida (Jerić, 2004). Veći afinitet peptidomimetika prema receptoru postiže se uvođenjem konformacijskih ograničenja. Neki od načina za postizanje rigidne bioaktivne konformacije su: ciklizacija peptida, uvođenje tzv. gradivnih blokova sačinjenih od neprirodnih aminokiselina i dipeptidnih surogata te zamjena određene peptidne veze s njenim izoesterom (Vagner i sur., 2008). Strategije modifikacije peptida prikazane su na slici 2.



Slika 2. Strategije modifikacije peptida s ciljem poboljšanja terapijskih i biokemijskih karakteristika (prema Sharma i sur., 2023)

S obzirom na strukturne karakteristike, peptidomimetici se prema Pelay-Gimeno i sur. (2015) mogu svrstati u 4 kategorije:

- Klasa A: peptidi koje čine minimalno izmijenjene aminokiseline
- Klasa B: peptidi s promijenjenom okosnicom i/ili bočnim lancima
- Klasa C: peptidi s neprirodnim aminokiselinama
- Klasa D: spojevi koji oponašaju načine djelovanja peptida bez direktne poveznice sa strukturom peptida

2.1.1. Peptidomimetici kao terapeutici

Da bi se neki peptidomimetik mogao koristiti u terapijske svrhe, potrebna mu je metabolička stabilnost, dobra biodostupnost, afinitet i selektivnost prema ciljnom receptoru te minimalne nuspojave (Barišić, 2018).

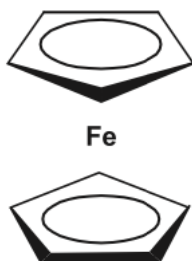
Primjer jednostavnog poboljšanja djelovanja peptida je dezmpresin, koji je pripremljen zamjenom L-arginina u vazopresinu s D-argininom. Ovakvom promjenom je povećana anti-diuretska aktivnost lijeka te je uklonjena nuspojava porasta tlaka krvi. Karbetocin acetat je mimetik oksitocina koji se koristi za kontrolu postporođajnog krvarenja. Sintetiziran je tako da se leucin zamjeni neprirodnom aminokiselinom metil-tirozinom, te se disulfidna veza zamijeni tioesterskom čime se povećava metabolička stabilnost. Još neki od peptidomimetika koje možemo naći na tržištu su: daptomicin (antibiotik sa spektrom djelovanja protiv Gram-pozitivnih bakterija), linaklotid (terapeutik sindroma iritabilnog crijeva), eptifibatid (prevanira grušanje krvi) (Qvit i sur., 2017). Nadalje, neki peptidomimetici djeluju kao inhibitori protein-protein interakcija u tumorskim stanicama. Tako su na primjer za liječenje karcinoma prostate i endometrioze dostupni leuprorelin–acetat i goserelin, koji funkcioniraju kao agonisti gonadotropin–otpuštajućeg hormona (Schteingart & Lau, 2017).

Na tržištu je dostupno više peptidomimetika koje koriste oboljeli od AIDS-a (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*). Takvi lijekovi ciljaju viralnu aspartat proteazu, koja je zaslužna za sazrijevanje novih čestica HIV-a (engl. *human immunodeficiency virus*). Davne 1996.g., za liječenje oboljelih od AIDS-a počeo se primjenjivati ritonavir (Tsantrizos, 2008), koji danas u kombinaciji sa nirmatrelvirom daje lijek Paxlovid, koji se koristi za liječenje odraslih sa uznapredovanim stadijem bolesti COVID-19 (Chaplin, 2022).

Od novijih predstavnika peptidomimetika ističe se voklosporin, koji je Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*, FDA) odobrila za upotrebu 2021. godine. Koristi se kao imunosupresivni lijek za lupus nefritis. Analog je ciklosporina, s većom metaboličkom stabilnošću i jačim inhibitornim djelovanjem protiv kalcineurina (Gelder i sur., 2022). Te iste godine odobren je i odeviksibat, koji se koristi u liječenju progresivne intrahepatične kolestaze (Hussan & Farzam, 2023), dok je setmelanotid prvi dostupni anoreksidni lijek, odobren 2020.g. za liječenje pretilosti uzrokovane određenom genetskom mutacijom (EMA, 2024).

2.2. Ferocen

Ferocen je organometalni spoj, otkriven 1951. godine reakcijom C_5H_5BrMg sa $FeCl_3$. Wilkinskon i Fischer pripisali su mu ispravnu strukturu u kojoj se oko atoma željeza (Fe) nalaze dva paralelna aromatska ciklopentadienilna (Cp) liganda. Ovakva struktura (Cp-Fe-Cp), prikazana na slici 3, svrstava ferocen u skupinu metalocena, tzv. "sendvič – spojeva" (Staveren i Metzler-Nolte, 2004). Čak i samo ime ferocen dodatno naglašava njegovu sličnost benzenu u reaktivnosti i aromatičnosti. Ferocen je narančasti kristalini spoj, kojeg karakterizira visoka stabilnosti do 400 °C, dobra topljivost u organskim otapalima i netopljivost u vodi. Otkriće ferocena predstavlja početnu točku moderne organometalne kemije (Čakić-Semenčić i Barišić, 2017).



Slika 3. Kemijska struktura ferocena (Rapić i Semenčić, 2011)

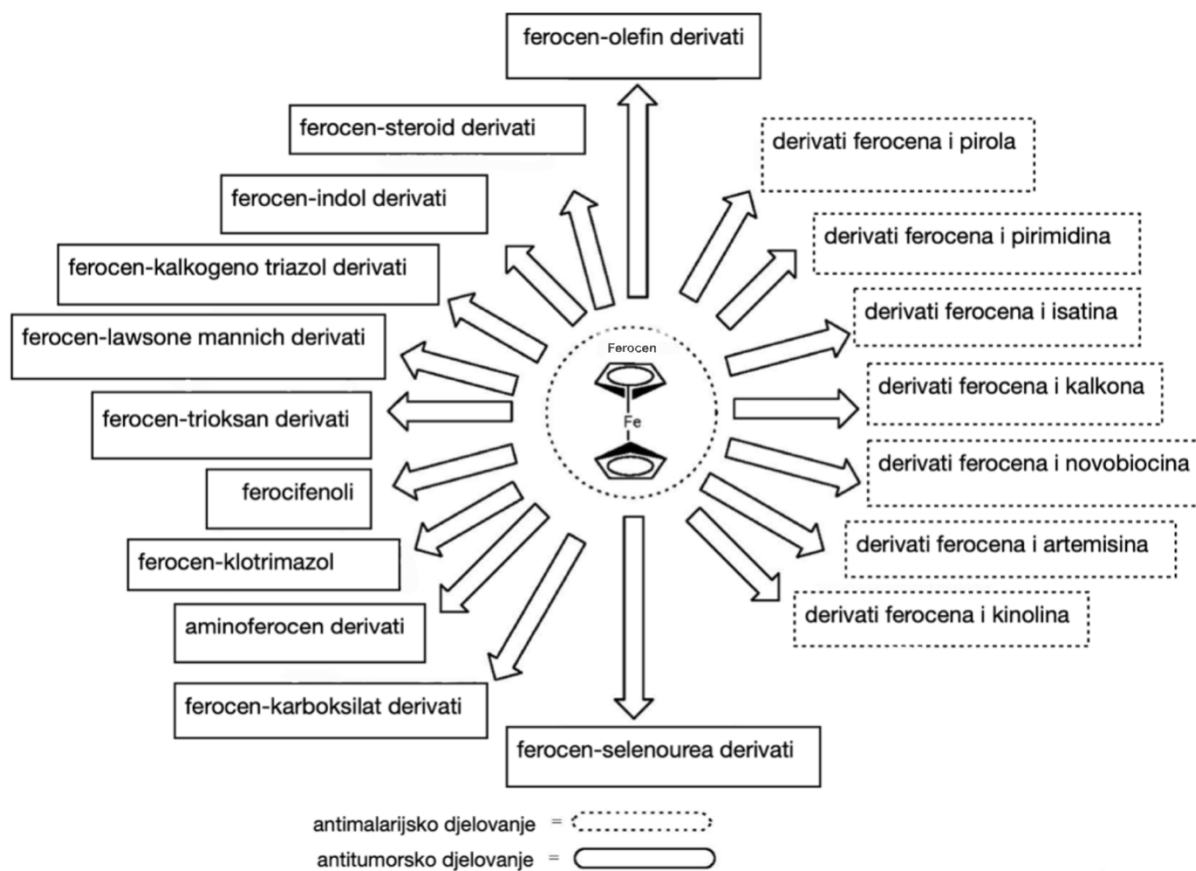
“Tajna” stabilnosti ferocena leži u vezi formalno stabilnog 6π elektronskog ciklopentadienilnog aniona (Cp^-) i željezovog (II) kationa. To je delokalizirana veza u kojoj sudjeluju svi atomi liganda, odnosno ukupno 18 elektrona, po 6 iz Cp te 6 elektrona iz željeza. Upravo taj broj elektrona svojstven je strukturi plemenitih plinova, što daje stabilnost ferocenu. Zahvaljujući “sendvič–strukturi”, ferocen odlikuju posebna stereokemijska odnosno kiroptička

svojstva. Superaromatičnost ovog kompleksa postiže se zbog ciklopentadienilnih liganda koji se ponašaju kao da su zadržali 6π elektronsku strukturu. Navedeno svojstvo ferocenu daje stabilnost te omogućuje reakcije elektrofilne supstitucije. Jedna od brojnih reakcija elektrofilne supstitucije na ferocenu je i Friedel – Craftsoevo aciliranje, što ukazuje na analogiju s benzenom. Ferocen ima veću reaktivnost u odnosu na benzen, zahvaljujući većoj sklonosti protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te zahvaljujući reverzibilnoj oksidaciji željeza u ferocenijski ion (Rapić i Semenčić, 2011). Fleksibilnosti ferocena pak pridonosi mogućnost rotacije veze između atoma željeza i aromatskih prstenova. Navedeno je najuočljivije u ferocenofanima u kojima može doći do znatne iskrivljenosti ferocenske jezgre (Grdenić, 1987).

Kako bi se iskoristila povoljna svojstava ferocena, ovaj spoj se često konjugira sa biomolekulama, čime nastaju razni bioorganometalni spojevi. Takve konjugate odlikuje veća bioaktivnost zbog nastajanja oksidiranih vrsta u blizini aktivnog centra (Rapić i Semenčić, 2011). Ferocenski derivati mogu nastati zahvaljujući aromatskoj reaktivnosti i mogućoj transformaciji supstitucijskih produkata. Označavaju ih iznimna stabilnost, netoksičnost, kemijska raznolikost te komercijalna dostupnost. Stoga svoju primjenu pronalaze u farmakologiji, biokemiji, medicini, mikrobiologiji, organskoj sintezi, bioorganometalnoj kemiji, biosenzorici te znanosti materijala (Rapić i Kovačević, 2012).

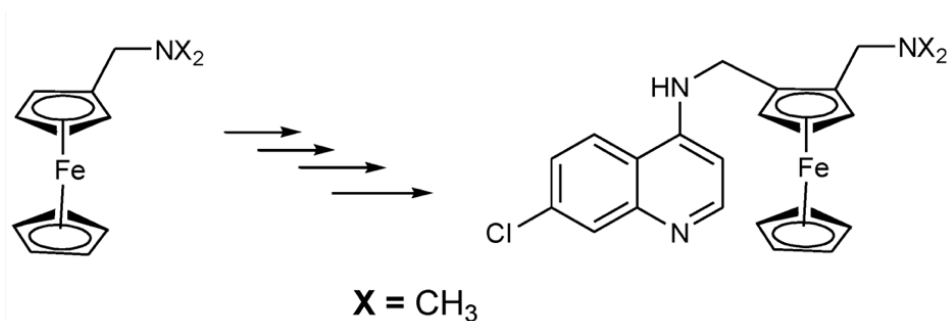
2.2.1. Derivati ferocena kao terapeutici

Poboljšanje aktivnosti određenih terapeutika može se postići ugradnjom ferocena u molekule već postojećeg terapeutika. S druge strane, konjugacija biomolekula i ferocena rezultira novim potencijalnim terapeutcima. U oba slučaja, bitna prednost konjugata sa ferocenom je lipofilni karakter ferocena, zbog kojeg ferocenski derivati mogu lako prolaziti kroz stanične membrane. Derivati ferocena pokazuju različitu biološku aktivnost kao što je: antimalarijsko, antitumorsko, antifungalno te antiviralno djelovanje. Skupine derivata ferocena sa antimalarijskim i antitumorskim učincima prikazane su na slici 4. Učinak ovih biokonjugata ovisi o duljini nepolarnog ugljikovog lanca, položaju ferocenijske skupine te prirodi i položaju supstituenata u konjugatima (Peter i Aderibigbe, 2019).



Slika 4. Derivati ferocena sa antitumorskim i antimalarijskim učinkom (prema Peter i Aderibigbe, 2019)

Malarija je letalna bolest uzrokovana parazitom roda *Plasmodium*. Postoje četiri vrste ovih parazita koji kod ljudi uzrokuju malariju, a to su: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* te najopasniji *P. falciparum*. Veliki problem prilikom liječenja malarije predstavlja stvaranje rezistencije na postojeće lijekove, kao što je klorokin. Jedan od prvih antimalarika na bazi ferocena je ferokin, kojeg su sintetizirali Biot i sur. 1994. godine. Ferokin je nastao zamjenom CH_3 skupine u klorokinu sa ferocenom (slika 5). Ovakvim novim spojem potencijalno se riješio problem rezistencije *P. falciparum* na klorokin (Wani i sur., 2015). Naime, ferokin je trenutno u 2. fazi kliničkih ispitivanja (Ashley i Phyo, 2018).



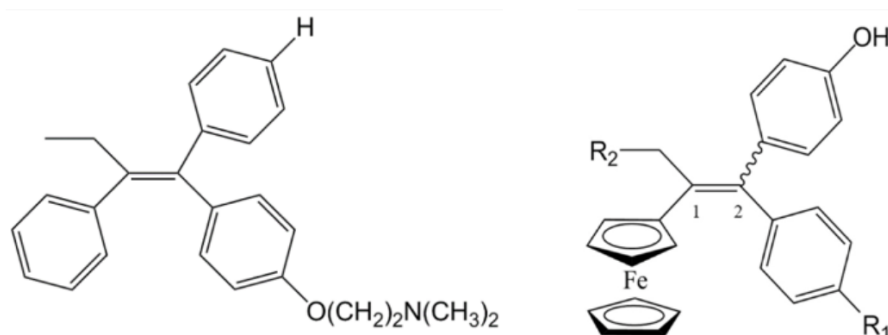
Slika 5. Sinteza ferokina (Wani i sur., 2015)

Rak je kronična bolest koju karakterizira nekontrolirana dioba stanica. Najprisutniji zloćudni tumori odgovorni za 92 % smrtnosti od raka, su tumori pluća, dojki, želudca, jetre te kolorektalni tumori. Na tržištu je dostupno više od 200 antitumorskih lijekova, što je samo 5 % od ukupnog broja istraživanih lijekova. Visokoj smrtnosti pridonosi i stvaranje rezistencije tumorskih stanica na lijekove (Liu i sur., 2017).

Istraživanjem antitumorskih lijekova na bazi ferocena, nastoje se razviti visoko učinkoviti te slabo toksični lijekovi. Istraživani derivati ferocena pokazuju antiproliferativnu aktivnost prema nekoliko tumorskih staničnih linija, a svoju antitumorsku aktivnost temelje na sudjelovanju u redoks reakcijama (Osella i sur., 2000). Naime, ferocen pa tako i ferocenski kompleksi oksidacijsko–redukcijskim reakcijama prevode se do ferocenijevog iona, radikalskog kationa visoke stabilnosti. Ova je reakcija reverzibilna i sudjeluje u biološkim reakcijama kao što su: redukcija NADH, redukcija metaloproteina, enzimska oksidacija ferocena hidrogen peroksidazom itd. U povratnom smjeru, ferocenijev kation reagira sa radikalima superoksidnog aniona, što dovodi do regeneracije ferocena i dioksigena (Peter i Aderibigbe, 2019). Prilikom ovakvih redoks reakcija nastaju slobodni radikali, kao što su reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) te hidroksilni radikali nastali Fentonovom reakcijom (reakcija željezova (II) kationa s vodikovim peroksidom uz nastajanje hidroksilnih radikala). Slobodni radikali pak oksidiraju lipide, proteine i DNA. Ovakva oksidacijska oštećenja potiču apoptozu tumorskih stanica te dovode do poremećaja u regulaciji staničnog ciklusa, što je zapravo mehanizam funkcioniranja mnogih antitumorskih lijekova (Osella i sur., 2000).

Primjer bioorganometalnog spoja antitumorskog djelovanja je hidroksiferocifen, analog antikancerogenog tamoksifena (slika 6). Tamoksifen se koristi za liječenje rano otkrivenog

karcinoma dojke, međutim česta je pojava rezistencije tumorskih stanica na ovaj lijek. S druge strane, hidroksiferocifen odlikuje veća lipofilnost, čime je povećano antiproliferativno djelovanje lijeka. Također, pokazuje i visoku selektivnost prema tumorskim stanicama. Postoji više mehanizama djelovanja hidroksiferocifena, a to su: vezanje na estrogenski receptor, proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsti (što dovodi do zastoja staničnog ciklusa te do apoptoze) i citotoksičnost kao posljedica Fentonove reakcije. Ovakvu molekulu hidroksiferocifena moguće je dalje oblikovati dodatkom raznih funkcionalnih skupina na R₁ i/ili R₂ poziciju, kako je prikazano na slici 6. Na taj način se u posljednjih 20 godina sintetiziralo više od 300 kompleksa, od kojih neki pokazuju antiproliferativno i citotoksično djelovanje prema staničnim linijama glioblastoma, melanoma te raka dojke. No niti jedan od spojeva na bazi hidroksiferocifena još nije ušao u fazu kliničkih ispitivanja (Idlas i sur., 2021).



Slika 6. Struktura tamoksifena (lijevo) i hidroksiferocifena (desno) (Idlas i sur., 2021)

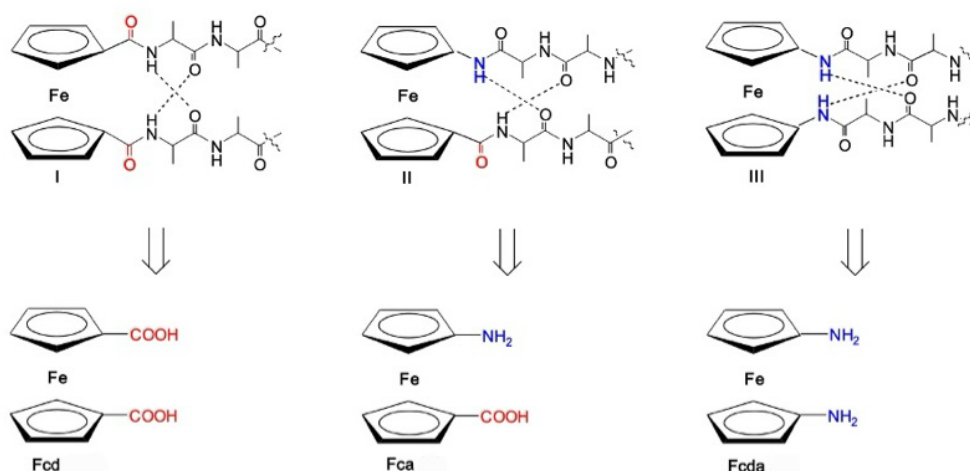
2.3. Ferocenski peptidomimetici

Prolin je aminokiselina sa brojnim karakteristikama koje se mogu upotrijebiti u terapijske svrhe. Naime, prolin smanjuje osjetljivost peptida na većinu peptidaza te povećava aktivnost enzima (Szabados i Saviouré, 2009). Bitno je naglasiti da pokazuje i antioksidativna svojstva što omogućuje zaštitu humanih stanica od oksidativnog stresa, jednog od glavnih pokretača kancerogeneze (Krishnan i sur., 2008). S druge strane, karakteristika alanina je visoka sklonost prema stvaranju elemenata sekundarne strukture, točnije α uzvojnica, koje ne pokazuju izrazitu stabilnost u vodi. Međutim, bitno je naglasiti da peptidi sačinjeni od prolina i alanina pokazuju

odsutnost sekundarne i tercijarne strukture, zbog destabilizacije α uzvojnica (Breibeck i Skerra, 2017).

Konjugacijom ferocenske osnove i peptidnih lanaca dolazi do tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*, IHB), kojima peptidi postaju konformacijski ograničeni, što je nužno za prepoznavanje željenog ciljnog mjesta. Nastajanje IHB moguće je zbog udaljenosti dva ciklopenatienilna prstena u ferocenu koja iznosi 3,3 Å. IHB potom dovodi do nastajanja više elemenata sekundarne strukture, poput α -uzvojnice, β -nabrane ploče te različitih okreta. Elementi sekundarne strukture utječu na konačnu konformaciju peptida koja je specifična i uvjetuje aktivnost peptida u biološkim sustavima. Tvorba IHB utječe na stvaranje konačne konformacije, kojom se "oponaša" ne samo struktura peptida već i sama aktivnost peptida. Nastajanje elemenata sekundarne strukture ovisi o vrsti ferocenskih prekursora koji se ugrađuju u peptidnu strukturu. Prema strukturi ferocenskog prekursora, razlikujemo tri glavne skupine 1,1'-disupstituiranih ferocenskih peptidomimetika (slika 7), (kratica Fn predstavlja ferocenilen, AA je oznaka za prirodnu aminokiselinu, a Y predstavlja zaštitne skupine koje mogu biti Ac (acetilna) odnosno Boc (*tert*-butoksikarbonilna)):

- (i) Fn-[CO-(AA)_m-OMe]₂ (**I**) u kojima se uspostavlja 10-eročlani IHB prsten izvedeni su iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd);
- (ii) Y-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OMe (**II**) u kojima se uspostavlja 12-eročlani IHB prsten izvedeni su iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca);
- (iii) Fn-[NH-(AA)_m-Y]₂ (**III**) u kojima može nastati 14-eročlani prsten IHB prsten ili 2 10-eročlana IHB prstena izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) (Kovačević, 2014; Kirin i sur., 2006).



Slika 7. Tri glavne skupine 1,1'-disupstituiranih ferocenskih peptidomimetika (Kovačević, 2014)

U ovom radu ispitan je niz homo- i hetereokiralnih konjugata ferocena i aminokiselina sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kako bi se utvrdila poveznica kiralnosti pojedinih aminokiselina i zaštitinih *N*-terminalnih skupina s antitumorskom aktivnosti (Kovačević i sur., 2021; Kovačević i sur., 2017; Kovačević i sur., 2015; Kovačević i sur., 2014; Barišić i sur., 2012). Konkretno, provedena je *in vitro* biološka evaluacija ferocenskih peptidomimetika nastalih konjugacijom 1'-aminoferocen-1-karbonsilne kiseline s Ala-Pro dipeptidima.

2.4. Primjena kulture stanica u *in vitro* ispitivanjima biološke aktivnosti

Prirodnim i novosintetiziranim spojevima potrebno je odrediti biološku aktivnost, kako bi se mogao procijeniti njihov učinak na ljude i okoliš. Ispitivanja se mogu provesti *in vivo*, dakle testovima na različitim organizmima, ili *in vitro*. *In vitro* testiranja podrazumijevaju korištenje kultura životinjskih stanica, uključujući stanične frakcije, primarne stanične kulture, stanične linije, dijelove tkiva, kulture organa i slično (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Kultura životinjskih stanica označava uzgoj stanica izoliranih iz tkiva ili organa životinja u kontroliranom umjetnom okolišu, odnosno u hranjivom mediju. Stanice u kulturi su sposobne dijeliti se mitozom, čime populacija nastavlja rasti sve dok ne dođe do limitacije nekog nužnog parametra, npr. potrošnje

hranjivih tvari ili nedostatka prostora za rast (Butler, 2003). Održavanjem uvjeta za rast omogućeno je dobivanje homogene populacije stanica kroz više generacija. Pripravljene kulture stanica uzete neposredno iz organizama nazivaju se primarnim kulturama. Subkultiviranje primarne kulture dovodi do razvoja stanične linije. Stanična linija nakon nekoliko subkultiviranja može odumrijeti pa se u tom slučaju naziva konačnom staničnom linijom. Druga je opcija da se stanična linija transformira u kontinuiranu staničnu liniju, koju karakterizira neograničen broj dioba stanica (Slivac i sur., 2016).

Postoje brojne prednosti primjene *in vitro* kultura naspram *in vivo* kultura, kao što su etički, ekonomski i znanstveni razlozi. Ovakva ispitivanja su jeftinija, brža, reproducibilnija i etički povoljnija jer smanjuju broj potrebnih laboratorijskih životinja. Nedostatak kulture stanica je taj da se nakon određenog perioda kontinuiranog rasta, stanice mogu promijeniti i postati dosta drugačije od izvora iz kojeg su izolirane. Također, kultura stanica ne može u potpunosti zamijeniti *in vivo* ispitivanja. U konačnici je ipak potrebno provesti testiranje i na cjelokupnom organizmu. Razlog tomu je kompleksnost metaboličkih promjena i adaptivnog odgovora na spoj te tkivno-specifična toksičnost. Međutim, iako je riječ o pojedinačnim stanicama izdvojenim iz tkiva i organa te uzgajanim u umjetnom okolišu, podudaranost rezultata testova sa *in vivo* ispitivanjima iznosi 80 % (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Najčešće se koriste kontinuirane tj. besmrtnne stanične linije dostupne u bankama stanica. Dvije najveće banke stanica su ATCC (engl. *American Type Cell Culture*) i ECACC (engl. *European Collection of Animal Cell Culture*), koje obuhvaćaju preko 3000 različitih staničnih linija. U znanstvene svrhe najčešće se koristi HeLa stanična linija, izolirana 1952. godine iz adenokarcinoma grlića maternice. Za uzgoj staničnih kultura koristi se kompleksni tekući medij. On mora zadovoljiti potrebe stanica kao u odgovarajućem *in vivo* sustavu. Osnovne komponente koje mora sadržavati su: ugljikohidrati, aminokiseline, lipidi, soli, vitamini, hormoni, a mediju za uzgoj stanica najčešće se dodaje i serum životinjskog podrijetla. Prednost uporabe seruma je prisutnost proteina i tvari neophodnih za proliferaciju stanica, međutim serum je kemijski nedefiniran i postoji rizik kontaminacije (Slivac i sur., 2016).

Za ispitivanje biološke aktivnosti kemikalija kao i novih lijekova provode se testovi vijabilnosti stanica (broja zdravih stanica u uzorku) i testovi citotoksičnosti. Temelje se na raznim funkcijama stanice kao što su: permeabilnost membrana, aktivnost enzima, adherencija stanica, sinteza ATP-a, itd. U farmakologiji i toksikologiji koristi se širok spektar takvih testova, koji se mogu svrstati u

sljedeće skupine: i) metode isključenja bojanjem, ii) kolorimetrijske metode, iii) fluorimetrijske metode, iv) luminometrijske metode i v) metode bazirane na protočnom citometru (Kamiloglu i sur., 2020).

- i) U metode isključenja bojanjem spadaju: Tripan plavo, eozin, Congo crveno i eritrozin B metoda. Temelje se na bojanju mrtvih stanica, koje tada možemo jasno razlikovati od živih stanica. Naime, membranama mrtvih stanica narušen je integritet te stoga boja prodire u njihovu citoplazmu. Žive stanice imaju cjelovitu membranu u koju boja ne može prodrijeti (Aslantürk, 2018). Najizvođenija metoda je određivanje broja živih i mrtvih stanica tripan plavom bojom. Kao rezultat dodatka boje staničnoj suspenziji, pod svjetlosnim mikroskopom vidimo plavo obojane mrtve stanice, dok žive stanice ostaju bezbojne. Prednosti metode su jednostavnost te brzina prodiranja boje. Nedostatak je što točnost brojanja stanica može narušiti prisutnost mjehurića zraka, kao i toksičnost boje za stanice nakon kratkog vremena izlaganja (Piccinini i sur., 2017).
- ii) U kolorimetrijske metode spadaju MTT, MTS, kristal violet, LDH (laktat dehidrogenaza) i druge metode. Princip kolorimetrijskih metoda je mjerenje biokemijskog markera za određivanje metaboličke aktivnosti stanica. Reagensi koji se koriste u kolorimetrijskim metodama razvijaju boju kao odgovor na metaboličke aktivnosti stanice, čime je omogućeno kolorimetrijsko mjerenje vijabilnosti pomoću spektrofotometra (Aslantürk, 2018). MTT metoda, tj. test redukcije tetrazolijeve soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid], jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje citotoksičnosti. Temelji se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija, mjerenjem aktivnosti mitohondrijskog enzima sukcinat dehidrogenaze. Sukcinat dehidrogenaza reducira topljivu žutu MTT tetrazolijevu sol u plavi netopljivi formazan. Metoda je brza i jednostavna, a nedostatak je netopljivost MTT formazana u vodi i formiranje ljubičastih kristala u stanicama (Kumar i sur., 2018). MTS metoda je novija izvedba MTT metode. Temelji se na konverziji tetrazolijeve soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol] u obojani formazan, koji je u ovom slučaju topiv u mediju za uzgoj stanica. Količina nastalog formazana ovisi o broju vijabilnih stanica, a mjeri se spektrofotometrijski. Prednost ove metode je ta što se može koristiti za toksikološka istraživanja na mjestu događaja. Nedostatak je što nivo apsorbancije ovisi o vremenu inkubacije, vrsti i broju stanica (Aslantürk, 2018).

- iii) Neke od fluorimetrijskih metoda su alamar plavo (metoda redukcije resazurina) i CFDA-AM (metoda markera vijabilnosti proteaze). Ove su metode jednostavno izvedive uz posjedovanje fluorescentnog mikroskopa, fluorimetra ili protočnog citometra. Primjenjive su za adherentne stanice i za stanice u suspenziji. Fluorimetrijske metode su osjetljivije od kolorimetrijskih metoda, a reagensi potrebni za njihovu izvedbu su najčešće komercijalno dostupni u obliku tzv. *kit*-ova (Kamiloglu i sur., 2020).
- iv) U luminometrijske metode spadaju ATP metoda i test vijabilnosti u stvarnom vremenu. Luminometrijske metode su brze i jednostavne te omogućuju dugotrajan i stabilan svjetleći signal koji nastaje nakon dodatka reagensa. Ovo svojstvo omogućuje istovremeno određivanje vijabilnosti i citotoksičnosti (Aslantürk, 2018).
- v) Protočni citometar omogućuje mjerenje promjena u staničnoj morfologiji putem raspršivanja svjetla na uzorak sa prednje i bočne strane, što čini ovu tehnologiju prikladnom za mjerenje stanične smrti. Protočnom citometrijom uz primjenu različitih načina obilježavanja i fluorescentnih boja može se određivati asimetričnost i permeabilnost membrane (Kamiloglu i sur., 2020).

Pri odabiru metoda bitna je karakteristika točnosti i pouzdanosti rezultata. Odabir ovisi o mnogim parametrima, a to su: svojstva i mehanizam djelovanja spoja koji se testira, mogućnosti laboratorija, specifičnost i osjetljivost metoda. Korisno je i provođenje više različitih metoda za određivanje istog svojstva stanica, kako bi se odredio mehanizam djelovanja spoja (Aslantürk, 2018).

Osim ispitivanja vijabilnosti i citotoksičnosti, još se mogu ispitivati antitumorsko, antioksidacijsko, antimikrobno, antihiperглиkemijsko, antiinflamatorno, analgetsko, antikoagulantno, antihipertenzivno djelovanje biološki aktivnih tvari (Barbara-Ostria i sur., 2022). Tvari koje pokazuju antitumorsko djelovanje, odnosno citotoksičnost prema tumorskim stanicama, predstavljaju potencijalni izvor farmakološki aktivnih spojeva u procesu istraživanja i razvoja lijekova. Nacionalni institut za rak (engl. *National Cancer Institute*, NCI) je devedesetih godina predložio primarni *in vitro* test za ispitivanje antitumorske aktivnosti. Uključuje 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija, za testiranje prirodnih ekstrakata te novosintetiziranih spojeva u definiranim rasponima koncentracija (Cortés-Ciriano, 2016). Ispitivanje tvari od interesa najprije se provodi na staničnim linijama koje su najosjetljivije na

terapiju lijekovima, a to su: MCF7 (adenokarcinom dojke), NCI-H460 (karcinom pluća) i SF-268 (gliom). Kad se ustvrdi da ispitivana tvar inhibira rast barem jedne stanične linije, testiranje se provodi na panelu 60 staničnih linija tzv: NCI160. Prednost ovakvog testiranja je ta što svaka od 60 staničnih linija daje specifičan odgovor na određen lijek koji se testira (Blatt i sur., 2013).

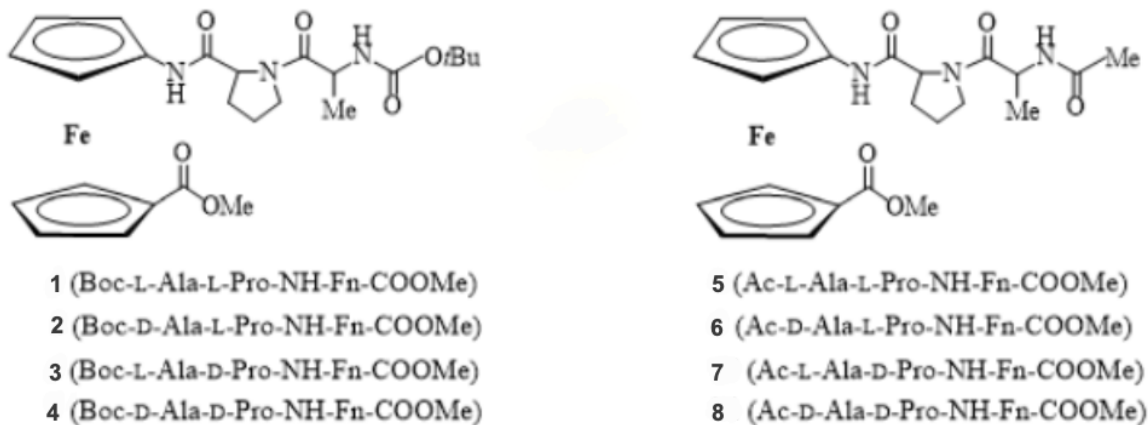
Kultura životinjskih stanica predstavlja jedan od najmoćnijih alata moderne biotehnologije, koji je našao svoju primjenu u brojnim znanstvenim disciplinama. Mogu se primjenjivati u biokemijskim, farmakološkim, imunološkim istraživanjima, a za ovaj rad zanimljiva je njihova primjena u *in vitro* procjeni antitumorske aktivnosti novosintetiziranih spojeva s ciljem otkrivanja i razvoja antitumorskih lijekova.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Ferocenski peptidomimetici

Na slici 8 prikazane su kemijske strukture osam ferocenskih peptidomimetika ispitivanih u ovom radu. Konjugati 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline sa: D-Pro i L-Ala (**3** i **7**); D-Pro i D-Ala (**4** i **8**); L-Pro i L-Ala (**1** i **5**) te sa L-Pro i D-Ala (**2** i **6**) sintetizirani su u Laboratoriju za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Među spojevima se razlikuje i vrsta prisutne zaštitne skupine, pa tako dio spojeva sadrži Boc (*tert*-butoksikarbonilnu) skupinu (**1**, **2**, **3** i **4**), a drugi dio spojeva Ac (acetilnu) zaštitnu skupinu (**5**, **6**, **7** i **8**). Spojevi su otopljeni u DMSO te sterilno filtrirani, a čuvani su na +4 °C.



Slika 8. Kemijska struktura ferocenskih peptidomimetika (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**)

3.1.2. HeLa stanična linija

Za ovo istraživanje korištena je stanična linija HeLa, koju je 1951. izolirao doktor George Gey, biopsijom agresivnog karcinoma vrata maternice Henriette Lacks. Ove su stanice postale prve uspješno uzgojene humane stanice u laboratoriju, odnosno prva kontinuirana tumorska stanična linija. Doprinijele su razvoju polio cjepiva, otkriću telomeraza i omogućile su brojna druga dostignuća u znanosti. Mogu se naći u gotovo svakom molekularno - biološkom laboratoriju (Callaway, 2013). U posljednje vrijeme, HeLa stanice koriste se kao pioniri u razvoju proteomike i transkriptomike tj. profiliranja ekspresije gena te istraživanja odgovora na signale iz okoline. Istraživanje RNA interferencije na HeLa stanicama, dovelo je do otkrića gena uključenih u mitozu, citokinezu, endocitozu i ostale stanične procese. Naknadnim sekvencioniranjem genoma HeLa stanica otkrila se mutacija koja je sam tumor činila jako agresivnim i uzrokovala smrt Henriette Lacks samo 8 mjeseci nakon postavljene dijagnoze (Landry i sur., 2013).

3.1.3. Kemikalije

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

3.1.4. Pufferi i otopine

PBS puffer (pH=7,4):

- m (NaCl) = 8,0 g
- m (KCl) = 0,2 g
- m (Na₂HPO₄) = 1,44 g
- m (KH₂PO₄) = 0,24 g
- Destilirana voda do 1000 mL

Otopina tripan plavo (0,4 %):

- Boja tripan plavo 0,04 g
- PBS puffer do 10 mL

Otopina kristal violet (0,2 %):

- Boja kristal violet 0,02 g
- 2 % etanol 10,00 mL

3.1.5. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Ploče s 6 jažica, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak i zamrzivač (+4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, Eppice, kivete)
- MuseTM Cell Analyzer, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD

3.2. Metode

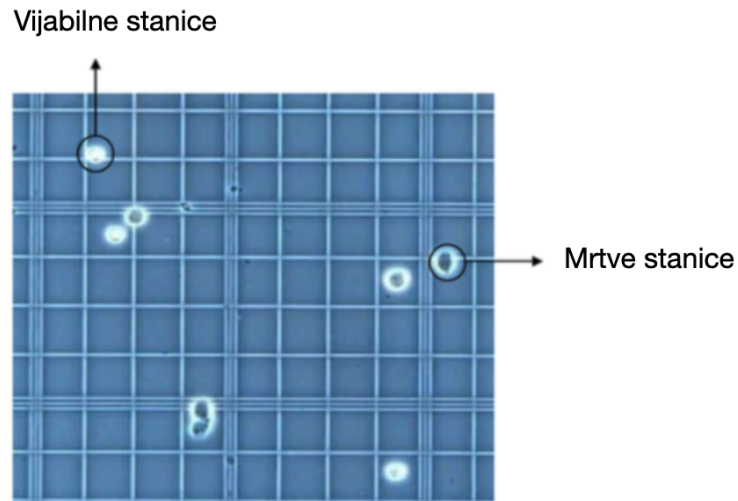
3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice se uzgajaju u Petrijevim zdjelicama koje sadrže DMEM medij sa 5 % (v/v) FBS serumom. Kako bi se održali kontrolirani uvjeti, uzgoj stanica provodi se u inkubatoru u kojem udio zraka iznosi 95 %, a udio CO₂ iznosi 5 %. Temperatura u inkubatoru iznosi 37 °C. Potrebno je svakodnevno pratiti brojnosti i morfologiju stanica, kao i prihvaćanje stanica na podlogu, s obzirom na adherentnu prirodu HeLa stanica. Navedene karakteristike mogu se pratiti inverznim mikroskopom. Za potrebe postavljanja pokusa ispitivanja biološke aktivnosti, stanice se presađuju u ploče s 6, 24 ili 96 jažica (engl. 6 *well*, 24 *well* ili 96 *well*).

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Određivanje broja stanica provodi se metodom bojanja stanica otopinom tripan-plavo. Nakon provjere morfologije stanica pod inverznim mikroskopom, u sterilnim je uvjetima potrebno ukloniti stanični medij za uzgoj. Potom je potrebno isprati stanice sa PBS-om kako bi se pokupio ostatak medija. Zatim, da bi se stanice odvojile od podloge, dodaje se tripsin u volumenu potrebnom da pokrije površinu podloge. Za djelovanje tripsina potrebna je inkubacija od 2 do 3 minute, nakon čega se provjerava morfologija stanica i odvojenost od podloge. Stanice odvojene od podloge, pod inverznim mikroskopom, prepoznaju se po promjeni iz vretenastog u zaokružen oblik. Tada se može dodati medij sa serumom uz resuspendiranje, kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina te kako bi se preostale pričvršćene stanice odvojile od podloge. Za potrebe brojanja, iz stanične suspenzije izuzme se alikvot od 20 µL, čemu se pridoda 20 µL boje tripan-plavo. Na Neubaureovu komoricu nanese se alikvot od 20 µL pripremljene otopine. Neubaureova komorica sadrži 4 velika kvadrata, od kojih svaki sadrži 16 manjih kvadrata. Koristeći se svjetlosnim mikroskopom potrebno je prebrojiti bezbojne stanice, dakle žive stanice u koje boja ne može prodrijeti zbog cjelovite membrane, i to u sva 4 velika kvadrata (slika 9). Broj stanica u mililitru izračuna se prema jednadžbi:

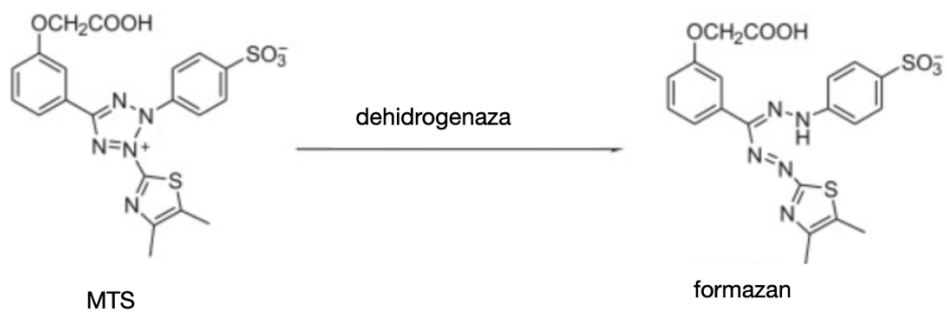
$$\text{Broj stanica mL}^{-1} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad [1]$$



Slika 9. Određivanje vijabilnosti stanica metodom tripan-plavo (prema Kamiloglu i sur, 2020)

3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

MTS test odnosno The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay korišten je za određivanje vijabilnosti stanica. Reakcija na kojoj se temelji ova kolorimetrijska metoda je redukcija MTS-a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol] u ljubičasti formazan pomoću dehidrogenaze u živim stanicama (slika 10). Prilikom te reakcije dolazi do oksidacije NADPH u NADP⁺.



Slika 10. Enzimaska redukcija MTS-a u formazan (prema Kuete i sur., 2017)

Stanice je potrebno prebrojati u Neubauerovoj komorici te izračunati volumen stanične suspenzije potreban za naciepljivanje u 96 *well* ploču. U svaku jažicu naciepi se po 100 μL stanične suspenzije u koncentraciji od 3×10^4 stanica mL^{-1} . Zatim je potrebno staviti 96 *well* ploču u inkubator na 37 °C. Nakon 24 sata dodaju se ispitivani spojevi. Spojevi **7, 8, 1 i 2** dodani su u koncentracijama 26,47 mg L^{-1} , 52,94 mg L^{-1} , 132,35 mg L^{-1} te 264,7 mg L^{-1} . Spojevi **7, 8, 5 i 6** dodani su u koncentracijama 23,46 mg L^{-1} , 46,91 mg L^{-1} , 117,28 mg L^{-1} te 234,57 mg L^{-1} . Za svaku koncentraciju svakog spoja napravljene su po 3 paralele. U jažice koje predstavljaju kontrolu, ispitivani spojevi nisu dodani. Nakon inkubacije 72 sata na 37 °C dodaje se po 10 μL MTS reagensa u sve jažice, bez prethodnog uklanjanja medija. Nakon 3-4 sata ponovne inkubacije na 37 °C, spektrofotometrijski se određuje apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm. Apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica. Omjer apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole, tj. netretiranih stanica, predstavlja preživljenje stanica (%):

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

3.2.4. Klonogena analiza i bojanje stanica bojom kristal-violet

Klonogenom analizom određuje se sposobnost pojedinačne stanice da formira koloniju, što pak označava sposobnost neograničenog rasta, karakterističnog za tumorske stanice. Stanice je potrebno prebrojati u Neubauerovoj komorici te izračunati volumen stanične suspenzije potreban za naciepljivanje u 6 *well* ploče. U svaku jažicu naciepe se po 2 ml stanične suspenzije u koncentraciji od 100 stanica mL^{-1} . Zatim je potrebno 6 *well* ploče staviti u inkubator na temperaturu 37 °C. Nakon 24 sata dodaju se ispitivani spojevi. Spojevi **3, 4, 1 i 2** dodani su u koncentraciji 132,35 mg L^{-1} . Spojevi **8 i 6** dodani su u koncentraciji 117,28 mg L^{-1} . Spojevi **7 i 5** dodani su u koncentracijama 46,91 mg L^{-1} te 117,28 mg L^{-1} . Ispitivani spojevi nisu dodani u jažice koje predstavljaju kontrolu. Nakon 24 sata inkubacije na 37 °C, potrebno je izmijeniti stanični medij te nastaviti uzgoj stanica u kulturi.

Nakon 2-3 tjedna, kada su vidljive kolonije u kontroli, provodi se bojanje kolonija kristal violetom. Bojanje kristal violetom je korisna metoda za indirektnu procjenu smrti stanica i za određivanje klonogenog potencijala tumorskih stanica uslijed tretiranja citotoksičnim agensima. Kristal violet veže se za proteine i DNA vijabilnih adherentnih stanica, prilikom čega se stanice bojaju u ljubičasto. Ova je metoda brza i ima raznoliku primjenu. Nedostatak metode je

neosjetljivost na promjene metaboličke aktivnosti (Aslantürk, 2018). Najprije je potrebno ukloniti medij, isprati stanice sa PBS-om te u digestoru dodati metanol za fiksaciju, koji se ukloni nakon 10 min. Nakon uklanjanja metanola, ploču je potrebno ostaviti 10-ak minuta da se suši na zraku. Zatim se ravnomjerno dodaje boja kristal-violet uz inkubaciju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena, uklanja se boja, jažice se ispiru sa PBS-om, a potom i sa deioniziranom vodom. Potom slijedi brojanje poraslih stanica i računanje učinkovitosti naciepljivanja (PE, eng. *plating efficiency*) te frakcije preživljenja (SF, eng. *surviving fraction*). Učinkovitost naciepljena označava omjer broja poraslih kolonija u odnosu na broj stanica koje smo naciepili. Frakcija preživljenja označava udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima. Navedene vrijednosti računaju se prema formulama:

$$PE = \frac{\text{broj kolonija poraslih u kontroli}}{\text{broj naciepljenih stanica}} \times 100 \quad [3]$$

$$SF = \frac{\text{broj kolonija poraslih nakon tretmana}}{\text{broj naciepljenih stanica} \times PE} \quad [4]$$

3.2.5. Određivanje tipa stanične smrti primjenom MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit-a

Pomoću MuseTM analizatora staničnog zdravlja može se pratiti broj, preživljenje, proifleracija, apoptoza, oksidativni stres stanica i stanični ciklus. Ovaj uređaj analizu temelji na izgledu i veličini stanica te na temelju specifičnog obilježavanja fluorescentnim tvarima. Annexin V je fosfolipid-vezujući protein ovisan o kalciju, koji ima visok afinitet za vezanje na fosfatidilserin. Fosfatidilserin je lipid unutarnje strane membrane zdravih stanica. Translocira se na vanjsku stranu membrane kada je u stanici potaknuta apoptoza, odnosno programirana stanična smrt. Annexin V se već u ranoj fazi apoptoze veže na translocirane molekule fosfatidilserina. U kombinaciji s Annexinom V najčešće se koristi neki fluorescentni interkalator (7-AAD ili PI) za obilježavanje mrtvih stanica, stanica sa oštećenom staničnom membranom te stanica koje su prethodno fiksirane i permeabilizirane. Te boje pokazuju spektralni pomak nakon vezanja za DNK. MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit koristi se za kvantitativnu analizu, čiji se rezultati izražavaju kao broj stanica u mililitru (stanica mL⁻¹) te kao postotak stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa. U konačnici, primjenom MuseTM protočnog citometra mogu se razlikovati 4 populacije stanica: žive i zdrave stanice (annexin V (-) i 7-AAD (+)), rano apoptotične stanice (annexin V (+)

i 7-AAD (-)), kasna faza apoptoze i mrtve stanice (annexin V (+) i 7-AAD (+)) te mrtve stanice i stanični ostatci (annexin V (-) i 7-AAD (+)).

Stanice je potrebno prebrojati u Neubauerovoj komorici te izračunati volumen stanične suspenzije potreban za naciepljivanje u 24 *well* ploču. U svaku jažicu naciepi se po 1 ml stanične suspenzije u koncentraciji od 3×10^4 stanica mL^{-1} . Zatim je 24 *well* ploču potrebno staviti u inkubator na temperaturu $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon 24 sata dodaju se ispitivani spojevi. Spojevi **3**, **4**, **1** i **2** dodani su u koncentraciji $132,35\text{ mg L}^{-1}$. Spojevi **8** i **6** dodani su u koncentraciji $117,28\text{ mg L}^{-1}$. Spojevi **7** i **5** dodani su u koncentracijama $46,91\text{ mg L}^{-1}$ te $117,28\text{ mg L}^{-1}$. Za svaku koncentraciju svakog spoja napravljene su po 2 paralele. U jažice koje predstavljaju kontrolu, ispitivani spojevi nisu dodani.

Nakon 72 sata inkubacije na $37\text{ }^\circ\text{C}$, potrebno je sakupiti stanični medij u Eppice. Zatim se stanice ispiru sa PBS-om, te se dodaje tripsin u volumenu potrebnom da pokrije dno 24 *well* ploča, kako bi se stanice odvojile od podloge. Potom se tripsinizirane stanice pripoje odgovarajućem sakupljenom mediju, te se iz svake Eppice uzme alikvot od $20\text{ }\mu\text{L}$ kako bi se odredio broj stanica. Uzorci se centrifugiraju 5 min na 3000 RPM (engl. *rotations per minute*). Centrifugiranjem se stanice istalože na dno, a supernatant se ukloni. Talog stanica potom se resuspendira u odgovarajućem volumenu DMEM medija sa minimalno 1 % FBS seruma, kako bi konačna koncentracija stanica bila u rasponu $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Zatim se pripremi reakcijska smjesa koja sadrži $100\text{ }\mu\text{L}$ stanične suspenzije i $100\text{ }\mu\text{L}$ reagensa. Reakcijska smjesa inkubira se 20 minuta, zaštićena od svjetla na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak potrebno je lagano resuspendirati, prije samog mjerenja na Muse™ uređaju. Nakon postavljanja parametara analize, koji uključuju pozitivnu i negativnu kontrolu, analiziraju se pojedinačni uzorci.

3.2.6. Obrada podataka

Za potrebe statističke obrade podataka, dobiveni rezultati prezentirani su kao prosječne vrijednosti uzoraka u provedenim pokusima [5], te su iskazani i sa standardnim devijacijama [6], pri čemu je n ukupan broj uzoraka, a x_i vrijednost pojedinačnog uzorka:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [5]$$

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

[6]

4. Rezultati i rasprava

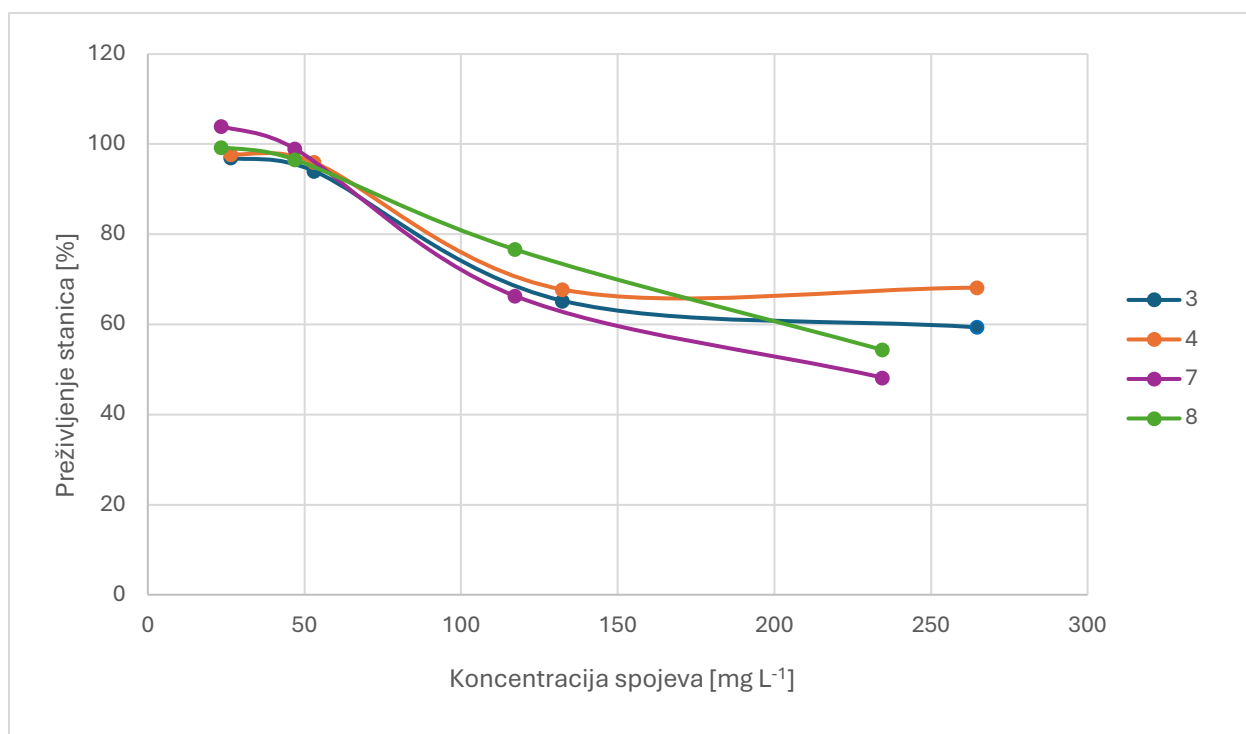
Peptidi imaju ograničenu terapijsku primjenu zbog brojnih biokemijskih ograničenja. U svrhu poboljšanja njihovih svojstava sintetiziraju se peptidomimetici čiji farmakorni elementi oponašaju strukturu peptida uz zadržavanje željenog biološkog učinka (Vagner i sur., 2018). Poželjna svojstva peptidomimetika kao terapeutika su metabolička stabilnost, biodostupnost, afinitet i selektivnost prema ciljnom receptoru (Barišić, 2018). Na tržištu su već dostupni lijekovi na bazi peptidomimetika, a mnogo ih se nalazi u nekoj od faza pretkliničkog odnosno kliničkog ispitivanja.

Posebna važnost pridaje se razvoju lijekova za rak. Naime, broj pacijenata s dijagnozom raka se povećava iz godine u godine i jedan od najvažnijih izazova današnjice je razvoj efektivnih, sigurnih i ekonomski pristupačnih antitumorskih lijekova (Hay i sur., 2014). Mnogi postojeći lijekovi imaju nisku specifičnost te su podložni stvaranju rezistencije. Ferocen svoju antitumorsku aktivnost temelji na redoks reakcijama, a peptidomimetici na narušavanju protein-protein interakcija u tumorskim stanicama. Također, prolin pokazuje antioksidativna svojstva što omogućuje zaštitu humanih stanica od oksidativnog stresa, jednog od glavnih pokretača kancerogeneze. Stoga ferocenski peptidomimetici predstavljaju nove potencijalne antitumorske terapije s povećanom aktivnošću protiv stanica osjetljivih na lijekove i onih rezistentnih na lijekove (Wang i sur., 2020).

U ovom radu provedena je *in vitro* biološka evaluacija osam ferocenskih peptidomimetika sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Spojevi su pripremljeni konjugacijom 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline s L- i D- Ala i Pro, kako bi se ispitalo utjecaj konformacije peptida na antitumorsku aktivnost prema HeLa stanicama. Citotoksičan učinak raspona koncentracija spojeva ispitan je MTS metodom, uz računanje pripadajuće IC_{50} vrijednosti. Nadalje, ispitan je učinak na klonogeni rast HeLa stanica, definiran frakcijom preživljenja stanica, koji također ukazuje na antitumorski potencijal ispitivanih spojeva. Naposljetku, MuseTM analizator staničnog zdravlja korišten je kako bi se odredilo dolazi li do aktivacije procesa stanične smrti.

4.1. Učinak ferocenskih peptidomimetika na preživljenje HeLa stanica

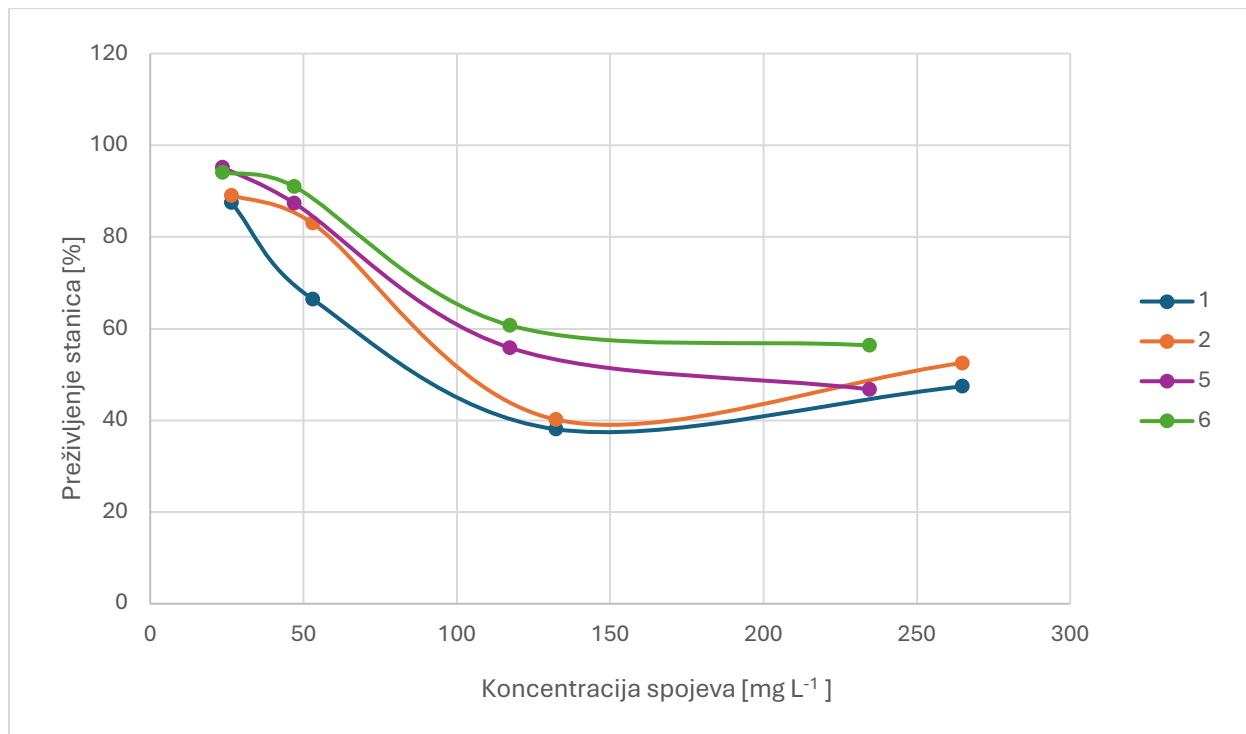
Kako bi se ispitaio citotoksičan učinak ferocenskih peptidomimetika s L- i D- alaninom i prolinom, odnosno učinak ovih spojeva na preživljenje, HeLa stanice nacijepljene su u 96 *well* mikrotitarsku ploču. Nakon 24 sata tretirane su sa ispitivanim spojevima (u koncentracijama od 23,46 mg L⁻¹ do 264,7 mg L⁻¹), a potom je nakon protekla 72 sata MTS metodom i primjenom čitača mikrotitarskih ploča određena je vijabilnost stanica. Na slikama 11. i 12. nalazi se grafički prikaz rezultata mjerenja, prikazanih kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji ispitivanih spojeva.



Slika 11. Utjecaj spojeva **3**, **4**, **7** i **8** (u rasponu koncentracija od 23,46 mg L⁻¹ do 254,7 mg L⁻¹) na preživljenje HeLa stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 11. može se zaključiti da sva četiri spoja imaju inhibitorni učinak na rast HeLa stanica. Spojevi **3** i **4** ne pokazuju inhibitorni učinak u rasponu koncentracija od 26,47 mg L⁻¹ do 52,94 mg L⁻¹. Rast inhibitornog učinka spojeva **3** i **4** izraženiji je u rasponu od 52,94 mg L⁻¹ do 132,35 mg L⁻¹. Daljnjim povećanjem koncentracije spojeva do 264,7 mg L⁻¹,

inhibitorni učinak je i dalje prisutan, no trend pada preživljenja stanica usporava. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji od $264,7 \text{ mg L}^{-1}$ preživljenje stanica tretiranih spojem **3** iznosi $59,39 \%$. Stanice tretirane sa $264,7 \text{ mg L}^{-1}$ **4** spoja pokazuju preživljenje od $68,15 \%$. Spoj **7** pokazuje inhibitorni učinak u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija, tj. od $23,46 \text{ mg L}^{-1}$ do $234,57 \text{ mg L}^{-1}$, s padom preživljenja uz rast koncentracije dodanog spoja. Postotak preživljenja HeLa stanica pri $234,57 \text{ mg L}^{-1}$ spoja **7** iznosi $48,19 \%$. Spoj **8** ne pokazuje inhibitorni učinak na HeLa stanice u rasponu koncentracija od $23,46 \text{ mg L}^{-1}$ do $46,91 \text{ mg L}^{-1}$. No, u rasponu koncentracija od $46,91 \text{ mg L}^{-1}$ do $234,57 \text{ mg L}^{-1}$ vidljiv je pad preživljenja HeLa stanica te u konačnici, tj. pri $234,57 \text{ mg L}^{-1}$ preživljenje HeLa stanica iznosi $54,34 \%$. Dakle, prema podacima prikazanim u slici 11. najmanje preživljenje imaju HeLa stanice tretirane sa spojem **7**, a najveće one stanice tretirane sa spojem **4**.



Slika 12. Utjecaj spojeva **1**, **2**, **5** i **6** (u rasponu koncentracija od $23,46 \text{ mg L}^{-1}$ do $254,7 \text{ mg L}^{-1}$) na preživljenje HeLa stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 12, može se zaključiti da sva 4 spoja pokazuju inhibitorni učinak prema HeLa stanicama. Spojevi **1** i **2** pokazuju sličnu ovisnost dodane koncentracije i preživljenja HeLa stanica. U rasponu koncentracija od $26,47 \text{ mg L}^{-1}$ do $132,35 \text{ mg L}^{-1}$, za oba spoja

vidljiv je trend pada preživljenja stanica s rastom koncentracije spojeva. Najveća razlika ova dva spoja prisutna je pri 52,94 mg L⁻¹, gdje **1** pokazuje jači inhibični učinak s manjim preživljenjem stanica koje iznosi od 66,44 %. S povećanjem koncentracije **1** i **2** iznad 132,35 mg L⁻¹, povećava se preživljenje HeLa stanica, u odnosu na niže koncentracije. Najmanji vidljivi postotak preživljenja HeLa stanica pri ispitivanoj koncentraciji od 132,35 mg L⁻¹ spoja **1** iznosi 38,07 %, a spoja **2** iznosi 40,17 %. Nadalje, spojevi **5** i **6** imaju inhibični učinak na HeLa stanice u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija od 23,46 mg L⁻¹ do 234,57 mg L⁻¹, s vidljivim padom preživljenja uz porast koncentracije. Stoga je najniže ispitano preživljenje HeLa stanica upravo pri 234,57 mg L⁻¹. Ono za spoj **5** iznosi 46,78 %, a za spoj **6** iznosi 56,35 % preživjelih stanica.

Iz podataka prikazani na slikama 11 i 12 moguće je izračunati koncentraciju spojeva pri kojoj dolazi do 50 %-tne inhibicije staničnog rasta, tzv. IC₅₀ vrijednost (engl. *Inhibitory concentration*). IC₅₀ se računa iz ovisnosti preživljenja stanica o dozi ispitivanog spoja i to prema jednadžbi koja najbolje opisuje ovu ovisnost (R²~1). IC₅₀ vrijednosti izračunate za ispitivane spojeve prikazane su kao masene i molarne koncentracije u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. IC₅₀ vrijednosti za spojeve **3**, **4**, **7** i **8**

Spoj	IC₅₀ (mg L⁻¹)	IC₅₀ (μM)
3	403,209	761,376
4	694,423	1312,257
7	203,199	493,17
8	257,997	533,236

Najveću citotoksičnost prema HeLa stanicama, od spojeva s D-Pro prikazanih u **Tablici 1**, pokazuje spoj **7** koji ima najmanju izračunatu IC₅₀ vrijednost. Spojevi **8** i **3** pokazuju nešto blaži citotoksični učinak, odnosno, veća doza tih spojeva da bi se izazvao učinak inhibicije rasta stanica od 50 %. Najslabiju citotoksičnost pokazuje spoj **4**.

Tablica 2. IC₅₀ vrijednosti za spojeve **1**, **2**, **5** i **6**

Spoj	IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
1	126,127	238,62
2	175,07	353,62
5	188,495	401,669
6	291,766	621,567

Najveću citotoksičnost prema HeLa stanicama, od spojeva sa L-Pro prikazanih u tablici 2, pokazuje spoj **1**, kojem IC₅₀ iznosi 238,62 μM. Najmanju citotoksičnost pokazuje **6**, sa IC₅₀ vrijednosti 621,567 μM. Nadalje, spojevi **1**, **2**, **5** imaju veći citotoksični učinak od spoja **7**, stoga se može zaključiti da su ferocenski peptidomimetici koji sadrže L-Pro citotoksičniji od ferocenskih peptidomimetika sa D-Pro.

S obzirom da je riječ o novosintetiziranim spojevima, njihova biološka aktivnost je u ovom radu po prvi puta ispitana. Međutim, u dostupnoj literaturi ispitana je biološka aktivnost nekih drugih konjugata 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline sa aminokiselinama. Kovačević i suradnici su 2014. godine sintetizirali konjugate 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline sa prolinom te su ispitivali njihov biološki učinak na MCF-7 te na HeLa staničnoj liniji. Najvišu citotoksičnost prema HeLa staničnoj liniji imao je spoj Boc-Fca-Pro-OMe, sa IC₅₀ vrijednošću 203,27 μM, što je jače citotoksično djelovanje od svih spojeva ispitivanih u ovom radu. Kovačević i suradnici su 2021. godine sintetizirali konjugate 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline sa hetero- i homokiralnim Pro-Ala sekvencama, te su ispitivali njihov biološki utjecaj na MCF-7 te na HeLa stanicama. U tom je radu potvrđen bolji inhibički učinak na rast stanica u peptidomimeticima koji sadrže *tert*-butoksikarbonilnu zaštitnu skupinu u odnosu na acetilnu zaštitnu skupinu. Navedeno potvrđuju i rezultati u ovom radu. Naime, najveću citotoksičnost od spojeva ispitivanih 2021. godine pokazao je Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe sa IC₅₀ vrijednošću od 370,397 μM. Veću citotoksičnost od te pokazuju spojevi **1** i **2** koji također sadržavaju L-Pro te *tert*-butoksikarbonilnu zaštitnu skupinu. Valja naglasiti da spoj **1** s najvećim citotoksičnim efektom sadrži i L-Ala baš kao i Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe.

Međutim, svi spojevi ispitivani u ovom radu, imaju nisku citotoksičnost prema HeLa stanicama u odnosu na poznate kemoterapeutike kao što su doksorubicin i cisplatin, čije IC₅₀ vrijednosti variraju između 0,1 μM i 15 μM, ovisno o tipu stanice (Kovačević i sur., 2021).

4.2. Učinak ferocenskih peptidomimetika na klonogeni rast HeLa stanica

Osim poticanja apoptoze u tumorskim stanicama, kao poželjnog alata u borbi protiv malignih oboljenja, spriječavanje proliferacije tumorskih stanica je također jedan od načina anitumorskog djelovanja lijekova. Naime, tumorske stanice karakterizira nekontroliran rast tj. dioba koja dovodi do nastanka tumorskih masa koje narušavaju zdravlje pojedinca. Stoga, kako bi se ispitalo učinak ferocenskih peptidomimetika s L- i D- Ala i -Pro na sposobnost HeLa stanica da stvaraju kolonije, stanice su naciijepljene u ploče s 6 jažica. Nakon 24 sata tretirane su sa ispitivanim spojevima. Nakon 18 dana porasle su kolonije HeLa stanica koje su zatim obojane bojom kristal ljubičastom. Na temelju broja poraslih kolonija, izračunate su frakcije preživljenja stanica (engl. *surviving fraction*, SF) prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Frakcije preživljenja (SF) za ispitivane spojeve

Ispitivani spojevi	Masena koncentracija (mg L ⁻¹)	Molarna koncentracija (μM)	SF
1	132,35	250	0,0004
2	132,35	250	0,0001875
3	132,35	250	0,0001875
4	132,35	250	0,0001875
5	117,28	250	0,001525
6	117,28	250	0,0002625
7	117,28	250	0,0038375
8	117,28	250	0,002525

Mogući raspon SF vrijednosti je 0-1, pri čemu manja vrijednost (~0) označava manju sposobnost stanica da stvaraju kolonije nakon tretmana sa ispitivanim spojem. Najveću SF vrijednost ima spoj 7, koji se stoga može smatrati spojem koji najmanje utječe na klonogeni rast HeLa stanica. Drugim riječima, po kriteriju smanjenja klonogenog rasta, ima najmanji antitumorski potencijal. Izrazito male SF vrijednosti izračunate su i za spojeve 8 te 5. Nešto manje vrijednosti imaju i spojevi 1 te 6. Najmanju SF vrijednost pokazuju spojevi 3, 4 te 2, koja iznosi 0,0001875. Navedeno označava da su spojevi 3, 4 te 2 učinkovitiji u smanjenju sposobnosti klonogenog rasta

HeLa stanica, što ukazuje na njihov veći antitumorski potencijal. Klonogenu analizu provele su i Kovačević i sur. (2021) godine za ferocenske peptidomimetike s Pro i Ala, pri čemu su niže SF vrijednosti pokazali spojevi sa Boc zaštitnom skupinom u odnosu na spojeve sa Ac zaštitnom skupinom. Navedeno je potvrđeno i u ovom radu. Naime, spojevi **3**, **4** i **2** također imaju Boc zaštitnu skupinu.

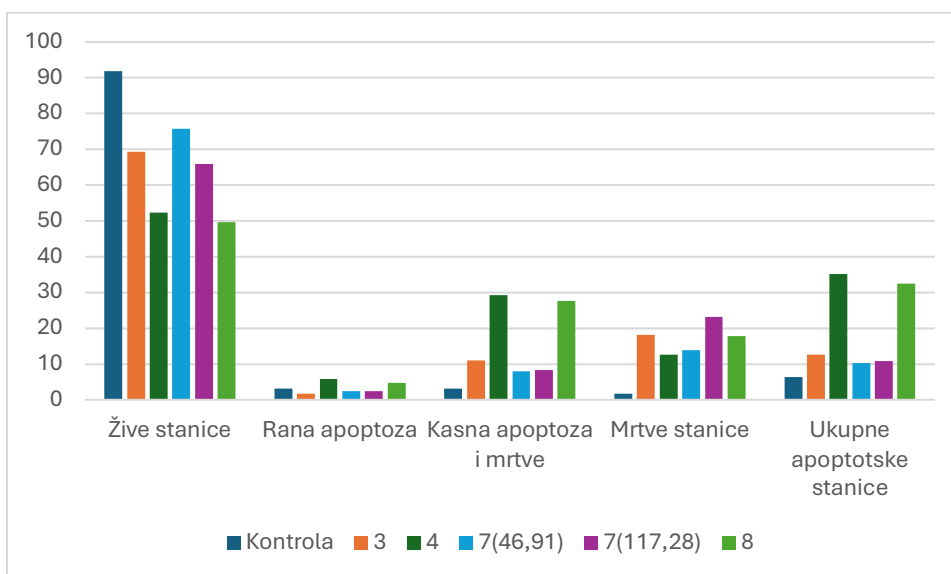
Rezultati klonogene analize djelomično su u skladu sa rezultatima MTS testa. Naprimjer, u oba testa **2** se pokazao kao spoj sa najvećim antitumorskim potencijalom, s obzirom da ima visoku toksičnost prema HeLa stanicama i da dosta utječe na smanjenje klonogenog rasta. Međutim, rezultati za spojeve **3** i **4** pokazuju da su ti spojevi najmanje toksični za HeLa stanice, ali s druge strane jako utječu na smanjenje njihovog klonogenog potencijala.

4.3. Učinak ferocenskih peptidomimetika na poticanje stanične smrti u HeLa stanicama

Stanična smrt je složen biološki proces koji omogućuje održavanje homeostaze. Ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju, obnovi tkiva te u eliminaciji zaraženih i kancerogenih stanica (Chen i sur., 2020). Postoji više mehanizma stanične smrti, a najuobičajeniji su: autofagija (katabolički proces razgradnje staničnih komponenti unutar stanica u stanju stresa), nekroza (pasivna i nekontrolirana stanična smrt potaknuta vanjskim fizikalnim i/ili kemijskim agensom) i apoptoza (programirana i strogo regulirana stanična smrt). Apoptoza je obično inicirana slabljenjem ili izostankom signala potrebnih za preživljavanje stanica ili prisutnošću signala koji ukazuju na oštećenje DNA (Su i sur., 2015).

Razumijevanje mehanizma apoptoze bitno je jer deregulacija tih mehanizama često povezana s patogenezom mnogih bolesti. S jedne strane, pretjerana apoptoza se povezuje s razvojem degenerativnih bolesti, dok se izostanak ili smanjene apoptoze povezuje s malignim bolestima. Naime, u tumorima je narušena ravnoteža između diobe stanica i stanične smrti. Mehanizmi apoptoze su kompleksni i uključuju mnoge biokemijske puteve. Greške se mogu dogoditi u bilo kojoj točki tih puteva, što pak dovodi do transformacije stanica u maligne stanice, metastaziranje tumora i rezistenciju na antitumorske lijekove. Lijekovi koji mogu ponovno aktivirati apoptotski signalni put imaju potencijal eliminacije tumorskih stanica (Wong, 2011).

Peptidomimetici sa antitumorskim karakteristikama potiču apoptozu vežući se na ciljane proteine i oponašajući interakcije koje aktiviraju specifične puteve smrti tumorskih stanica. Također, peptidomimetici s minimalno modificiranim aminokiselinama, uključeni su i u regulaciju apoptoze putem inhibicije p53-MDM2 i p-53 MDMX kompleksa (Mabonga i Kappo, 2020). Kako bi se detektiralo potiču li ferocenski peptidomimetici s L- i D- alaninom i prolinom proces stanične smrti tj. apoptozu, HeLa stanice su naciepljene u 24 *well* ploče i tretirane su sa ispitivanim spojevima. Prepoznavanje i razlikovanje stanica u različitim fazama staničnog ciklusa omogućeno je sa Muse™ analizatorom staničnog zdravlja, u kojem su uzorci analizirani 72 sata nakon dodatka spojeva. Ovaj analizator detektira signale fluorescentno obilježenog Annexin V proteina koji se veže na fosfatidilserin te 7-AAD fluorescentnog interkalatora s DNK. Na slikama 13. i 14. nalaze se grafički prikazi provedenog mjerenja udjela živih stanica, stanica u ranoj odnosno kasnoj apoptozi, mrtvih stanica i ukupan udio stanica u apoptozi.

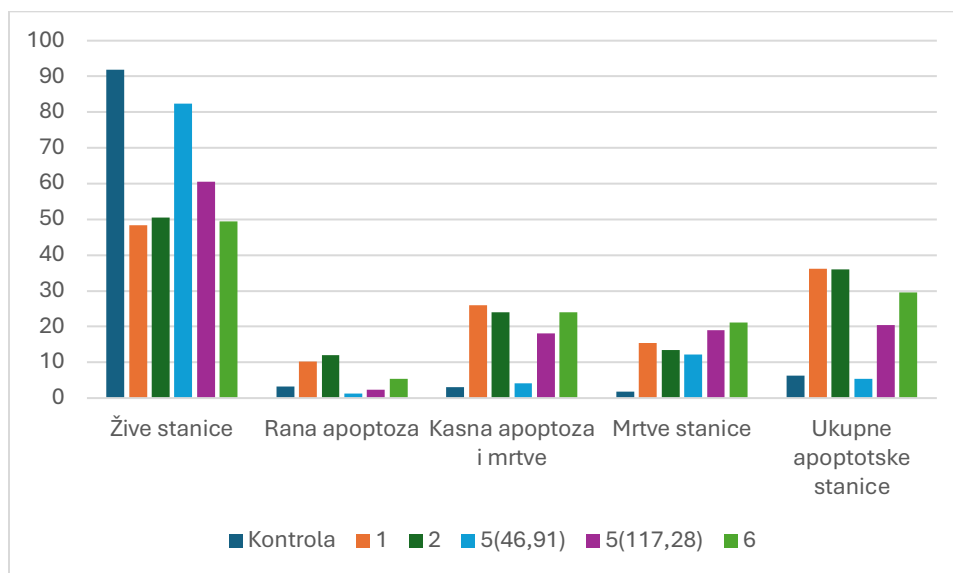


Slika 13. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj fazi apoptoze, mrtvih stanica i ukupnih HeLa stanica u apoptozi nakon tretmana sa spojevima **3, 4, 7 i 8**

Na slici 13 vidljivo je da populaciju HeLa stanica nakon dodatka određene koncentracije ispitivnih spojeva s D-Pro čine uglavnom žive stanice. Najveći postotak ukupnih apoptotskih stanica prisutan je nakon dodatka spoja **4** i iznosi 35,08 %, od čega je 5,87 % stanica u fazi rane apoptoze, a 29,21 % stanica u fazi kasne apoptoze. Nešto manji postotak ukupnih apoptotskih stanica od 32,49 % vidljiv je za stanice tretirane spojem **8**. Od navedenog postotka, 4,8 % su

stanice u ranoj apoptozi, a 27,69 % stanice u kasnoj apoptozi. Navedeno ukazuje da spojevi **4** i **8** potiču programiranu smrt tj. apoptozu u HeLa stanicama.

Ostali spojevi prikazani na slici 13 imaju dosta niži učinak na poticanje apoptoze u HeLa stanicama. Za usporedbu, kontrolu čine HeLa stanice bez dodanih spojeva, u čijoj populaciji je 91,945 % živih stanica, 1,775 % mrtvih stanica i 6,28 % stanica u nekoj od faza apoptoze. Spoj **3** je nakon 72 sata potakao apoptozu kod samo 12,59 % stanica. Spoj **7** ispitan je za dvije koncentracije, međutim razlika u populaciji HeLa stanica je prisutna jedino kod udjela mrtvih tj. živih stanica. Naime, 23,23 % stanica je mrtvo nakon tretmana sa 117,28 mg L⁻¹, a 13,89 % je mrtvih stanica nakon dodatka 46,91 mg L⁻¹ spoja **7**. Postotak ukupnih apoptotskih stanica za 117,28 mg L⁻¹ spoja **7** iznosi 10,8 %, a za 46,91 mg L⁻¹ je 10,34 %. Dakle, povećanjem koncentracije spoja **7**, po rezultatima ovog istraživanja, ne povećava se poticanje apoptoze u HeLa stanicama.



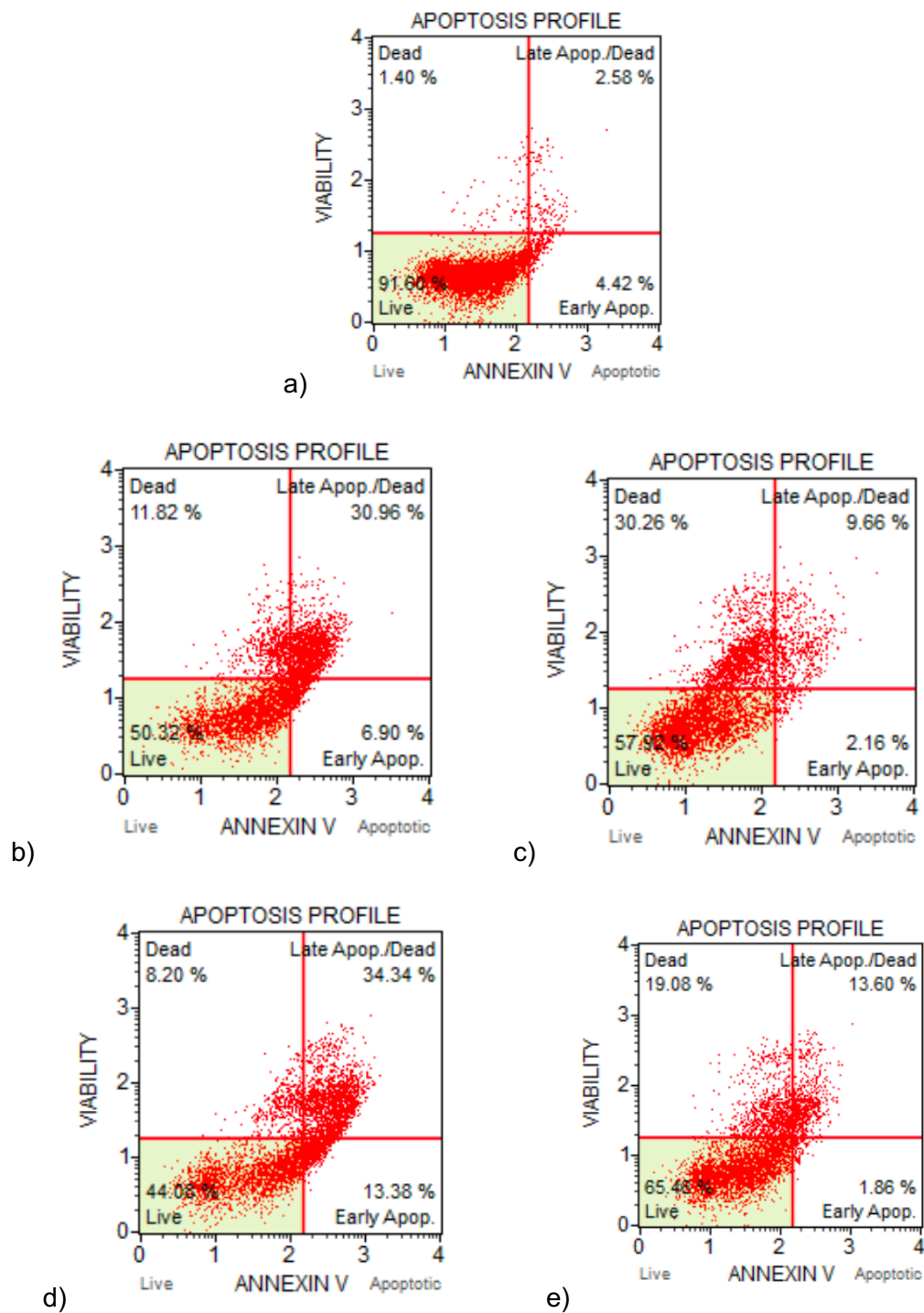
Slika 14. Udio živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj fazi apoptoze, mrtvih stanica i ukupnih HeLa stanica u apoptozi nakon tretmana sa spojevima **1**, **2**, **5** i **6**

Uvidom u rezultate prikazane na slici 14 može se ustanoviti da spojevi s L-Pro jače potiču apoptozu, odnosno pokazuju veći antitumorski potencijal. Naime, vidljiv je manji udio živih stanica nakon tretmana te veći udio HeLa stanica u apoptozi u odnosu na ispitivane spojeve s D-Pro. Spoj koji najviše potiče apoptozu je **1**, sa 36,21 % stanica u apoptozi, a slijedi ga **2** sa 35,99 %

ukupnih stanica u apoptozi. Udio živih stanica nakon tretmana sa **1** spojem iznosi 48,42 %, a nakon tretmana sa spojem **2** 50,48 %, uz napomenu da je u kontroli 91,945 % živih stanica. Ti nam rezultati potvrđuju da ispitivani spojevi koji sadrže L-Pro imaju veći antitumorski potencijal od spojeva sa D-Pro. Na slici 14, može se vidjeti da spoj **6** također potiče apoptozu u HeLa stanicama. Udio ukupnih apoptotskih stanica iznosi 29,52 %, od čega je 5,47 % stanica u ranoj apoptozi, a 24,05 % stanica u kasnoj apoptozi. Treba naglasiti da je preživjelih stanica 49,4 % 72 sata nakon tretmana sa spojem **6**.

Najmanji potencijal za uzrokovanje apoptoze u HeLa stanicama od spojeva prikazanih na slici 14 pokazuje spoj **5**, koji je ispitivan u dvije koncentracije. Nakon tretmana sa višom koncentracijom spoja **5** od 117,28 mg L⁻¹, 60,59 % je živih stanica, 20,38 % stanica u apoptozi (2,28 % u ranoj apoptozi i 18,1 % u kasnoj apoptozi) te 19,03 % mrtvih stanica. S druge strane, dodatkom niže koncentracije spoja **5** od 46,91 mg L⁻¹, živih je stanica 82,44 %, 5,44 % stanica je u apoptozi (što je niže od kontrole) te je 12,12 % mrtvih stanica. Ovi rezultati ukazuju da viša koncentracija spoja **5** potiče apoptozu i to više od spojeva **3** i **7**. Također, vidljivo je da niža koncentracija spoja **5** nije dovoljna za poticanje apoptoze.

Na slici 15 prikazani su reprezentativni histogrami analize tipa stanične smrti u uzorcima HeLa stanica, i to za kontrolni uzorak te predstavnicima obje skupine ispitivanih spojeva koji su najviše odnosno najmanje potaknuli staničnu smrt apoptozom.



Slika 15. Reprezentivni histogrami analize tipa stanične smrti HeLa stanica: a) kontrolne stanice; b) nakon tretmana sa spojem **4**; c) nakon tretmana sa 117,28 mg L⁻¹ spoja **7**; d) nakon tretmana sa spojem **1**; e) nakon tretmana sa 117,28 mg L⁻¹ spoja **5**

U prethodno spomenutom radu, Kovačević i sur. (2021) također je provedeno ispitivanje stanične smrti na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja. Rezultati analize pokazali su da su HeLa stanice tretirane sa 500 µM spoja Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe pokazale najviši postotak ukupnih stanica u apoptozi (33,19 %). Spojevi ispitivani u ovom radu, konkretnije **1**, **2** i **4**, imaju veći postotak ukupnih stanica u apoptozi i to pri manjoj molarnoj koncentraciji od 250 µM.

Rezultati citotoksičnosti i analize stanične smrti, provedenih u ovom istraživanju, uglavnom su u skladu. Naime, spoj **3** pokazuje nisku citotoksičnost te nisku sposobnost poticanja apoptoze, dok spojevi **1** i **2** pokazuju najvišu citotoksičnost te najviše potiču apoptozu u HeLa stanicama. S druge strane, spoj **4** najmanje je citotoksičan od ispitivanih spojeva, dok rezultati analize tipa stanične smrti pokazuju da je udio apoptotskih stanica nakon tretmana s ovim spojem viši od većine drugih spojeva. Drugim riječima, spoj **4** djeluje mehanizmom poticanja apoptoze, međutim pokazuje najslabiju citotoksičnost. Isto tako, spoj **7** pokazuje najnižu mogućnost poticanja apoptoze, no MTS metodom je pokazano da ima citotoksičnost višu od nekolicine drugih ispitanih spojeva. Dakle, provođenjem ovih dviju metoda može se zaključiti da su ferocenski peptidomimetici s L- i D- Ala i Pro citotoksični prema HeLa stanicama i da je moguć mehanizam djelovanja upravo poticanje apoptoze. Najveći antitumorski potencijal imaju spojevi **1** i **2**, a najniži spoj **3**.

Uspoređujući rezultate klonogene analize sa rezultatima analize tipa stanične smrti, može se zaključiti da postoje preklapanja. Tako naprimjer spoj **2** ima visok klonogeni potencijal te visoku sposobnost poticanja apoptoze, u odnosu na ostale ispitivane spojeve. Isto vrijedi i za spoj **4**. Najniži klonogeni potencijal te ujedno i najnižu sposobnost poticanja apoptoze ima spoj **7**. Rezultati za spoj **5** ove dvije metode također ukazuju na niži antitumorski potencijal.

U konačnici, kao potencijalni antitumorski kandidati pokazuju se spojevi **1** i **2** zbog najviše citotoksičnosti, klonogenog potencijala te poticanja apoptoze. S druge strane, spojevi **3**, **7**, **8** te **5** pokazuju slabije rezultate pri ispitivanju različitim metodama na tumorskim HeLa stanicama. Stoga dobar smjer i okosnicu za daljnja istraživanja predstavljaju ferocenski peptidomimetici **1** i **2**, odnosno one strukture koje imaju Boc-zaštitne skupine i L-prolin. Valja naglasiti da ovi rezultati nisu zadovoljavajući u usporedbi sa postojećim antitumorskim lijekovima, no pružaju važnu smjernicu za sintezu novih spojeva sa poboljšanim biološkim svojstvima.

5. Zaključci

1. Ispitivani ferocenski peptidomimetici s L- i D- Pro i Ala imaju inhibitorni učinak na rast HeLa stanične linije. Citotoksičan efekt ovisi o primijenjenoj dozi spojeva, na način da je citotoksičnost proporcionalna povećanju koncentracije spojeva. Najjače citotoksično djelovanje pokazuju spojevi **1, 2 i 5**.
2. Ispitivani ferocenski peptidomimetici s L- i D- Pro i Ala smanjuju klonogeni rast HeLa stanica pri čemu su spojevi **2, 3, i 4** najučinkovitiji.
3. Neki od ispitivanih ferocenskih peptidomimetika s L- i D- Pro i Ala potiču apoptozu u HeLa staničnoj liniji. Navedeno je najizraženije za spojeve **1 i 2**.
4. Temeljem određivanja citotoksičnosti, klonogene analize te analize stanične smrti pokazano je da ispitivani ferocenski peptidomimetici s L- i D- Pro i Ala imaju antitumorski potencijal. Najizraženiji antitumorski potencijal pokazuju spojevi koji sadrže Boc- zaštitnu skupinu te L-Pro, odnosno spojevi **1 i 2**.

6. Literatura

Ashley EA, Phyo AP (2018) Drugs in Development for Malaria. *Drugs* **78**, 861-879. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>

Aslantürk ÖS (2018) In vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. U: Larramendy ML, Soloneski S (ured.) In *Genotoxicity—A Predictable Risk to Our Actual World*, IntechOpen, London, UK

Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopetida. Interna skripta Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Barišić L, Kovačević M, Mamić M, Kodrin I, Mihalić Z, Rapić V (2012) Synthesis and conformational analysis of methyl N-alanyl-1-aminoferrocene-1-carboxylate. *Eur J Inorg Chem* **11**, 1810-1822. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101270>

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

Blatt NL, Mingaleeva RN, Solovieva VV, Khaiboullina SF, Lombard VC, Rizvanov AA (2013) Application of Cell and Tissue Culture Systems for Anticancer Drug Screening. *World Appl. Sci. J.* **23(3)**, 315-325. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.23.03.13064

Breibeck J, Skerra A (2017) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers* **109**, 23069-23081. <https://doi.org/10.1002/bip.23069>

Butler M (2003) *Animal Cell Culture and Technology*, 2.izd., Taylor and Francis, London, str. 12-18.

Callaway E (2013) Deal done over HeLa cell line. *Nature* **500**, 132-133. <https://doi.org/10.1038/500132a>

Chaplin S (2022) Paxlovid:antiviral combination for the treatment of COVID-19. *Prescriber* **33**, 31-33. <https://doi.org/10.1002/psb.1979>

Chen Y, Hua Y, Li X, Arslan IM, Zhang W, Meng G (2020) Distinct Types Of Cell Death and the Implication in Diabetic Cardiomyopathy. *Front. pharmacol.* **11**
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>

Cortés-Ciriano I, van Westen GJP, Bouvier G, Nilges M, Overington JP, Bender A, Malliavin TE (2016) Improved large-scale prediction of growth inhibition patterns using the NCI60 cancer cell line panel. *Bioinformatics* **33(1)**, 85-95. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv529>

Čakić-Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90 (4)**, 537-569. DOI: 10.5562/cca3246

EMA (2024) Bylvay. EMA-European medicines agency, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/bylvay>. Pristupljeno 14. ožujka 2024.

Gante J (1994) Peptidomimetics- Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew. Chem* **33(17)**, 1699-1720. <https://doi.org/10.1002/anie.199416991>

Gelder van T, Lerma E, Engelke K, Huizinga RB (2022) Volcosporin: a novel calcineurin inhibitor for the treatment of lupus nephritis. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **15(5)**, 515-529. <https://doi.org/10.1080/17512433.2022.2092470>

Grdenić D (1987) Molekule i kristali, 3.izd., Školska knjiga, str. 172.

Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economider C, Rosenthal J (2014) Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 40-51. <https://doi.org/10.1038/nbt.2786>

Hussain A, Farzam K (2023) Setmelanotid. NCBI–National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589641/>. Pristupljeno 14. ožujka 2024.

Idlas P, Lepeltier E, Jaouen G, Passirani C (2021) Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. *Cancers* **13 (19)**, 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>

Jerić I (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako?. *Kem. Ind.* **53(11)**, 495-504.

Jimmidi R (2023) Synthesis and Applications of Peptides and Peptidomimetics in Drug Discovery. *Eur. J. Org. Chem.* **26(18)** <https://doi.org/10.1002/ejoc.202300028>

Mabonga L, Kappo AP (2020) Peptidomimetics: A synthetic tool for inhibiting protein-protein interactions in cancer. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **26**, 225-241. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09831-5>

Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E (2020) Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* **1(3)**, 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>

Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocenopeptides. *Chem Soc Rev* **35**, 348-354. <https://doi.org/10.1039/B511332F>

Kovačević M, Čakić-Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Barišić 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(24)**, 13532. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>

Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Kovačević M, Kodrin I, Cetina I, Kmetič I, Murati T, Barišić L i sur. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions* **44**, 16405-16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>

Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B i sur. (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene-1,1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Eur J Chem* **23**, 1037-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>

Kovačević M, Molčanov K, Radošević K, Srček VG, Roca S, Čače A, Barišić L (2014) Conjugates of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and proline: Synthesis, conformational analysis and biological evaluation. *Molecules* **19(8)**, 12852-12880. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>

Krishnan N, Dickman MB, Becker DF (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biol Med*. **44(4)**, 671-681. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.054>

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P i sur. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12**, 1463-1467 <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. U: Kuete V (ured.) Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 271-297.

Kumar P, Nagarajan A, Uchil D (2018) Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **6**. DOI: 10.1101/pdb.prot095505

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (2010) Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9. Izd., Elsevier, Philadelphia, str. 52-61

Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM i sur. (2013) The genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes Genomes Genet.* **3(8)** 1213-1224. <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>

Liu Z, Delavan B, Roberts R, Tong W (2017) Lessons learned from two decades of anticancer drugs. *Trends Pharm. Sci.* **38**, 852–872. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.005>

Osella D, Ferrali M, Zanello P, Laschi F, Fontani M, Nervi C, Cavigliolo G (2000) On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives. *Inorg. Chim. Acta* **306**, 42–48.

Pelay-Gimeno M, Glas A, Koch O, Grossmann TN (2015) Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew. Chem.* **54(31)**, 8849-9126. <https://doi.org/10.1002/anie.201412070>

Peter S, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene-Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity. *Molecules* **24 (19)**, 3604. <https://doi.org/10.3390/molecules24193604>

Piciinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A (2017) Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol. Proced. Online* **19**, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>

Qvit N, Rubin SJS, Urban TJ, Mochly-Rosen D, Gross ER (2017) Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities. *Drug Discov.* **22**, 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.003>

Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Srček G, Radošević K (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 169-175.

Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61-79.

Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**, 71-120.

Schteingart CD, Lau JL (2017) From Natural Peptides to Market. *Annu. Rep. Med. Chem.* **50**, 543-586. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.003>

Sharma K, Sharma KK, Sharma A, Jain R (2023) Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug. Discov. Today* **28(2)** <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103464>

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

Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem. Rev* **104** (12), 5931-5986. <https://doi.org/10.1021/cr0101510>

Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer* **14**, 48 <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>

Szbados L, Savouré A (2009) Proline: multifunctional amino acid. *Tres Plant Sci.* **15**(2), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>

Tsantrizos YS (2008) Peptidomimetic Therapeutic Agents Targeting the Protease Enzyme of the Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Acc. Chem. Res.* **41**(10), 1252-1263. <https://doi.org/10.1021/ar8000519>

Vagner J, Qu H, Hruby VJ (2008) Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 292-296. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>

Wani WA, Jameel E, Baig U, Mumtazuddin S, Hun LT (2015) Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 534–551. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.009>

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

Wong RS (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 87 <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Petra Ivić

Petra Ivić

Vlastoručni potpis