

**SVEU ILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveu ilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Marija Macan

**UTJECAJ NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA FEROCENA NA RAST
TUMORSKIH STANICA IN VITRO**

Završni rad

Osijek, 2017.

**SVEU ILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveu ilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Marija Macan

**UTJECAJ NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA FEROCENA NA RAST
TUMORSKIH STANICA IN VITRO**

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor rada: Prof.dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac

Rad ima 23 lista, 1 tablicu i 13 slika.

Veliku zahvalnost prije svega dugujem mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na predloženoj temi, pruženoj prilici za suradnju, potpori mojem stručnom i znanstvenom usavršavanju i pomoći pri realizaciji rada.

Nadalje, zahvaljujem asistentici dr. sc. Teuti Opačić-Bernardi na dragocjenoj pomoći, utrošenom vremenu i mnogim savjetima kako bi mi što više olakšala rad u laboratoriju i pisanje ovog rada.

Pri nastanku ovoga završnog rada, koji je napravljen u Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, na razliku mi je naime pomogao velik broj ljudi prenošenjem svojega znanja i kolegijalnošću. Hvala lijepa svima!

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na svim odricanjima i razumijevanju.

Hvala svima od srca što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene!

SADRŽAJ

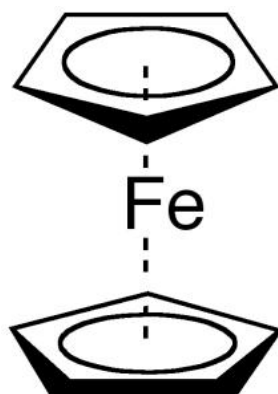
1. UVOD	1
1.1. Ferocen	1
1.1.1. Ferocen.....	1
1.1.2. Derivati ferocena.....	1
1.2. Kultura stanice i uzgoj	2
1.2.1. Kultura stanice	2
1.2.2. Rast stanica <i>in vitro</i>	3
1.3. Genska osnova raka	4
1.4. Metode određivanja citotoksičnosti.....	6
2. CILJ	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Ispitivani spojevi	8
3.1.2. Stanične linije.....	8
3.1.3. Kemikalije.....	8
3.2. Metode	9
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	9
3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi.....	9
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	12
4. REZULTATI.....	14
5. RASPRAVA.....	17
6. ZAKLJUČAK	19
7. SAŽETAK.....	19
8. SUMMARY	21
9. LITERATURA.....	22
10. ŽIVOTOPIS	24

1. UVOD

1.1. Ferocen

1.1.1. Ferocen

Ferocen, poznat i kao bis(-ciklopentadienil)željezo, $C_{10}H_{10}Fe$ (slika 1.), izgledom podsjeća na oblik sendviča u kojemu se željezo nalazi između dvaju ciklopentadienilskih prstenova.



Slika 1. Strukturna formula ferocena (1)

Ferocen je otkriven 1951. godine. Objašnjenje strukture ferocena bilo je važno otkriće u povijesti kemije, što je dovelo do razvoja moderne organometalne kemije (2). Organometalna kemija i biokemija povezale su se zadnja dva desetljeća, ime je osnovano novo područje: bioorganometalna kemija. To novo područje omogućilo je sintezu novih organometalnih spojeva koji zbog svojih svojstava mogu biti primjenjivani u liječenju bolesti kao što su tumori i malarija (3). Stabilnost ferocena u vodenom i aerobnom mediju, sposobnost stvaranja velikoga broja derivata i povoljna elektrokemijska svojstva učinila su ferocen zanimljivim u bioorganometalnim istraživanjima (2).

1.1.2. Derivati ferocena

Daljnjim istraživanjima koja su provedena na ferocenu otkriveno je da se zbog njegovih povoljnih kemijskih i fizikalnih svojstava mogu sintetizirati razni derivati istoga spoja. Posljednjih desetljeća, sintetizirani su derivati koji su ispitivani u različitim studijama, kao imunosenzori za proteine, DNA i površinski antigeni hepatitisa B (HbSAg) te senzori za ugljikov monoksid (4), a istraživana je i njihova primjena u terapijske svrhe (5). Terapija derivatima ferocena potpomognuta je steroidnim i nesteroidnim endokrinim modulatorima i

prirodnim produktima. Derivati, u ovome slučaju, poboljšavaju u inak aktivnih biomolekula mijenjaju i njihov farmakokinetički profil (5). Danas se metaloorganski spojevi koriste uz platinu u kemoterapiji (6).

U najnovijim istraživanjima najčešće se koriste derivati ferocena, (3)ferocenofani.

Oni sadržavaju strukturu ferocena, pri čemu su dva ciklopentadienilna prstena spojena s 3 ugljikova atoma (5).

1.2. Kultura stanice i uzgoj

1.2.1. Kultura stanice

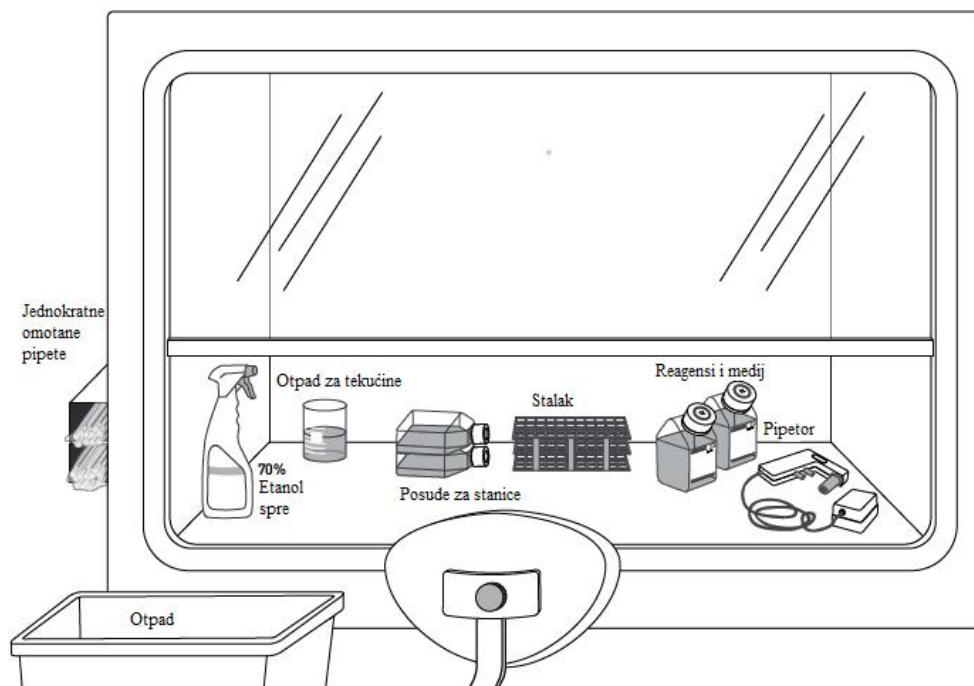
Kultura stanice je uzgoj stanica životinja ili biljaka i njihov rast u povoljnome umjetnom okolišu.

Primarna se kultura odnosi na stadij kulture kada su stanice izolirane iz tkiva direktnim ili indirektnim enzimskim ili mehaničkim metodama i započeta je njihova proliferacija u uvjetima *in vitro*. Nakon njihova rasta, one se supkultiviraju prenošenjem u novi medij, gdje će imati i više prostora za rast i razmnožavanje (7).

Stanična linija jest linija nakon prve supkultivacije. Stanične linije nastale iz primarnih kultura imaju ograničen životni vijek. Presadbom preživljavaju one koje imaju dominantniji rast i time nastupa uniformnost u populaciji.

Kabinet za rad sa stanicama mora biti posebno opremljen zbog opasnosti od kontaminacije, a time i upropaštavanja cijele stanične linije.

Prostor mora biti dovoljno velik kako bi se njime mogla koristiti jedna osoba, mora biti lak za održavanje i čišćenje, iznutra i izvana, adekvatno osvijetljen i mora biti smješten tako da je sve nadohvat ruke kako bi se što manje manipuliralo. Svaki predmet koji dolazi u kabinet mora biti dezinficiran 70 %-tnim etanolom (7).



Slika 2. Prikaz kabineta za rad (iz 7)

1.2.2. Rast stanica *in vitro*

Razlikujemo dvije vrste stanica u kulturi, adherentne i stanice u suspenziji. Adherentne kulture prijanjaju za podlogu. Kako bi se mogle koristiti, potrebno je stanice odvojiti od podloge, što se rješava enzimski (tripsin) ili mehanički. Zahtijevaju redovitu izmjenu medija i supkultiviranje, na što nas upozorava broj stanica u kulturi koji se dobije gledanjem mikroskopom. Budući da stanice prijanjaju na podlogu, njihov je rast ograničen na površinu posude. Primjenjuje se u citologiji i u istraživanjima.

Stanice u suspenziji lakše su za održavanje, ali zahtijevaju svakodnevno brojenje stanica i uvid u živu, odnosno mrtve stanice. Rast stanica postiže se razrjeđivanjem. Budući da nema prijanjanja stanica na površinu, nije potrebna enzimski ili mehanička disocijacija. Rast je ograničen koncentracijom stanica u mediju. Iskorištava se za proizvodnju proteina te u istraživanjima.

Stanici je medij najvažniji sastojak stanice i njezina okoliša jer osigurava potrebne nutrijente, faktore rasta i hormone za rast stanice te regulira pH i osmotski tlak kulture (7).

1.3. Genska osnova raka

Postoji mnogo na ina nastanka raka, ali ono što je zajedni ko svima njima jest nekontrolirani rast stanica. Razlikujemo zlo udne ili maligne i dobro udne ili benigne tumore, ali samo maligni tumori metastaziraju i napadaju okolna tkiva. Tumori svojim rastom mogu pritiskati okolne dijelove tijela, a, razvijaju i svoju vlastitu opskrbu krvi (angiogeneza), tumorsko tkivo zdravomu tijelu oduzima potrebne hranjive tvari. Mikroskopski, stanica raka nalikuje stanicama tkiva organa koji je zahva en (9).

Zlo udni se tumori mogu podijeliti na sarkome, karcinome i hemoblastome. Karcinomi su zlo udni tumori epitelnih i mukoidnih stanica te parenhimatoznih organa. Sarkomi su zlo udni tumori vezivnoga i potpornoga tkiva, a hemoblastomi su zlo udni tumori hematopoeznoga tkiva.

Mutacije gena velikim su dijelom odgovorne za nastanak zlo udnih stanica. Mutacije mijenjaju koli inu ili funkciju proteina koji nadziru stani ni rast, diobu i popravak DNK. Dvije su glavne skupine mutiranih gena: onkogeni i tumorsupresorski geni.

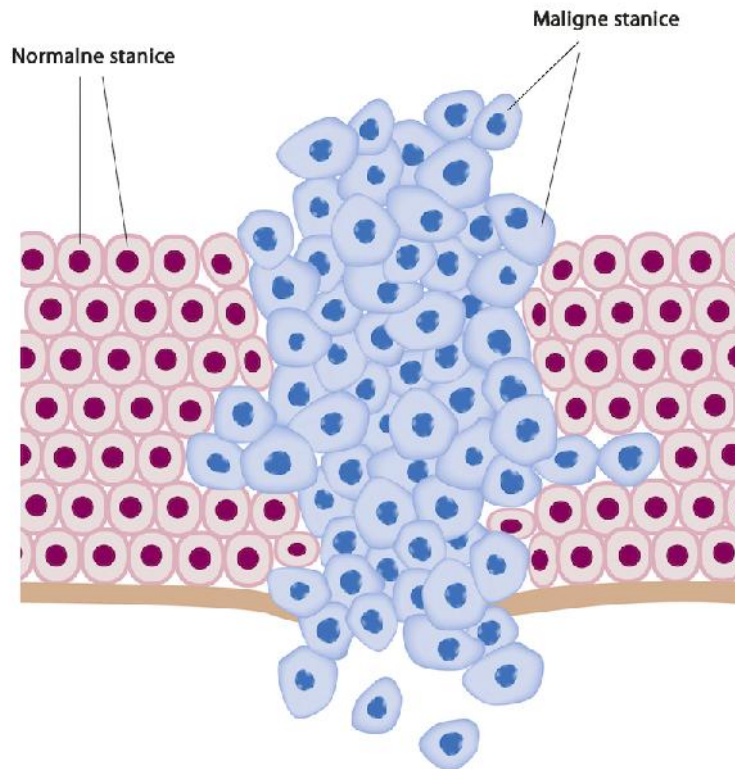
Onkogeni su izmijenjeni normalni geni (protoonkogeni) koji nadziru stani ni rast. Mutacija protoonkogeni nastupaju zbog ste enih stani nih mutacija uzrokovanih to kastim promjenama, genskim amplifikacijama ili insercijama genskih dijelova virusa u DNK doma ina (8).

Produkti tumorsupresorskih gena sudjeluju u diobi stanica i popravku DNK i presudni su za otkrivanje neprimjerenih poruka za stani ni rast. Ako takvi geni zbog ste enih ili naslije enih mutacija više ne mogu funkcionirati, mutacije drugih gena više se ne provjeravaju, što vodi u neoplasti nu pretvorbu. Kao i ve inu gena, tako i tumorsupresorske gene kodiraju dva alela. Manjkava kopija jednog gena može biti nasljedna, te može lako uzrokovati mutacije, ime se gubi normalna zaštitna osobina gena. Osim naslje ivanjem manjkavog alela, može do i do metiliranja promotorske regije, ime se ko i prepisivanje (transkripcija). Što je ve i stupanj pogrešnog metiliranja i ve i broj zahva enih gena, nastaje zlo udnija novotvorina (8).

Uz mutaciju gena, razvoju zlo udnih novotvorina pridonose i virusi, kemijski karcinogeni, ultraljubi aste zrake, ioniziraju i zra enje i sl.

Neki virusi se povezuju a DNK doma ina te se pri ponovnoj replikaciji normalni geni ošte uju, a novonastali geni mogu utjecati na rast ili diobu stanica. Virusna infekcija uzrokuje i imunosnu reakciju, što remeti normalan nadzor ranih novotvorina i pove ava u estalost zlo udnih neoplazmi (8).

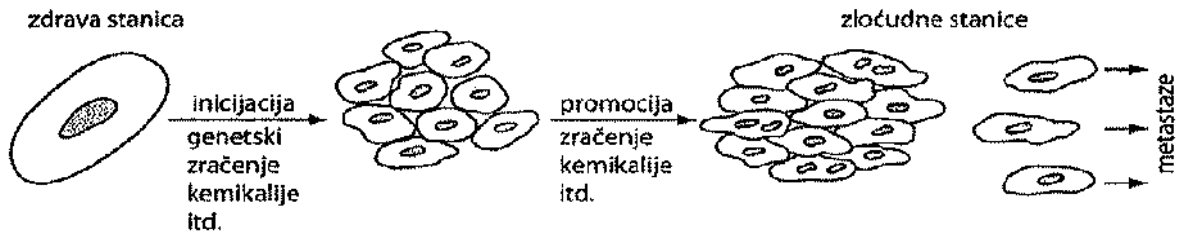
Kemijski karcinogeni mogu uzrokovati mutacije gena s nekontroliranim rastom i nastankom novotvorina. Mogu biti prisutni u prirodi (prirodni pesticidi), ali i kao proizvodi kemijske industrije (skupina aromatskih ugljikovodika, aromatskih amina, alifatskih spojeva i teških metala). Ultraljubiaste zrake mogu izazvati rak kože oštećenjem DNK, pri čemu nastaju dimeri timidina koji izbjegnu popravak zbog urođenih mana u popravku DNK (8).



Slika 3. Invazija malignih stanica među normalne stanice (preuzeto iz 9)

Za zloćudne stanice karakteristično je da su slabije diferencirane od normalnih, nezrele su i primitivne te imaju osobine fetalnih stanica koje još nisu prošle proces diferencijacije i sazrijevanja. Karcinogeneza je kompleksan proces za koji se smatra da nastaje kao posljedica promjena u regulacijskim genima koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje. Zloćudni se tumor razvija u 4 stadija: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje (10).

Pojava presadnica (metastaza) označuje tumor kao zloćudni te bolesnici s tim stadijem imaju ograničene mogućnosti liječenja i time lošiju prognozu. Metastatske stanice izgledom i ponašanjem odgovaraju stanicama primarnog raka (9).



Slika 4. Proces karcinogeneze (10)

1.4. Metode određivanja citotoksičnosti

Stani na se citotoksi nost odnosi na sposobnost određene kemikalije da uništi živu u stanicu. Koriste i se citotoksi nim spojem, zdrave stanice mogu se podvrgnuti nekrozi ili apoptozi. Mjerenje citotoksi nosti pokazalo se kao važna tehnika za identificiranje spojeva koji mogu nositi određeni rizik za ljudsko zdravlje te pri razvoju novih farmaceutskih proizvoda.

Ve ina metoda kojima se mjeri citotoksi nost uzima u obzir činjenicu da mrtve stanice nemaju kompletnu stani nu membranu, pri emu uporabljena boja vizualizira unutrašnjost mrtvih stanica (11).

Test citotoksi nosti koristi se za pregled stani ne kulture kako bi se moglo odrediti kako je ispitivani spoj djelovao na stani nu proliferaciju ili pokazati izravni citotoksi ni efekt koji uzrokuje stani nu smrt. Bez obzira na tip testa citotoksi nosti, važno je znati koliko ima živu ih stanica na kraju svakog eksperimenta. Testovi citotoksi nosti uključuju: test redukcije tetrazolijumom, test redukcije resazurinom, markere proteaze i detekciju ATP-a. Svi zahtijevaju inkubaciju reagensa s ispitivanom stani nom linijom. Kada stanice umru, ubrzo se gubi sposobnost da supstrat postane produkt (12).

2. CILJ

U ovom su istraživanju postavljeni sljedeći ciljevi:

1. ispitati antiproliferativni potencijal derivata ferocena na rast normalnih i tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*,
2. ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta te definirati supstanciju koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica a da istodobno ne djeluje inhibitory na rast kulture normalnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani spojevi

Derivati ferocena pripremljeni su u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveu ilišta u Zagrebu. Za svrhu *in vitro* istraživanja neposredno prije testiranja pripremljene su finalne otopine otapanjem *stock*-otopine novosintetiziranih spojeva (1×10^{-2} mol/L) u DMSO mediju. Prema pokazanoj topljivosti u DMSO mediju, definirana finalna koncentracija novosintetiziranoga spoja bila je 10^{-5} mol/dm³, 10^{-6} mol/dm³ i 5×10^{-6} mol/dm³.

3.1.2. Stanične linije

Kako bi se bolje pokazao u inak derivata ferocena na različite vrste stanice, uporabljene su adherentne stanice i stanice u suspenziji.

Adherentne stanične linije: stanice adenokarcinoma vrata maternice (HeLa), stanice kolorektalnog adenokarcinoma (CaCo-2) i stanice bubrega psa (MDCK).

Stanice u suspenziji: stanice kronične mijeloidne leukemije (K562) i stanice Burkittova limfoma (Raji).

Od staničnih linija koje su iskorištene, sve su tumorske, osim MDCK koji je normalna stanična linija.

3.1.3. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada rabljeni su reagensi i kemikalije različitih proizvođača. Za adherentne stanice koristio se hranjivi medij koji se priprema kompletiranjem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) temeljnog medija. Za stanice u suspenziji iskorišten je Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), kao izotonična otopina upotrebljuje se PBS (fosfatom puferirana otopina soli), a za lakše brojenje stanica služe otopina tripsanskog plavila te dimetilsulfoksid (DMSO).

3.2. Metode

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Protokol za kultivaciju stanica se razlikuje za adherentne stanice i za stanice u suspenziji. Zajednički kod kultivacijama stanica jest rad u kabinetu u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Sav pribor, posuđe, medij, puferi i otopine moraju biti sterilni.

Protokol za adherentne stanice započinje izbacivanjem starog medija iz kulture, nakon čega slijedi ispiranje stanica slanom otopinom bez kalcija i magnezija, pazite i pritom da se ne ošteti sloj stanica na stijenci. Budite i da se radi o adherentnim stanicama potrebno je dodavanje reagensa, npr. tripsina kako bi se stanice odvojile od stijenke boce za uzgoj stanica, te inkubiranje oko 2 minute na sobnoj temperaturi. Potrebno je provjeriti pod mikroskopom jesu li se stanice odvojile. Ako ih se manje od 90 % odvojilo, onda je potrebno produljiti vrijeme inkubacije i svakih 30-ak sekundi provjeriti mikroskopom.

Kada se odvojilo dovoljno stanica, dodaje se dvaput više volumena medija da bi reagens disocirao, stanice se prebacuju u 15-mililitarsku epruvetu i centrifugiraju se na 200xg na 5 – 10 minuta, resuspendiraju se stanice i odvoje se za brojanje. Brojanje stanica izvodi se pomoću mikroskopa, koriste i se brojač stanica, hemocitometrom i otopinom tripanskog plavila (7).

Nakon brojenja stanica mikroskopom, potrebno je izračunati koliko ima ukupno stanica te koliko nam je medija potrebno za određeni broj stanica.

Supkultivacija stanica u suspenziji manje je komplicirana i zahtjevnija od adherentnih stanica. Jednostavnija je samim time što su stanice već u suspenziji u mediju te ih ne treba odvajati od podloge. Nije potrebno mijenjati medij, nego se stanice održavaju tako što ih se svaka 2 do 3 dana hrani dok se ne sjedine.

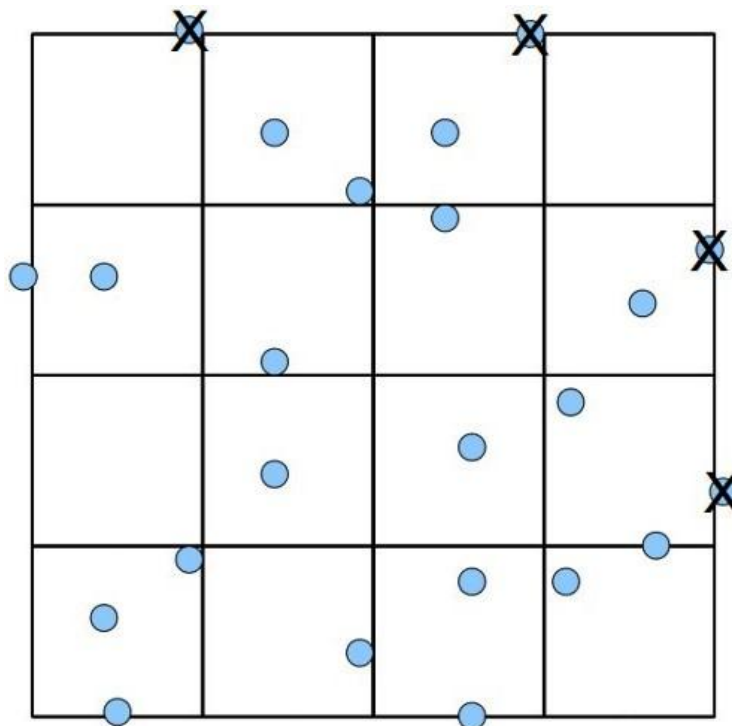
Kada su stanice spremne za pasazu, posuda se vadi iz inkubatora i uzima se mali uzorak sterilnom pipetom. Uzorak se pregledava mikroskopom, kako bi se moglo utvrditi sadržava li određena stani na liniji dovoljan broj stanica. Brojenje stanica provodi se isto kao i za adherentne, odnosno s pomoću hemocitometra, brojača stanica i otopinom tripanskog plavila. Nakon čega se računa volumen medija koji se treba dodati kako bi se stani na kultura razrijedila do preporučene gustoće.

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Kako bi rezultati istraživanja bili kvalitetni broj stanica u svakom eksperimentu mora biti definiran, stoga je potrebno prije svakog pokusa utvrditi broj stanica u suspenziji.

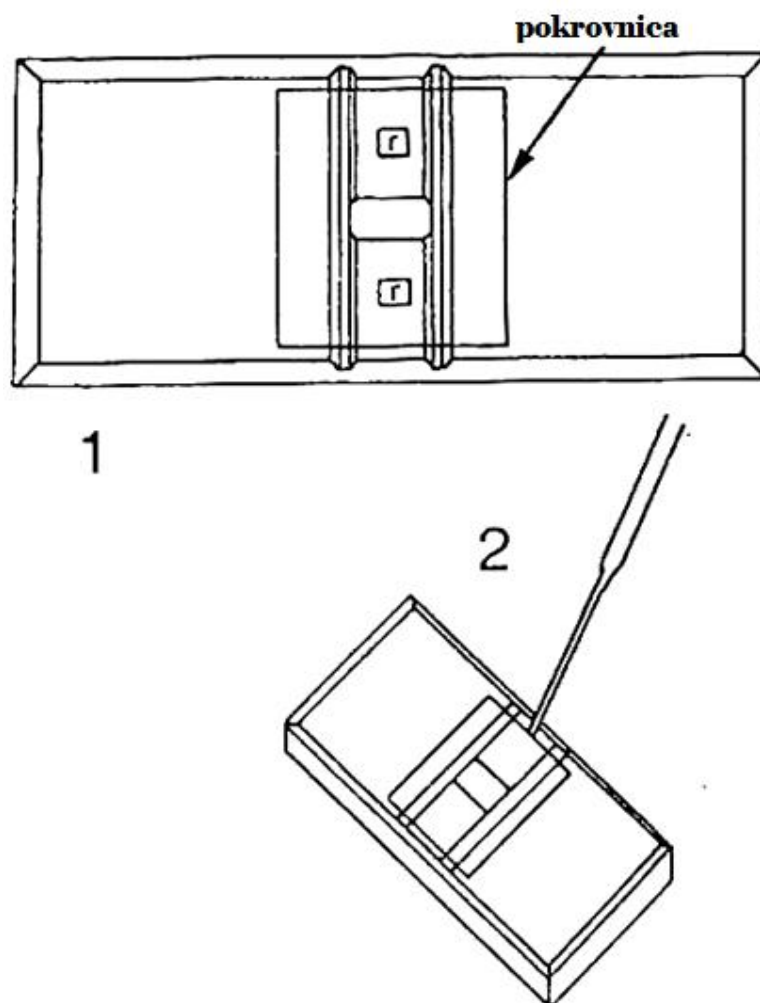
Vijabilnost i brojnost stanica određuje se bojenjem otopinom tripanskog plavila u Bürker-Türk komorici.

Za određivanje broja stanica potrebno je otopine tripanskog plavila. Žive stanice s neoštećenom staničnom membranom aktivno izbacuju boju i tako ostaju nebojene, za razliku od mrtvih, koje ostaju obojene nakon ulaska boje u stanicu kroz oštećenu membranu.



Slika 5. Skica stanica pod mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno s *weba*:

<http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>



Slika 6. Bürker-Türkova komorica. Preuzeto i prilagođeno s *weba*:

<http://viagralevitradzheneriki.ru/eritrocitos-recuento-de-reticulocitos-leucocitos-y.html>

Pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) prebrojavaju se žive stanice unutar 4 kvadrata a brojenjem gornjeg i jednoga od postrani noga brida kvadrata a. Broj se živih stanica preračunava prema formuli:

$$\text{broj stanica} \frac{N}{4} \times 3 = X \times 10^4 \text{ stanica/cm}^3,$$

gdje su:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

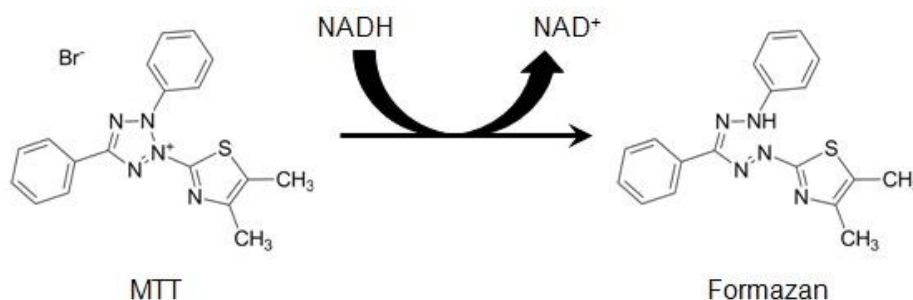
3 – faktor razrjeđenja.

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

Naj češće rabljeni spojevi za test redukcije tetrazolijumom jesu: MTT, MTS, XTT i WST-1.

MTT (3-(4,5-dimetiltazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) prvi je homogeni test za uvid u stanje proliferacije. Količina formazana mjeri se razlikom promjena u apsorpciji na 570 nm koristeći se spektrofotometrom. Referentna je valna duljina 630 nm, ali se ne rabi često (12).

Žuti tetrazolijum MTT reduciran je u metabolički aktivnim stanicama djelovanjem dehidrogenaza, kao što su NADH i NADPH. Rezultat je nastanak ljubičastog formazana koji se onda kvantificira pomoću spektrofotometra (13). Kada stanica umre, izgubi se sposobnost da se MTT pretvara u formazan pa zato i promjena boje izostaje (12).



Slika 7. Struktura MTT-a i obojenog formazanskog produkta (12)

Formazan se kao produkt MTT tetrazolijuma taloži kao netopljivi precipitat unutar stanice. Formazan mora biti topljiv kako bi se mogla očitati apsorpcija spektrofotometrijom. Primjenjuju se razne metode za topljivost, kao što su: stabilizacija boje, izbjegavanje isparivanja i reduciranje interferencija s fenol crvenilom i ostalim komponentama medija. Od kemijskih spojeva za topljivost se mogu uporabljivati: kiseli izopropanol, DMSO (dimetil-sulfoksid), dimetilformamid, SDS (natrijev dodecil sulfat) i kombinacija detergenta i organskog otapala (12).

MTT reagens stabilan je i spreman za uporabu na +4 °C u mraznom prostoru do 18 mjeseci. Pri primjeni reagensa potrebno je voditi brigu o tome da se pipetom ne dođe do pojave kontaminacije staničnom linijom (13).

Adherentne stanice nasađene su na mikrotitarske pločice (96 jažica) u koncentraciji 2×10^4 st./cm³ u volumenu od 0,2 cm³ (0,18 cm³ stanične suspenzije i 0,02 cm³

derivata ferocena) u svaku jažicu. Stanice su inkubirane u CO₂ inkubatoru preko noći i kako bi se prihvale za podlogu te tretirane s 0,02 cm³ derivata ferocena u završnim koncentracijama od 1x10⁻⁴, 1x10⁻⁵, 5x10⁻⁶ i 1x10⁻⁶ mol/dm³. Nakon inkubacije od 72 sata, medij je uklonjen sa stanica, a stanice su tretirane 1 x MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/mL. Stanica pod tretmanom inkubirane su u CO₂ inkubatoru 4 sata. Kako bi se nastali formazanski kristali otopili nakon inkubacije, dodan je DMSO, a zatim se ploha lagano promiješa na miješalici (u trajanju od 20 minuta). Rezultati su očitani na mikroita u ploha pri valnoj duljini od 570 nm.

Suspenzijske stanice uzgajane su na mikrotitarskim ploham s okruglim dnom u volumenu u koncentraciji 1x10⁵ st/cm³ u volumenu 0,1 cm³ suspenzije po jažici (0,09 cm³ suspenzije i 0,01 cm³ derivata ferocena). U jažice su istog dana nasativan dodani ispitivani derivati ferocena u konačnim koncentracijama te se nakon inkubacije od 72 sata dodaje 0,01 cm³ 10 x MTT, a slijedi inkubiranje od 4 sata. Dodavanjem 0,1 cm³ 10% SDS-a u 0,01 M HCl inkubacija je nastavljena sve do sljedećeg dana. Sljedeći su dana rezultati očitani na mikroita u pri valnoj duljini od 570 nm.

Radnom dobivenih apsorbancija dobije se postotak živih stanica u određenoj jažici te se time interpretira koliko je određeni spoj utjecao na stanice.

$$\% = \frac{(A_{\text{tretman}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

Slika 8. Formula za dobivanje postotka živih stanica u kulturi

Za sve stanične linije (K562, Raji, HeLa, CaCo-2 te MDCK) izrađene su srednja vrijednost i standardna devijacija te je napravljen graf. Odabran je studentov T-test zbog kontinuiranih parametrijskih varijabli, te su dobiveni rezultati kojima se može izraziti statistička značajnost, p < 0,05. Statistički značajni rezultati označeni su u grafu zvjezdicom iznad stupaca.

4. REZULTATI

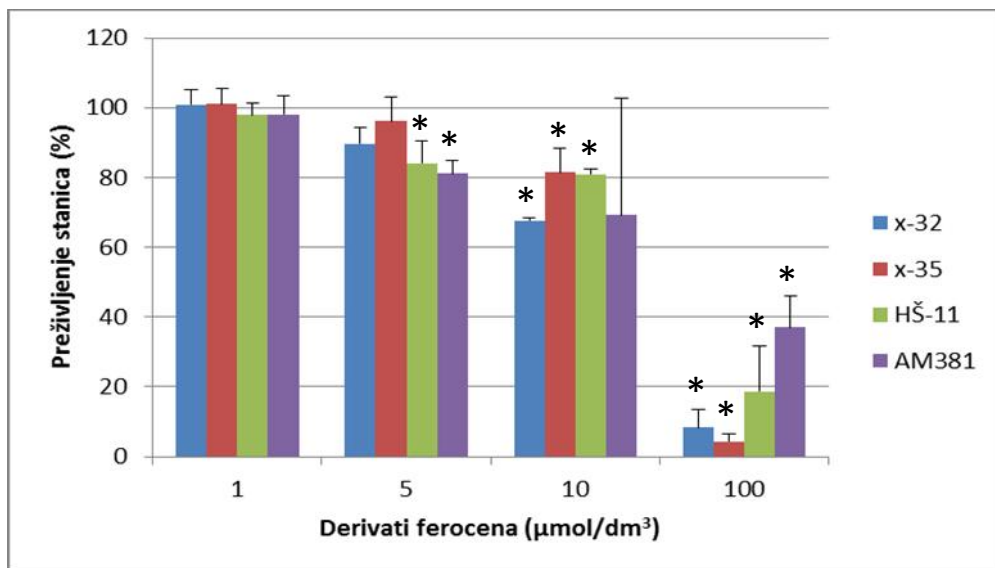
Antiproliferativni u inak derivata ferocena pra en je na pet stani nih linija (HeLa, CaCo-2, MDCK, K562 i Raji). Stanice su izložene spojevima **x-32**, **x-35**, **HŠ-11-1** i **AM381** u koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i 5×10^{-6} mol/dm³ koji su ostavljeni djelovati 72 sata. Za adherentne stani ne linije (CaCo-2, HeLa) nije pra en utjecaj derivata HŠ-11-1 i AM381 u ispitivanim koncentracijama 1×10^{-6} i 5×10^{-6} mol/dm³, jer nije uo en zadovoljavaju i u inak pri ve im ispitivanim koncentracijama.

Polovica maksimalne inhibitorne koncentracije (IC₅₀) jest mjera u inkovitosti supstancije u inhibiciji specifi ne biološke ili biokemijske funkcije.

Tablica 1. Prikaz IC₅₀ za navedene derivate ferocena na stani nim linijama

μmol/dm ³	MDCK	CaCo-2	HeLa	K562	Raji
x-32	16,34	18,53	28,62	29,35	81,27
x-35	77,04	57,20	60,50	46,21	> 100
HŠ-11-1	> 100	> 100	86,56	60,26	60,69
AM381	> 100	> 100	> 100	67,91	> 100

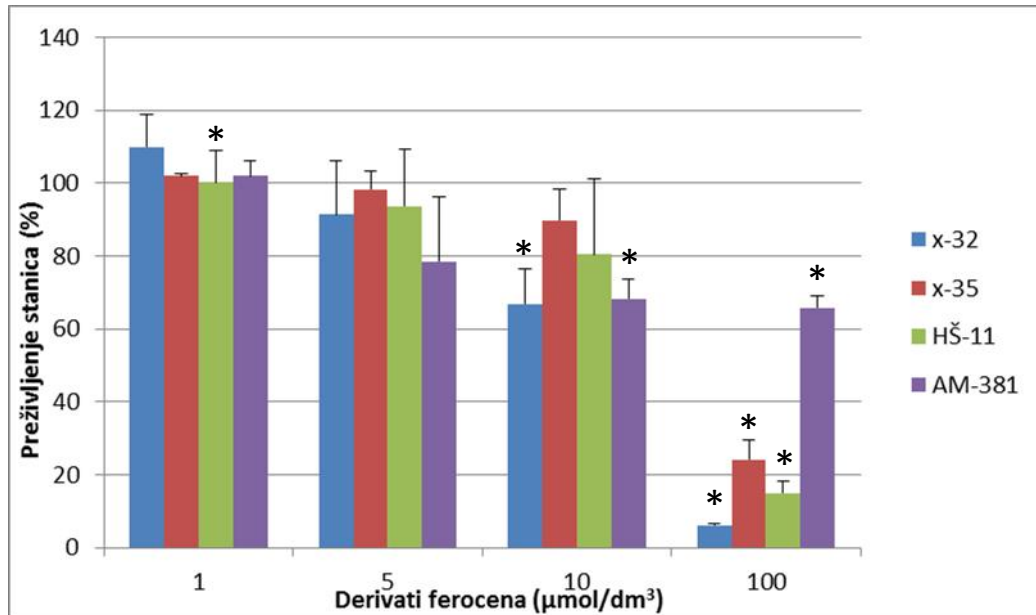
Najviša primjenjena koncentracija, 1×10^{-4} mol/dm³ bila je u inkovita u inhibiciji rasta na svim stani nim linijama. Kod K562 stani ne linije svi spojevi u koncentraciji 1×10^{-4} mol/dm³ zna ajno inhibiraju stanice, pri emu se isti e **x-35** s najve im u inkom inhibicije rasta. Može se istaknuti koncentracija 1×10^{-5} mol/dm³ spoja **x-32** koja ujedno pokazuje i statisti ku zna ajnost.



Slika 9. Utjecaj derivata ferocena na stani nu liniju K562

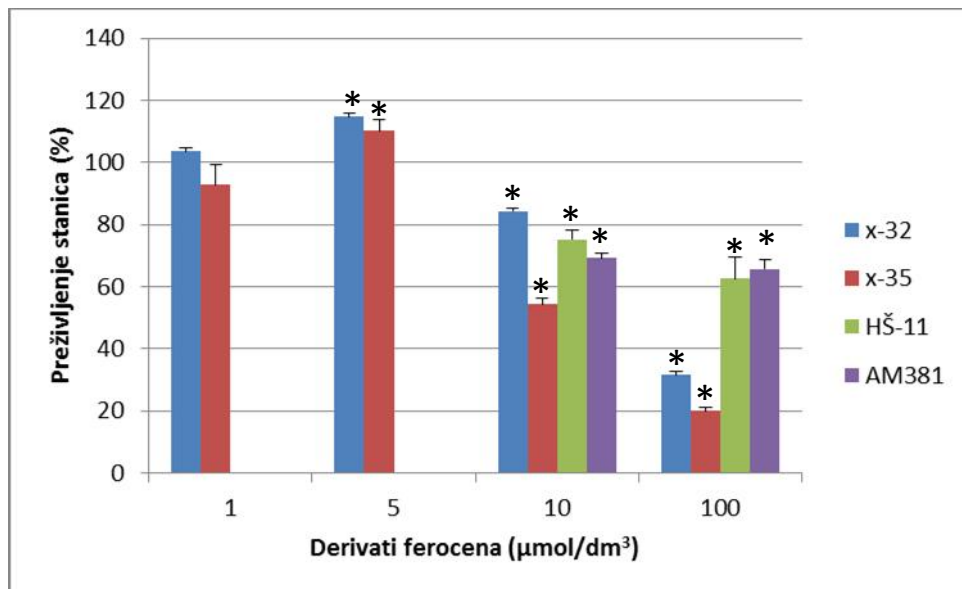
REZULTATI

Kod Raji stani ne linije spojevi **x-32** i **AM381** koji pri koncentraciji od 1×10^{-4} mol/dm³ pokazuju najbolji inhibitorski učinak.



Slika 10. Utjecaj derivata ferocena na Raji

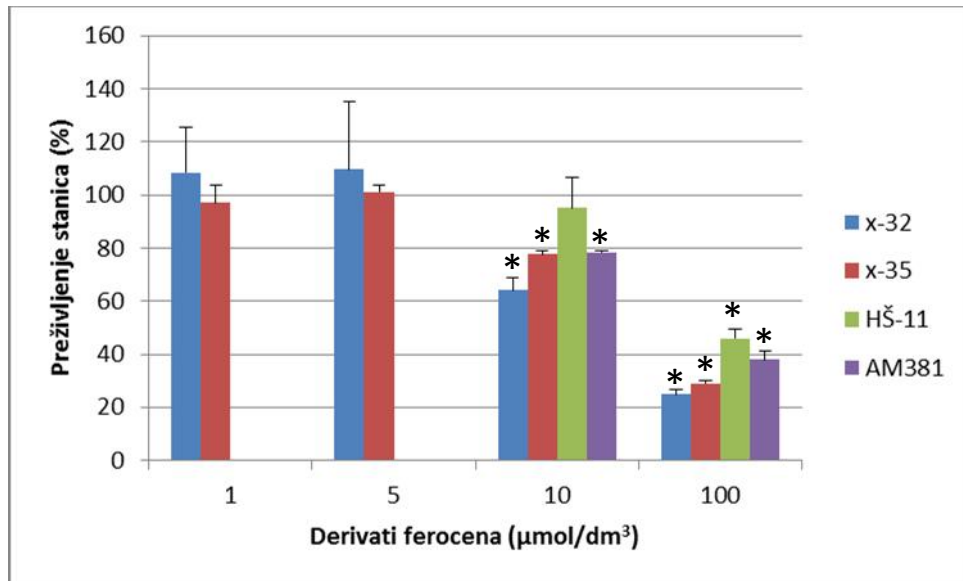
Spoj **x-35** na stani noj liniji CaCo-2 pokazuje najbolji inhibitorski učinak. Može se istaknuti i spoj **x-32** koji ima najbolji učinak pri koncentraciji od 1×10^{-4} mol/dm³, dok spojevi **HŠ-11-1** i **AM381** ne pokazuju zadovoljavajuće rezultate pa se stoga nisu ni testirali pri nižim koncentracijama (5×10^{-6} , 1×10^{-6} mol/dm³).



Slika 11. Utjecaj derivata ferocena na CaCo-2 stani nu liniju

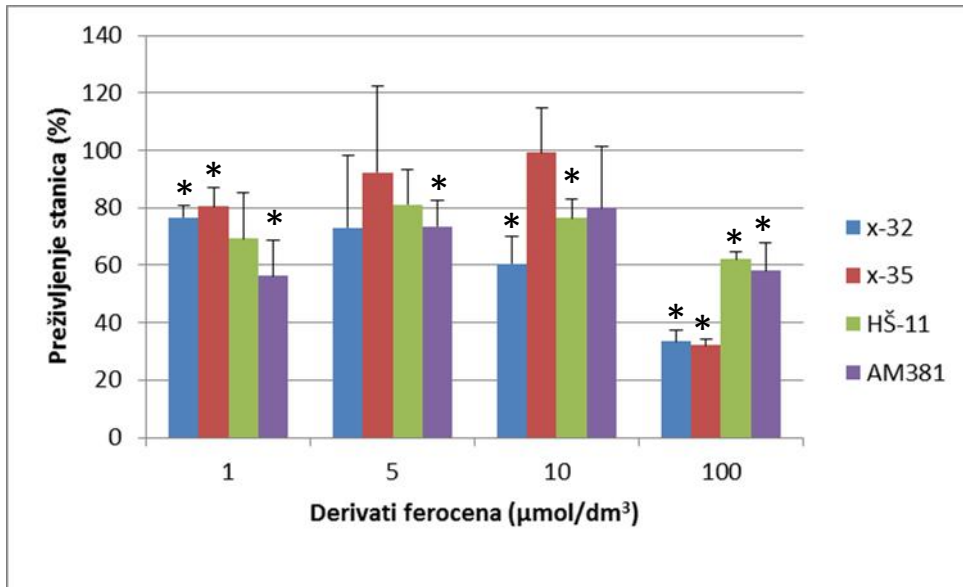
REZULTATI

Na HeLa stani nu liniju spoj **x-32** pokazao se naju inkovitijim pri višim koncentracijama (1×10^{-5} , 1×10^{-4} mol/dm³) te se uz njega može istaknuti i spoj **x-35** koji prati inhibitory u inak **x-32**.



Slika 12. Utjecaj derivata ferocena na HeLa stani nu liniju

Na normalnoj stani noj liniji, MDCK, spoj **x-32** pokazuje inhibitory u inak, pri emu je najve i skok primije en pri najvišoj koncentracije, 1×10^{-4} mol/dm³. Kod normalne stani ne linije bitan je što manji inhibitory u inak, a to pokazuje **HŠ-11-1** na koncentraciji 1×10^{-4} mol/dm³.



Slika 13. Utjecaj derivata ferocena na MDCK stani nu liniju

5. RASPRAVA

Organometalni spojevi se zbog njihovih biološki aktivnih svojstava mogu koristiti u liječenju različitih bolesti poput tumora i malarije (3). Posljednjih desetljeća, sintetizirani su brojni derivati ferocena koji su se pokazali kao izvrsni imunosenzori za proteine, DNA i površinski antigeni hepatitisa B (HbSAg), kao i senzori za ugljikov monoksid (4), a ispitana je i mogućnost njihove primjene u terapijske svrhe (5).

Usporedbom djelovanja različitih koncentracija derivata ferocena na sve ispitivane stanice ustanovljeno je da K562 stanice na liniji pokazuje najveću osjetljivost na djelovanje nosintetiziranih derivata ferocena što se vidi na slici 10. Normalne stanice, MDCK, gotovo jednako su bile osjetljive na ispitivane spojeve što ove spojeve isključuje kao kandidate za daljnje ispitivanje protutumorske učinkovitosti budući da protutumorski lijekovi trebaju djelovati selektivno na tumorske stanice s minimalnim toksičnim utjecajem na normalne stanice (14).

Primjena derivata ferocena u kemoterapijske svrhe je aktivno područje istraživanja. Mnogo istraživanja je pokazalo da su određeni spojevi ferocena pokazali izrazito citotoksičnost u *in vitro* uvjetima za tumorske stanice. No, iako je mnogo uspješnih istraživanja provedeno u *in vitro* uvjetima, svega ih je nekoliko testirano u *in vivo* uvjetima. Uz određene dodatke samoj terapiji ferocenom uspješno se inhibira rast tumorskim stanicama. Uspjeh *in vivo* antitumorske aktivnosti je ohrabrujući i nadahnjuje nova istraživanja na tom području (2). Na djelovanje spojeva ferocena utječe veza kojom je spoj povezan s biomolekulom kao i njihova topljivost u vodi, npr. velika zainteresiranost pridaje se derivatima ferocena topljivim u vodi i spojevima ferocena povezanim kovalentnom vezom sa poliaspartamidom (3).

Najveći potencijal za daljnji razvoj pokazuju derivati ferocena x-32 i x-35 čija se antiproliferativna aktivnost najviše ističe u rezultatima ovog rada. Potrebno je smanjiti njihov inhibični utjecaj na normalne stanice kako bi se mogli koristiti kao protutumorski lijekovi. HŠ-11-1 i AM381 djeluju manje inhibično na normalnu staničnu liniju, no njihov utjecaj na tumorske stanice kroz različite koncentracije ne pokazuje utjecaj koji je vidljiv kao i kod spojeva x-32 i x-35.

RASPRAVA

Za daljnja istraživanja potrebno je ispitati više derivata ferocena različitih obilježja, te osim rasta tumorskih stanica u *in vitro* uvjetima obratiti pozornost i na topozomeraze I i II na koje djeluje nekoliko derivata ferocena.

Pri samom izvješću eksperimentalnog dijela istraživanja pripremala su se razrijeđena derivata različitih koncentracija. Primijetilo se da postoji razlika kada se upotrebljuje svježe pripremljeno razrijeđeno te se njime tretiraju stanične linije.

6. ZAKLJUČAK

Nakon završetka istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- 1) Uočeni su antiproliferativni učinci testiranih derivata ferocena.
- 2) Najjači i toksičan učinak pokazali su istraživani ferocenski spojevi x-32 i x-35 na svim tumorskim stanicama, najbolje pri koncentraciji 1×10^{-4} mol/dm³.
- 3) Najosjetljivijom stanicom linijom pokazala se stanica K562 na kojoj je primijećeno da između koncentracija 1×10^{-5} mol/dm³ i 1×10^{-4} mol/dm³ svih ispitivanih spojeva dolazi do pada u postotku živih stanica.

7. SAŽETAK

Uvod: Organometalni spojevi se zbog svojih svojstava mogu koristiti u liječenju različitih bolesti poput tumora i malarije.

Cilj: ispitati antiproliferativni potencijal derivata ferocena na rast normalnih i tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*. Definirati derivat koji ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica a da istodobno ne djeluje inhibitory na rast kulture normalnih stanica.

Materijali i metode: Primijenjene su stanične linije u suspenziji (Raji i K562) i adherentne stanične linije (HeLa, CaCo-2 i MDCK). Stanične linije inkubirane su na temperaturi 37°C uz 5% CO₂. Nakon obrade stanica derivatima ferocena (x-32, x-35, HŠ-11-1 i AM381) i inkubacije od 72 sata, uvid u broj živih stanica određivao se MTT testom.

Rezultati: Najveći i inhibitory u odnosu na stanične linije pokazali su derivati x-32 i x-35, a uočeno je da je najosjetljivija stanica na liniji K562.

Zaključak: Derivati ferocena uzrokuju smrt tumorskih stanica i smanjuju njihov rast. Postotak inhibicije ovisi o samoj koncentraciji spoja i o staničnoj liniji.

Cljučne riječi: feroceni; derivati ferocena; antiproliferativni u odnosu na; kultura stanica; tumorske stanice

8. SUMMARY

Introduction: Organometallic compounds due to their properties, can be used in the treatment of various diseases, such as cancer and malaria.

Objective: The aim of the study is to examine the antiproliferative potential of ferrocene derivatives on the growth of normal and tumor cells under *in vitro* conditions. To define the derivatives that has the highest tumor cell growth performance while simultaneously not inhibiting the growth of normal cell cultures.

Materials and Methods: The cell lines in suspension (Raji and K562) and adherent cell lines (HeLa, CaCo-2 and MDCK) were used in this research. Cell lines were incubated on the temperature of 37°C with 5% CO₂. After treating the cells with the ferrocene derivatives (x-32, x-33, x-34, x-35, HŠ-11-1 and AM381) and incubation for 72 hours, the number of viable cells was determined by MTT test and measuring their absorbance on spectrophotometer.

Results: The highest inhibitory effect on cell lines were derivatives x-32 and x-35, while the most sensitive cell line was K562.

Conclusion: Ferrocene derivatives cause the death of tumor cells and reduce their growth. The percentage of inhibition depends on the concentration of the compound and the type of the cells.

Key words: ferrocene; derivatives of ferrocene; antiproliferative effect; cell culture; tumor cell

9. LITERATURA

1. Ferrocene preparation – organometallic compounds; 23. 6. 2017.
<http://chem.pieceofscience.com/?p=807>
2. Cátia Ornelas. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research.
Received (in Montpellier, France) 27th February 2011, Accepted 10th May 2011.
DOI: 10.1039/c1nj20172g
3. Mohammad F. R. Fouda, Mokhles M. Abd-Elzaher, Rafeek A. Abdelsamaia and Ammar A. Labib. On the medicinal chemistry of ferrocene. Inorganic Chemistry Department, National Research Centre, PO 12622 Dokki, Cairo, Egypt. Received 1 November 2006; Revised 6 December 2006; Accepted 26 December 2006
4. Wael A. Amer, Li Wang, Abid M. Amin, Liang Ma, Haojie Yu. Recent Progress in the Synthesis and Applications of Some Ferrocene Derivatives and Ferrocene-Based Polymers. Received: 8 March 2010 / Accepted: 16 May 2010 / Published online: 2 June 2010. Springer Science+Business Media, LLC 2010
5. Meral Gcrmen, Pascal Pigeon, Siden Top, Elizabeth A. Hillard, Michel Huche, Christian G. Hartinger, Frederic de Montigny, Marie-Aude Plamont, Anne Vessieres, Gerard Jaouen. Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]Ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives against Human Cancer Cells.
6. Santiago Gomez-Ruiz, Danijela Maksimovi -Ivani , Sanja Mijatovi , Goran N. Kalu erovi . On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. Universidad Rey Juan Carlos. Institute for Biological Research “Sinisa Stankovic”, University of Belgrade. Institut fur Chemie, “Martin-Luther-Universi” at Halle-Wittenberg, Germany
7. Cell culture basics – handbook, 4.7.2017.
<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>
8. Stani ne i molekularne osnove zlo udnosti, 5. 7. 2017.
<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/pregled-malignih-tumora/stanicne-i-molekularne-osnove-zlocudnosti>
9. Onkologija – što je rak?, 5. 7. 2017.
<http://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>
10. Dubravka voriš ec i Ivana epelak. Štrausova Medicinska biokemija. Tre e izdanje, Zagreb, 2009., 518.-519.str.

LITERATURA

11. What Is Cell Cytotoxicity an How to Measure It?, 5. 7. 2017.
<https://info.gbiosciences.com/blog/bid/164400/what-is-cell-cytotoxicity-and-how-to-measure-it>
12. Terry L Riss, PhD, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, Lisa Minor. Cell Viability Assays. Published May 1, 2013; Last Update: July 1, 2016.
13. ATCC – 306/59 01. MTT Cell Proliferation Assay – Instruction Guide.
14. Moderni lijekovi pobje uju rak, 2. 8. 2017.
www.zzjzpgz.hr/nzl/27/kemo.htm

10. ŽIVOTOPIS

Marija Macan rođena je 17. studenoga 1994. u Zagrebu. Cjelokupno djetinjstvo provela je baveći se kulturom i sportom. Nakon završene Osnovne škole dr. Ante Starčevića u Zagrebu, 2009. godine upisuje Klasičnu gimnaziju.

Godine 2014. upisuje sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Aktivnim sudjelovanjem u izvannastavnim aktivnostima stječe nova iskustva i znanja volontirajući u Bolnici za medvjede i udruge EMSA te na sportskim sveučilišnim igrama održanima u Zagrebu i Rijeci 2016. godine i sudjelujući na radionicama u sklopu udruge CMLDSA. U ožujku 2017. godine postaje aktivnim članom udruge AIESEC, a nedugo nakon toga *Alumni Manager*.

Usporedo uz studiranje zapošljava se na mjestu biljetera u Zagrebačkom gradskom kazalištu Komedija.