

Protutumorski učinci novih derivata ferocena na leukemijske stanice in vitro

Seletković, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:537318>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Dominik Seletković

**PROTUTUMORSKI UČINCI NOVIH
DERIVATA FEROCENA NA
LEUKEMIJSKE STANICE *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2020.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Dominik Seletković

**PROTUTUMORSKI UČINCI NOVIH
DERIVATA FEROCENA NA
LEUKEMIJSKE STANICE *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada je prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac.

Rad ima 25 stranica i 6 slika.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac, na pomoći i pruženom znanju pri izradi ovoga završnoga rada.

Posebno se zahvaljujem, dr. sc. Marijani Jukić, na iznimnom strpljenju, trudu i podršci.

Zahvaljujem se gospođi Sandi Grgić na iznimnom strpljenju i pomoći kroz cijeli studij.

Zahvaljujem se osoblju laboratorija čiju sam pomoć imao kroz praktični dio svojega rada.

Zahvaljujem se svim prijateljima na podršci tijekom izrade ovoga rada.

Za kraj, posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri koji su mi bili najveća podrška i motiv kako tijekom cijeloga školovanja, tako i tijekom izrade završnoga rada.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Ferocen	1
1.1.1.	Otkriće i svojstva ferocena	1
1.1.2.	Medicinska primjena derivata ferocena	2
1.2.	Leukemije	3
1.2.1.	Akutna i kronična mijeloična leukemija	4
1.2.2.	Akutna i kronična limfocitna leukemija	5
2.	HIPOTEZA	6
3.	CILJ	7
4.	MATERIJALI I METODE	8
4.1.	Materijali	8
4.1.1.	Derivati ferocena	8
4.1.2.	Kemikalije	8
4.1.3.	Stanične linije	8
4.2.	Metode	9
4.2.1.	Uzgoj stanica in vitro	9
4.2.2.	Određivanje broja živih stanica u kulturi	9
4.2.3.	Određivanje antiproliferativnih učinaka MTT testom	10
4.2.4.	Statistika	11
5.	REZULTATI	12
5.1.	Učinci derivata ferocena na stanice CCRF-CEM	12
5.2.	Učinci derivata ferocena na stanice HL-60	13
5.3.	Učinci derivata ferocena na stanice THP-1	14
5.4.	Učinci derivata ferocena na stanice K562	15
6.	RASPRAVA	17
7.	ZAKLJUČAK	19
8.	SAŽETAK	20
9.	SUMMARY	21
10.	LITERATURA	22
11.	ŽIVOTOPIS	25

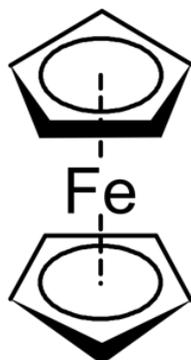
1. UVOD

Nakupinu zloćudno preobraženih stanica koje nastaju od zdravih stanica procesom poznatim kao zloćudna pretvorba nazivamo rakom. Vrste raka međusobno se razlikuju prema etiologiji, biologiji, kliničkoj slici te protokolima liječenja. Rak nastaje kao posljedica sloma regulacijskih mehanizama koji su odgovorni za kontrolu stanične signalizacije. Poremećaj regulacijskih mehanizama uglavnom je posljedica genskih mutacija proto-onkogene u onkogene (1). Trajno poremećena regulacija stanične proliferacije, izbjegavanje apoptoze i imunološkog sustava te metastaziranje u druga tkiva i organe su neka od temeljnih svojstava raka (2). Leukemija je rak matičnih hematopoetskih stanica koštane srži. Postoji nekoliko čimbenika koji ju mogu uzrokovati, a neki od njih su izloženost radijaciji, genetički čimbenici, izlaganje određenim kemikalijama, virusi te imunodeficijentna stanja (3). Za liječenje karcinoma postoji nekoliko metoda, a jedna od njih je kemoterapija. Prilikom kemoterapije koriste se antitumorski lijekovi koji uništavaju stanice raka. U posljednjem desetljeću, kemičari iz područja bioorganometalne kemije su došli do napretka u liječenju raka. Novo područje posvećeno je istraživanju sinteze novih organometalnih spojeva među kojima veliku pozornost imaju derivati ferocena (4).

1.1. Ferocen

1.1.1. Otkriće i svojstva ferocena

Otkriće ferocena sredinom 20. stoljeća otvorilo je put značajnim interdisciplinarnim istraživanjima. Danas se koriste u katalizi, nelinearnoj optici, organskoj sintezi, elektrokemiji i raznim drugim područjima. Feroceni imaju jedinstvenu strukturu u kojoj se nalazi atom željeza između dva ciklopentadienska prstena (Slika 1.). Atomi čine trodimenzionalni sustav.



Slika 1. Strukturna formula ferocena

Feroceni posjeduju tri izvanredna svojstva: stabilnost do 400 °C, reaktivnost kao superaromatski elektrofilni i blagu i reverzibilnu oksidaciju pri oko +0,4 V. Također, dobro su topljivi u vodi i stabilni na zraku. Reaktivnost ferocena omogućila je sintezu vrlo korisnih derivata s velikim brojem liganada, posebno je velik broj ferocenilfosfina. Iako su najpoznatije reakcije ferocena elektrofilne i reverzibilne oksidacije, reakcije izmjene liganda su također česte. Izmjena jednog ferocenskog prstena s aromatskom skupinom lako je izvediva u prisutnosti jake Lewisove kiseline (5).

1.1.2. Medicinska primjena derivata ferocena

Temeljne osobine stanica raka su narušavanje morfologije i funkcije stanica pogođenih tkiva, organa i organizma u cijelosti (2). U liječenju malignih bolesti potrebno je postići visoku terapijsku učinkovitost na maligne stanice, a nisku toksičnost za zdrave stanice. Noviji pristup u liječenju tumora upotreba je molekula s više biološki aktivnih skupina koje ciljano utječu na mehanizme preživljavanja tumorskih stanica. Isto tako, potrebno je da se isti odlikuju i svojstvima poput strukturne fleksibilnosti. Ovim zahtjevima udovoljavaju metaloceni, čija je biološka učinkovitost dala poticaj za istraživanjem organometalnih spojeva (4).

Prvi, na ferocenu zasnovan lijek koji se i danas koristi u kliničkoj praksi, je natrijeva sol karboksibenzoilferocena. Namijenjen je liječenju patoloških promjena krvotvornog sustava uzrokovanim insuficijencijom željeza. Dokazana je i njegova niska toksičnost u kombinaciji s drugim niskotoksičnim derivatima ferocena što je obećavajući čimbenik u istraživanju novih lijekova (6).

Ferocen je kemijski i biološki zanimljiv zato što je neutralna, kemijski stabilna i netoksična molekula. Mnogi ferocenilni spojevi pokazuju citotoksičnost, protutumorsku, antimalarijsku i antifungalnu aktivnost, kao i učinak na cijepanje DNA (4). Ono što je dovelo do razvoja biološki aktivnih spojeva zasnovanih na ferocenima jesu njihova relativna stabilnost u vodenom mediju i niska *in vivo* toksičnost njihovih derivata (7).

Rezultati istraživanja su pokazali da ferocifeni inhibitorno djeluju i na hormonski ovisne i neovisne stanice raka dojke, koji je najčešći rak u ženskoj populaciji (4). Prisutnost hormonskog receptora na stanicama značajno povećava vjerojatnost učinkovitosti hormonske terapije. U novijim istraživanjima primjenjuju se konjugati ferocena. Konjugati su u istraživanju pokazali veću antiproliferativnu aktivnost za hormonski ovisne i neovisne stanične linije karcinoma dojke. Također, citotoksični učinak usporediv je s konvencionalno dostupnim lijekom kao što

je tamoksifen (8). Ferocenil, osim antitumorskog djelovanja, ima i druge terapijske učinke, od kojih je jedno antimalarijsko (9).

Nadalje, ferocenilni derivati topljivi u vodi privukli su pažnju znanstvenika i farmaceuta zbog veće antikancerogene aktivnosti spram nekih spojeva netopljivih u vodi. Ovaj učinak rezultat je bolje topljivosti ferocena i vezanja za molekule. Zbog toga su se istraživanja usmjerila na sintezu ferocenskih konjugata u kojima je bioaktivna tj. ferocenska jedinica kovalentno vezana na poliaspartamid koji je topljiv u vodi. Konjugati su ispitivani na staničnim kulturama karcinoma vrata maternice (HeLa) i stanicama raka debelog crijeva (Colo 205). Rezultati su pokazali učinkovitost većine konjugata na obje stanične linije (4).

Stalno se povećava broj znanstvenih radova koji opisuju rezultate istraživanja bioloških učinaka metalocena i njihovih derivata zbog njihovih svojstava stabilnosti u biološkom mediju, redoks aktivnosti, lipofilnosti, lakog prolaska kroz staničnu membranu, niske toksičnosti, njihove reakcije s biološkim supstratima, varijabilnosti kemijskih izmjena i komercijalne dostupnosti. Derivati ferocena koriste se i kao amperometrički biosenzori za proteine i DNA probe zbog njihove visoke stope izmjene elektrona, niskog redoks potencijala i kemijske stabilnosti reduciranog (ferocen) i oksidiranog (ferocerij) oblika. Elektrokemijska detekcija je vrlo jeftina i visoko osjetljiva analitička metoda. Posljednjih nekoliko godina istraživani su derivati ferocena koji sadrže aminokiseline, peptide, šećere i steroide (6).

Rezultati istraživanja mehanizama djelovanja ferocena pokazali su kako njihova aktivnost ovisi o oksidacijskom stanju željeza. Uočeno je kako su derivati ferocena sa željezom u fero-obliku (Fe^{2+}) aktivniji od onih sa željezom u feri-obliku (Fe^{3+}). Također, rezultati studija pokazuju kako se oksidacijom Fe^{2+} kompleksa stvaraju reaktivni kisikovi radikali kao što je hidroksil, koji je odgovaran za protutumorsku aktivnost kroz stvaranje radikalnih metabolita odgovornih za biološka oštećenja u stanicama raka (4).

1.2. Leukemije

Krv se sastoji od krvne plazme i krvnih stanica: eritrocita, leukocita i trombocita. Sve krvne stanice nastaju od pluripotentne hematopoetske matične stanice uzastopnim diobama koju prati diferencijacija. Postoje dvije glavne leukocitne loze, limfocitna i mijeloična. Od limfocitne loze nastaju limfociti, a od mijeloične loze polimorfonuklearni bazofili, neutrofilni, eozinofili i mononuklearni monociti (10). Leukemija je maligno stanje karakterizirano prekomjernom proizvodnjom nezrelih ili abnormalnih leukocita. Porast broja nezrelih leukocita dovodi do

supresije sinteze normalnih krvnih stanica i rezultira simptomima pancitopenije (11). Pancitopenija uključuje anemiju, leukopeniju, te trombocitopeniju što označava smanjenje broja svih krvnih stanica, a neki od simptoma su: groznica, umor, gubitak tjelesne težine, hepatosplenomegalija, krvarenje (12). Maligna transformacija se obično događa u pluripotentnoj matičnoj stanici. Nekontrolirana proliferacija, smanjena apoptoza, te klonska ekspanzija dovode do zamjene normalnih krvnih stanica zloćudnim stanicama (11). To se događa kada se ošteti DNA nezrelih krvnih stanica, uglavnom leukocita. Leukemija, kao i drugi karcinomi, sadrži subpopulaciju stanica koje pokazuju karakteristike matičnih stanica i koje održavaju rast tumora (13).

Postoje četiri glavna tipa leukemije (14):

- akutna mijeloična leukemija (AML);
- kronična mijeloična leukemija (KML);
- akutna limfocitna leukemija (ALL);
- kronična limfocitna leukemija (KLL).

1.2.1. Akutna i kronična mijeloična leukemija

AML označava klonalnu malignost hematopoetskog prekursora mijeloične leukocitne loze. Karakterizirana je akumulacijom slabo diferenciranih mijeloičnih stanica u koštanoj srži i krvi. Oslabljen proces normalne hematopoeze dovodi do pancitopenije (15). Odrasle osobe obično imaju sporiji progresivni klinički tijek. Temelj dijagnoze AML čini citomorfologija i citokemija stanica koštane srži. U posljednjem desetljeću se u dijagnostici AML koristi imunofenotipizacija koja je obično provedena citogenetikom, protočnom citometrijom te molekularnim markerima (16).

KML je mijeloproliferativna, progresivna i vrlo često fatalna bolest. Karakteristika je stečena kromosomska translokacija poznata kao Philadelphia (Ph) kromosom koja je uzrok nastanka bolesti (17). Ph kromosom prisutan je u 90 do 95 % slučajeva kronične mijeloične leukemije. Ph kromosom nastaje recipročnom translokacijom između kromosoma 9 i kromosoma 22, t(9; 22). Tijekom translokacije, dio kromosoma 9 koji sadrži onkogen ABL premješten je na kromosom 22 i spojen s BCR genom. Novonastali kimerni fuzijski gen BCR-ABL odgovoran je za proizvodnju onkoproteina BCR-ABL tirozin kinaze koji ima nekontroliranu aktivnost tirozin kinaze koja štiti leukemijske stanice od apoptoze (11). Ph kromosom u većini slučajeva

se ne nasljeđuje nego nastaje nakon oplodnje u krvotvornom tkivu (18). Takvi pacijenti se liječe tirozin kinaznim inhibitorima (19).

1.2.2. Akutna i kronična limfocitna leukemija

ALL je druga najčešća leukemija u odraslih, čija karakteristika su kromosomske nepravilnosti i genetske promjene koje su uključene u diferencijaciju i proliferaciju limfoidnih prekursorskih stanica. U odraslih se u 75 % slučajeva razvija iz prekursora B-stanica, a ostatak slučajeva od prekursora T-stanica. Identifikacija genetskih promjena pomogla je u poboljšanju prognoze. U terapiji se koristi vinkristin, kortikosteroidi i antraciklini s alogenskom transplantacijom matičnih stanica (20). U jednoj podskupini ALL, B-ALL, postoji translokacija između kromosoma 8 i 14 t(8; 14) koja dovodi do aktivacije onkogena c-myc. U nekih bolesnika je prisutan i Ph kromosom (18).

KLL je najčešća vrsta leukemija u zapadnom svijetu i uglavnom pogađa osobe starije životne dobi. Bolest ima promjenjiv klinički tijek što rezultira nepredvidivim vremenom preživljavanja. U 70 % slučajeva otkrije se rutinskim pregledom krvi, a neki od simptoma mogu biti infekcija, anemije, limfadenopatija. U terapiji se koristi kemoterapija s ciklofosfamidom i rituksimabom, ciljane terapija te suportivna terapija (21). Potrebno je uzeti u obzir i mogućnost liječenja alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (11).

2. HIPOTEZA

Polazna pretpostavka bila je da skupina novosintetiziranih derivata ferocena u određenim koncentracijama pokazuje citotoksično djelovanje na leukemijske stanice koje rastu *in vitro*.

3. CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj novih derivata ferocena na rast leukemijskih stanica u uvjetima *in vitro*; te ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Derivati ferocena

Derivati ferocena pripremljeni su u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U svrhu *in vitro* istraživanja derivati ferocena otopljeni su u DMSO-u i čuvani kao koncentrirane (1×10^{-2} mol/l) (M) otopine. Stanične linije tretirane su derivatima ferocena u koncentracijama 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M. Svi testovi rađeni su u triplikatu.

4.1.2. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

- RPMI 1640, CAPRICORN SCIENTIFIC FBS;
- GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija);
- natrijev piruvat, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija);
- glutamin, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija);
- HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonskakiselina), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD);
- MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5 difeniltetrazolium bromid), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD);
- Antibiotic Antimycotic Solution (100X), Sigma;
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide, 98 %, ACROS ORGANICS;
- DMSO, dimetilsulfoksid 99,8 %, Acros organics (New Jersey, SAD);
- SDS (natrij dodecil sulfat), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD);
- HCL (klorovodična kiselina), Kemika (Zagreb, Hrvatska);
- 0,4 % otopine tripanskog plavila, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD).

4.1.3. Stanične linije

Derivati ferocena testirani su na leukemijskim staničnim linijama u suspenziji:

- K562 (ATCC® CCL243™) - limfoblasti kronične mijeloične leukemije;
- CCRFCM (ATCC® CCL119™) - stanice akutne limfoblastične leukemije;

- HL60 (ATCC® CCL240™) - stanice akutne premijeloidne leukemije;
- THP1 (ATCC® TIB202™) - stanice akutne monocitne leukemije.

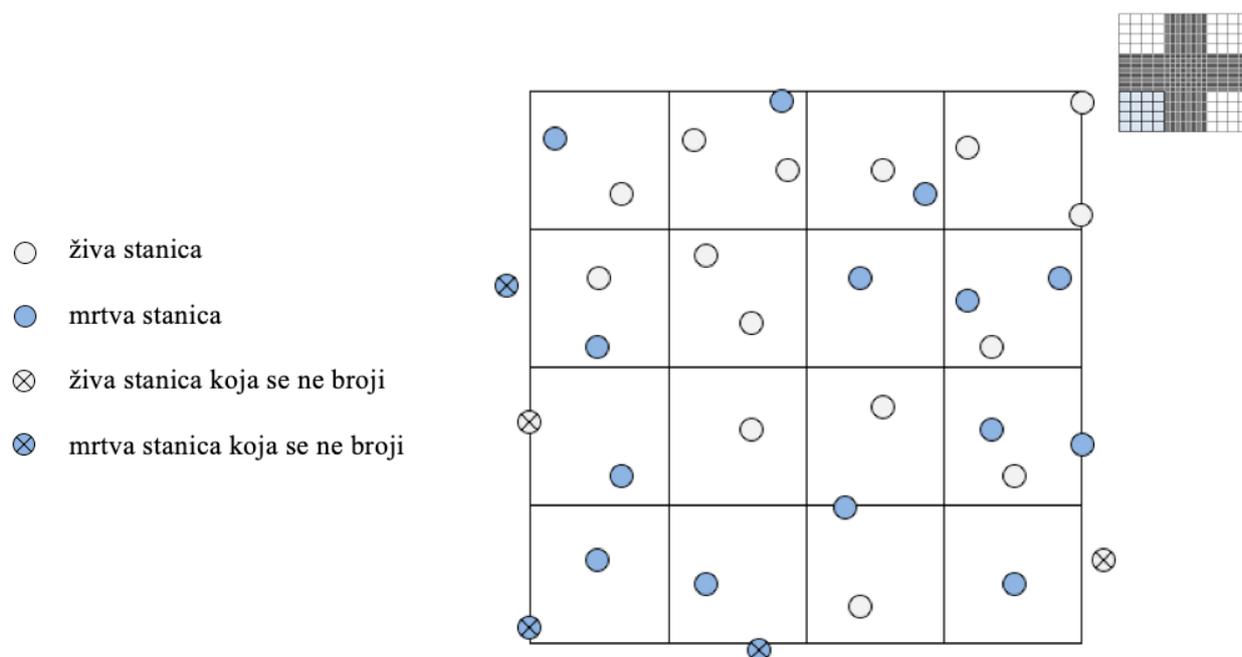
4.2. Metode

4.2.1. Uzgoj stanica *in vitro*

Stanične linije leukemija kultivirane su u RPMI 1640 mediju s 10 % FBS-om, 2 mM glutamina, 1 mM natrijevog piruvata i 10 mM HEPES-om, te su inkubirane u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri temperaturi od 37 °C i 5 % CO₂ uz visoku vlažnost.

4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Broj i vijabilnost stanica određeni su pomoću otopine tripanskog plavila, Bürker-Türkove komorice (Hirschmann em Techcolor) invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Mrtve stanice su bile plavo obojene zbog oštećene stanične membrane, dok žive stanice ostaju neobojene. Brojanje se vršilo unutar sva 4 kvadranta uključujući gornji i jedan medijalni ili lateralni postranični brid istog kvadranta (Slika 2.).



Slika 2. Skica stanica pod mikroskopom u jednom kvadrantu. Sliku je izradio autor.

Formula za određivanje živih stanica glasi:

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

N – broj stanica; 4 – broj kvadranta u komorici; 3 – faktor razrjeđenja.

4.2.3. Određivanje antiproliferativnih učinaka MTT testom

Antiproliferativna aktivnost derivata ferocena određena je kolorimetrijskim metiltetrazolijskim, MTT testom, gdje se mjerila aktivnost grupe enzima dehidrogenaza u živim stanicama (22). MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolij bromid) tetrazolij je test redukcije pogodan za primjenu na 96 jažica. Kako metabolizam mogu vršiti samo žive stanice, one imaju mogućnost stvaranja ljubičastog formazana, dok mrtve stanice s inaktivnim metabolizmom ne mogu. Pretpostavka je kako je mehanizam nastanka formazana od žutog MTT posljedica redoks reakcije prenošenja elektrona na MTT pomoću NADH ili drugih sličnih reducirajućih tvari. Formazan je netopljivi spoj koji je potrebno prije očitavanja apsorbancije solubilizirati, za čiju se svrhu može koristiti SDS, DMSO, kombinacija detergenata i organskog otapala. Novija metoda uključuje uporabu tetrazolijevih spojeva kojima nastaju formazanski spojevi koji su topljivi u vodi, čime sama metoda postaje praktičnija jer se izbjegava drugo dodavanje reagensa radi otapanja netopljivog spoja (23). Mitohondrijski enzim dehidrogenaza katalizira cijepanje tetrazolnog prstena pri čemu dolazi do promjene žute boje MTT u ljubičasto-crveni formazanprecipitat (22). Formazanski precipitat otopljen je pomoću 10 % SDS-u u 0,001 M HCL-a. Intenzitet nastalog obojenja izmjereno je na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 595 nm spektrofotometrijskom metodom. Intenzitet obojenja pokazuje proporcionalnost broju živih stanica s prethodnom kalibracijom metode (23).

Svi pokusi su izvedeni tri puta u triplikatu. Leukemijske stanice tretirane su s derivatima ferocena u koncentracijama od 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M kroz 72 sata. Stanice se uzgajaju na mikrotitarskim pločama s okruglim dnom u volumenu od 100 μ l suspenzije po jažici, od čega je 90 μ l suspenzija stanica koja se miješa s 10 μ l supstance u koncentraciji od 1×10^5 stanica/ml. Prvi dan stanice su nasadene na ploču te su aplicirani derivati ferocena i odrađena je inkubacija u trajanju od 72 sata. Nakon inkubacije dodano je 10 μ l MTT u svaku jažicu te je izvršena inkubacija u trajanju od 4 sata. Po isteku vremena inkubacije dodano je 100 μ l 10 %-tnog SDS-a u 0,01 M HCL-a. Ploča je inkubirana preko noći te su rezultati očitani na *readeru*.

4.2.4. Statistika

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Primijenjen je neparametrijski test Mann-Whitney uz statističku značajnost $p < 0,05$. Statistička analiza podataka obavljena je pomoću XLSTAT 2019 programa.

5. REZULTATI

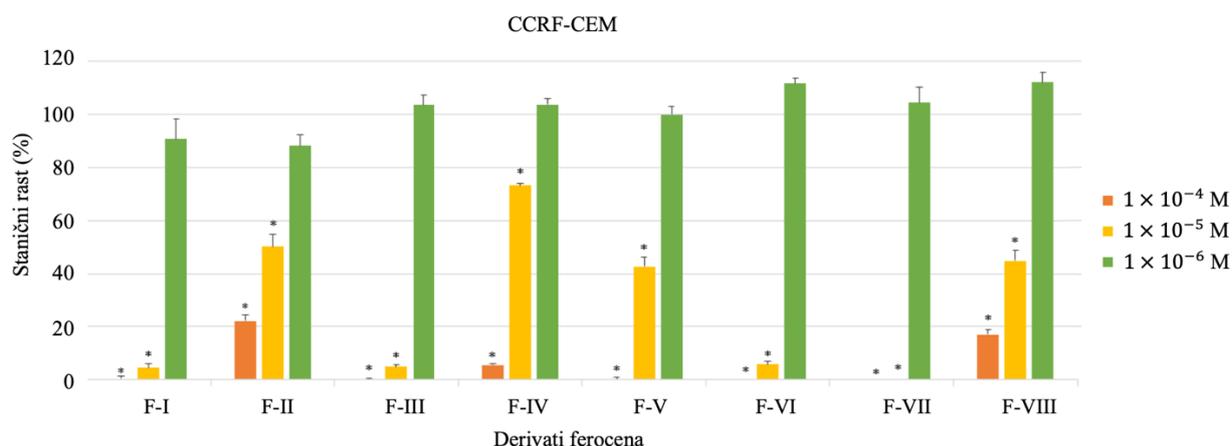
Antiproliferativna aktivnost osam derivata ferocena određena je kolorimetrijskim MTT testom na četiri leukemijske stanične linije: K562, CCRF-CEM, HL-60 i THP1. Pokus je izveden u triplikatu u koncentracijama od 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M kroz 72 sata. Podatci su prikazani u obliku grafa kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija (\pm SD) za tri neovisna mjerenja. Rezultati su dobiveni pomoću neparametrijskog Mann-Whitney testa uz statističku značajnost $p < 0,05$.

5.1. Učinci derivata ferocena na stanice CCRF-CEM

Statistički značajno inhibicijsko djelovanje na rast stanične linije CCRF-CEM ostvarili su derivati **F-I**, **F-III**, **F-V**, **F-VI** i **F-VII** u koncentraciji 1×10^{-4} M s 99 %-tnim inhibicijskim učinkom. Derivati **F-II** i **F-VIII** pokazali su 80 %-tni inhibicijski učinak, dok je derivat broj **F-IV** inhibirao rast stanica za 95 % (Slika 3.).

Pri koncentraciji od 1×10^{-5} M derivat **F-VII** ostvario je 99 %-tni inhibicijski učinak, dok su derivati **F-I**, **F-III** i **F-VI** ostvarili 95 %-tnu inhibiciju staničnog rasta. Derivati **F-II**, **F-V** i **F-VIII** nešto su slabije inhibirali stanični rast (55 %). Derivat **F-IV** ostvario je najslabiji inhibicijski učinak od 25 % (Slika 3.).

Derivati **F-III**, **F-IV**, **F-V**, **F-VI**, **F-VII** te **F-VIII** nisu ostvarili inhibicijski učinak pri koncentracijama 1×10^{-6} M. Derivati **F-I** i **F-II** pri istoj koncentraciji pokazuju inhibicijski učinak od 10 % (Slika 3.).



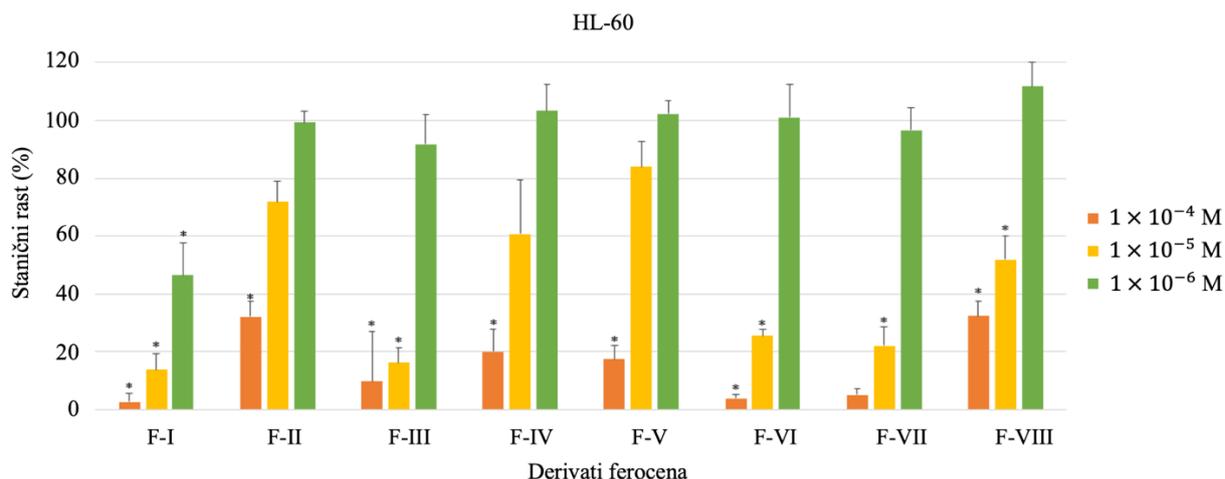
Slika 3. Antiproliferativni učinak osam derivata ferocena na staničnu liniju CCRF-CEM. Stupci su aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; * označava statistički značajnu p vrijednost, $p < 0,05$

5.2. Učinci derivata ferocena na stanice HL-60

Derivati **F-I**, **F-III**, **F-VI** i **F-VII** ostvarili su statistički značajan inhibicijski učinak na HL-60 staničnu liniju pri koncentraciji 1×10^{-4} M koji iznosi 97 %, dok derivati **F-IV** i **F-V** ostvaruju inhibicijski učinak od 80 % pri jednakim koncentracijama. Derivati **F-II** i **F-VIII** pokazuju za oko 70 % inhibiciju na rast HL-60 stanične linije (Slika 4.).

Pri koncentraciji 1×10^{-5} M derivati **F-I**, **F-III**, **F-VI**, i **F-VII** pokazuju naj snažnije inhibicijsko djelovanje na rast stanične kulture HL-60 koji iznosi 80 %. Derivati **F-IV** i **F-VIII** ostvarili su inhibicijski učinak od oko 45 % dok derivati **F-II** i **F-V** inhibiraju oko 20 % staničnog rasta pri istoj koncentraciji (Slika 4.).

Stanice su se pokazale neosjetljive na najnižu primijenjenu koncentraciju 1×10^{-6} M, te pokazuju rast veći od 100 % HL-60 stanica. Izuzetak je ostvaren u primjeru derivata **F-I** gdje je pri jednakoj apliciranoj koncentraciji ostvaren statistički značajan inhibicijski učinak od 57 % (Slika 4.).



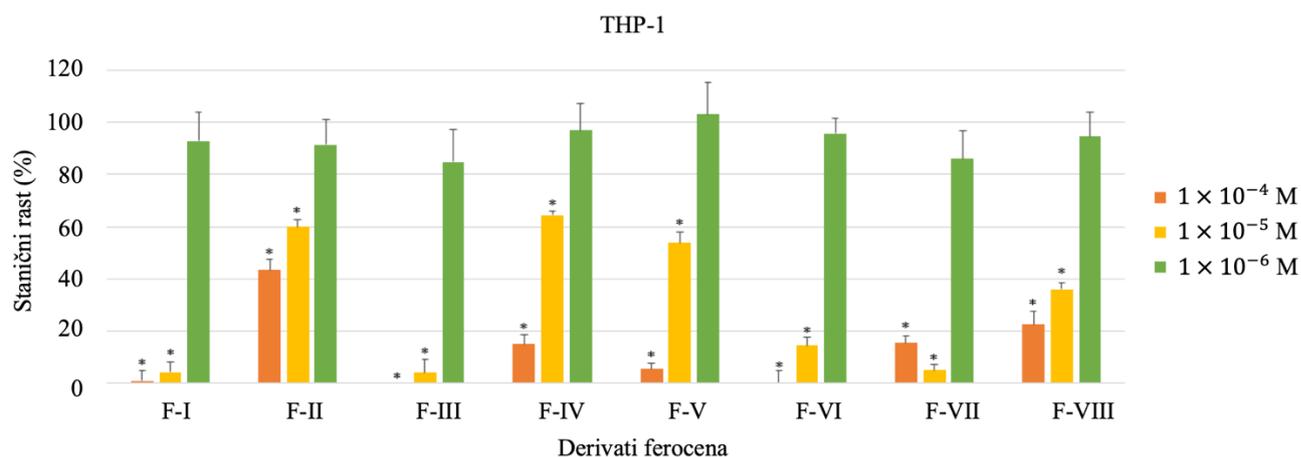
Slika 4. Antiproliferativni učinak osam derivata ferocena na staničnu liniju HL-60. Stupci su aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; * označava statistički značajnu p vrijednost, $p < 0.05$

5.3. Učinci derivata ferocena na stanice THP-1

Pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji od 1×10^{-4} M, derivati **F-I**, **F-III**, **F-V** i **F-VI** ostvarili su statistički najveći inhibicijski učinak od 95 %. Derivati **F-IV**, **F-VII** te **F-VIII** pokazuju inhibiciju od 80 % na THP-1 staničnu liniju pri istoj koncentraciji, dok derivat **F-II** pokazuje najmanji inhibicijski učinak od 58 % (Slika 5.).

Derivati **F-I**, **F-III**, **F-VI** i **F-VII** ostvarili su najsnažniju inhibiciju rasta tretiranih stanica od 95 % pri koncentraciji od 1×10^{-5} M. Derivat **F-VIII** pokazuje statistički značajnu inhibiciju od 62 % dok derivati **F-II**, **F-IV** i **F-V** ostvaruju najmanju inhibiciju od 40 % na rast THP-1 stanične linije pri istoj apliciranoj koncentraciji (Slika 5.).

Stanice su se pokazale relativno neosjetljive pri koncentraciji 1×10^{-6} M te je ostvaren stanični rast veći od 90 % (Slika 5.).



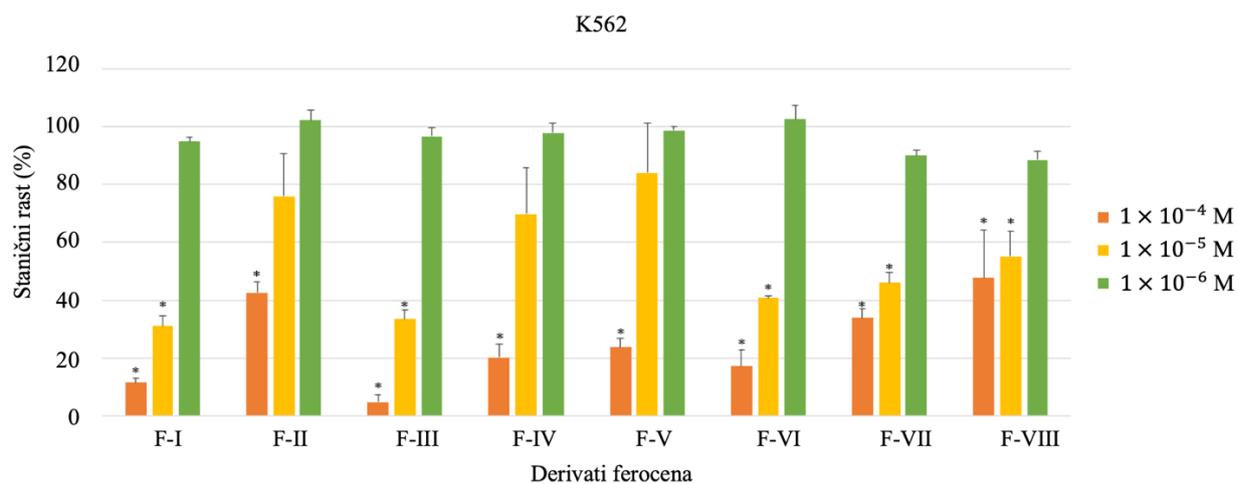
Slika 5. Antiproliferativni učinak osam derivata ferocena na staničnu liniju THP1. Stupci su aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; * označava statistički značajnu p vrijednost, $p < 0.05$

5.4. Učinci derivata ferocena na stanice K562

Statistički značajan inhibicijski učinak na rast stanične linije K562 pri koncentraciji 1×10^{-4} M ostvarili su derivati **F-I** i **F-III** u iznosu od 90 %. Derivati **F-IV**, **F-V** i **F-VI** pokazuju slabiju inhibiciju od 80 % pri istoj koncentraciji, dok derivati **F-II**, **F-VII** i **F-VIII** inhibiraju 60 % rasta K562 stanične linije (Slika 6.).

Pri koncentraciji od 1×10^{-5} M derivati **F-I**, **F-III** i **F-VI** ostvarili su statistički značajan inhibicijski učinak od 65 %. Derivati **F-VII** i **F-VIII** pokazuju inhibiciju staničnog rasta od 47 %, dok derivati **F-II**, **F-IV** i **F-V** pokazuju najmanju inhibiciju na rast stanične linije od 25 % (Slika 6.).

Derivati primijenjeni u koncentraciji 1×10^{-6} M nisu ostvarili inhibicijski učinak (Slika 6.).



Slika 6. Antiproliferativni učinak osam derivata ferocena na staničnu liniju K562. Stupci su formirani od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; * označava statistički značajnu p vrijednost, $p < 0.05$

6. RASPRAVA

Biološki učinci novosintetiziranih derivata ferocena se danas intenzivno istražuju u svrhu liječenja raznih malignih oboljenja. U ciljanoj terapiji protiv raka prostate djelotvornima su se pokazali konjugati ferocena s antiandrogenima, koji vezanjem za testosteronski receptor sprječavaju vezanje endogenog testosterona i njegovog metabolita dihidrotestosterona te time sprječavaju poticanje malignog rasta (24). Nova skupina spojeva koji sadrže ferocen sintetizirana je na osnovi MNK1/2 kinaznih inhibitora. MNK 1 i 2 kinaze integriraju signale iz raznih signalnih puteva kao što su RAS, p38MAPK signalni put te vrše fosforilaciju eukariotskog faktora inicijacije eIF4E koji je ključan regulator u procesu translacije. Uočeno je kako je fosforilacija eIF4E povezana s lošijim kliničkim ishodom karcinoma dojke u uznapredovanom stadiju te kako selektivna inhibicija MNK kinaza može utjecati na smanjenje onkogenog signaliziranja. Neki spojevi pokazali su smanjenje stanične vitalnosti u staničnim linijama AML-e, MOLM-13 i MV-4-11, s vrijednostima IC_{50} od 5,39 μ M, odnosno 9,72 μ M (25). Primjena ferocenijskih soli koje su visoko topljive u vodi, poput ferocenijska klorferata $[Cp_2Fe]^+[FeCl_4]^-$, pokazala je protutumorsko djelovanje u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom. Primjena soli ferocena uzrokovala je preživljenje 83 % životinja i produžila im životni vijek za 380 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Za razliku od ferocenijskih soli, primjena slabo topljivog ferocena, u kombinaciji s propilen glikolom u miševa s EAT, nije pokazala protutumorsko djelovanje. Konjugati ferocena s azolima, uključujući imidazol i adenin, pokazuju visoku aktivnost protiv solidnih tumora. Primjena derivata *in vitro* na staničnoj liniji humanog karcinoma pluća u obliku konjugata s peptidima pokazala je IC_{50} vrijednost manju od 10 mM koja i nije značajna (24).

Nadalje, derivat ferocena, 2-ferocenil-1,1-difenilbut-1-en, pokazao je selektivan citotoksičan učinak na staničnoj liniji humanog glioblastoma (SF-295), staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva (HCT-8) i staničnoj liniji akutne promijelocitne leukemije (HL-60) nakon 72 sata bez utjecaja na zdrave humane stanice. Navedeni ferocenski derivat potiče stanicu na apoptozu zaustavljajući stanični ciklus u G0/G1 fazi staničnog ciklusa, nakon kojeg je uočen velik broj stanica s fragmentiranom DNA (26).

Rezultati istraživanja antiproliferativne učinkovitosti novih derivata ferocena na različite leukemijske stanične linije potvrdili su sposobnost molekula koje u sebi sadrže ferocensku jezgru da inhibiraju rast tumorskih stanica u rasponu koncentracija od 1×10^{-5} do 1×10^{-4} M. Podatci dobiveni u ovome radu pokazuju isto tako inhibiciju rasta HL-60 stanica nakon

izlaganja testiranih derivatima ferocena (Slika 4.). Stanice su se pokazale neosjetljive jedino na najnižu primijenjenu koncentraciju 1×10^{-6} M, osim derivata **F-I** gdje je pri istoj apliciranoj koncentraciji ostvaren statistički značajan inhibicijski učinak od 57 % (Slika 4.).

Nedavno je sintetizirana serija novih hibrida na bazi 1,2,4-trioksana koji sadrže egonol i/ili ferocenske fragmente sintetizirana i testirana *in vitro* protiv sojeva *Plasmodiuma falciparuma* te stanica CCRF-CEM. Ovi spojevi pokazali su jak protutumorski i antimalarijski učinak. Druga generacija novih hibridnih spojeva 7 (1,2,4-trioksan-ferocen-egonol), 9 (1,2,4-trioksan-ferocen) i 11 (artesusna kiselina-egonol) pokazala je citotoksičnost prema CCRF-CEM stanicama s IC_{50} vrijednošću od 0,07 μ M, 0,25 μ M i 0,18 μ M (27). Ispitivani derivati ferocena u ovoj studiji također su inhibirali rast stanica CCRF-CEM (Slika 3.).

Važno je naglasiti da se feroceni mogu aplicirati u obliku soli ili konjugata te mogu ciljati različite dijelove stanice uključujući stanične receptore, DNA molekulu ili djelovati na enzim topoizomerazu.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- pri koncentracijama derivata ferocena od 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M ostvaruje se antiproliferativan učinak na staničnim linijama;
- sve korištene stanične linije pri aplikaciji najniže koncentracije od 1×10^{-6} M pokazale su se neosjetljive u ovom pokusu;
- najznačajnije inhibicijsko djelovanje na rast stanične linije CCRF-CEM pokazuje derivat **F-VII** u koncentraciji od 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M s 99 %-tnim inhibicijskim učinkom;
- na staničnu liniju HL-60 derivati **F-I**, **F-III**, **F-VI**, i **F-VII** pokazuju inhibicijski učinak u koncentraciji od 1×10^{-4} M s 97 %-tnom inhibicijom, a pri koncentraciji od 1×10^{-5} M pokazuju 80 %-tnu inhibiciju;
- derivati **F-I**, **F-III**, **F-V** i **F-VI** u staničnoj liniji THP-1 pri koncentracijama 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M pokazuju 95 %-tni inhibitorni učinak;
- na staničnoj liniji K562 derivati ferocena pokazali su najmanji inhibicijski učinak pri svim apliciranim koncentracijama, a najznačajniji inhibitorni učinak pokazali su derivati **F-I** i **F-III** s 90 %-tnom inhibicijom pri koncentraciji 1×10^{-4} M te 65 %-tnom inhibicijom pri koncentraciji od 1×10^{-5} M;
- ostaje za istražiti mehanizam djelovanja ispitivanih novih derivata ferocena.

8. SAŽETAK

UVOD: Rak je bolest koju karakteriziraju nekontrolirana stanična proliferacija i sposobnost širenja na druge stanice i tkiva. Primjena ferocena aktivno je područje istraživanja, a izvješća pokazuju *in vitro* i *in vivo* aktivnosti protiv različitih bolesti, a područje najvećega interesa su maligne bolesti.

CILJ: Ispitati utjecaj novih derivata ferocena na rast leukemijskih stanica u uvjetima *in vitro*. Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta.

MATERIJAL I METODE: Korištene su četiri stanične leukemijske linije u triplikatu: K562, CCRF-CEM, HL60 i THP1 koje su tretirane u koncentracijama 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M novo-sintetiziranih derivata ferocena. Antiproliferativna aktivnost određena je MTT testom nakon izlaganja stanica derivatima ferocena kroz 72 sata.

REZULTATI: Najznačajniji citotoksični učinak derivati ferocena na svim staničnim linijama ostvaruju pri apliciranoj koncentraciji od 1×10^{-4} M, a najmanji pri koncentraciji od 1×10^{-6} M.

ZAKLJUČAK: Novi derivati ferocena sposobni su inhibirati rast leukemijskih staničnih linija. Ostaje za istražiti mehanizam djelovanja ispitivanih novih derivata ferocena.

KLJUČNE RIJEČI: derivati ferocena, feroceni; leukemija; stanična kultura.

9. SUMMARY

ANTITUMOR EFFECTS OF NEW FERROCENE DERIVATIVES ON *IN VITRO* LEUKEMIA CELLS

INTRODUCTION: Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation and the ability to spread to other cells and tissues. The application of ferrocene is an active area of research, and reports show *in vitro* and *in vivo* activities against various diseases, while the area of greatest interest is malignant diseases.

OBJECTIVE: To investigate the effect of new ferrocene derivatives on the growth of leukemic cells *in vitro*. To establish an association between the structure and concentration of new compounds and growth inhibition.

MATERIAL AND METHODS: Four cell leukaemia lines in triplicate were used as listed: K562, CCRF-CEM, HL60 and THP1 treated at concentrations of 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M and 1×10^{-6} M newly synthesized ferrocene derivatives. Antiproliferative activity was determined by MTT assay after exposure of cells to ferrocene derivatives for 72 hours.

RESULTS: The most significant cytotoxic effect of ferrocene derivatives on all cell lines is achieved at an applied concentration of 1×10^{-4} M and the smallest at a concentration of 1×10^{-6} M.

CONCLUSION: New ferrocene derivatives appear to be able to inhibit the growth of leukemic cell lines. It remains to investigate the mechanism of action of the investigated new ferrocene derivatives.

KEYWORDS: ferrocene derivatives, ferrocenes; leukaemia; cell culture

10. LITERATURA

- (1) Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- (2) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- (3) Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. 5. preuređeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- (4) Fouda MFR, Abd-Elzaher MM, Abdelsamaia RA, Labib AA. On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*. 2007;21(8):613 – 625.
- (5) Astruc D. Why is Ferrocene so Exceptional? *Wiley Online Library. EurJIC*. 2016;2017(1):6-29.
- (6) Babin V, Belousov Y, Borisov V, Gumenyuk V, Nekrasov Y, Ostrovsckaya. Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses. *Russian Chemical Bulletin*. 2014;63(11):2405-2422.
- (7) Jadhav J, Juvekar A, Kurane R, Khanapure S, Salunkhe R, Rashinkar G. Remarkable anti-breast cancer activity of ferrocene tagged multi-functionalized 1,4-dihydropyridines, *Eur. J. Med. Chem*. 2013;65:232 - 239.
- (8) Carmona-Negron JA, Santana A, Rheingold AL, Melendez E. Synthesis, structure, docking and cytotoxic studies of ferrocene-hormone conjugates for hormone-dependent breast cancer application. *Dalton Transaction*. 2019;48:5952-5964.
- (9) Kumar K, Pradines B, Madamet M, Amalvict R, Benoit N, Kumar V. 1H-1,2,3-triazole tethered isatin-ferrocene conjugates: Synthesis and in vitro antimalarial evaluation. *Eur J Med Chem*. 2014 Nov 24;87:801-4.
- (10) Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
- (11) Emandi A, York Law JYL. Overview of Leukemia. 2018. *MSD Manual Professional Version*. Dostupno na adresi: <https://www.msdmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/leukemias/overview-of-leukemia>
Datum pristupa: 30. 4. 2020.
- (12) Jalaiekhoo H, Kashfi SMH, Azimzadeh P, Narimani A, Moghadam KG, Rajaienejad M i sur. Acute Myeloid Leukemia as the Main Cause of Pancytopenia in Iranian Population. *Iran J Pathol*. 2017;12(3):265-27.

- (13) Healthline Media UK Ltd, Brighton, UK, a Red Ventures Company.
MedicalNewsToday. Leukemia: What you need to know. Dostupno na adresi:
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/142595.php>
Datum pristupa: 29. 4. 2020.
- (14) Columbia University Herbert Irving Comprehensive Cancer Center. Dostupno na adresi: https://cancer.columbia.edu/leukemia-classifications?fbclid=IwAR3rW5BGwwH2_SKRsXvcnbSN-P2LTSr_sx6bSfb2WsukddySUPbK5n3hdXE
Datum pristupa: 4. 5. 2020.
- (15) Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Manual of Medicine. 19. izd. UK: McGraw-Hill Education; 2016.
- (16) Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(4):1154-63.
- (17) Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Long-term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011;117(5):897-906.
- (18) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. Patofiziologija. 8. obnovljeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- (19) Planinc-Peraica A, Mandac Rogulj I. Kronična mijeloična leukemija, stručni rad. *Medix* 2012. Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/96001>
Datum pristupa: 30. 4. 2020.
- (20) Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;30;7(6):e577.
- (21) Ralston SH, Penman ID, Strachan MWJ, Hobson RP. Davidson's Principles and Practice of Medicine. 23. izd. Velika Britanija: Elsevier Science Ltd.; 2018.
- (22) Cell Proliferation Assay. Dostupno na adresi:
<https://www.atcc.org/~-/media/da5285a1f52c414e864c966fd78c9a79.ashx>
Datum pristupa: 4. 5. 2020.
- (23) Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. NCBI, Assay Guidance Manual. 2016. Dostupno na adresi:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#mttassays.Abstract>
Datum pristupa: 29. 4. 2020.
- (24) Ornelas C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *NJC*. 2011;35(10):1973-1985.

- (25) Sansook S, Lineham E, Hassell-Hart S, Tizzard G, Coles S, Spencer J, Morley S. Probing the Anticancer Action of Novel Ferrocene Analogues of MNK Inhibitors. *Molecules*. 2018;23(2126):1420-3049.
- (26) Cabral de Oliveira A, Gomes da Silva E, Damasceno Rocha D, Hillard EA, Pigeon P, Jaouen G, i sur. Molecular Mechanism of Action of 2-Ferrocenyl-1,1-diphenylbut-1-ene on HL-60 Leukemia Cells. *Chemmedchem*. 2014;9(11):2580-2586.
- (27) Reiter C, Capcı Karagöz A, Fröhlich T, Klein V, Zeino M, Viertel K, i sur. Synthesis and study of cytotoxic activity of 1,2,4-trioxane- and egonol-derived hybrid molecules against *Plasmodium falciparum* and multidrug-resistant human leukemia cells. *Eur J Med Chem*. 2014;21(75):403-12.

11. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME:

Dominik Seletković

DATUM I MJESTO RODENJA:

10. siječnja 1997., Osijek

OBRAZOVANJE:

2016. – danas Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2015. - 2020. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. - 2015. Opća gimnazija Osijek

2003. - 2011. Osnovna škola Ljudevita Gaja u Osijeku