

Proapoptotski učinak novih derivata ferocena na tumorske stanice in vitro

Kirchofer, Juraj

Master's thesis / Diplomski 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:152:447522>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Juraj Kirchofer

**PROAPOPTOTSKI UČINAK NOVIH
DERIVATA FEROCENA NA TUMORSKE
STANICE *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Juraj Kirchofer

**PROAPOPTOTSKI UČINAK NOVIH
DERIVATA FEROCENA NA TUMORSKE
STANICE *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentorica: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš – Obrovac

Broj listova : 35

Broj slika: 7

Broj tablica: 0

Broj literaturnih navoda: 46

Jezik izvornika: hrvatski

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Ljubica Glavaš - Obrovac
2. doc.dr.sc. Teuta Opačak - Bernardi
3. doc.dr.sc. Katarina Mišković - Špoljarić

Zahvala

U prvom redu zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš – Obrovac na pomoći tijekom pisanja diplomskog rada, ali i čitavog studiranja. Iskreno sam zahvalan na svakom savjetu, ukazanoj prilici, ali i poticaju da u svakoj prilici budem i težim najboljem mogućem. U svijetu znanosti, u prof. dr. sc. Ljubici Glavaš - Obrovac dobio sam najbolju moguću mentoricu i na tome sam neizmjereno zahvalan!

Posebno se zahvaljujem i dr.sc. Marijani Jukić mag. biol. na pomoći, potpori i stalnoj dostupnosti tijekom provedbe istraživanja, ali i pisanja rada.

Velika hvala svim profesorima, docentima, asistentima od kojih sam svakoga dana imao prilike učiti i razvijati se u akademskom svijetu.

Od srca hvala tetama iz referade, Mirjani i Sandi na svakoj pomoći, naknadno prijavljenom ispitu, ali iskrenoj brizi! Uljepšali ste mi svaki ulazak u referadu i srušili mit o loše raspoloženim tetama iz referade.

Sve godine studiranja ne bi imale smisla bez kvalitetnih kolega te im ovim putem želim zahvaliti što su preddiplomski i diplomski studij učinili zanimljivim, zabavnim i zdravo kompetitivnim.

Ovim putem se želim zahvaliti i svima koji su mi bili potpora tijekom preddiplomskog i diplomskog studija, a osobito roditeljima, braći i čitavoj obitelji koja je svakoga dana bila uz mene i bodrila me tijekom studiranja.

Posebnu zahvalu dugujem svojoj djevojci Bernardi, na svakom ohrabrenju, podršci, pomoći oko statističke problematike, ali i poticaju da budem bolji, kvalitetniji kao osoba, a potom i kao student.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Apoptoza	1
1.2. Autofagija.....	3
1.3. Feroceni.....	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE	8
4.1. Materijali	8
4.1.2. Stanične linije.....	8
4.1.3. Kemikalije	9
4.2. Metode.....	10
4.2.1. Rad sa staničnim kulturama	10
4.2.3. Određivanje apoptoze.....	10
4.2.5. Određivanje autofagije	11
4.2.6. Statistička obrada podataka	12
5. REZULTATI.....	13
5.1. Indukcija apoptoze i kasne apoptoze/nekroze	13
5.2. Određivanje autofagije	19
6. RASPRAVA.....	25
7. ZAKLJUČAK	27
8. SAŽETAK.....	28
9. SUMMARY	29
10. LITERATURA.....	30
11. ŽIVOTOPIS	35

POPIS KRATICA :

DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraoctena kiselina

PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) – fosfat puferirana fiziološka otopina

Bcl-2 (engl. *B-cell lymphom 2*) – B-stanični limfom 2

IAP (engl. *inhibitors of apoptosis proteins*) – inhibitor apoptoze

HbsAg (engl. *Hepatitis B surface antigen*) – površinski antigen hepatitisa B

DMSO (engl. *dimethyl sulfoxide*) – dimetil sulfoksid

DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – Dulbeccov modificirani Eagleov medij

FBS (engl. *fetal bovine serum*) – fetalni goveđi serum

PS (engl. *Phosphatidylserine*) – fosfatidil serin

PI (engl. *Propidium iodide*) – propidij jodid

AO (engl. *Acridine orange*) – akridin narančasto

ROS (engl. *reactive oxygen species*) – reaktivni kisikovi spojevi

MDR (engl. *multidrug-resistance*) – višestruka otpornost na lijekove

1. UVOD

Tumorske bolesti predstavljaju jedan od vodećih zdravstvenih problema i uzročnika smrtnosti u svijetu. One nastaju kao posljedica zagađenja okoliša, starenja svjetske populacije i kao takve golemi su teret zdravstvenim sustavima i društvu u cjelini. Prema podacima Europske statističke agencije u Europskoj Uniji 2016. godine registrirano je više od 1 milijun i 300 000 smrti kao posljedica tumorskih bolesti (1). Zbog navedenih razloga, sve je veća potreba za pronalaskom selektivnih protutumorskih lijekova koji bi djelovali toksično na tumorske stanice, a pritom imali minimalan utjecaj na zdrave stanice.

Razvoj i progresija tumora ovise o brojnim čimbenicima među kojima se ističu promjene u strukturi, funkciji gena i njihovih proteinskih produkata. Stanični ciklus normalnih stanica reguliran je brojnim genima koji se ubrajaju u skupine proto-onkogeni i tumor supresorskih gena. Njihova je zadaća da djeluju na različitim razinama kao što su stanični rast, proliferacija i diferencijacija stanice. Mutacije proto-onkogeni dovodi do povećanja funkcije genskih produkata koji uobičajeno potiču staničnu proliferaciju. Za razliku od njih, zadaća supresora tumora je da ograničavaju staničnu proliferaciju (progresija staničnog ciklusa, usmjeravanje stanice u apoptozu, održavanje stabilnosti genoma i niske razine mutacija). U slučaju njihove mutacije dolazi do nesmetane proliferacije stanica i nastanka tumora (2). Stanice imaju i najmanje tri druga sustava koji im pomažu u nesmetanoj proliferaciji stanica, a to su: sustav popravka deoksiribonukleinske kiseline, apoptoza i djelovanje telomeraza (3). U ovom radu promatrat će se proces apoptoze i moguće proapoptotsko djelovanje novosintetiziranih derivata ferocena.

1.1. Apoptoza

Apoptoza ili „programirana smrt stanice“ jedan je od mehanizama kojim stanica aktivno (uz utrošak energije) i sintezu određenih proteina pokreće vlastitu smrt kao dio fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja. Poremećaji u apoptozi dovode do nefunkcionalnih, mutiranih ili na bilo koji način oštećenih stanica koje izmaknu kontrolnim mehanizmima i pritom ne obavljaju svoju fiziološku funkciju. Prekomjerna aktivacija apoptoze može izazvati različite upalne procese, moždane i srčane udare, neurodegeneracije, dijabetes, dok premala ekspresija tih procesa može uzrokovati različite autoimune ili tumorske bolesti.

Zbog svega navedenog pravilan je tijek apoptotskih procesa ključan čimbenik za pravilno održavanje stanične homeostaze (4).

Tijekom apoptoze kromosomska deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) fragmentirana je zbog kidanja veza između nukleosoma. Dolazi do kondenziranja kromatina i raspadanja jezgre u male dijelove. U konačnici se stanica skupi i raspadne u komadiće okružene membranom koje nazivamo apoptotskim tjelešcima. Apoptotske stanice učinkovito se uklanjaju iz tkiva djelovanjem makrofaga (5).

Proučavanje razvoja i stanične smrti u primjeru *C. elegans* dovelo je do otkrivanja gena koji imaju ključnu ulogu u regulaciji i izvršavanju apoptoze. Za nesmetano odvijanje apoptoze nužna su 3 gena: *ced-3*, *ced-4* i *ced-9*. Ako je bilo koji od prva dva navedena gena inaktivan (*ced-3* i *ced-4*), izostat će normalan tijekom stanične smrti. Treći gen *ced-9* djeluje kao negativni regulator, što znači da njegova inaktivacija dovodi do umiranja zdrave stanice te njegova prekomjerna aktivnost dovodi do izostanka stanične smrti. Kod sisavaca su otkriveni geni koji su srodni navedenim genima i nose upute za sintezu proteina te predstavljaju efektore i regulatore apoptoze. *Ced-3* je prethodnik porodice koja sadržava desetine proteaza, koje su poznate pod nazivom kaspaze. Središnje je mjesto apoptoze proenzimska skupina cisteinskih proteaza (kaspaza). Kaspaze se nalaze u citoplazmi stanica te uništavaju esencijalne strukturne komponente, uključujući genski materijal stanice, induciraju različite procese uslijed kojih dolazi do bubrenja stanica, promjene membrana, fragmentacije DNA i na kraju stanične smrti. Kaspaze sadrže cisteinske ostatke na svojim aktivnim mjestima i kidaju proteinski supstrat na aspartatnim ostacima. Kaskadna aktivacija tih proteaza ključna je u genezi morfoloških i biokemijskih apoptotskih promjena. Kaspaze se sintetiziraju kao inaktivne preteče, a pretvaraju se u svoj aktivni oblik pomoću proteolitičkog kidanja, koji je kataliziran od strane drugih kaspaza. Aktivacija početne kaspaze započinje lančanu reakciju koja je potaknuta aktivacijom dodatnih kaspaza koje dovode do smrti stanice (5).

Kod apoptoze razlikujemo unutarnji i vanjski apoptotski put. Vanjski put uključuje receptore smrti ili izravno djelovanje enzima citotoksičnih T-limfocita (perforin, granzim B), dok se unutrašnji put još naziva i mitohondrijski put (4). Sisavci nose uputu za sintezu porodice antiapoptičkih proteina B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphom 2*, Bcl-2) koja je srodna s *Ced-9*. Neki članovi Bcl-2 porodice djeluju kao inhibitori (antiapoptički), dok drugi potiču (proapoptički) aktivaciju kaspaza i staničnu smrti. Kaspaze reguliraju i porodice proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitors of apoptosis proteins*, IAP) koji koče apoptozu, tj. aktivnost kaspaza. Članovi porodice Bcl-2 djeluju u mitohondrijima i imaju središnju ulogu u nadzoru apoptoze. Jedna od glavnih početnih kaspaza naziva se kaspaza-9, koja se aktivira kao

i *Ced-3* u *C. elegans*, stvarajući kompleks s apoptičkim proteaznim aktivacijskim čimbenikom 1 (engl. *apoptose protease activation factor 1*, APAF-1) koji je homolog *Ced-4*. Za nastanak kompleksa bitan je i citokrom c, koji se otpušta iz mitohondrija kao odgovor na podražaje (oštećenje DNA, manjak čimbenika rasta). U citosolu se citokrom c veže na Apaf-1 koji potiče nastanak kompleksa Apaf-1/kaspaza-9 (apoptosom) i takva aktivirana kaspaza-9 dovodi do aktiviranja ostalih kaspaznih reakcija, što u konačnici dovodi do stanične smrti (5).

Do danas je već poznat velik broj vanjskih i unutarnjih čimbenika koji dovode do pojave apoptoze. Poznavanje tih čimbenika (vanjskih i unutarnjih) i mehanizama apoptotskih procesa otvara potpuno nove mogućnosti u liječenju teških i u ovom trenutku neizlječivih bolesti.

1.2. Autofagija

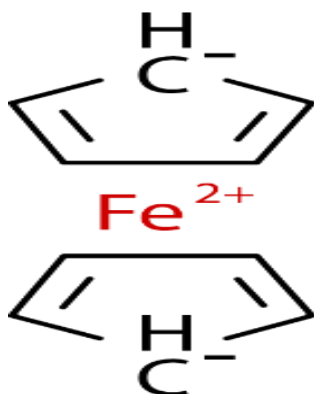
Uz apoptozu, bitan proces u stanicama koji će se također promatrati u sklopu ovog rada je i autofagija (autofagocitoza). Autofagija je osnovni katabolički mehanizam u kojem se odvija razgradnja nepotrebnih ili nefunkcionalnih staničnih dijelova. Autofagija pripada neapoptičkom mehanizmu programirane stanične smrti, a najčešće se pokreće prilikom nedostatka hranjivih tvari. U procesu autofagije dolazi do razgradnje organela i staničnih proteina koji se zatim upotrebljavaju za osiguravanje energije za nužne stanične funkcije. Autofagija može biti alternativa apoptozi kada je apoptoza onemogućena (6). Određeni dijelovi citoplazme izolirani su od ostatka stanice unutar vezikula s dvostrukom membranom – autofagosomima. Autofagosom se spaja s lizosomom i tako se njegov sadržaj reciklira i razgrađuje.

Autofagiju dijelimo na tri tipa definirana na temelju morfoloških razlika: mikroautofagija, šaperon-posredovana autofagija i makroautofagija. Svi tipovi autofagije u konačnici dovode do proteolitičke razgradnje staničnih komponenti u lizosomu za daljnje iskorištavanje energije iz recikliranog staničnog materijala. Najtemeljitije je proučavana makroautofagija (7, 8).

Autofagija se pojavljuje u mnogim osnovnim biološkim procesima poput stanične homeostaze, starenja, imunosti, kontrole kvalitete proteina (5). Izostanak autofagocitoze dovodi do različitih bolesti poput tumorskih, kardiomiopatije, neurodegeneracije, infektivnih bolesti i hepatske encefalopatije (5, 6).

1.3. Feroceni

Ferocen je organometalni spoj formule $C_{10}H_{10}Fe$ poznat i kao bis(η -ciklopentadienil)željezo, koji je otkriven 50-ih godina 20. stoljeća. Građen je od dvaju ciklopentadienilskih prstena sa željezom između njih. Takva je struktura poznata pod nazivom *sandwich* struktura (9).



Slika 1. Struktura molekule ferocena (izradio autor)

Otkriće strukture ferocena bilo je bitno otkriće u povijesti kemije koje je dovelo do ubrzanog razvoja moderne organometalne kemije. Zadnja dva desetljeća povezale su se organometalna kemija i biokemija, što je dovelo do razvoja novog pravca – bioorganometalne kemije. Znanstvena istraživanja u tom novom području omogućila su sintezu novih organometalnih spojeva koji se zbog svojih svojstava mogu primjenjivati u liječenju bolesti kao što su tumori i malarija (10). Ferocen je stabilan u vodenom i aerobnom mediju te ima povoljna elektrokemijska svojstva koja dovode do mogućnosti stvaranja velikog broja derivata (9). U posljednje vrijeme sintetiziraju se brojni derivati ferocena koji su ispitivani u različitim studijama, kao imunosenzori za proteine, DNA i površinski antigen hepatitisa B (engl. *hepatitis B surface antigen*, HbSAg), ali i senzori za ugljikov monoksid (11). Derivati ferocena koriste se i u terapijske svrhe (lijek Tamoksifen – rak dojke) (12), a terapija derivatima ferocena potpomognuta je steroidnim i nesteroidnim endokrinim modulatorima i prirodnim produktima. Spoznala se vrijednost derivata ferocena, koji poboljšavaju učinak aktivnih biomolekula (npr. goveđi serumski albumin) mijenjajući farmakokinetički profil molekula (13, 14, 15). Najnovija istraživanja najčešće koriste derivate ferocena – ferocenofane. Ferocenofani sadržavaju strukturu ferocena, pri čemu su dva ciklopentadienilna prstena spojena s 3 ugljikova atoma (11). Proteklih 10-ak godina zamijećena su brojna svojstva ferocena: protutumorska, antibiotska, antimalarična i antioksidativna. Ferocen ima izraženo redoks svojstvo zbog kojeg je privukao

posebnu pozornost, a dokazano je da je redoks svojstvo još izraženije u kombinaciji s drugim organskim molekulama (14, 16). Upravo zbog toga derivati ferocena mogući su kandidati za stvaranje nove vrste lijekova za liječenje bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom, a pritom se najviše misli na tumorske bolesti.

Ferocen kao samostalna molekula pokazuje blago citotoksično djelovanje, ali konjugiran s biološki aktivnim spojevima prikazuje obećavajuća protutumorska svojstva (17, 18, 19). Derivat ferocifen nastao je zamjenom fenilne skupine analoga tamoksifena s ferocenom i pokazuje snažan učinak na stanice raka dojke (20, 21, 22). Derivat ferocena – ferocefín također je pokazao antiproliferativno djelovanje protiv glioma na *in vivo* modelima, s lipidnim nanokapsulama kao sustavom nosača lijeka (23). Pokazalo se da je derivat ferocena – feroceníl plinabulin snažni inhibitor proteina u svojstvu višestruke otpornosti na lijekove (engl. *multidrug-resistance*, MDR) (24). Istražen je i protutumorski potencijal analoga organometalnih nukleozida koji je nastao sintezom konjugata ferocen-nukleobaza (25, 26), a nedavno je pokazano da je uvođenje lipofilnog feroceníl-metilen-ferocenílnog (Fc-CH₂-Fc) dijela poboljšalo aktivnosti u usporedbi s pojedinačnim spojevima koji sadrže metalocen (27). Ostali analozi ferocenílnog nukleozida koji su dobiveni enantioselektivnom sintezom, pokazali su značajnu aktivnost indukcije apoptoze protiv stanica nalik Burkittovu limfomu (28). Brojni su primjeri djelovanja derivata ferocena, njihovog korištenja u terapijske svrhe i zato se sve više istražuju i sintetiziraju novi derivati.

2. HIPOTEZA

Polazna je pretpostavka da odabrani derivati ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) djeluju proapoptotski na stanice karcinoma debelog crijeva (CaCo-2), stanice leukemija (CCRF-CEM) i limfoma (Raji) u *in vitro* uvjetima.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- ispitati proapoptotski potencijal derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na tumorske stanice
- usporediti rezultate kontrolnih uzoraka i tretiranih uzoraka derivatima ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) u procesu apoptoze, kasne apoptoze/nekroze i autofagije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

Derivati ferocena sintetizirani su u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Neposredno prije testiranja pripremljene su *stock*-otopine novosintetiziranih spojeva koncentracija ($1 \times 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$ (M)) u dimetil sulfoksidu (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO).

4.1.2. Stanične linije

Biološki učinak novosintetiziranih derivata ferocena testiran je na komercijalno dostupnim humanim staničnim linijama. U radu je korištena adherentna stanična linija:

- CaCo-2 (ATCC[®] HTB-37[™]) epitelne stanice humanog karcinoma kolona.

CaCo-2 stanična linija uzgojena je iz humanog epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma. Odlikuje se velikom heterogenošću stanica, što je čini odličnim odabirom za istraživanje.

Korištene su i stanične linije leukemija i limfoma čovjeka:

- CCRF-CEM (ATCC[®] CCL-119[™]) stanice akutne limfoblastične leukemije
- Raji (ATCC[®] CCL-86[™]) B-limfocitni Burkittov limfom

CCRF-CEM je izolirana stanična linija akutne limfoblastične leukemije koja predstavlja najčešću zloćudnu bolest dječje dobi.

Raji je prva humana stanična linija izolirana iz hematopoetskog tkiva. Stanična linija nastala je uzgojem humanih limfocita transformiranih Epstein-Barr virusom.

4.1.3. Kemikalije

Za izvođenje pokusnog dijela korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača:

- Dulbeccov modificirani Eagleov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM), Lonza, Basel, Switzerland), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640, Lonza, Basel, Switzerland)
- Fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS), (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- 0,25 %-tni tripsin EDTA (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- Na-piruvat (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- Penicilin/streptomycin 100 x (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- Tripansko plavilo 0,4 % (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- L-glutamin 200 mM (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- HEPES-4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO), (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) pripremljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 Mm, KH₂PO₄, i titriran do pH 7,4
- NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- EDTA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
- Alexa Fluor 488 Annexin V (Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen, California, SAD)
- Akridin narančasto: Acridine orange solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

4.2. Metode

4.2.1. Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvio se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Posuđe, pribor, otopine, puferi i mediji moraju biti sterilni prilikom tretiranja stanica.

Održavanje stanične kulture :

Stanice su uzgajane u bocama za kulturu stanica površine rasta 25 cm² (BD, Falcon, Njemačka) u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima (37 °C, 5 % CO₂) u atmosferi zasićenoj vlagom. Adherentna stanična linija CaCo-2 uzgojena je u T-bocama prilagođenima kultivaciji stanica koje prijanjaju za podlogu. Stanične linije leukemija i limfoma (CCRF-CEM i Raji) uzgojene su u T-bocama za uzgoj staničnih linija u suspenziji (29).

Stanične linije koje rastu u suspenziji održavaju se oduzimanjem dijela volumena i nadopunom svježim medijem ili zamjenom ukupnog volumena medija. Konfluentnost stanica svakodnevno je provjeravana pod inverznim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).

Stanice su nasadene u bočice za uzgoj stanica u koncentraciji od 1 x 10⁶ stanica za adherentnu liniju CaCo-2 i 5 x 10⁶ stanica za CCRF-CEM i Raji stanice, u volumenu od 5 ml. Adherentna stanična linija CaCo-2 inkubirana je preko noći u CO₂ inkubatoru na 37 °C kako bi se stanice prihvatile za podlogu (29).

4.2.3. Određivanje apoptoze

Proapoptotska aktivnost ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) određena je na CaCo-2, CCRF-CEM i Raji stanicama. Stanice su nasadene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji od 1 x 10⁵ stanica/jažici za CaCo-2 stanice i 1,7 x 10⁵ stanica/jažici za CCRF-CEM i Raji stanice. Stanice su tretirane derivatima ferocena u koncentraciji od 1 x 10⁻⁵ M tijekom 72 h. Nakon završetka

inkubacije stanica derivatima, stanice su pokupljene i centrifugirane 6 minuta na 1100 rpm. Sa stanica je uklonjen supernatant i stanice su obojene s Alexa Fluor 488 Annexin V i propidij jodid bojom (Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen, California, USA). Fluorescentna propidij jodid (engl. *Propidium iodide*, PI) boja koja se veže na DNA, ulazi u stanice s oštećenom membranom koje se nalaze u kasnoj apoptozi/nekrozi. Odmah nakon pokretanja apoptoze, stanice translociraju fosfatidil-serin (engl. *Phosphatidylserine*, PS) s unutarnje strane membrane na površinu stanice. Kada PS dospije na površinu stanice može se lako uočiti bojenjem fluorescentnim konjugatom Aleksa 488 annexin V, proteinom koji ima visoki afinitet za PS (30, 31). Nakon bojenja, analiza stanica provedena je na BD FACScanto II, BD Biosciences, New Jersey, SAD protočnom citometru pomoću FlowJo software (FlowJo, LLC, USA).

4.2.5. Određivanje autofagije

Detekcija autofagije utvrđena je na CaCo-2, Raji i CCRF-CEM staničnim linijama pomoću boje Akridin narančasto (engl. *Acridine orange*, AO). AO je zelena fluorescentna, lizosomotropna boja koja se nakuplja u kiselim organelima ovisno o pH-u. Djeluje tako da se protonira i ostaje unutar kiselih vezikula, odnosno autolizosoma (32, 33). Stanice su nasadene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji od 1×10^5 stanica/jažici za CaCo-2 stanice i $1,7 \times 10^5$ stanica/jažici za CCRF-CEM i Raji stanice. Stanice su tretirane derivatima ferocena u koncentraciji od 1×10^{-5} M tijekom 72 h. Nakon završetka inkubacije stanica derivatima, one su pokupljene i centrifugirane 6 min na 1100 rpm. Stanice su bojene na 37 °C u mraku pola sata s 1 µg/ml Acridin Orange bojom. nakon inkubacije stanice su isprane u PBS-u i analizirane na BD FACScanto II, BD Biosciences, New Jersey, SAD protočnom citometru pomoću FlowJo software (FlowJo, LLC, USA).

4.2.6. Statistička obrada podataka

Istraživanje proapoptotskog učinka novosintetiziranih derivata ferocena obavilo se u duplikatu. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija ($\pm SD$) za dva neovisna mjerenja. Primijenio se parametrijski test ANOVA uz statističku značajnost $P < 0,05$. Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa STATISTICA 11.0 za Windows operativne sustave. Podatci dobiveni protočnom citometrijom prikazani su kao srednja vrijednost postotka populacije u dva neovisna mjerenja, pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata s protočne citometrije u FlowJo programu.

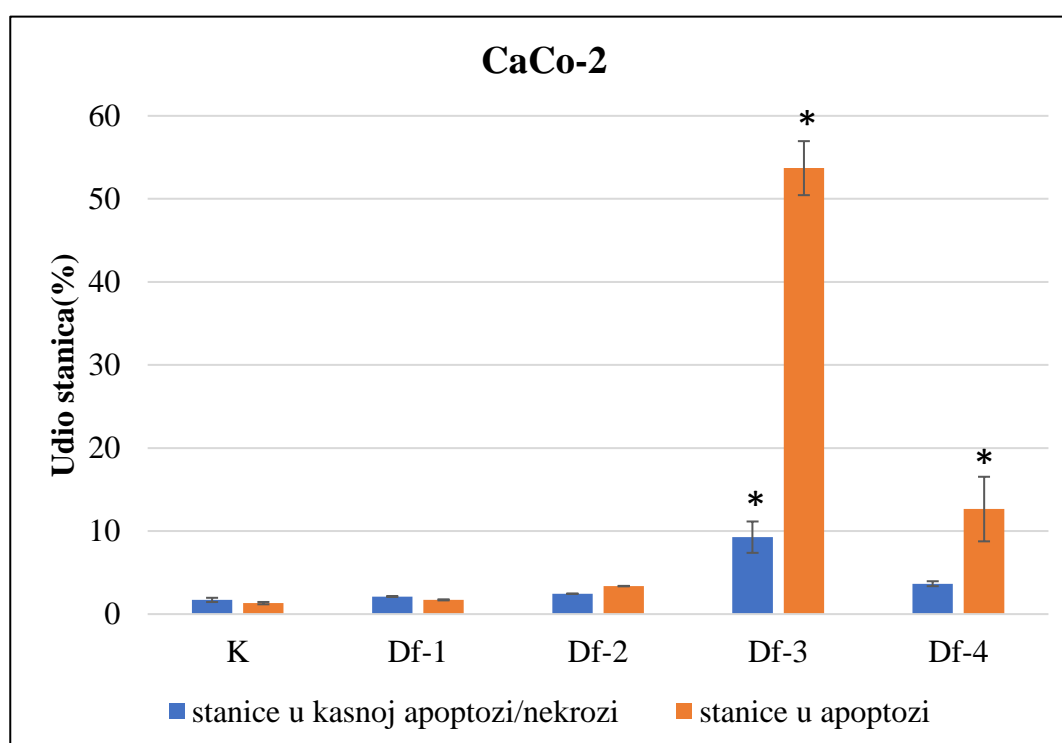
5. REZULTATI

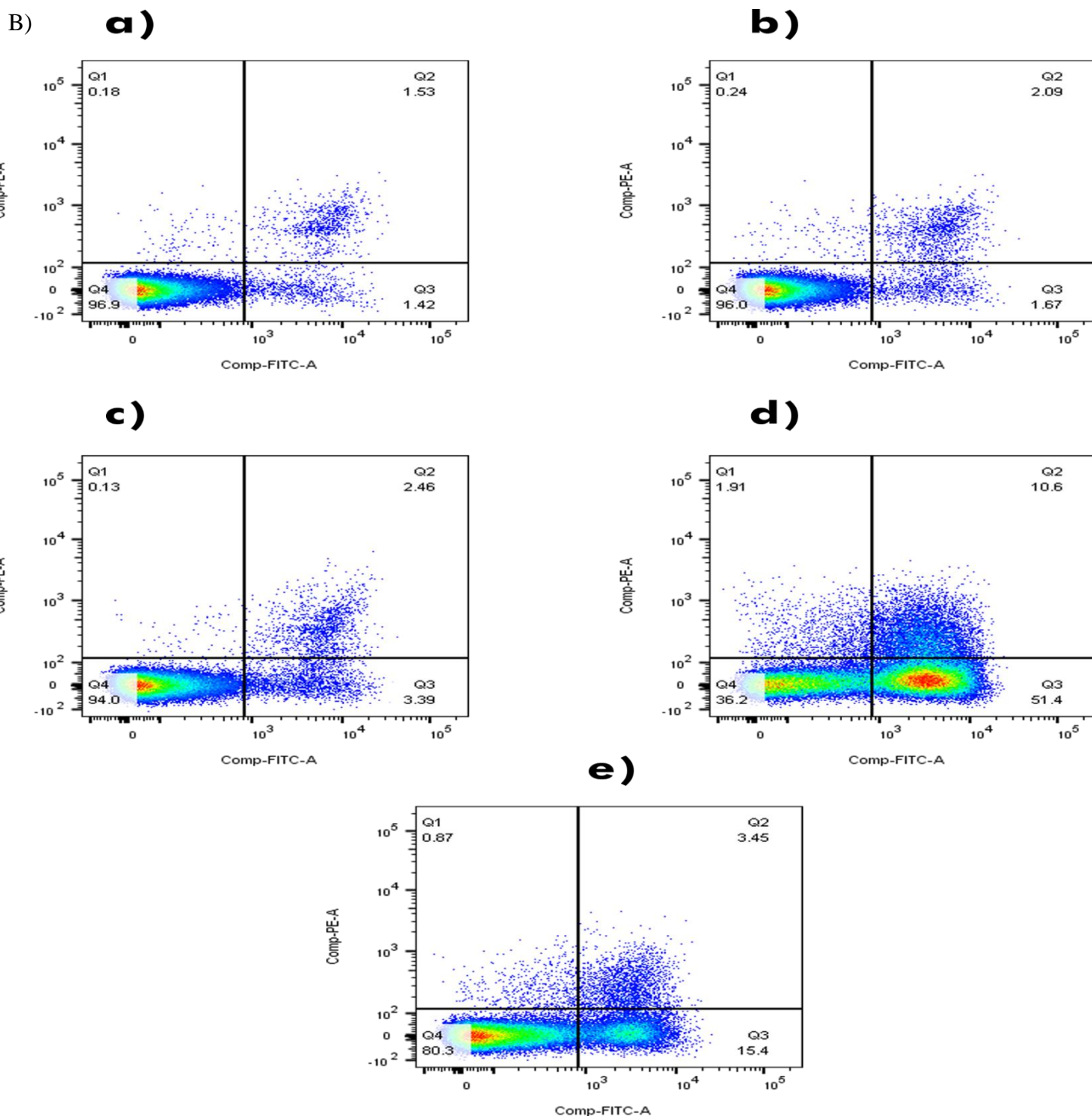
Biološki učinak novosintetiziranih derivata ferocena testiran je na komercijalno dostupnim humanim staničnim linijama, od čega je jedna adherentna stanična linija (CaCo-2), jedna leukemijska (CCRF-CEM) i jedna stanična linija limfoma (Raji). Stanice su tretirane derivatima ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 h. Rezultati prikazuju postotak apoptotskih stanica, stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi i autofagije u stanicama navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

5.1. Indukcija apoptoze i kasne apoptoze/nekroze

Djelovanje novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na staničnu liniju CaCo-2 prikazano je u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (*slika 2.*). Kod derivata ferocena Df-1, Df-2 rezultati su blago povišeni u procesu apoptoze i kasne apoptoze/nekroze u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, ali nisu statistički značajni (*slika 2.*). Statistički značajna razlika prisutna je u promjenama na CaCo-2 stanicama izloženima derivatima Df-3 i Df-4 za apoptozu i derivatu Df-3 za kasnu apoptozu/nekrozu u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (*slika 2.*), dok je izostao rezultat za Df-4 u procesu kasne apoptoze/nekroze. Dakle, navedeni derivati statistički značajno doprinose apoptozi i kasnoj apoptozi/nekrozi CaCo-2 stanica.

A)





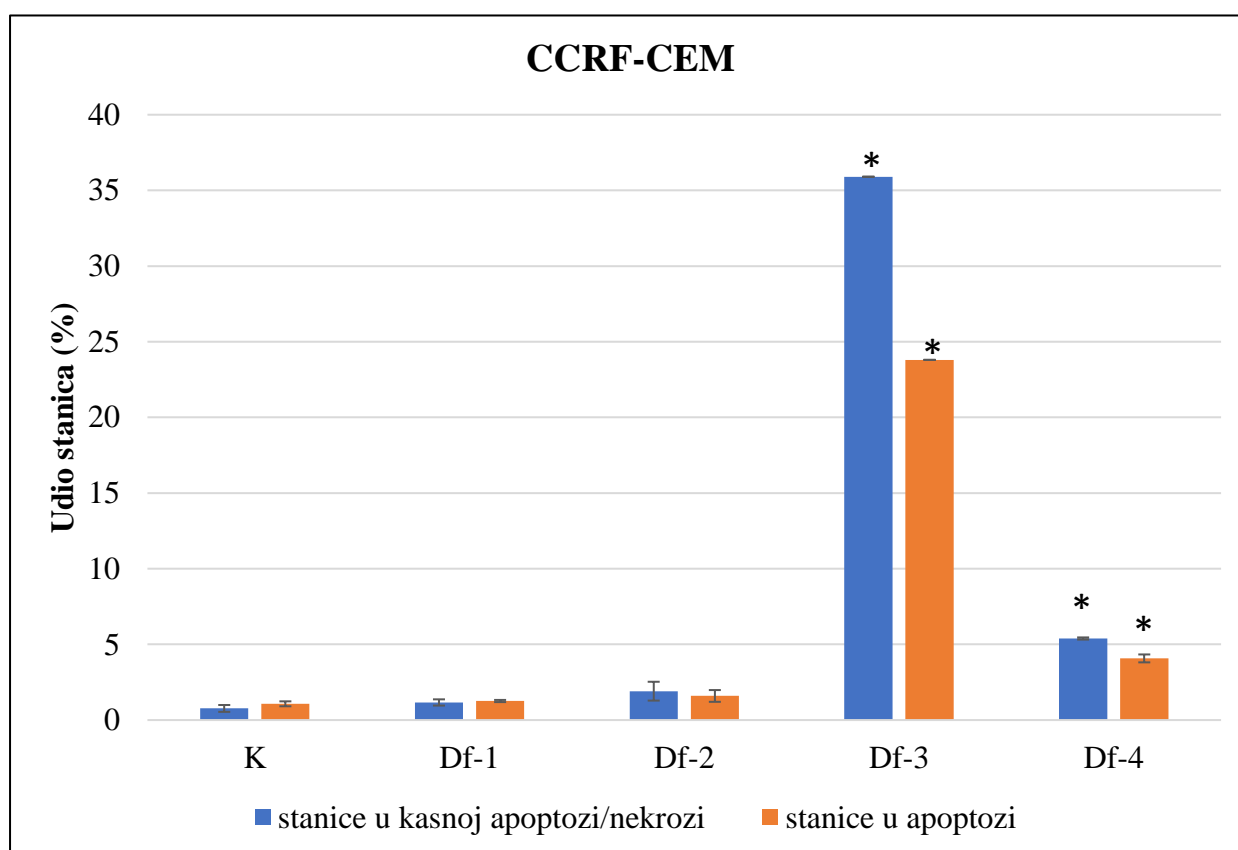
Slika 2. Indukcija apoptoze u CaCo-2 stanicama

A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

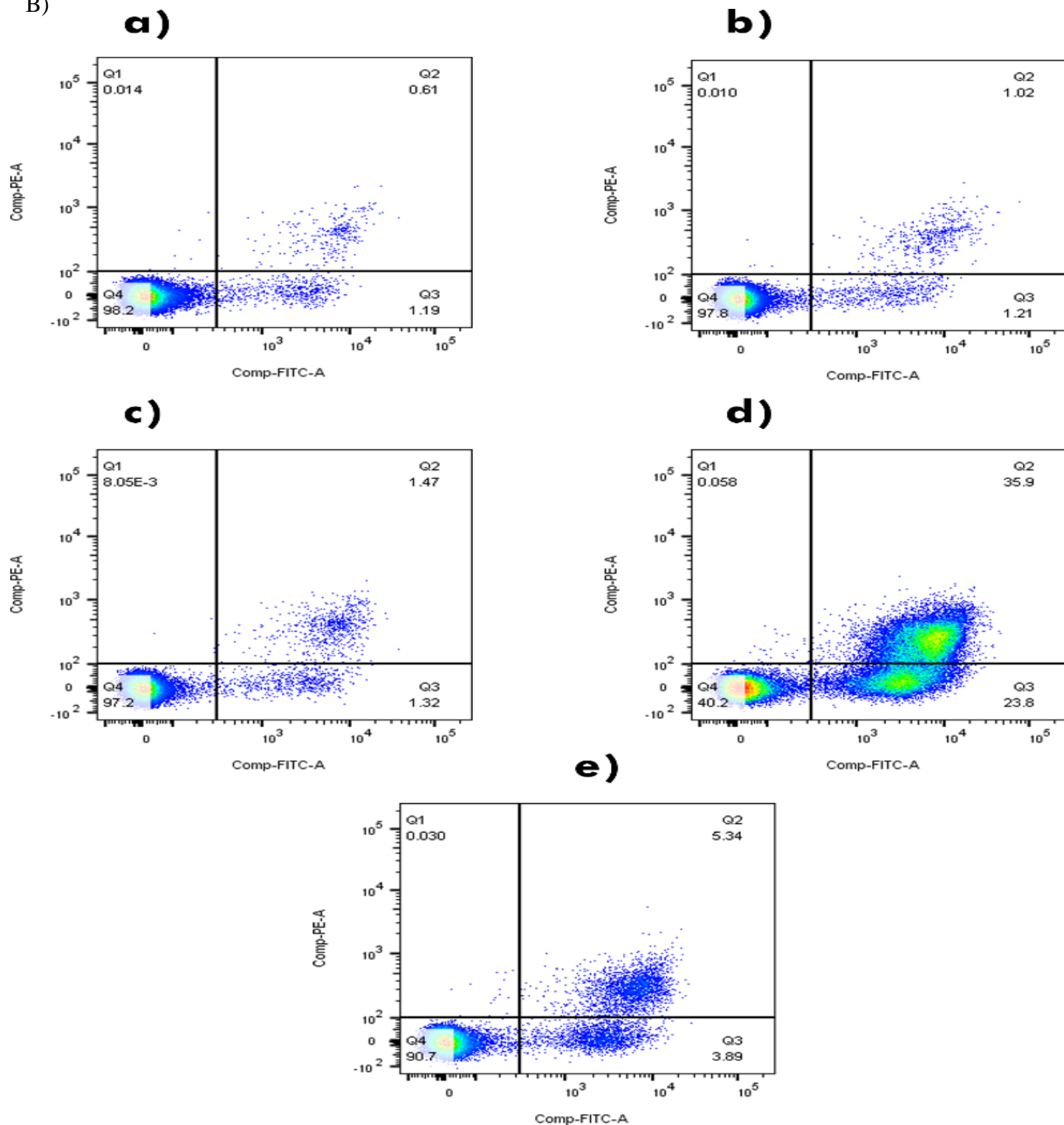
Stanice su izlagane derivatima ferocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 sata. Apoptoza je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: vitalne stanice (Q4), rane apoptotske stanice (Q3), kasne apoptotske stanice (Q2). Histogramski prikaz predstavlja: a) kontrolne stanice, b) Df-1, c) Df-2, d) Df-3, e) Df-4.

Usporedba rezultata učinka apoptoze novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na staničnu liniju CCRF-CEM u odnosu na kontrolne, netretirane stanice prikazana je na *slici 3*. Kao i kod CaCo-2, tako i kod CCRF-CEM rezultati za derivate ferocena Df-1 i Df-2 blago su povišeni u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, ali niti jedan rezultat nije statistički značajan (*slika 3*). Prema rezultatima, derivati Df-3 i Df4 pokazuju statistički značajnu razliku u CCRF-CEM staničnoj liniji za apoptozu i kasnu apoptozu/nekrozu u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (*slika 3*). Navedeni derivati statistički značajno doprinose apoptozi te kasnoj apoptozi/nekrozi stanica.

A)



B)



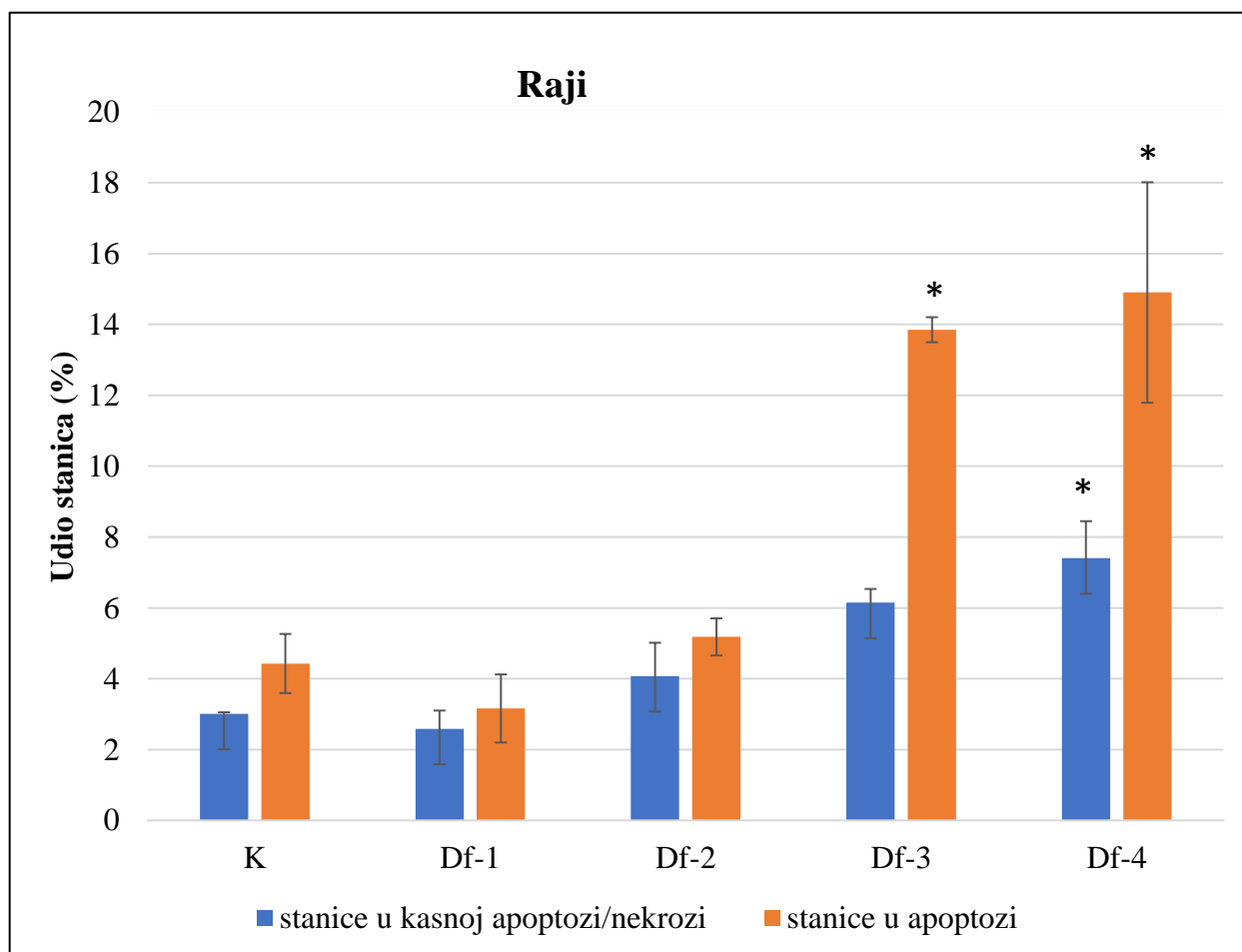
Slika 3. Indukcija apoptoze u CCRF-CEM stanicama

A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

Stanice su izlagane derivatima ferocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 sata. Apoptoza je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: vitalne stanice (Q4), rane apoptotske stanice (Q3), kasne apoptotske stanice (Q2). Histogramski prikaz predstavlja: a) kontrolne stanice, b) Df-1, c) Df-2, d) Df-3, e) Df-4.

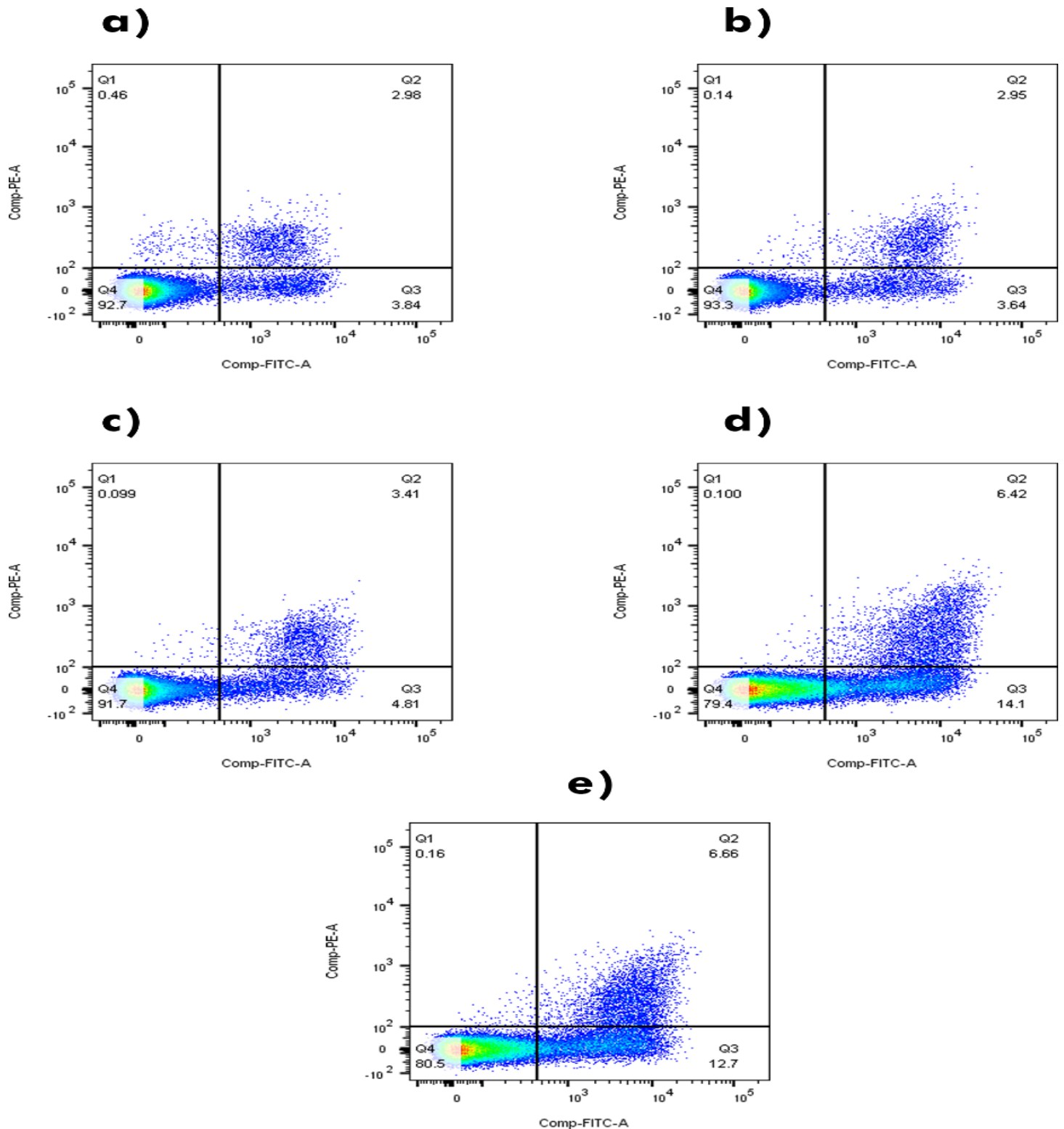
Na slici 4. prikazani su rezultati djelovanja novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na staničnu liniju Raji u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Kao i slučaju s CaCo-2 i CCRF-CEM staničnim linijama, ponovno su izostali statistički značajni rezultati za derivate Df-1 i Df-2 i kod Raji stanične linije u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (*slika 4.*). Na grafičkom prikazu označene su statistički značajne razlike u promjenama u Raji staničnoj liniji pri izlaganju derivatima Df-3 i Df-4 za apoptozu i derivata Df-4 za kasnu apoptozu/nekrozu u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (*slika 4.*), dok je u procesu kasne apoptoze/nekroze izostao statistički značajan rezultat za derivat Df-3. Navedeni derivati statistički značajno doprinose apoptozi te kasnoj apoptozi/nekrozi Raji stanica.

A)



B)

REZULTATI



Slika 4. Indukcija apoptoze u Raji stanicama

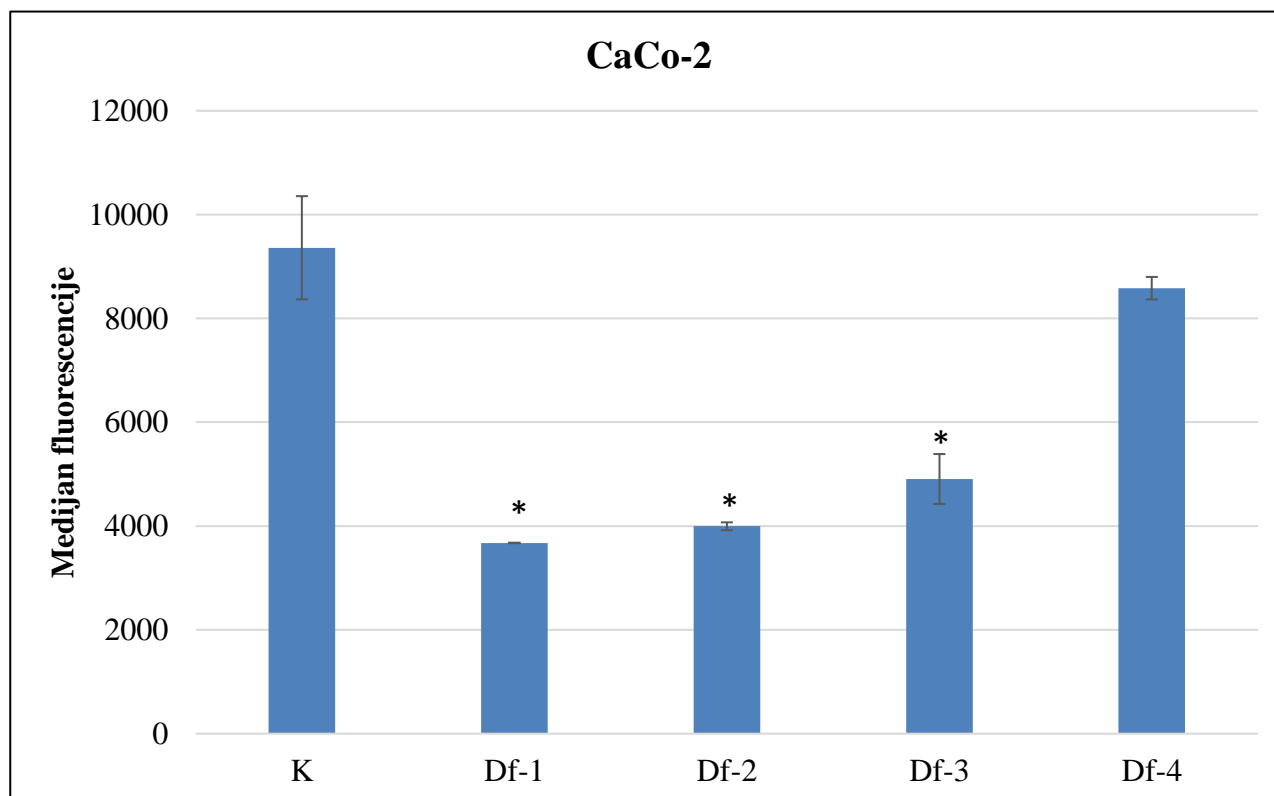
A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

Stanice su izlagane derivatima ferocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 sata. Apoptoza je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: vitalne stanice (Q4), rane apoptotske stanice (Q3), kasne apoptotske stanice (Q2). Histogramski prikaz predstavlja: a) kontrolne stanice, b) Df-1, c) Df-2, d) Df-3, e) Df-4.

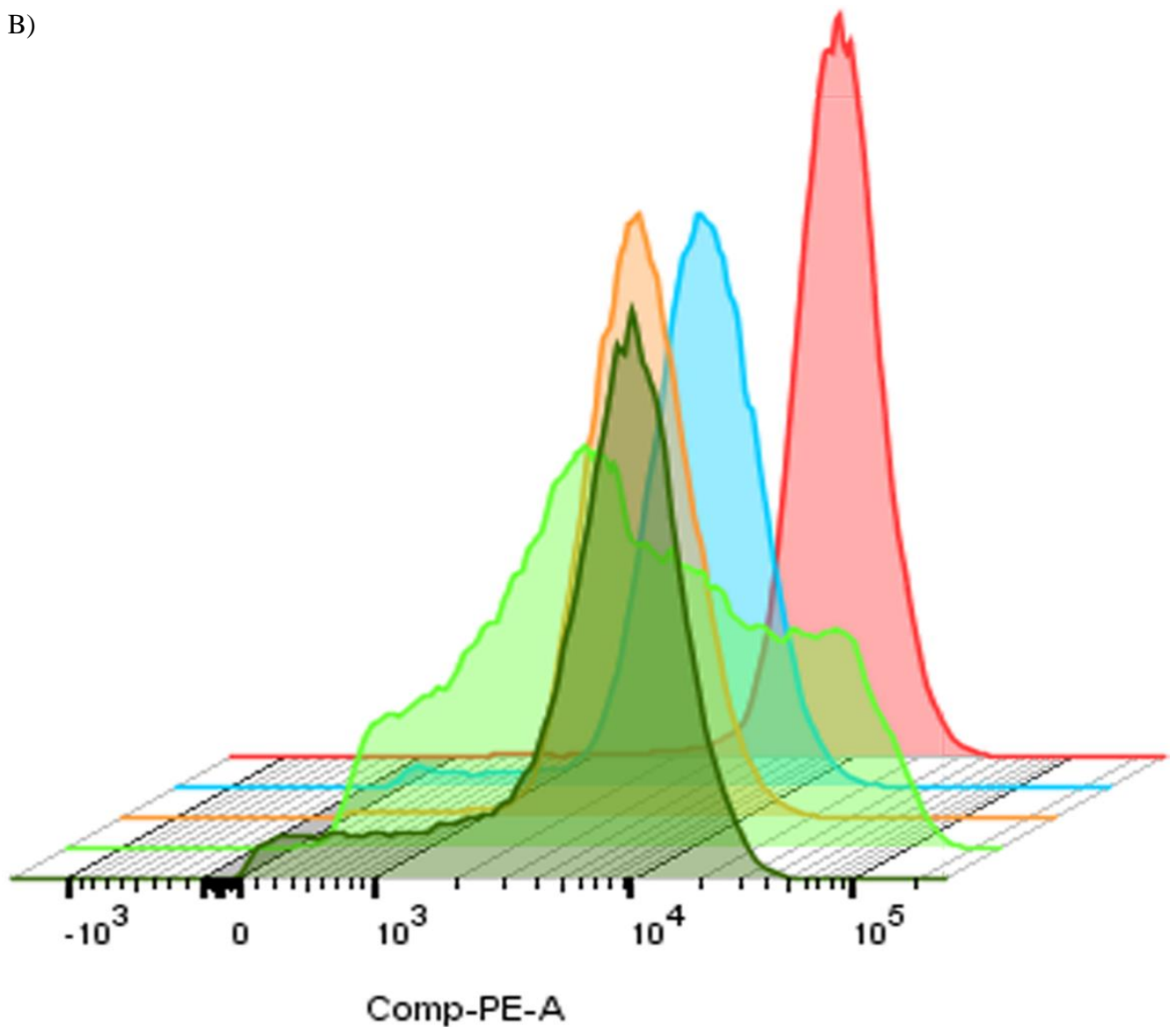
5.2. Određivanje autofagije

Djelovanje novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na staničnu liniju CaCo-2 prikazano je u odnosu na kontrolne, netretirane stanice na *slici 5*. Stanice tretirane derivatom ferocena Df-4 pokazuju smanjenu aktivnost autofagije, ali rezultat nije statistički značajan (*slika 5*.) Derivati Df-1, Df-2 i Df-3 pokazuju statistički značajnu razliku u CaCo-2 staničnoj liniji u procesu autofagije (*slika 5*.). Navedeni derivati (Df-1, Df-2 i Df-3) inhibiraju (smanjuju aktivnost) proces autofagije stanica.

A)



B)



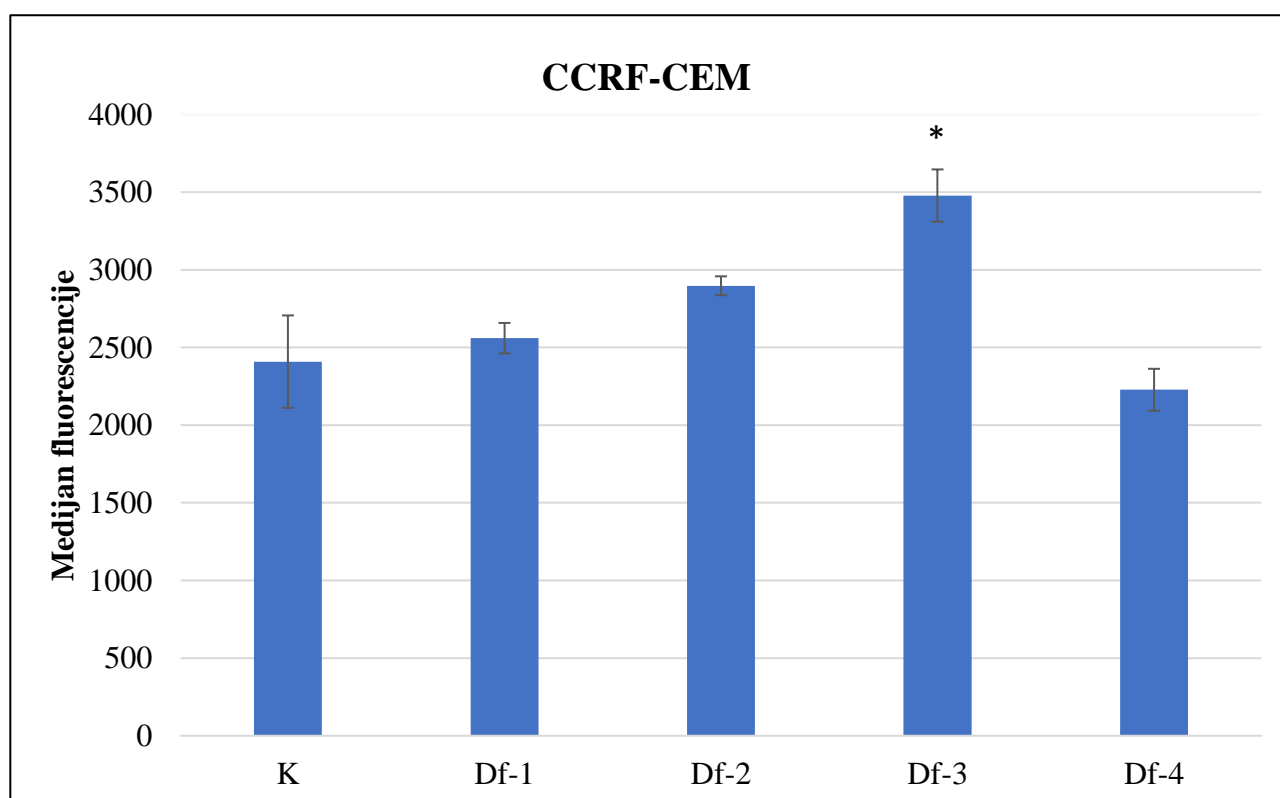
Slika 5. Utjecaj derivata ferocena na autofagiju u CaCo-2 stanicama

A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

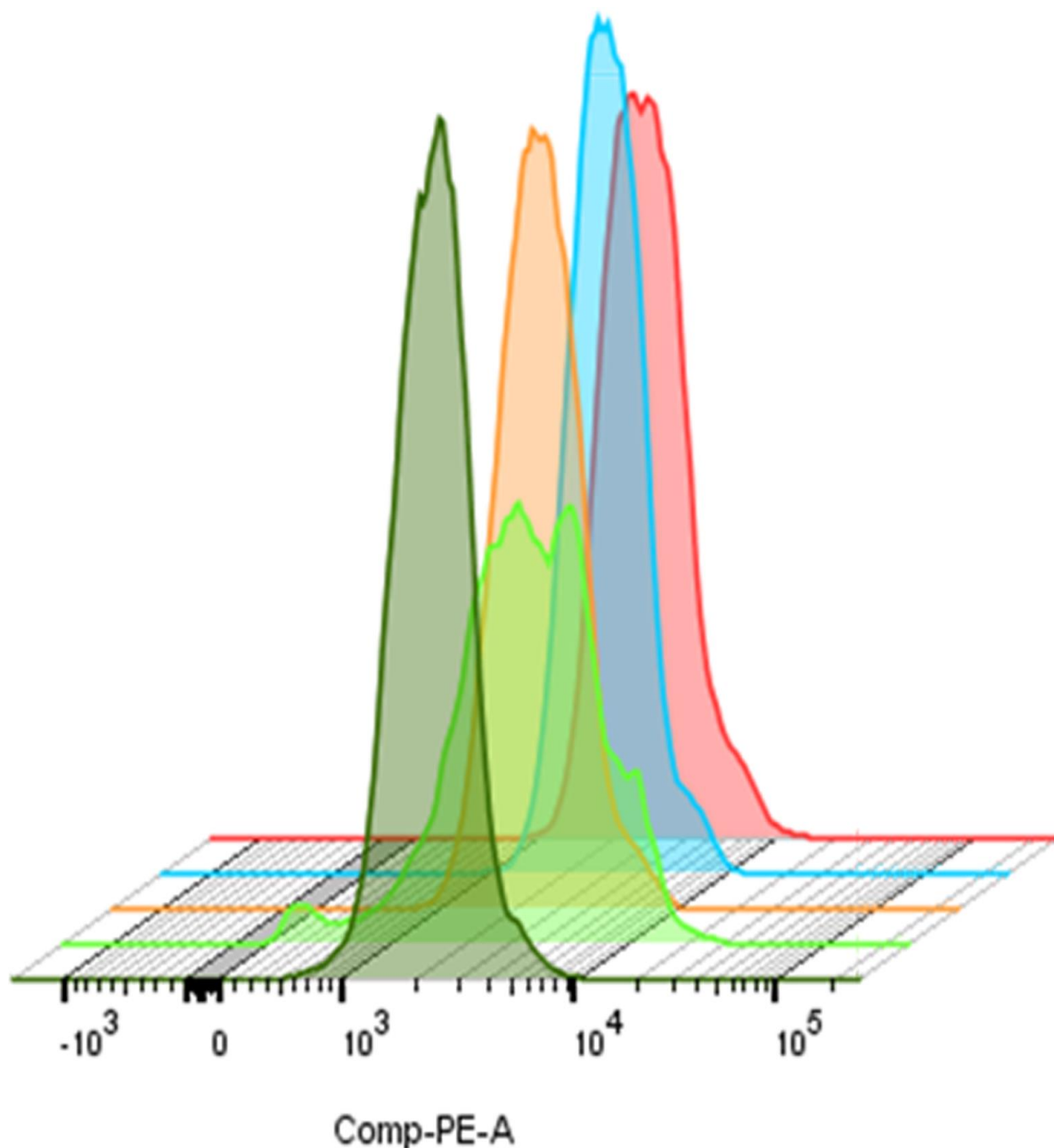
Stanice su izlagane derivatima ferocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 h. Autofagija je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: kontrolne stanice (crvena boja), Df-1 (narančasta boja), Df-2 (plava boja), Df-3 (svijetlo zelena boja) i Df-4 (tamno zelena boja).

Nadalje, djelovanje novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice proučavano je i na staničnoj liniji CCRF-CEM (*slika 6.*). Stanice tretirane derivatom Df-4 pokazuju smanjenu aktivnost autofagije, dok derivati Df-1 i Df-2 pokazuju povećanu aktivnost autofagije u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, ali niti jedan rezultat nije statistički značajan (*slika 6.*). Rezultat koji pokazuje statistički značajnu razliku u CCRF-CEM staničnoj liniji je prisutan kod derivata Df-3 u procesu autofagije (*slika 6.*), što znači da navedeni derivat statistički značajno doprinosi povećanju aktivnosti autofagije kod CCRF-CEM stanica.

A)



B)



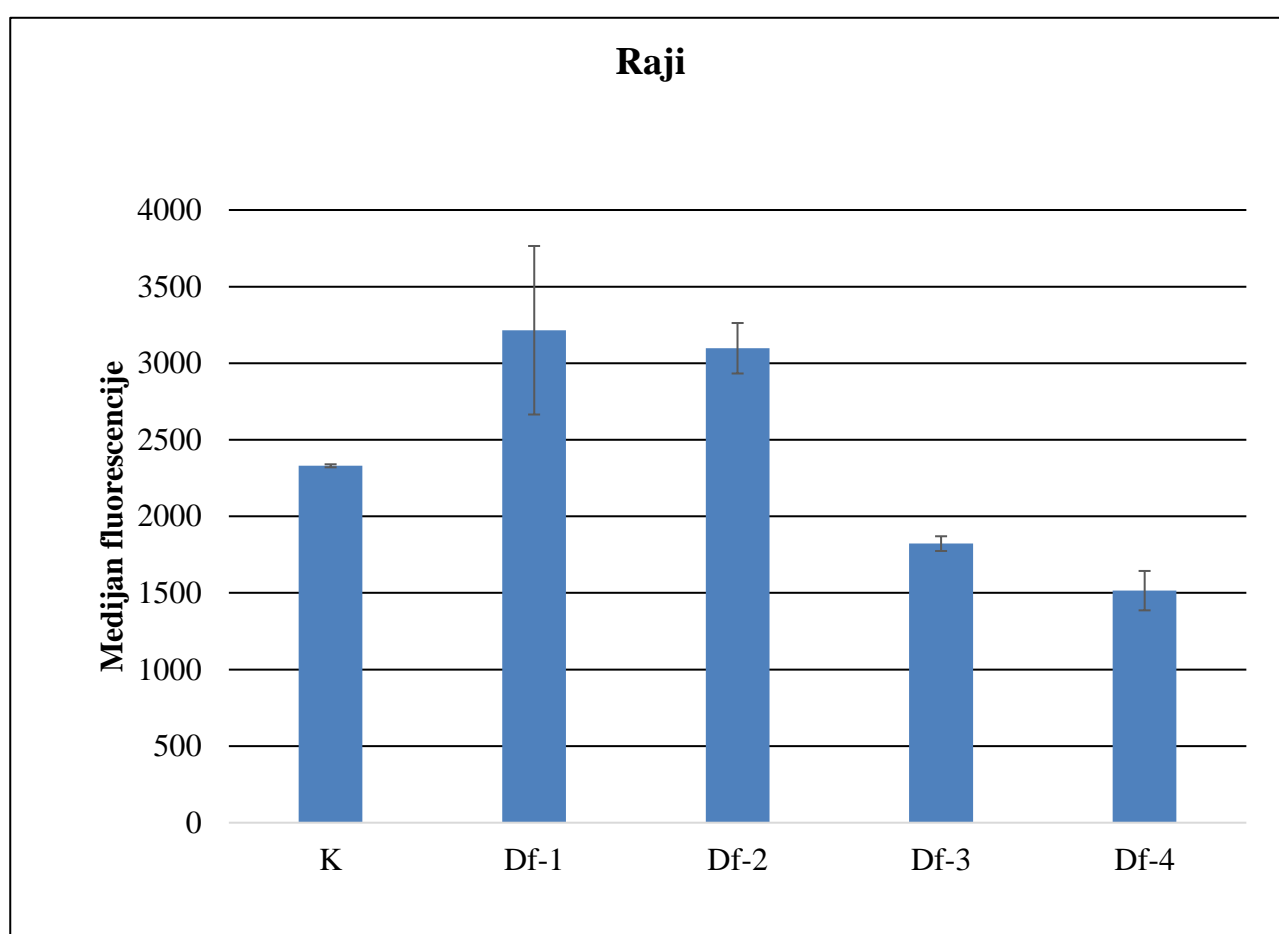
Slika 6. Utjecaj derivata ferrocena na autofagiju u CCRF-CEM stanicama

A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

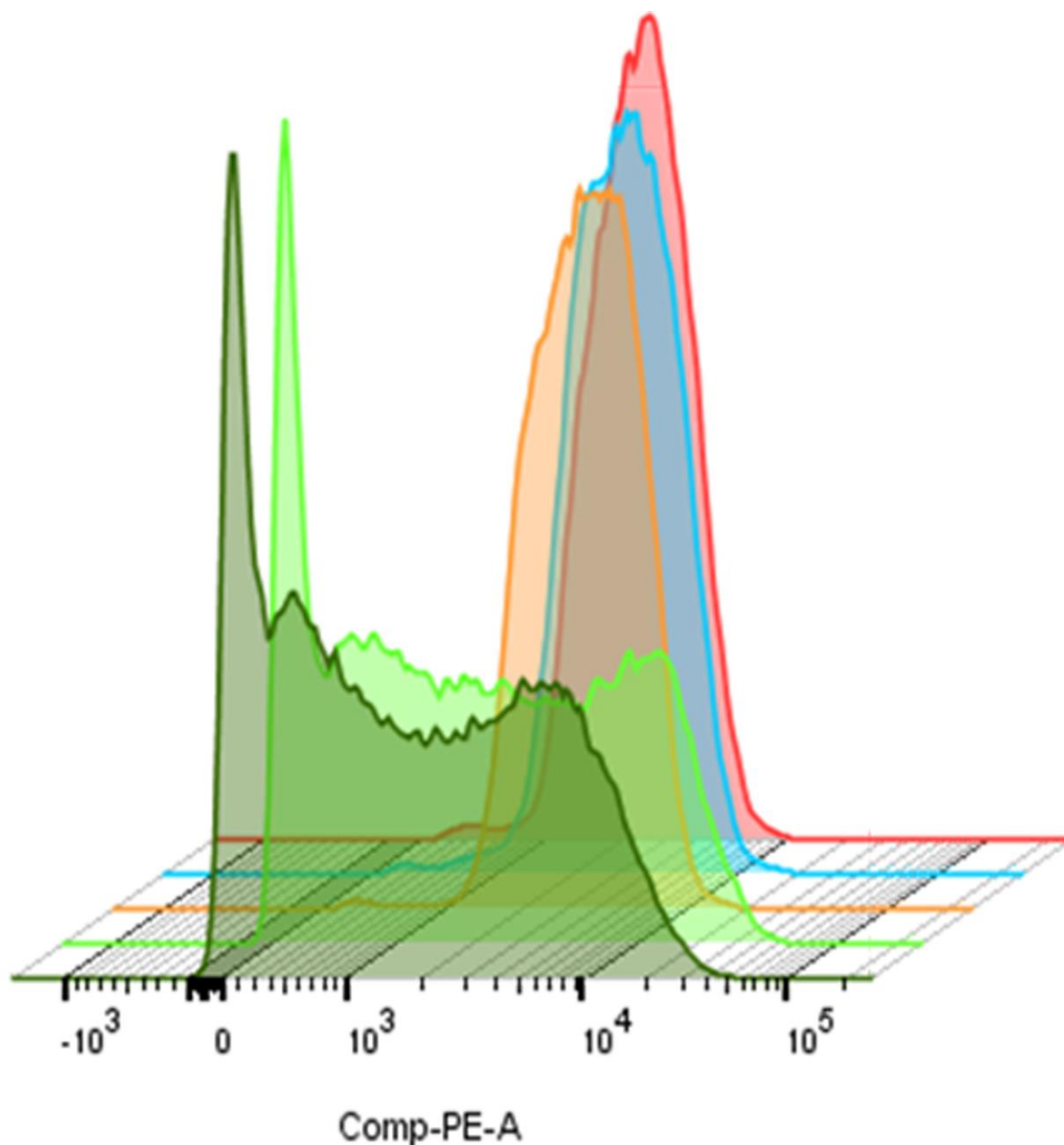
Stanice su izlagane derivatima ferrocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 h. Autofagija je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: kontrolne stanice (crvena boja), Df-1 (narančasta boja), Df-2 (plava boja), Df-3 (svijetlo zelena boja) i Df-4 (tamno zelena boja).

Slika 7. prikazuje rezultate djelovanja novosintetiziranih derivata ferocena (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) u odnosu na kontrolne, netretirane stanice za staničnu liniju Raji. Iz grafičkog prikaza rezultata, vidljivo je da stanice tretirane derivatima Df-1 i Df-2 povećavaju aktivnost procesa autofagije, dok derivati Df-3 i Df-4 smanjuju aktivnost procesa autofagije u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Bitno je naglasiti, kako niti jedan rezultat nije statistički značajan u procesu autofagije kod stanične linije Raji (*slika 7.*).

A)



B)



Slika 7. Utjecaj derivata ferocena na autofagiju u Raji stanicama

A) Grafički prikaz B) Histogramski prikaz

Stanice su izlagane derivatima ferocena u koncentraciji 1×10^{-5} M tijekom 72 h. Autofagija je određena protočnom citometrijom. Histogramski prikaz: kontrolne stanice (crvena boja), Df-1 (narančasta boja), Df-2 (plava boja), Df-3 (svijetlo zelena boja) i Df-4 (tamno zelena boja).

6. RASPRAVA

Indukcija apoptoze analizirana je na hibridima bis-ferocenil-uracila Df-1, Df-2, Df-3 i Df-4 u stanicama karcinoma debelog crijeva (CaCo-2), stanicama leukemije (CCRF-CEM) i limfoma (Raji) u *in vitro* uvjetima na temelju njihove visoke antiproliferativne osjetljivosti. S obzirom na dosad objavljene rezultate istraživanja iz kojih su vidljivi učinci različitih derivata ferocena na indukciju apoptoze (Huni 068, Fc-OH-TAM, nukleozid ferocena, hibrid ferocen-pirazol) (12, 20, 34, 35), pretpostavljalo se da će nosintetizirani derivati ferocena pokazati značajan proapoptotski učinak u tumorskim stanicama.

Kao što je prikazano na slikama 2. i 4., nakon 72 sata izlaganja na derivatu Df-4 primijećen je porast populacije ranih apoptotskih stanica CaCo-2 i Raji (> 15 %) u usporedbi s kontrolom. Spoj Df-3 u istoj primijenjenoj koncentraciji povećao je postotak ranih apoptotičnih stanica u CaCo-2 (> 50 %), Raji (10 %) i u CCRF-CEM (blizu 24 %) stanicama. Uz to, spoj Df-3 uzrokovao je nakupljanje 35,9 % CCRF-CEM i 10,6 % CaCo-2 stanica u kasnoj apoptozi. Iako su spojevi Df-1 i Df-2 pokazali izražene citostatske aktivnosti protiv tumorskih stanica, nije primijećena značajna indukcija apoptoze (manje od 5 %).

Za sve istraživane derivate bis-ferocenil-uracila (Df-1, Df-2, Df-3 i Df-4) dokazan je antioksidativni učinak (36). U nedavno objavljenom istraživanju pokazano je da derivat ferocena inducira apoptozu oksidativnim oštećenjem putem reakcije s reaktivnim kisikovim spojevima (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (20), što može potaknuti unutarnji ili mitohondrijski put apoptoze zbog povećanog oksidativnog stresa (37). Također, postoje veze između povećanog unutarstaničnog stvaranja ROS-a i apoptoze inducirane izvana kemijskim agensima (38). Iako je mehanizam djelovanja još uvijek prilično nejasan, smatra se da je reverzibilna stanična oksidacija ferocenilnog dijela u citotoksični ferocenijev ion popraćena stvaranjem ROS-a koje su sposobne oštetiti DNA i druge važne biološke molekule, što rezultira staničnim ozljedama i smrću (39, 40, 41).

Upravo te spoznaje mogle bi biti temelj za objašnjenje načina djelovanja derivata Df-3 i Df-4 na tumorske stanice i indukciju apoptoze u njima.

S obzirom na to da aktivacija procesa autofagije može imati dvostruku ulogu u suzbijanju i promociji tumora kod mnogih karcinoma (42), bilo je zanimljivo istražiti utjecu li nosintetizirani derivati ferocena na autofagiju u odabranim tumorskim stanicama. Kao što je

i opisano u poglavlju Rezultati, rezultati određivanja autofagije u stanicama koje su bile izložene testiranim derivatima pokazuju da u Caco-2 stanicama derivati Df-1, Df-2 i Df-3 statistički značajno smanjuju autofagiju u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, (*slika 5.*). U stanicama CCRF-CEM došlo je do potaknute autofagije od strane derivata Df-3 (*slika 6.*), dok u tretiranim Raji stanicama nisu uočene značajne promjene u odnosu na netretirane kontrolne stanice (*slika 7.*).

Statistički značajni rezultati dobiveni izlaganjem CaCo-2 stanica derivatima Df-1, Df-2 i Df-3 ukazuju na inhibiciju (smanjivanje aktivnosti) autofagije. Sličan rezultat dobiven je istraživanjem na derivatima ferocenkinidina (43). U ovom istraživanju objašnjeno je nedavno otkriće da ROS inhibiraju autofagiju smanjenjem regulacije ekspresije proteina potrebnog za indukciju autofagije (44). Upravo tako djeluju derivati ferocenkinidina, inhibirajući autofagiju povećanjem proizvodnje ROS-a koji potiču nakupljanje p62, što dovodi do inicijacije procesa apoptoze (43).

Za razliku od inhibitornih učinaka na autofagiju u CaCo-2 stanicama, derivat Df-3 u CCRF-CEM staničnoj liniji potaknuo je autofagiju. Takav način djelovanja može se objasniti provedenim istraživanjem nad derivatom ferocena koji sadrži kamfor sulfonamid DK-164. U sklopu tog istraživanja koristio se modelni supstrat za uočavanje autofagije protein LC3 (protein povezan s mikrotubulama 1A/1B-laki lanac 3), koji je središnji protein u procesu autofagije i najčešće korišteni marker autofagosoma (45). Njegov konjugirani oblik nalazi se na membrani autofagosoma, dok se boja akridin narančasto, koja je korištena u ovom radu, protonira i ostaje unutar kiselih vezikula, odnosno autofagosoma (45, 46). Iako nije korištena CCRF-CEM, već HeLa stanična linija, istraživanje može poslužiti za bolje razumijevanje načina poticanja autofagije od strane derivata ferocena.

Neophodna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdili učinci testiranih spojeva na tumorske stanice. Većina rezultata nije statistički značajna te je za donošenje kvalitetnih zaključaka potrebno koristiti i druge metode praćenja autofagije (46).

7. ZAKLJUČAK

1. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je prisutan proapoptotski učinak pojedinih novosintetiziranih derivata ferocena u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, a to su sljedeći derivati:
 - CaCo-2 stanična linija – Df-3 i Df-4 u procesu apoptoze i Df-3 u procesu kasne apoptoze/nekroze
 - CCRF-CEM stanična linija – Df-3 i Df-4 u procesu apoptoze i kasne apoptoze/nekroze
 - Raji stanična linija – Df-3 i Df-4 u procesu apoptoze i Df-4 u procesu kasne apoptoze/nekroze.
2. Novosintetizirani derivat ferocena Df-3 pokazao je najveći proapoptotski učinak i jedini od svih ostalih derivata potaknuo aktivnost procesa autofagije kod CCRF-CEM stanične linije.
3. Istraživanje je potrebno nastaviti i dodatno istražiti mogućnosti derivata ferocena Df-3, ali i proširiti istraživanje procesa autofagije upotrebom drugih metoda kako bi se mogli donijeti sigurni zaključci.

8. SAŽETAK

Uvod: Tumorske bolesti predstavljaju jedan od vodećih svjetskih problema i uzročnika smrtnosti te se nameće potreba za pronalaskom učinkovitih selektivnih protutumorskih lijekova. Novosintetizirani derivati ferocena pokazuju potencijalno protutumorsko djelovanje jer izazivaju apoptozu kod tumorskih stanica, a pritom ne oštećuju zdrave stanice.

Cilj istraživanja: Cilj je bio ispitati proapoptotski potencijal derivata ferocena bis-feroceniluracila (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) na tumorskim stanicama i usporediti rezultate uzoraka tretiranih derivatima ferocena s kontrolnim, netretiranim uzorkom.

Materijali i metode: Stanice su tretirane derivatima ferocena tijekom 72 h, a detekcija utjecaja derivata ferocena na stanične linije u procesu apoptoze i autofagije određena je metodom protočne citometrije. Dobiveni podatci prikazani su kao postotak populacije pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata s protočne citometrije u FlowJo programu.

Rezultati: Značajan je statistički utjecaj derivata ferocena Df-3 i Df-4 na stanične linije CaCo-2, CCRF-CEM i Raji u procesu apoptoze i kasne apoptoze/nekroze te je značajan statistički utjecaj derivata ferocena Df-3 na potaknutu autofagiju kod CCRF-CEM stanica. Derivati Df-1, Df-2 i Df-3 su pokazali inhibitorški učinak na autofagiju kod CaCo-2 stanične linije.

Zaključak: Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su derivat Df-3 i Df-4 pokazali proapoptotski učinak u procesu apoptoze i kasne apoptoze/nekroze. Derivat Df-3 pokazao je najveći proapoptotski učinak od svih ispitivanih derivata. Istraživanje utjecaja derivata ferocena u procesu autofagije potrebno je dodatno istražiti, upotrebom drugih metoda.

Ključne riječi: tumorske bolesti, derivati ferocena, protočna citometrija, apoptoza, autofagija, derivat ferocena Df-3.

9. SUMMARY

Proapoptotic effect of new ferrocene derivatives on tumor cells in vitro

Introduction: Tumor diseases are a leading cause of death worldwide and there is a rising need to discover efficient form of tumor treatment. Newly synthesized ferrocene derivatives show potential antitumor activity by inducing apoptosis in tumor cells without damaging healthy cells.

Objective: The aim of this study was to examine the proapoptotic potential of ferrocene derivatives (Df-1, Df-2, Df-3, Df-4) on tumor cell lines and to compare the results of samples treated with ferrocene derivatives with a control, untreated sample.

Materials and methods: Cells were treated with ferrocene derivatives for 72 h and the flow cytometry was used to detect the influence of ferrocene derivatives on cell lines in the process of apoptosis, and autophagy was determined. The obtained data are presented as a percentage of the population, using a statistical function for data analysis and results processing obtained from flow cytometry in the FlowJo program.

Results: The results indicate a significant statistical effect of ferrocene derivatives Df-3 and Df-4 on CaCo-2, CCRF-CEM and Raji cell lines in the process of apoptosis and late apoptosis/necrosis. A significant statistical effect of ferrocene derivatives Df-3 on induced autophagy in CCRF-CEM cell line, while Df-1, Df-2, and Df-3 derivatives showed an inhibitory effect on autophagy in the CaCo-2 cell line.

Conclusion: Based on the obtained results, it can be concluded that the derivatives Df-3 and Df-4 show a proapoptotic effect in apoptosis and late apoptosis/necrosis. The Df-3 derivative showed the highest proapoptotic effect of all tested derivatives. Research of the influence of ferrocene derivatives in the process of autophagy needs to be further investigated, using other methods.

Keywords: tumor diseases, ferrocene derivatives, flow cytometry, apoptosis, autophagy, ferrocene derivative Df-3.

10. LITERATURA

1. Eurostat Statistic Explained, Cancer statistics, Deaths from cancer, dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics#Deaths_from_cancer
Datum pristupa: 06.09.2020.
2. Šlaus-Pećina N, Jakuš-Bulić F, Radić K. Tumor supresorski geni [nastavni tekst]. Zagreb: Zavod za biologiju, Medicinski fakultet; 2005.
3. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007.
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
Datum pristupa: 06.09.2020.
4. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
5. Cooper GM, Hausman RE, Lauc G - ur. Stanica: molekularni pristup, treće izdanje. Zagreb. Medicinska naklada. 2004.
6. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(6).
7. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221(1): 3–12. 8.
8. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(3):460–473.
9. Ornelas C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. Received (in Montpellier, France) 27th February 2011; DOI: 10.1039/c1nj20172g.
10. Fouda FRM, Mokhles M, Abd-Elzaher, Rafeek A i sur., On the medicinal chemistry of ferrocene. Inorganic Chemistry Department. National Research Centre. 2006.

11. Wael AA, Li Wang, Abid M i sur., Recent Progress in the Synthesis and Applications of Some Ferrocene Derivatives and Ferrocene-Based Polymers. 2010.
12. Sansook S, Lineham E, Hassell-Hart i sur., Probing the Anticancer Action of Novel Ferrocene Analogues of MNK Inhibitors, *Molecules*. 2018; 23(9):2126.
13. Gcrlen M, Pigeon P, Top S i sur., Synthesis, Cytotoxicity and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]Ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives against Human Cancer Cells. 2009.
14. Sivaev IB. Ferrocene and Transition Metal Bis(Dicarbollides) as Platform for Design of Rotatory Molecular Switches. *Molecules*. 2017; 22(12):2201.
15. Anderson CM, Jain SS, Silber L i sur., Synthesis and characterization of water-soluble, heteronuclear ruthenium(III)/ferrocene complexes and their interactions with biomolecules. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2015; 145:41-50.
16. Liu ZQ, Potential Applications of Ferrocene as a Structural Feature in Antioxidants. Department of Organoc Chemistry. 2011; 345-358.
17. Santos MM, Bastos P, Catela I, Zalewska K, Branco LC. Recent Advances of Metallocenes for Medicinal Chemistry. *Mini-Reviews Med. Chem*. 2017; 17, 771.
18. Hartinger CG, Metzler-Nolte N, Dyson PJ. Challenges and opportunities in the development of organometallic anticancer drugs. *Organometallics*. 2012; 31, 5677.
19. Ornelas C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem*. 2011; 35, 1973.
20. Jaouen G, Vessières A, Top S. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chemical Society Reviews*. 2015; 44(24), 8802–8817.
21. Belousov Yu A, Ostrovskaya LA, Sergeeva NS i sur., Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses, *Russian Chemical Bulletin*. 2014; 63(11):2405-2422.

22. Wani WA, Jameel E, Baig U, Mumtazuddin S, Hun LT. Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. *Eur J Med Chem.* 2015; 101:534-551. doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.009.
23. Huynh NT, Passirani C, Allard-Vannier E, Lemaire L, Roux J i sur., Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma. *Int. J. Pharm.* 2012; 423(1) 55-62. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.037. PMID: 21536115.
24. Snegur LV, Zykova SI, Simenel AA i sur., Redox-active ferrocene-modified pyrimidines and adenine as antitumor agents: structure, separation of enantiomers, and inhibition of the DNA synthesis in tumor cells. *Russ Chem Bull.* 2013; 62, 2056–2064.
25. Jadhav J, Juvekar A, Kurane R, Khanapure S, Salunkhe R, Rashinkar G. Remarkable anti-breast cancer activity of ferrocene tagged multi-functionalized 1,4-dihydropyrimidines. *Eur J Med Chem.* 2013; 65:232-239.
26. Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J i sur., Synthesis and anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine-3,6-dihydro-2H-thiopyranes – A new class of metallocene-nucleobase derivatives. *Organometallics.* 2013; 32, 5766.
27. Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J i sur., Metallocene-uracil conjugates: Synthesis and biological evaluation of novel mono-, di- and tri-nuclear systems. *Organomet. Chem.* 2015, 782, 52.
28. James P, Neudörfl J, Eissmann M, Jesse P, Prokop A, Schmalz HG i sur., Enantioselective Synthesis of Ferrocenyl Nucleoside Analogues with Apoptosis-Inducing Activity, 2006; 8, 2763.
29. Ambriović Ristov A. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2007.
30. Thermo Fisher Scientific, Fluorescence Tutorials, dostupno na: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/support/tutorials.html>
Datum pristupa: 30.08.2020.

31. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018; 120:5.1.1-5.1.11.
32. Murugan S, Amaravadi RK. Methods for Studying Autophagy Within the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 899:145–166.
33. Thomé MP, Filippi-Chiela, EC, Villodre ES i sur., Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science.* 2016; 129(24), 4622–4632.
34. Kater B, Hunold A, Schmalz H i sur., Iron containing anti-tumoral agents: unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137, 639–649.
35. Wang R, Chen H, Yan W i sur., Ferrocene-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, mechanisms of action and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem.* 2020; 190:112109.
36. Martinović I. Antioksidativni učinak novosintetiziranih derivata ferocena [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2017 [pristupljeno 02.09.2020.]
Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:246690>.
37. Aghvami M, Salimi A, Eshghi P, Zarei MH, Farzaneh S i sur., Targeting the mitochondrial apoptosis pathway by a newly synthesized COX-2 inhibitor in pediatric ALL lymphocytes. *Future Med. Chem.* 2018; 10, 2277.
38. Diwanji N, Bergmann A. An unexpected friend - ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 80:74-82.
39. Hillard E, Vessières A, Le Bideau F i sur., A series of unconjugated ferrocenyl phenols: prospects as anticancer agents. *Chem Med Chem.* 2006; 1(5):551-559.
40. Braga SS, Silva AMS. A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics.* 2013; 32, 5626.

41. Vessières A. Metal carbonyl tracers and the ferrocifen family: Two facets of bioorganometallic chemistry. *J Organomet. Chem.* 2013; 734, 3.
42. Schröder M, Yusein-Myashkova S, Petroval M i sur., The Effect of a Ferrocene Containing Camphor Sulfonamide DK-164 on Breast Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2019; 19, 000-000.
43. Podolski-Renić A, Dinić J, Bosze S i sur., Ferrocene–cinchona hybrids with triazolyl-chalcone linkers act as pro-oxidants and sensitize human cancer cell lines to paclitaxel. *Metallomics.* 2017; DOI: 10.1039/C7MT00183E.
44. Ci Y, Shi K, An, J i sur., ROS inhibit autophagy by downregulating ULK1 mediated by the phosphorylation of p53 in selenite-treated NB4 cells. *Cell death & disease.* 2014; 5, e1542.
45. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008; 445:77-88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4.
46. Žuvela L. Usporedba i odabir prikladne metode za djelotvornu analizu autofagije u staničnim uzorcima [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2019 [pristupljeno 02.09.2020.]
Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:257837>.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 12. 6. 1994. u Slavonskom Brodu. Završio sam osnovnu školu „Antun Mihanović“, nakon koje i opću gimnaziju „Matija Mesić“ u Slavonskom Brodu. 18. 7. 2014. godine započeo sam svoj akademski put upisavši preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku. U svibnju 2017. godine sudjelovao sam na trećoj međunarodnoj Chalnoky konferenciji, a u rujnu 2017. godine završio preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Nedugo nakon toga upisao sam diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika. Tijekom diplomskog studija sudjelovao sam na 4. Kongresu strukovnog razreda za Medicinsko-laboratorijsku djelatnost, koji se održao u lipnju 2018. godine u Zagrebu. Trenutno završavam 5. godinu diplomskog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika.