

# Antitumorski potencijal novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa

---

Milić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:336448>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lea Milić

**Antitumorski potencijal novosintetiziranih  
heterobimetalnih kompleksa**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lea Milić

**Anticancer potential of newly synthesized  
heterobimetallic complexes**

Graduation thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Anamarije Brozović, te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## ZAHVALA

*Prije svega, želim se zahvaliti svojoj mentorici, dr. sc. Anamariji Brozović na pruženoj prilici, povjerenju, pomoći, optimizmu te svim stručnim i prijateljskim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Vi ste primjer kakav bi svaki mentor trebao biti.*

*Također, zahvaljujem se i suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na svim savjetima i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i članovima Laboratorija prof. dr. Raić-Malić, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu na ustupljenim materijalima u svrhu izrade ovog diplomskog rada. Posebno hvala Silviju na savjetima i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala i svim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković. Hvala vam za odgovore na sva moja pitanja, uskakanje u pomoć kada je bilo potrebno te sve razgovore i šale.*

*Posebno hvala dr. sc. Vanji Tadić na svim savjetima, razgovorima i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Od srca ti hvala na posvećenom vremenu, uloženom trudu, beskrajnom strpljenju, kritikama, pohvalama, prenesenom znanju, odgovorima na sva moja pitanja i nedoumice te prekrasnoj atmosferi. Također hvala Juranu na pomoći, savjetima i urnebesnim pričama. Hvala vam što ste mi oboje učinili ovo iskustvo predivnim.*

*Ovim radom zatvaram jednu etapu svoga života do čijeg je kraja bilo teško doći, ali uz ogroman trud, volju i rad, sad napokon mogu reći: uspjela sam. No do toga nikada ne bih mogla doći bez podrške svoje obitelji. Stoga se najviše želim zahvaliti upravo njima. Neizmjereno hvala mojoj mami Josipi, tati Ivi te braći Filipu i Mateju što ste mi bili najveća podrška i oslonac kroz cijelo školovanje. Hvala što ste vjerovali u mene.*

*Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su me pratili na ovom putu. Hvala vam na svakom savjetu, razgovoru, druženju i zabavama tijekom svih ovih godina. Posebno hvala mojoj Loreni, Pauli, Rebeki, Sari, Ani, Valentini te svim drugima koji su zaslužni za to. Hvala Nikolini, Heleni, Ana-Mariji, Ivanu, Lovri na svakoj pomoći, druženjima, kavama, pričama i večerama. Vi ste dokaz da su prijateljstva na faksu od samog juga do istoka Hrvatske moguća.*

*Posebne zahvale idu mojoj Moreni. Ti si primjer prijateljice koja se samo jednom pronalazi. Mogla bih nadahnuto pisati, ali samo ću reći da svakome želim da u životu ima jednu Morenu. Ja sam svoju pronašla. Hvala ti što si mi poput sestre koju nikad nisam imala.*

*Za kraj, posebne zahvale idu i na nebo. Hvala ti bako na svemu. Nadam se da si ponosna.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Antitumorski potencijal novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa

Lea Milić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ferocen (bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil)željezo(II)) vrlo je značajan pripadnik skupine metalocena, organometalnih spojeva čiji se derivati intenzivno proučavaju kao potencijalni kandidati u liječenju tumora. Jedna od obećavajućih strategija je sinteza heterobimetalnih kompleksa koji uz ferocen u svojoj strukturi imaju i drugi metal čime bi se potencijalno mogli prevladati nedostaci široko korištenog kemoterapeutika cisplatine. U ovom diplomskom radu istraženo je biološko djelovanje dva novosintetizirana heterobimetalna kompleksa nikla s aminorocenskim ligandima. Navedeni kompleksi su odabrani za daljnja ispitivanja od prvotnih 20 sintetiziranih spojeva s ferocenom zbog stabilnosti i značajne toksičnosti kod stanica karcinoma vrata maternice HeLa ispitanih metodom MTT. Istom metodom ispitana je citotoksičnost odabranih kompleksa kod tumorskih linija stanica MES-OV, RPMI-7951 i MDA-MB-435 te na normalnoj liniji stanica. Oba su kompleksa pokazala manju toksičnost kod normalnih, u odnosu na tumorske linije stanica što ukazuje na njihovo selektivno djelovanje. Pomoću specifičnih inhibitora i prekursora sinteze glutationa pokazano je da glutation ne sudjeluje u odgovoru stanice na stres potaknut s oba kompleksa. Protočnom citometrijom pokazano je da oba kompleksa potiču nakupljanje stanica u fazama G0/G1 i S ciklusa stanice te uzrokuju apoptozu. Metodom *Western blot* utvrđeno je da tretmani kompleksima ne uzrokuju cijepanje proteina PARP-1, specifičnog biljega apoptoze te da povećanjem koncentracije oba kompleksa dolazi do smanjenja ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2.

**Ključne riječi:** tumor, ferocen, glutation, ciklus stanice, smrt stanice  
(61 stranica, 16 slika, 8 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Mentor:** Dr. sc. Anamaria Brozović, znanstveni savjetnik

**Komentor:** Dr. sc. Maja Matulić, izvanredni profesor

**Ocjenitelji:** Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

**Rad prihvaćen:** 8. 12. 2022.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

## Anticancer potential of newly synthesized heterobimetallic complexes

Lea Milić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Ferrocene (bis( $\eta^5$ -cyclopentadienyl)iron(II)) is an important member of metallocenes, organometallic compounds whose derivatives are intensively studied as potential candidates for tumor treatment. A promising strategy that could potentially overcome the disadvantages of the widely used chemotherapeutic agent cisplatin is the synthesis of heterobimetallic complexes that, in addition to ferrocene, have another metal in their structure. In this graduation thesis, the biological activity of two newly synthesized heterobimetallic complexes of nickel with aminoferrocene ligands was examined. The mentioned complexes were selected for further testing from the original 20 synthesized compounds with the ferrocenyl moiety, due to their stability and significant toxicity for human cervical carcinoma HeLa cells as tested by the MTT assay. Using the same method, the cytotoxicity of the selected complexes was tested on tumor cell lines MES-OV, RPMI-7951, MDA-MB-435 and on a normal cell line. Both complexes were less toxic for normal than for tumor cell lines, which indicates their selective action. Using specific inhibitors and precursors of glutathione synthesis, it was shown that glutathione was not involved in cell stress response caused by both complexes. Flow cytometry showed that both complexes stimulated the accumulation of cells in the G0/G1 and S phase of the cell cycle and caused apoptosis. Using the Western blot method, it was determined that treatments with the selected complexes did not cause cleavage of the PARP-1 protein, a specific marker of apoptosis, and that increasing the concentration of both complexes led to a decrease in the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2.

**Keywords:** tumor, ferrocene, glutathione, cell cycle, cell death  
(61 pages, 16 figures, 8 tables, 63 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

**Mentor:** Dr. Anamaria Brozović, Senior research associate

**Co-mentor:** Dr. Maja Matulić, Associate Professor

**Reviewers:** Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 8<sup>th</sup> December, 2022.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Tumori.....	1
1.2. Liječenje tumora .....	3
1.2.1. Kemoterapija .....	3
1.2.1.1. Ioni prijelaznih metala u kemoterapiji .....	5
1.2.2. Heterobimetalni kompleksi kao potencijalni antitumorski lijekovi.....	6
1.2.2.1. Ferocen i njegovi derivati.....	8
1.2.2.2. Uvođenje ferocena u biološki aktivne spojeve .....	9
1.3. Stanični ciklus .....	12
1.3.1. Regulacija staničnog ciklusa.....	12
1.4 Smrt stanice.....	14
1.4.1. Apoptoza .....	14
1.4.2. Neapoptotske vrste smrti stanice.....	15
1.5. Glutation .....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Materijali.....	19
3.1.1. Linije stanica .....	19
3.1.2. Kemikalije.....	19
3.1.3. Protutijela.....	25
3.1.4. Uređaji i pomagala.....	26
3.2. Metode .....	27
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	27
3.2.2. Analiza vijabilnosti stanica testom MTT.....	27
3.2.3. Analiza ciklusa stanica protočnom citometrijom.....	28
3.2.4. Analiza smrti stanica protočnom citometrijom.....	29
3.2.5. Analiza ekspresije proteina .....	30
3.2.5.1. Izolacija proteina.....	30
3.2.5.2. Određivanje koncentracije proteina .....	31



3.2.5.3. Elektroforeza.....	31
3.2.5.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu.....	32
3.2.5.5. Imunodetekcija proteina.....	33
3.2.6. Statistička analiza.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa .....	34
4.1.1. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ odabrani za daljnja biološka ispitivanja.....	34
4.1.2. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ pokazuju selektivno djelovanje i širok opseg antitumorskog djelovanja .....	36
4.1.3. Citotoksično djelovanje heterobimetalnih kompleksa $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ ne ovisi o količini glutationa u stanici .....	38
4.2. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ potiču nakupljanje stanica u G0/G1 i S fazi ciklusa stanice.....	40
4.3. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ potiču programiranu smrt stanice.....	43
5. RASPRAVA .....	48
6. ZAKLJUČAK .....	55
7. LITERATURA .....	56
8. ŽIVOTOPIS .....	61

## **POPIS KRATICA**

**ABB** - pufer za vezanje aneksina (engl. *annexin-binding buffer*)

**APAF-1** - faktor 1 aktivacije proteaza apoptoze (engl. *apoptotic protease activating factor-1*)

**ATCC** - engl. *American type culture collection*

**BCA** - bicinkonična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*)

**BPA** – bis(2-pikolil)aminski ligand (engl. *bis(2-picolyl)amine*)

**BSA** - albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

**BSO** - L-butionin sulfoksimin (engl. *buthionine sulfoximine*)

**CDK** – kinaza ovisna o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase*)

**CDKI** - inhibitor kinaze ovisne o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*)

**DD** - domena smrti (engl. *death domain*)

**DMEM** - modificirani Dulbeco Eagl medij za uzgoj (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

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

**DISC** - signalni kompleks koji inducira smrt (engl. *death inducing signaling complex*)

**EAT** - Ehrlichov ascitesni tumor (engl. *Ehrlich ascites tumor*)

**FCS** - goveđi fetalni serum (engl. *fetal calf serum*)

**FDA** - Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

**FITC** - fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*)

**GSH** -  $\gamma$ -glu-cys-gly - glutation, reducirani oblik (engl. *glutathione*)

**GSSG** - glutation disulfid, oksidirani oblik (engl. *glutathione disulfide*)

**IC20** - 20% maksimalne inhibitorne koncentracije spoja (engl. *20% inhibitory concentration*)

**IC50** - 50% maksimalne inhibitorne koncentracije spoja (engl. *50% inhibitory concentration*)

**IC80** - 80% maksimalne inhibitorne koncentracije spoja (engl. *80% inhibitory concentration*)

**IMDA** - iminodiacetamidski ligand (engl. *iminodiacetamide*)

**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (engl. *3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*)

**NAC** - N-acetil cistein (engl. *N-acetylcysteine*)

**PARP** - poli(ADP-riboza) polimeraza (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase*)

**PBS** - fiziološka otopina puferirana fosfatom (engl. *phosphate buffered saline*)

**PI** - propidij jodid (engl. *propidium iodide*)

**RNaza A** - Ribonukleaza A (engl. *ribonuclease A*)

**ROS** - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

**SDS-PAGE** - poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**TNF** - čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

**WHO** - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

**$\gamma$ -GCS** -  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaza (engl.  *$\gamma$ -glutamylcysteine synthetase*)

# 1. UVOD

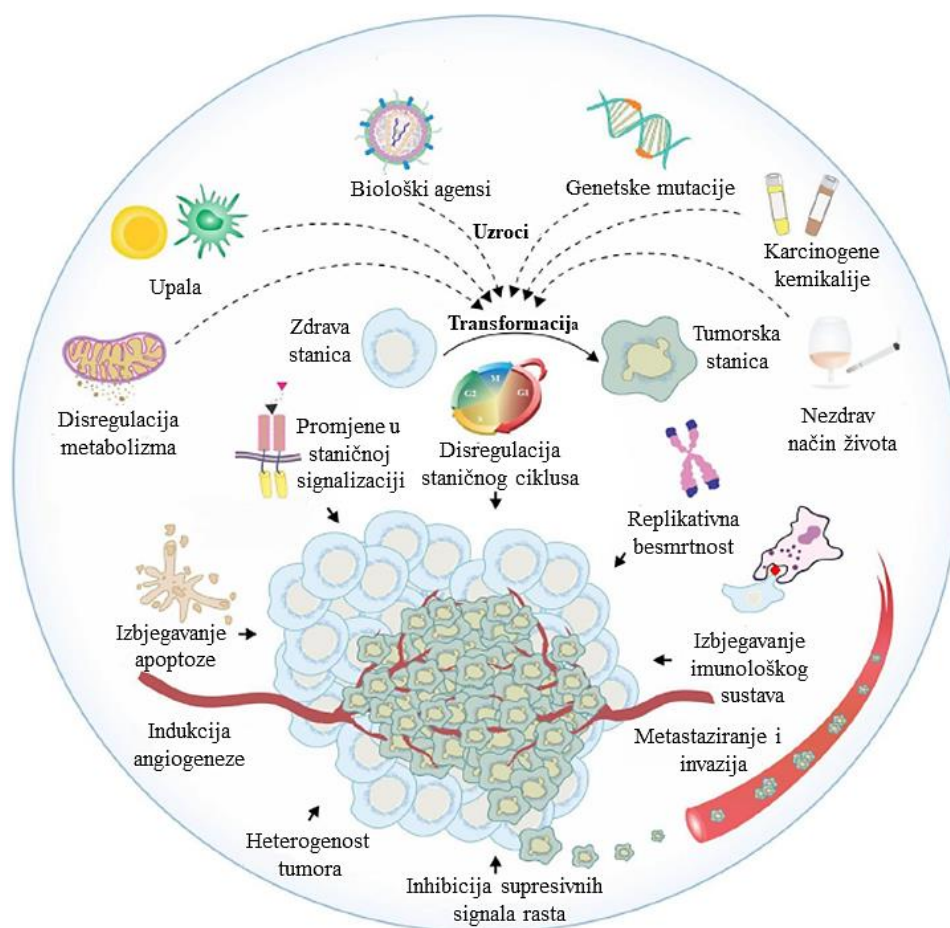
## 1.1. Tumori

Tumor ili neoplazma je nakupina atipičnih stanica određenog tkiva koja nastaje narušavanjem temeljnih regulacijskih mehanizama stanice. Razlikujemo benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne) tumore. Benigni tumor je lokaliziran, odnosno ograničen na svoje izvorno tkivo te za razliku od malignih tumora, nema sposobnost širenja i metastaziranja u susjedna niti udaljena tkiva. Obično ga je moguće kirurški ukloniti (Umar i sur. 2012; Cooper i Hausman 2004). Maligni tumori predstavljaju veliku opasnost za ljudski život zbog svoje sposobnosti širenja i metastaziranja u udaljene dijelove tijela. Nazivamo ih još i invazivnim tumorima. Tri ključna procesa za održavanje broja stanica u nekom tkivu su proliferacija, diferencijacija i smrt stanice. U normalnim su tkivima navedeni procesi u ravnoteži, dok kod tumora dolazi do narušavanja njihove ravnoteže. Tumori se klasificiraju prema tipu stanica iz kojih nastaju. Kod ljudi je najučestaliji karcinom, tumor nastao iz epitelnih stanica (Hassanpour i Dehghani 2017).

Ideja tumora kao bolesti datira od davne 400. godine pr. Kr., kada je Hipokrat, otac medicine, prvi put opisao i imenovao ovu skupinu oboljenja (Anand i sur. 2022). Postoje brojni dokazi koji ukazuju da je za nastanak tumora dovoljna maligna transformacija samo jedne stanice. Nastali neoplastični klon karakteriziraju brojne epigenetske i genetske promjene te će u konačnici prevladati klonovi stanica s onim promjenama koje nose selektivnu prednost. Stoga tumor, iako nastaje iz jedne ishodišne stanice, završava kao masa heterogenih stanica s različitim klonovima. Stanice s narušenim temeljnim regulacijskim mehanizmima rasta i proliferacije postaju tumorske stanice (Ponder 2001). Proces nastanka tumora naziva se karcinogeneza. Osnovni koraci u nastanku tumora su inicijacija, promocija i progresija. U fazi inicijacije dolazi do promjene normalne stanice u takozvanu dormantnu tumorsku stanicu. Takva promjena može biti potaknuta izlaganjem određenom kancerogenom agensu ili može nastati spontano. Inicijacija je ireverzibilan, brz proces koji je nasljedan jer inicirana stanica prenosi nastalu malignu promjenu na stanice kćeri. Nastale promjene uključuju aktivaciju određenih onkogenih i/ili inaktivaciju određenih tumor supresorskih gena, što rezultira narušavanjem regulacije signalnih puteva povezanih s proliferacijom, diferencijacijom i smrću stanice. Veći dio dormantnog perioda karcinogeneze odnosi se na promociju; sporiji, stupnjeviti proces koji može biti djelomično reverzibilan. Stanica u fazi promocije kao posljedica genomske nestabilnosti nakuplja dodatne mutacije od kojih su neke usputne (engl. *passenger*) mutacije koje ne nose selektivnu prednost te nisu važne za napredovanje

tumora, dok su druge pokretačke (engl. *driver*) mutacije koje nose selektivnu prednost te su važne za napredovanje tumora (Weinberg 2007). Progresija predstavlja posljednji korak neoplastične transformacije koja kod ljudi može trajati dugi niz godina. U stanici tumora se tada događaju brojne genetske i fenotipske promjene koje joj osiguravaju pokretljivost, sposobnost invazije i metastaziranja te konačno dovode do ubrzanog širenja tumora u organizmu (Siddiqui i sur. 2015).

Tumor zahvaljujući prikupljenim mutacijama nije ovisan o signalizaciji faktorima rasta, što mu omogućava ubranu i nekontroliranu proliferaciju. Druge bitne karakteristike tumorskih stanica su inhibicija supresivnih signala diobe, replikativna besmrtnost, izbjegavanje programirane smrti stanice (apoptoze), poticanje vlastite angiogeneze, sposobnost invazije i metastaziranja, izbjegavanje imunološkog sustava te velika genetska nestabilost uzrokovana nakupljanjem mutacija (Slika 1) (Anand i sur. 2022; Hanahan i Weinberg 2011).



**Slika 1.** Shematski prikaz molekularnih događaja koji dovode do transformacije normalne u tumorsku stanicu (gornji dio prikaza), te zajedničkih karakteristika stanica tumora (donji dio prikaza) (preuzeto i prilagođeno prema Anand i sur. 2022).

## 1.2. Liječenje tumora

Rak (bolest uzrokovana malignim tumorom) je ozbiljan zdravstveni problem koji prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, engl. *World Health Organization*) pripada vodećim uzrocima smrtnosti u svijetu (Garc i sur. 2018). Svake godine ova bolest uzrokuje smrt više milijuna ljudi diljem svijeta. 2020. godine dijagnosticirano je oko 19,3 milijuna ljudi oboljelih od raka od kojih je oko 10 milijuna završilo smrtnim ishodom. O ozbiljnosti ove bolesti govori činjenica da je trenutno u svijetu više od polovice svih kliničkih ispitivanja usmjereno na liječenje raka. Kemoterapija, radioterapija i kirurško odstranjenje tumora su desetljećima unazad bili jedini pristupi koji su se koristili u liječenju različitih vrsta raka (Debela i sur. 2021). Kirurško se uklanjanje tumora smatra najboljim pristupom u liječenju tumora u ranoj fazi napredovanja bolesti (Debela i sur. 2021), no mogućnost njegova izvođenja uvelike ovisi o veličini i smještaju tumorskog tkiva unutar organizma (Loktionov 2004). Radioterapija i kemoterapija pripadaju konvencionalnim, neselektivnim terapijama zbog sposobnosti indukcije smrti svih intenzivno proliferirajućih stanica, neovisno o tome radi li se o tumorskom ili zdravom tkivu. Posljedično, uzrokuju teške nuspojave koje uključuju narušavanje mentalnog i tjelesnog stanja bolesnika (Anand i sur. 2022). Nadalje, jedna od posljedica korištenja kemo- i radioterapije je razvoj otpornosti tumora na terapiju. S ciljem poboljšanja liječenja i smanjenja pojave otpornosti tumora na terapiju, koriste se različite kombinacije terapijskih pristupa. Osim navedenih konvencionalnih terapija, u posljednjih je nekoliko godina, zahvaljujući velikim napretcima u imunologiji, molekularnoj biologiji i virologiji, velika pažnja usmjerena ka biološkim terapijama (Schirmacher 2019). Koriste se različite ciljane terapije usmjerene na specifične signalne molekule, zatim hormonske terapije usmjerene na aktivnost hormona uključenih u razvoj tumora te imunoterapije usmjerene na aktivaciju imunološkog sustava u svrhu prepoznavanja i uklanjanja tumorskih stanica. Također se sve veći značaj pridaje personaliziranoj medicini-onkologiji koja se temelji na izradi molekularnog profila tumora i odabira lijeka koji najviše odgovara karakteristikama tumora individualnog bolesnika, čime se uvelike poboljšava kvaliteta liječenja (Anand i sur. 2022).

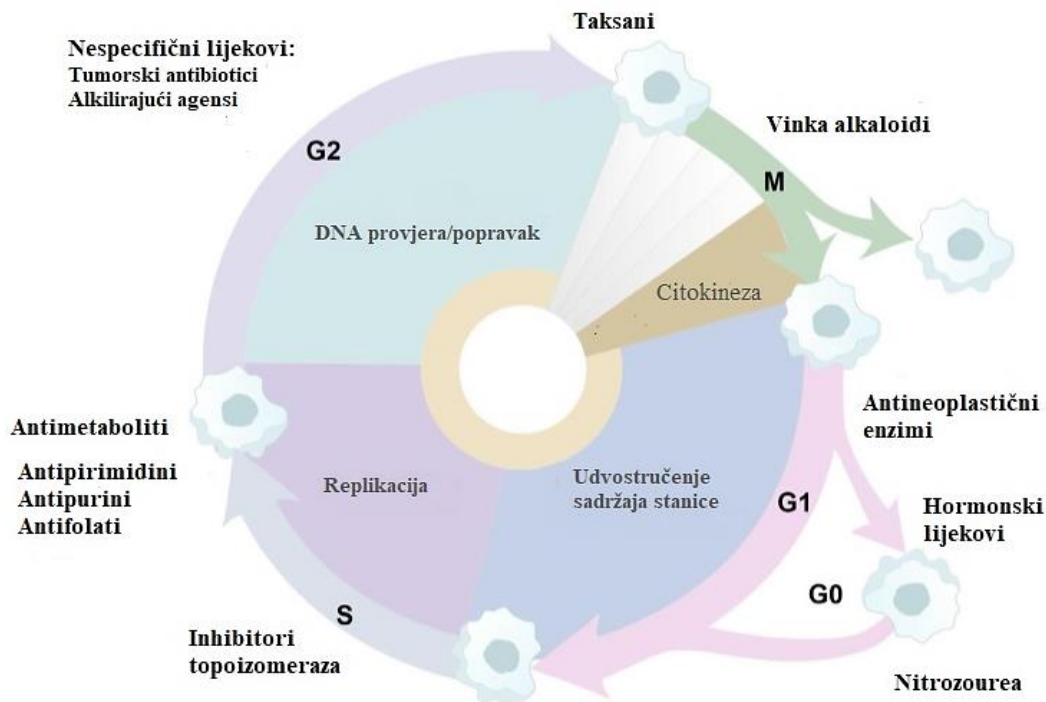
### 1.2.1 Kemoterapija

U klinici se, unatoč povećanoj upotrebi ciljanih terapija unazad nekoliko godina, i dalje uvelike primjenjuje kemoterapija. Kemoterapija se u svrhu liječenja raka počela koristiti u dvadesetom stoljeću. Tijekom Drugog svjetskog rata dolazi do velikih otkrića i istraživanja kemoterapeutika kroz četiri programa, koja su 1955. godine omogućila osnivanje Nacionalnog Instituta za kemoterapiju raka (Anand i sur. 2022; Chu 2008). Početkom dvadesetog stoljeća Paul

Ehrlich, slavni njemački kemičar, uvodi pojam kemoterapija. Definira ga kao upotrebu kemikalija za liječenje određenih bolesti, a učinkovitost kemikalija je ispitivao na životinjskim modelima. Bio je fokusiran na istraživanje potencijalnog liječenja zaraznih bolesti kao što je sifilis, no njegova otkrića su imala veliki utjecaj na daljnje istraživanje kemoterapeutika u svrhu liječenja tumora. Do sredine dvadesetog stoljeća u liječenju tumora su dominirali radioterapija i operativni zahvat, no veliki su problem predstavljale zaostale mikrometastaze. Taj se problem počeo smanjivati kombinacijom radioterapije i/ili operativnog zahvata s kemoterapeuticima. Nadalje, kemoterapija se počinje primjenjivati kao dodatna terapija nakon (adjuvantna) ili prije (neoadjuvantna) operativnog zahvata. Adjuvantna kemoterapija se primjenjuje s ciljem uništenja zaostalih mikrometastaza nakon operativnog zahvata, dok se neoadjuvantna kemoterapija primjenjuje s ciljem smanjenja tumorske mase u svrhu lakšeg kirurškog odstranjenja tumora (Chu 2008). Kemoterapija se može definirati kao terapija u kojoj se koriste kemikalije u svrhu inhibicije malignih stanica tumora, čija era korištenja započinje 40-ih godina dvadesetog stoljeća upotrebom antifolata i dušikovog iperita, spoja čija je uloga kemijskog oružja u Prvom svjetskom ratu prenamijenjena u antitumorsko djelovanje (Alam i sur. 2018; Chabner i Roberts 2005). Sredinom 50-ih godina dvadesetog stoljeća dolazi do sinteze 5-fluorouracila, analoga uracila i prvog kemoterapeutika koji je za razliku od tada korištenih kemoterapeutika za liječenje hematoloških karcinoma, usmjeren protiv niza solidnih tumora. Sinteza ovog kemoterapeutika je ostvarena zahvaljujući otkriću jedinstvenog biokemijskog puta u hepatomu štakora, gdje je primijećen povećan unos i iskorištavanje uracila u tkivu tumora u odnosu na normalno tkivo (Chu 2008).

Kemoterapeutici se klasificiraju na različite načine, npr. na temelju kemijske prirode, ciljne molekule, učinkovitosti i principa djelovanja protiv malignih tumora. To su citostatici koji djeluju na ciklus stanice (Slika 2) onemogućavajući njen rast i proliferaciju na različite načine kao što su npr. stvaranje adukata DNA, djelovanje na membranske pumpe te inhibicija djelovanja enzima bitnih za pravilnu replikaciju i popravak DNA (Schirrmacher 2019). Jedni od glavnih kemoterapeutika su alkilirajući agensi koji se preko alkilne skupine kovalentno vežu na DNA i time stvaraju adukte. Dolazi do pogrešnog sparivanja i loma lanaca DNA što naposljetku dovodi do nemogućnosti diobe stanice. To su primjerice klorambucil, doksorubicin, ciklofosfamid te lijekovi koji sadrže platinu kao što su cisplatina, karboplatina i oksaliplatina. Druga skupina kemoterapeutika su antimetaboliti koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina zahvaljujući svojoj strukturnoj sličnosti određenim endogenim molekulama. To su primjerice metotreksat i ranije spomenuti 5-fluorouracil. Ostali primjeri značajnih kemoterapeutika su kortikosteroidi, antitumorski antibiotici kao što je mitomicin-C, vinka alkaloidi kao što su vinblastin i vinkristin,

taksani npr. paklitaksel, inhibitori topoizomeraze koji uključuju antracikline npr. epirubicin, doksorubicin te kamptotecine npr. irinotekan i topotekan (Anand i sur. 2022).



**Slika 2.** Različite vrste kemoterapeutika korištenih za liječenje tumora (preuzeto i prilagođeno prema Anand i sur. 2022).

### 1.2.1.1. Ioni prijelaznih metala u kemoterapiji

Ioni prijelaznih metala imaju bitnu ulogu u biološkim sustavima, gdje kataliziraju toksične reakcije u stanici te se ujedno koriste i kao kofaktori (npr. kationi nikla,  $Ni^{2+}$  i bakra,  $Cu^{2+}$ ) u biološkim reakcijama. Metali imaju sposobnost stvaranja pozitivnog naboja u biološkim tekućinama što omogućava stvaranje veze između bioloških molekula bogatih elektronima kao što su DNA i proteini. Spoznaja da metali imaju različite funkcije u biološkim sustavima dovela je do sljedećih pitanja: postoji li mogućnost ugradnje iona metala u lijekove? Mogu li se koordinacijski spojevi prijelaznih metala koristiti kao potencijalni kemoterapeutici u liječenju tumora? Odgovor na navedena pitanja pokušava dati medicinska anorganska kemija. To je relativno mlada znanstvena disciplina koja se koristi za uvođenje metalnih iona u biološki sustav čovjeka što je

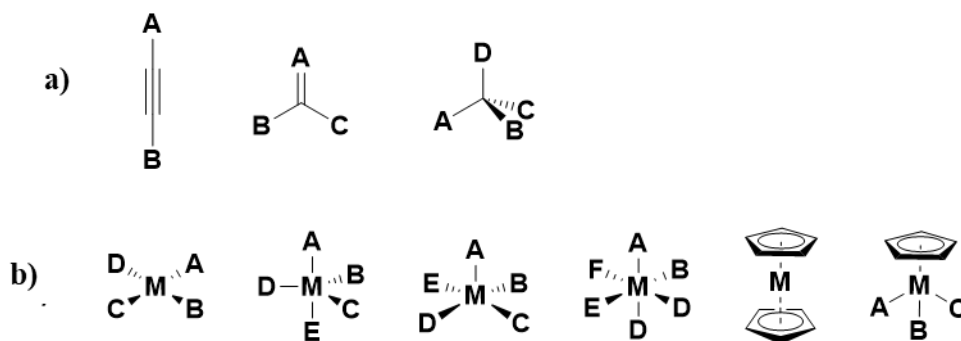


uvelike iskorišteno u terapijske i dijagnostičke svrhe. Jedan od najstarijih, ali i najuspješnijih lijekova na bazi metala (platine) je cisplatina. Smatra se konvencionalnom terapijom za liječenje širokog spektra tumora. Često se koristi kao adjuvantna i neoadjuvantna terapija. Mehanizam djelovanja cisplatine uključuje vezanje kationa platine ( $Pt^{2+}$ ) na dušične baze u molekuli DNA, obično na N7 poziciju adenina ili gvanina, što rezultira stvaranjem adukata DNA koji zajedno sa signalnim putevima aktiviranim kao odgovor na cisplatinu dovode do apoptoze stanice (Mjos i Orvig 2014). Aktivni se oblik cisplatine osim na nukleinske kiseline može vezati i na druge biološke molekule u stanici kao što su aminokiseline, peptidi (npr. glutation) i proteini, od kojih se uvelike ističu metalotioneini (Brozovic i Osmak 2010). Otpornost na lijekove (kemoterapeutike i/ili ciljane lijekove) koja se može razviti prije terapije (urođena, intrinzična otpornost) ili nakon terapije, odnosno djelovanja lijeka (stečena, ekstrinzična otpornost) odgovorna je za najveći udio (do 90%) smrtnosti bolesnika oboljelih od malignih tumora (Wang i sur. 2019). Neki od mogućih mehanizama stjecanja otpornosti tumora na kemoterapeutike su različite epigenetske promjene, mutacije gena, mijenjanje mete i metabolizma lijeka, povećano izlučivanje lijeka, pojačan mehanizam popravka DNA te supresija apoptoze (Mansoori i sur. 2017). Razvojem anorganske kemije napreduje sinteza novih spojeva, potencijalnih kemoterapeutika na bazi metala, ali još uvijek nisu otkriveni visoko učinkoviti lijekovi protiv invazivnih, metastatskih tumora. Stoga je potreba za kombinacijom različitih lijekova i sintezom novih spojeva poboljšanog dizajna neophodna (Mansoori i sur. 2017; Mjos i Orvig 2014).

### *1.2.2. Heterobimetalni kompleksi kao potencijalni antitumorski lijekovi*

Unatoč širokoj primjeni cisplatine i drugih lijekova na bazi metala, većina je današnjih lijekova biološkog ili organskog porijekla. Često se i dan danas potencijalni lijekovi na bazi metala otkrivaju u manjim istraživačkim ili akademskim grupama, nakon čega farmaceutske kompanije razvijaju tzv. metalolijek pogodan za daljnja ispitivanja (Mjos i Orvig 2014). Kao što je spomenuto u poglavlju 1.2.1.1., veliku ulogu u počecima razvoja i upotrebe metalnih kompleksa u terapijske svrhe imao je Paul Ehrlich. Zaslužan je za sintezu metalnog kompleksa arsfenamina poznatog i pod nazivom spoj 606 ili Salvarsan, koji je najraniji primjer metalnog kompleksa definirane strukture koji se do otkrića penicilina primjenjivao za liječenje sifilisa. Godinama kasnije dolazi do otkrića cisplatine, što je dodatno potaknulo sintezu i istraživanje moguće upotrebe različitih metalnih kompleksa u terapijske svrhe. Aktivnost i biofizikalna svojstva metalnih kompleksa ovise o raznim čimbenicima kao što su npr. vrsta koordiniranih liganada, koordinacijska geometrija te vrsta samog metala i njegovo oksidacijsko stanje. Također, prednosti metalnih kompleksa u odnosu na

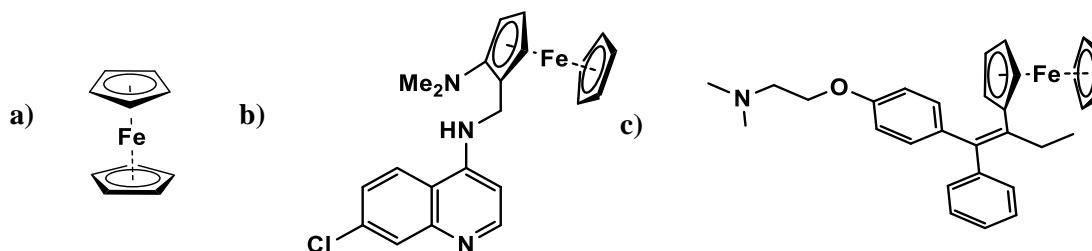
organske molekule su raznovrsnija geometrija koja može pokriti širi farmakoforni prostor te mogućnost stvaranja većeg broja stereoisomera, a posljedica su metala u strukturi biološki aktivnog spoja (Slika 3) (Karges i sur. 2021). Razvoj koordinacijske kemije omogućio je bolji dizajn spojeva u svrhu shvaćanja njihovog djelovanja, smanjenja ozbiljnih nuspojava te uspostave veće specifičnosti za tumorsko tkivo (Mjos i Orvig 2014). Zbog istaknutog značaja metalnih iona u biološkim procesima, sintetiziraju se različiti metalni kompleksi s visokom selektivnosti, citotoksičnosti i antimetastatskom aktivnosti. Jedna od obećavajućih strategija je sinteza heterobimetalnih kompleksa, odnosno ugradnja drugog metalnog centra s različitim biološkim metama čime bi se potencijalno mogli prevladati nedostaci cisplatine i njezinih analoga te uvelike poboljšati učinkovitost liječenja. Takvi se spojevi kao potencijalni antitumorski lijekovi istražuju već duži niz godina (Patra i Gasser 2017; Mjos i Orvig 2014). Heterobimetalni kompleksi platine i drugih metala (npr. srebra, rutenija, paladija, željeza, bakra) pokazali su značajan citotoksični učinak na stanice tumora. Primjerice, heterobimetalni kompleks platine i srebra pokazao je visoki citotoksični učinak na stanice raka jajnika (Melounková i sur. 2021). Svoj potencijal kao mogući antitumorski lijekovi pokazali su i različiti heterobimetalni kompleksi koji ne uključuju platinu, kao i derivati ferocena (Patra i Gasser 2017).



**Slika 3.** Geometrija organskih i metalnih kompleksa: **a)** linearna, planarna, tetraedarska geometrija organskih spojeva sa središnjim ugljikovim atomom; **b)** kvadratno planarna, trigonalno bipiramidalna, kvadratno piramidalna, oktaedarska, "sendvič" i "polu-sendvič" geometrija metalnih kompleksa (preuzeto iz Karges i sur. 2021).

### 1.2.2.1. Ferocen i njegovi derivati

Ferocen (bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil)željezo(II)) je vrlo značajan pripadnik skupine metalocena, organometalnih spojeva s dva ciklopentadienilna liganda vezana za atom metala (Gasser i sur. 2011). Struktura "sendviča" ferocena uključuje središnji metalni kation ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na koji su organometalnom vezom vezana dva ciklopentadienilna aniona (Slika 4a). Oni se sastoje od  $6\pi$  delokaliziranih elektrona koje doniraju  $\text{Fe(II)}$  kationu, što mu omogućava postizanje elektronske konfiguracije plemenitog plina (Astruc 2017). Ovaj je spoj prvi put sintetiziran 1951. godine, otkada se njegovi derivati intenzivno proučavaju kao potencijalni kandidati u liječenju tumora te različitih bakterijskih i parazitskih bolesti. Karakterizira ga inertnost u vodi i zraku, topivost u organskim otapalima kao što su benzen i alkohol, netopivost u vodi, termodinamička stabilnost do  $400^\circ\text{C}$  te jednoelektronska oksidacija kojom nastaje stabilni produkt, ferocenijev kation ( $\text{Fc}^+$ ). Derivati ferocena su vrlo značajni ligandi u koordinacijskoj kemiji, a od biološki aktivnih spojeva koji u strukturi sadrže ferocen ističu se ferokin (Slika 4b) i ferocifen (Slika 4c) koji se uvelike proučavaju u liječenju malarije i raka (Astruc 2017; Patra i Gasser 2017).



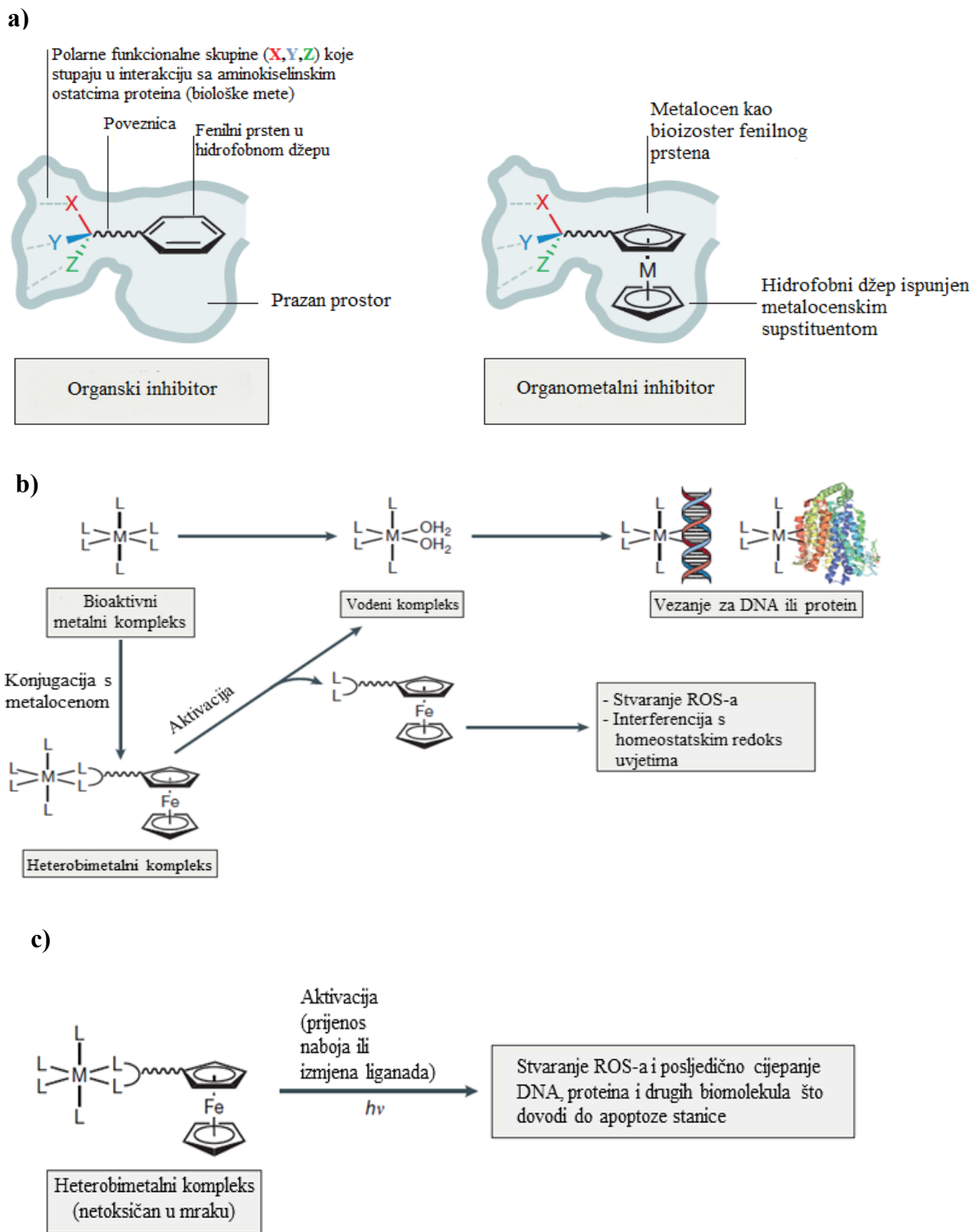
**Slika 4.** Ferocen (a) i derivati ferocena: ferokin (b) i ferocifen (c) (preuzeto iz Patra i Gasser 2017).

Ferocen je zbog svojih brojnih, značajnih svojstava kao što su pogodna elektrokemijska svojstva, sposobnost reagiranja s biološkim supstratima, lipofilnost te stabilnost u vodi i zraku, pronašao primjenu u različitim područjima kemije i medicine. Uvođenje ferocenske skupine u kemijske strukture potencijalnih kandidata za lijekove ili u kemijske strukture spojeva koji su odobreni za kliničku primjenu predstavlja mogućnost pronalaska učinkovitijih lijekova za liječenje različitih bolesti uključujući i rak. Kao potencijalni antitumorski lijekovi se krajem 70-ih godina dvadesetog stoljeća počinju sintetizirati spojevi s ferocenom kao strukturnom podjedinicom. Prvi takvi sintetizirani derivati ferocena sadržavali su amidnu ili amino skupinu te su bili namijenjeni za liječenje limfocitne leukemije. Nakon toga su uslijedila istraživanja antitumorskih svojstava ferocenskih soli za koje je dokazana učinkovitost protiv Ehrlichovih ascitesnih tumora (EAT, engl. *Ehrlich ascites tumor*) (Patra i Gasser 2017). Köpf-Maier i sur. su 1984. godine na miševima s

EAT-om pokazali da je primjena soli oksidiranih oblika ferocena s različitim anionima uzrokovala preživljenje do 83% miševa (u odnosu na miševe bez tretmana), dok primjena ferocena kao neutralne molekule nije pokazala antitumorski učinak protiv EAT. Nakon toga započinje intenzivno traganje za što učinkovitijim derivatima ferocena u liječenju tumora kao što je npr. sinteza konjugata ferocena s peptidima ili biološki aktivnim molekulama (Links 2011). Krajem dvadesetog stoljeća otkriveno je da derivati ferocena mogu ostvariti svoje citotoksično djelovanje stvaranjem reaktivnih kisikovih radikala, što je dodatno potaknulo istraživanje njihovih antitumorskih sposobnosti (Astruc 2017; Patra i Gasser 2017).

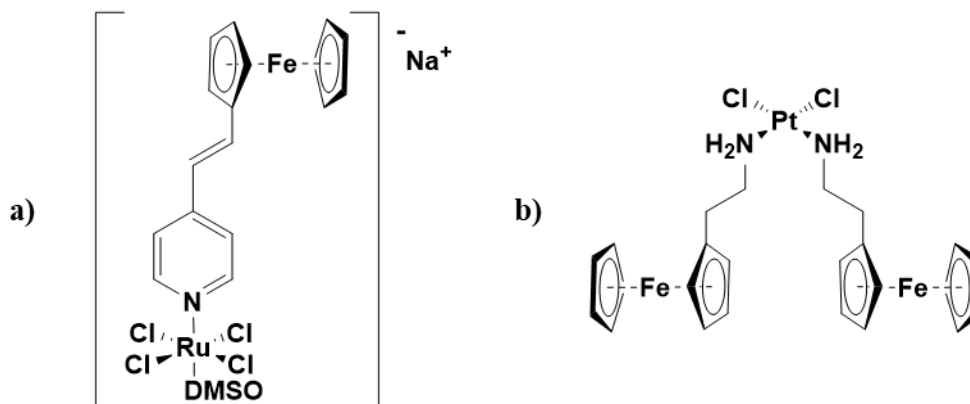
#### *1.2.2.2. Uvođenje ferocena u biološki aktivne spojeve*

Ferocen se u strukturu biološki aktivnih spojeva uvodi: 1) bioizosternom zamjenom organske (fenilne) skupine s ferocenom pri čemu nastali organometalni derivati pokazuju znatno bolju sposobnost inhibicije enzima od interesa u odnosu na svoje organske analoge (Slika 5a); 2) u obliku ferocenskih prolijekova - heterobimetalni kompleksi nastali uvođenjem ferocenske skupine u biološki aktivne metalne komplekse predstavljaju prolijekove sa sposobnošću aktivacije elektrofilnih oblika ferocena i drugog metala uključenog u njihovu strukturu (Slika 5b); 3) kao fotoaktivni heterobimetalni kompleks - bimetalni kompleks je inertan u osnovnom stanju, a nakon fotoaktivacije (svjetlosne aktivacije) nastaje pobuđeni kompleks koji ima mogućnost stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) koji oštećuju biomakromolekule (Slika 5c) (Patra i Gasser 2017).



**Slika 5.** Uvođenje ferocena u biološki aktivne spojeve i mehanizmi djelovanja nastalih derivata. **a)** organometalni derivati; **b)** ferocenski prolijekovi; **c)** fotoaktivni heterobimetalni kompleksi (preuzeto i prilagođeno prema Patra i Gasser 2017).

Nastali heterobimetalni kompleksi (Slika 5b) kao potencijalni antitumorski kemoterapeutici, uz ferocen koji sadrži željezo u svojoj strukturi imaju i drugi metal (obično srebro, platinu, paladij), no sve češće se, u njihovu strukturu uključuju metali poput bakra, nikla i rutenija s ciljem postizanja veće učinkovitosti. Najveći nedostatak upotrebe takvih heterobimetalnih kompleksa koji uključuju ferocensku skupinu je slabo shvaćanje mehanizama njihova djelovanja. Smatra se da svoje djelovanje ostvaruju vezanjem za biološke makromolekule kao što su DNA i proteini dok s druge strane zahvaljujući metalocenskoj strukturalnoj podjedinici mogu potaknuti stvaranje ROS-a u stanici. Navedena djelovanja dovode do smrti stanice. Prvi takav heterobimetalni kompleks, koji je uz željezo sadržavao platinu, sintetiziran je 1988. godine. Primjer heterobimetalnog kompleksa koji pokazuje veću citotoksičnost za stanice tumora debelog crijeva u odnosu na cisplatinu je *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(2-ferocenilaminoetan)<sub>2</sub>] (Slika 6b). Također je pokazano da dodavanje ferocenske skupine određenim potencijalnim kemoterapeuticima koji su već u kliničkim ispitivanjima, kao što je npr. kompleks rutenija (III) pod nazivom NAMI-A (nastali spoj Fc-NAMI, Slika 6a), pospješuje njihovu biološku aktivnost. U svrhu potencijalne kliničke upotrebe, bitno je detaljno ispitati i shvatiti mehanizme djelovanja takvih sintetiziranih heterobimetalnih kompleksa (Astruc 2017; Patra i Gasser 2017).



**Slika 6.** Primjeri heterobimetalnih kompleksa kao potencijalnih kemoterapeutika:

**a)** Na[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(dmsO){1-ferocenil-2-(4-piridil)eten}], Fc-NAMI; **b)** *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(2-ferocenilaminoetan)<sub>2</sub>] (preuzeto iz Patra i Gasser 2017).

### 1.3. Stanični ciklus

Stanični ciklus je energetski zahtjevan proces koji predstavlja skup organiziranih događaja odgovornih za pravilnu diobu stanice u dvije stanice kćeri (Diaz-Moralli i sur. 2013). To je strogo reguliran proces koji uključuje rast stanice, replikaciju DNA, raspodjelu udvostručenih kromosoma na stanice kćeri i podjelu stanice. Za razliku od složenog ciklusa eukariotskih stanica koji je većinom podijeljen na četiri faze (G1, S, G2 i M), ciklus bakterijskih stanica nije točno definiran te većinskim dijelom uključuje stanični rast i replikaciju DNA (Lamothe i Sherratt 2019). Kod eukariota, faze G1, S i G2 čine dio ciklusa stanice koji se naziva interfaza. U fazi S (od engl. *synthesis*) dolazi do replikacije genetskog materijala, u G1 i G2 (od engl. *gaps*) koji se nalaze ispred faze S odnosno M (od engl. *mitosis*), stanica raste te se priprema za iduću fazu. U fazi M koja uključuje mitozu i citokinezu dolazi do dijeljenja stanice u svrhu stvaranja dvije stanice kćeri. Ciklus tipične proliferirajuće ljudske stanice traje 24 sata, gdje faza G1 traje oko 11 sati, faza S oko 8 sati, faza G2 oko 4 sata i faza M oko 1 sat (Schnerch 2012; Alberts i sur. 2010).

#### 1.3.1. Regulacija staničnog ciklusa

Stanice mogu ući u fazu G1 nakon završetka citokineze (proliferirajuće stanice) ili iz faze mirovanja (G0). Ulaz stanica iz faze G0 u G1 potaknut je mitogenima ili faktorima rasta koji omogućavaju prijelaz stanica kroz kontrolnu točku koja se naziva restriksijska točka faze G1. Napredovanje stanica kroz fazu G1 ovisno je o mitogenima do prijelaza G1 restriksijske točke. Nakon prijelaza ove kontrolne točke, napredovanje stanica kroz ciklus je neovisno o mitogenim signalima (Diaz-Moralli i sur. 2013). Prijelaz stanica kroz različite faze ciklusa je reguliran grupom proteina koji se nazivaju ciklini i kinaze ovisne o ciklinu (CDK, engl. *cyclin-dependent kinase*). Ciklini su regulatorne podjedinice CDK koji svojim vezanjem uzrokuju njihovu konformacijsku promjenu i aktivaciju. Dobili su ime prema cikličkim promjenama u koncentracijama koje periodički rastu i opadaju tijekom ciklusa (Bai i sur. 2016). Animalne stanice imaju više različitih ciklina i CDK. Signalni put Ras/Raf/ERK omogućava sintezu ciklina D, koji zajedno sa CDK4/6 omogućava prijelaz kroz G1 restriksijske točke ciklusa. Za daljnje odvijanje staničnog ciklusa potrebni su ciklin E koji je zajedno sa CDK2 odgovoran za napredovanje kroz kasnu G1 fazu te prijelaz iz faze G1 u S, ciklin A koji je zajedno sa CDK2 odgovoran za napredovanje kroz fazu S te ciklin B koji je sa CDK1 odgovoran za prijelaz iz faze G2 u M ciklusa stanice. Aktivirane CDK potiču nizvodne procese fosforilacije ciljnih proteina na treoninu i serinu te tako osiguravaju izvršavanje događaja ključnih za proliferaciju stanica (Alberts i sur. 2010).

Oštećenjem DNA dolazi do zaustavljanja ciklusa stanice s ciljem sprječavanja replikacije oštećene DNA i diobe stanice. Stoga je ciklus stanice osim pomoću vanjskih regulatora, reguliran i unutrašnjim kontrolnim točkama koje omogućavaju popravak nastalog oštećenja. Ukoliko je oštećenje preveliko, kontrolne točke omogućavaju odlazak stanice u senescenciju ili apoptozu. Ukoliko dođe do oštećenja DNA tijekom faze G1 ciklusa stanice, s ciljem sprječavanja ulaska stanice u fazu S, dolazi do aktivacije kontrolne točke G1/S koja se nalazi na prijelazu faze G1 u S. U slučaju replikacijskog stresa, dolazi do aktivacije kontrolne točke unutar faze S (engl. *intra-S-checkpoint*). Zaustavljanjem replikacijskih rašlji npr. djelovanjem agensa hidroksiureje dolazi do aktivacije kontrolne točke u fazi S, što će dovesti do zaustavljanja ciklusa stanice i nemogućnosti ulaska u fazu G2. U slučaju oštećenja DNA u fazi S ili G2 ciklusa, doći će do zaustavljanja ciklusa u kontrolnoj točki G2/M koja se nalazi na prijelazu faze G2 u M ciklusa stanice. Glavna svrha ove kontrolne točke je onemogućiti diobu stanice s oštećenjem. Kontrolna točka mitoze koja se nalazi na prijelazu metafaze u anafazu provjerava uspješnost vezanja kromosoma za niti diobenog vretena što je bitno za njihovu pravilnu raspodjelu na stanice kćeri (Alberts i sur. 2010; Cooper i Hausman 2004). Za regulaciju ciklusa stanice važna je indukcija inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (CDKI, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*) koje omogućavaju zaustavljanje ciklusa zbog prethodno detektiranog oštećenja u određenoj kontrolnoj točki. Kontrolne točke ne dopuštaju prijelaz u sljedeću fazu staničnog ciklusa dok nisu izvršene sve radnje iz prethodne faze te su na taj način ključne za koordinaciju događaja u ciklusu koji se moraju događati prema točno određenom redu (Diaz-Moralli i sur. 2013; Cooper i Hausman 2004).

Brojni endogeni i egzogeni procesi kao što su upala, ROS te ionizirajuće zračenje mogu narušiti mehanizme proliferacije stanice i oštetiti sam genom koji se dalje prenosi na stanice kćeri. U svrhu izbjegavanja nasljeđivanja takvog genoma, kontrolne točke imaju veliku ulogu u zaustavljanju ciklusa stanice u slučaju oštećenja. Takvo se oštećenje u stanici pokušava popraviti ili se, ukoliko se radi o velikom i teško popravljivom oštećenju, potiče smrt stanice. Narušavanje funkcije kontrolnih točaka dovodi do genomske i kromosomske nestabilnosti koje mogu dovesti do nastanka mutacija te posljedično karcinogeneze. Razumijevanje biokemije kontrolnih točaka i njihove promijenjene regulacije u tumorima otvara nove mogućnosti u liječenju (Visconti i sur. 2016).



## 1.4. Smrt stanice

Diferencijacija, proliferacija i smrt stanice predstavljaju glavne procese u regulaciji broja stanica nekog tkiva. Smrt stanice ima veliku ulogu u odvijanju brojnih procesa kao što su embriogeneza, razvoj imunološkog sustava i održavanje homeostaze čitavog organizma. Predstavlja mehanizam zaštite od stanične transformacije jer se promijenjene i potencijalno opasne stanice uklanjaju iz organizma (Tait i sur. 2014). Poremećaji u mehanizmima koji vode smrti stanica mogu dovesti do nastanka različitih patoloških stanja kao što su kronične i akutne degenerativne bolesti uzrokovane prekomjernim umiranjem stanica ili tumori uzrokovani preživljavanjem poremećenih stanica. (Hassan i sur. 2014). Vrlo bitna sposobnost animalnih stanica je prepoznavanje oštećenja u vlastitim organelima. Jedan od bitnih primjera je oštećenje DNA koje, ako se ne popravi, može dovesti do mutageneze, a posljedično i karcinogeneze. U slučaju nemogućnosti popravka oštećenja DNA, inducira se smrt stanice (Alberts i sur. 2010). Najbolje istražen oblik programirane smrti stanice je apoptoza, ali postoje i razni neapoptski oblici smrti stanice koji se mogu inducirati zbog neuspjeha apoptoze ili neovisno o njoj (Tait i sur. 2014).

### 1.4.1. Apoptoza

Apoptoza je evolucijski najočuvaniji oblik programirane smrti stanice. Zasniva se na aktivnosti kaspaza, cisteinskih aspartat specifičnih proteaza, koje u stanicipostoje u inaktivnom oblikukao prokaspaze (Tait i sur. 2014; Alberts 2010). Apoptozu karakteriziraju razne morfološke promjene stanice, fragmentacija DNA, kondenzacija kromatina i raspad jezgre na manje komadiće. Naposljetku dolazi do fragmentacije čitave stanice u apoptotska tjelešca, manje komadiće okružene membranom koje učinkovito prepoznaju i fagocitiraju makrofazi (Cooper 2004). Jedno od osnovnih obilježja tumora je sposobnost izbjegavanja apoptoze, stoga je od velike važnosti shvaćanje mehanizama odvijanja ovog procesa (Hassan i sur. 2014).

Vanjski put apoptoze uključuje posredovanje receptora smrti koji se aktiviraju vezanjem izvanstaničnih signalnih proteina. Homotrimerni receptori smrti (FAS, TNFR) pripadaju obitelji receptora TNF (engl. *tumor necrosis factor*) koji sadrže izvanstaničnu domenu za vezanje liganda, transmembransku domenu te citoplazmatsku domenu koja se naziva domena smrti (DD, engl. *death domain*). Homotrimerni receptori smrti se aktiviraju vezanjem homotrimernih liganada koji pripadaju obitelji signalnih proteina TNF. Konformacijska promjena receptora uzrokovana vezanjem liganda dovodi do pojave citoplazmatske DD što omogućava vezanje proteina adaptora kao što su FADD (engl. *fas-associated death domain protein*) i TRADD (engl. *TNF receptor-associated death domain protein*). Proteini adaptori regrutiraju prokaspazu 8 te nastaje kompleks

DISC (engl. *death inducing signaling complex*). Inicijacijska kaspaza 8 se nakon aktivacije otpušta u citosol gdje aktivira nizvodne, efektorske kaspaze koje dalje cijepaju ciljne proteine u stanici što naposljetku dovodi do apoptoze stanice (Alberts i sur. 2010; Elmore 2007).

Unutarnji ili mitohondrijski put apoptoze ne ovisi o receptorima i vanjskim signalima, već o unutarnjim signalima kao što su oksidativni stres i oštećenje DNA (Elmore 2007). Posredovan je evolucijski visokoočuvanim membranskim proteinima obitelji Bcl-2, od kojih neki imaju proapoptotsku (npr. Bax, Bac, Bad, Bim), a neki antiapoptotsku ulogu (npr. Bcl-xl, Bcl-2). Odvijanje i regulacija apoptoze ovise o omjeru proapoptotskih i antiapoptotskih proteina u stanici. Aktivnost proapoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2 se temelji na kontroli otpuštanja citokroma c i drugih membranskih proteina u citosol. Bitna komponenta unutarnjeg puta apoptoze je citokrom c koji se ispuštanjem u citosol veže za protein Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) u kompleks koji se naziva apoptosom. Proteini Apaf-1 u apoptosomu regrutiraju prokaspazu 9 koja nakon aktivacije pokreće kaspaznu kaskadu aktivirajući nizvodne efektorske kaspaze za poticanje apoptoze (Opferman i Kothari 2017).

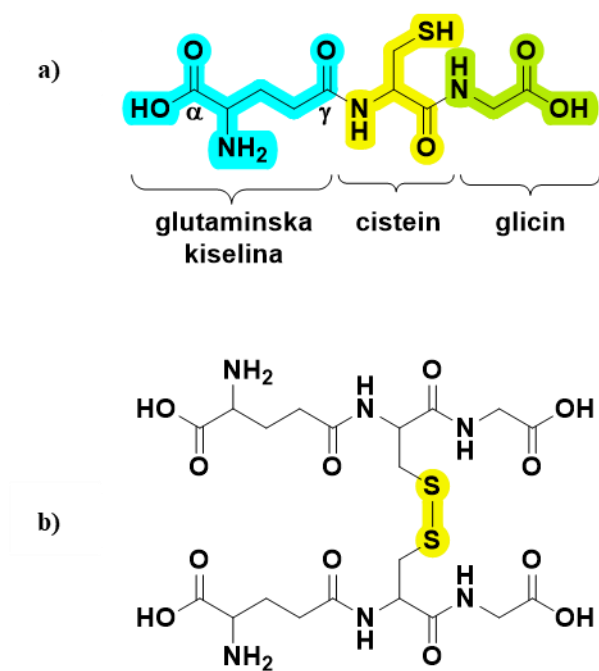
#### *1.4.2. Neapoptotske vrste smrti stanice*

Osim apoptoze, postoje i drugi oblici smrti stanice kao što su npr. autofagija, nekroza, kornifikacija, mitotska katastrofa, anoikis, paraptoza, piroptoza, pironekroza i drugi (Tait i sur. 2014). Nekroza je, za razliku od apoptoze, nekontrolirana smrt stanice u kojoj kao posljedica narušavanja integriteta stanične membrane dolazi do izlivanja staničnog sadržaja i upale. U normalnim stanicama postoje dva načina razgradnje nepotrebnih proteina: proteoliza posredovana ubikvitinom u proteasomima te autofagija u lizosomima. Tijekom procesa autofagije dolazi do uklanjanja nepotrebnih ili oštećenih organela u lizosomima, vezikulama ispunjenim hidrolitičkim enzimima. Stanice koje podliježu autofagiji, nekrozi ili apoptozi se međusobno morfološki razlikuju (Okada i Mak 2004). S obzirom na činjenicu da mnoge vrste tumora suprimiraju apoptozu, neapoptotske vrste stanične smrti otvaraju nove mogućnosti u liječenju tumora (Okada i Mak 2004; Tait i sur. 2014).

### **1.5. Glutation**

Glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cisteinilglycine) je niskomolekulski tripeptid s tiolnom (-SH) grupom cisteina u aktivnom mjestu. Pronađen je u svim tkivima sisavaca te većini ostalih životinja, mikroorganizama i biljaka. U eukariotskim se stanicama najveći udio GSH nalazi u citosolu, a

manji dio u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. Glutation je zbog svoje mogućnosti postojanja u reduciranom (GSH) (Slika 7a) i oksidiranom obliku (GSSG) (Slika 7b) vrlo bitan za održavanje redoks statusa unutar stanice. Većinski udio glutathiona u stanici predstavlja njegov reducirani oblik dok se manje od 1% glutathiona nalazi u oksidiranom obliku. Glutation predstavlja zaštitni mehanizam stanice od elektrofila i reaktivnih dušikovih i kisikovih vrsta (Lushchak 2012). Osim u zaštiti od oksidativnog stresa, glutathion sudjeluje u radu određenih transkripcijskih faktora te ima ulogu i u metabolizmu ksenobiotika i nutrijenata u stanici. Zbog višestrukih uloga u stanici, ciljanje glutathiona i njegovog metabolizma se uvelike istražuje u svrhu liječenja raznih bolesti uključujući i rak (Reliene i Schiestl 2006).



**Slika 7.** Reducirani (a) i oksidirani (b) oblik glutathiona  
(preuzeto i prilagođeno prema Lushchak 2012).

Kao posljedica oksidativne fosforilacije, aerobnog načina proizvodnje energije u mitohondrijima eukariotskih stanica, dolazi do oslobađanja ROS-a u citosol koji su zbog svoje uključenosti u brojne signalne puteve bitni za preživljenje stanice, ali u velikim koncentracijama mogu uzrokovati oštećenja bitnih bioloških makromolekula kao što su DNA i proteini (Traverso i sur. 2013). Stoga su antioksidansi izuzetno bitni za održavanje uravnoteženog redoks stanja u stanici u svrhu sprječavanja nastanka ireverzibilnih oštećenja u stanici. Oksidativni stres dovodi do

neuravnoteženog redoks stanja u stanici te se povezuje s razvojem tumora i brojnih drugih bolesti kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Smatra se da oksidativni stres dovodi do povećanja stope mutacije gena (npr. nastanak 8-OH deoksigvanozina koji dovodi do transverzije GC → TA zbog sparivanja s adeninom) i nastanka rearanžmana genoma, što utječe na signalne puteve povezane s diferencijacijom, rastom i smrti stanice te posljedično pridonosi razvoju tumora (Reliene i Schiestl 2006). U brojnim tumorima uočene su povišene koncentracije antioksidansa glutaciona što povećava otpornost tumorskih stanica na oksidativni stres te ih time čini rezistentnijima na kemoterapeutike. Često se za proučavanje uloge glutaciona u stanicama tumora koristi L-butionin sulfoksimin (BSO, engl. *L-buthionine sulfoximin*) koji ireverzibilno inhibira  $\gamma$ -glutamylcistein sintetazu ( $\gamma$ -GCS), enzim ključan u sintezi glutaciona (Traverso i sur. 2013) te time potencijalno čini tumorske stanice osjetljivijima na tretman zračenjem ili kemoterapeuticima (Reliene i Schiestl 2006) te N-acetil cistein (NAC, engl. *N-acetylcysteine*), netoksični analog cisteina koji ima ulogu prekursora u sintezi glutaciona (Han i Park 2009).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je ispitati citotoksičnost dva odabrana novosintetizirana heterobimetalna kompleksa koristeći liniju stanica HeLa kao eksperimentalni model te istražiti mogući mehanizam njihovog citotoksičnog učinka u svrhu potencijalne primjene u liječenju malignih tumora.

### **Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:**

- a) Ispitati toksičnost 20 novosintetiziranih derivata ferocena i njihovih metalnih kompleksa korištenjem ljudske linije stanica raka vrata maternice (HeLa) kako bi se za daljnja biološka ispitivanja odabrala dva spoja najvećeg toksičnog učinka.
- b) Istražiti potencijalno antitumorsko djelovanje dva odabrana spoja na tri dodatne ljudske tumorske stanične linije te ispitati potencijalnu preferencijalnu toksičnost spojeva za tumorske u odnosu na normalne stanice obradom normalnih linija ljudskih stanica, fibroblasta.
- c) Istražiti moguću ulogu glutationa u odgovoru stanica HeLa na stres uzrokovan tretmanom s dva odabrana novosintetizirana heterobimetalna kompleksa.
- d) Analizirati učinak odabranih heterobimetalnih kompleksa na ciklus i smrt stanica HeLa.
- e) Ispitati učinak odabranih heterobimetalnih kompleksa na ekspresiju proteina uključenih u smrt stanice.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

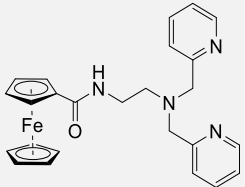
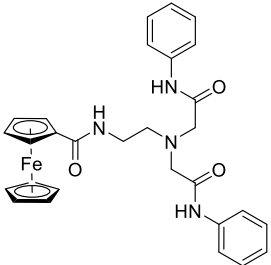
##### 3.1.1. Linije stanica

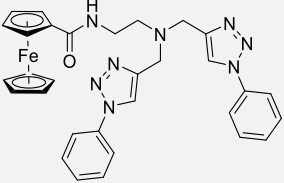
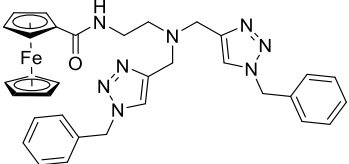
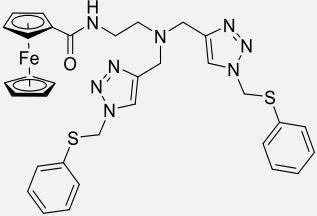
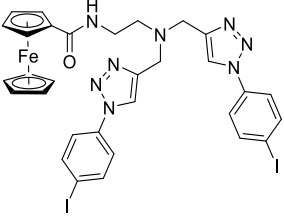
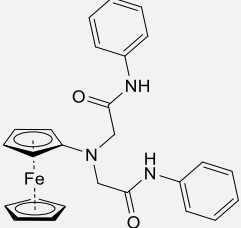
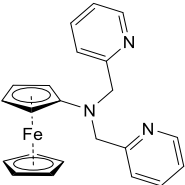
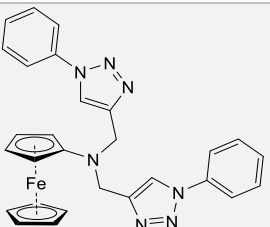
Koristila sam nekoliko ljudskih, tumorskih linija stanica: stanice karcinoma vrata maternice HeLa iz banke stanica i tkiva (GIBCO BRL, Invitrogen, Grand Island, New York, SAD), dvije različite linije stanica melanoma različite agresivnosti iz banke stanica i tkiva *American type culture collection* (ATCC; Manassas, Virginia, SAD): MDA-MB-435 (ATCC HTB-129) i RPMI-7951 (ATCC HTB-66) te stanice seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja MES-OV uspostavljene u laboratoriju prof. Šikića, Sveučilišta Stanford (Moisan i sur. 2014). Kao model normalne ljudske linije stanica, koristila sam fibroblaste, stanice vezivnog tkiva koje su izolirane iz zdravog donora.

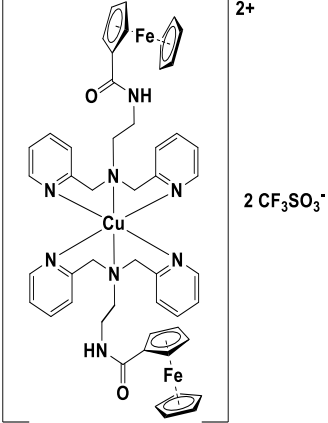
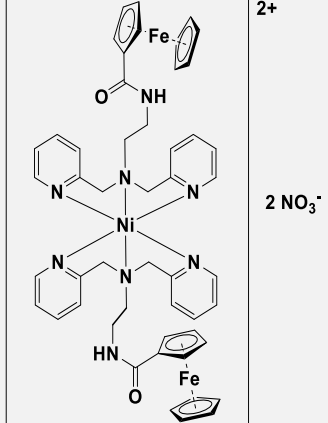
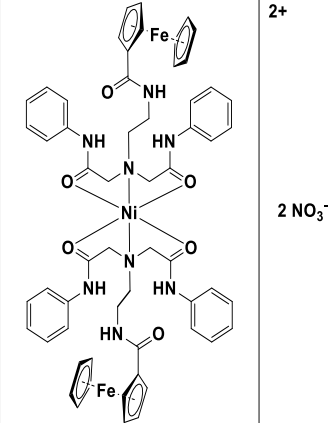
##### 3.1.2. Kemikalije

Dvadeset derivata ferocena i njihovih metalnih kompleksa sintetizirano je u laboratoriju prof. dr. Raić-Malić, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu (Tablica 1). Nakon prvotne analize njihove citotoksičnosti, odabrala sam dva heterobimetalna kompleksa nikla s aminoferocenskim ligandima ( $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ ) za daljnja biološka ispitivanja. Ostale korištene kemikalije sam navela u Tablici 2.

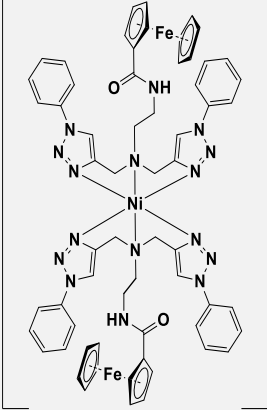
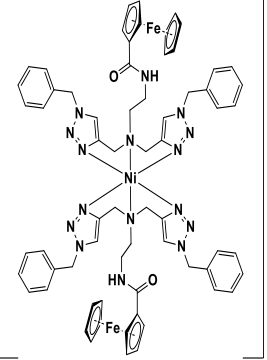
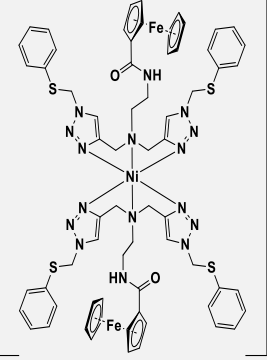
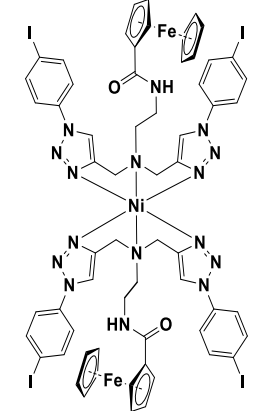
**Tablica 1.** Novosintetizirani derivati ferocena i njihovi metalni kompleksi

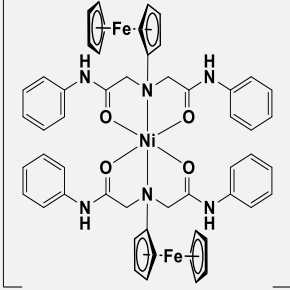
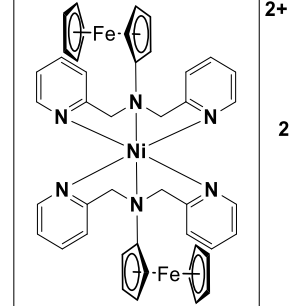
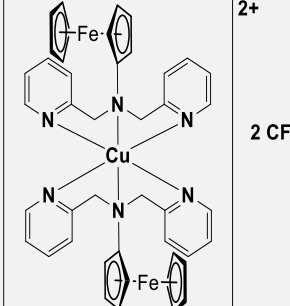
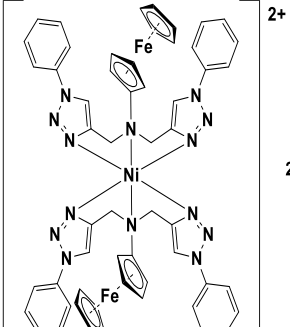
	Strukturna formula spoja	Nomenklatura
Derivati ferocena		<i>N</i> -(2-(bis(2-pikolil)amino)etil)ferocenkarboksamid (1)
		<i>N</i> -(2-(bis( <i>N</i> -fenilacetamid)amino)etil)ferocenkarboksamid (2)

<b>Derivati ferocena</b>		<i>N</i> -(2-(bis((1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)etil)ferocenkarboksamid ( <b>3</b> )
		<i>N</i> -(2-(bis((1-benzil-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)etil)ferocenkarboksamid ( <b>4</b> )
		<i>N</i> -(2-(bis((1-(feniltio)metil)-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)etil)ferocenkarboksamid ( <b>5</b> )
		<i>N</i> -(2-(bis((1-(4-jodfenil)-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)etil)ferocenkarboksamid ( <b>6</b> )
		<i>N,N</i> -di( <i>N</i> -fenilacetamid)aminoferocen ( <b>7</b> )
		<i>N,N</i> -di(2-pikolil)aminoferocen ( <b>8</b> )
		<i>N,N</i> -bis((4-fenil-1,2,3-triazol-1-il)metil)aminoferocen ( <b>9</b> )

	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Cu}(\mathbf{1})_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2, \mathbf{1}_{\text{Cu}}$
<b>Kompleksni spojevi</b>	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{1})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{1}_{\text{Ni}}$
	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{2})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{2}_{\text{Ni}}$



	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{3})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{3}_{\text{Ni}}$
<b>Kompleksni spojevi</b>	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{4})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{4}_{\text{Ni}}$
	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{5})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{5}_{\text{Ni}}$
	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	$[\text{Ni}(\mathbf{6})_2](\text{NO}_3)_2, \mathbf{6}_{\text{Ni}}$

	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	<p style="text-align: center;">[Ni(<b>7</b>)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <b>7</b><sub>Ni</sub></p>
Kompleksni spojevi	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	<p style="text-align: center;">[Ni(<b>8</b>)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <b>8</b><sub>Ni</sub></p>
	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	<p style="text-align: center;">[Cu(<b>8</b>)<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <b>8</b><sub>Cu</sub></p>
	 <p style="text-align: right;">2<sup>+</sup> 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	<p style="text-align: center;">[Ni(<b>9</b>)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <b>9</b><sub>Ni</sub></p>

**Tablica 2.** Kemikalije korištene u ovom istraživanju.

Naziv	Proizvođač
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Akrilamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	Serva, Heidelberg, Njemačka
Amonijev persulfat, APS ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Serva, Heidelberg, Njemačka
Annexin V-FITC	BD Biosciences, New Jersey, SAD
Bisakrilamid (C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Serva, Heidelberg, Njemačka
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Gram Mol, Zagreb, Hrvatska
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (DMEM, engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD
Etanol, 96% (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska
Fetalni goveđi serum (FCS, engl. <i>fetal calf serum</i> )	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD
IsoFlow Sheath tekućina	Beckman Coulter Inc., Brea, California, SAD
Komplet BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
L-butionin sulfoksimin, BSO (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
McCoyjev 5A medij obogaćen L-glutaminom, s antibiotikom	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
N-acetil cistein, NAC (HSCH <sub>2</sub> CH(NHCOCH <sub>3</sub> )CO <sub>2</sub> H)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
N,N,N',N'-tetrametiletilenediamin, TEMED (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Natrij-dodecil sulfat, SDS (NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
Propidij jodid, PI (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Proteinski marker Precision Plus Protein AllBlue Standards	BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD

RNaza A	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma, Roedermark, Njemačka
Tween-20 <sup>®</sup> (C <sub>56</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Western Lightning <sup>®</sup> Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD
Western Lightning <sup>®</sup> Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD

### 3.1.3. Protutijela

Korištena protutijela sam navela u tablici 3.

**Tablica 3.** Protutijela korištena u ovom istraživanju.

	<b>Specifičnost</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Kataloški broj</b>
<b>Primarna protutijela</b>	PARP-1	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, SAD)	#sc-8007
	Bcl-2	Abcam (Cambridge, UK)	#ab797
	ERK1/2 (K-23)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, SAD)	#sc-94
<b>Sekundarna protutijela</b>	Anti-mišje IgG ECL <sup>™</sup> HRP	GE Healthcare Life Sciences (SAD)	#NA931V
	Anti-zečje IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, SAD)	#sc-2370

### 3.1.4. Uređaji i pomagala

Korištene uređaje i pomagala sam navela u tablici 4.

**Tablica 4.** Uređaji i pomagala korišteni u ovom istraživanju.

<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
Centrifuga (Heraeus Functionline Labofuge 400)	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, SAD
Homogenizator	Cole Palmer, Vernon Hills, SAD
Inkubator (Heraeus cell 150)	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, SAD
Invertni mikroskop (Opton 4758862)	Zeiss, Oberkochen, Njemačka
Kadica za elektroforezu (Mini-PROTEAN® Tetra System)	BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD
Spektrofotometar (Stat Fax - 2100)	Awareness Technology Inc., Palm City, SAD
Termoblok (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Uređaj za prijenos proteina na membranu (TransBlot Turbo)	BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD
Uređaj Uvitec	Cambridge, UK
Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Sve ljudske linije stanica održavala sam u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Linije stanica HeLa, MDA-MB-435, RPMI-7951 te fibroblaste, uzgajala sam u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS, engl. *fetal calf serum*). Liniju stanica MES-OV uzgajala sam u hranjivom mediju McCoy 5A obogaćenom L-glutaminom, s dodatkom antibiotika i 10% FCS-a. Sve linije stanica sam presađivala dva puta tjedno. Prilikom presađivanja, stanicama sam prvo uklonila hranjivi medij u kojem su rasle te sam ih zatim tripsinizirala i ostavila 3-5 minuta u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>, prilikom čega se adherentne stanice odvajaju jedna od druge, kao i od podloge. Stanice sam zatim resuspendirala u svježem hranjivom mediju u svrhu neutralizacije djelovanja tripsina. Dio sam stanične suspenzije odvojila i koristila za provedbu eksperimenata, dok sam ostatak stanične suspenzije vratila u inkubator u svrhu održavanja stanica u kulturi uz dodavanje svježeg hranjivog medija.

### 3.2.2. Analiza vijabilnosti stanica testom MTT

Citotoksičnost novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa odredila sam pomoću kolorimetrijskog testa MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) koji služi za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica kao mjere njihove vijabilnosti. Žive stanice imaju aktivne dehidrogenaze u svojim mitohondrijima pomoću kojih reduciraju žutu, tetrazolijevu sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid ili MTT) u ljubičasto obojeni, netopivi, formazan čime se dokazuje njihova metabolička aktivnost, odnosno vijabilnost. Intenzitet obojenja koji je proporcionalan količini metabolički aktivnih stanica odredila sam mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica.

Test vijabilnosti stanica MTT najprije je korišten za ispitivanje toksičnosti 20 novosintetiziranih derivata ferocena i njihovih metalnih kompleksa korištenjem linije stanica HeLa, kako bi se za daljnja biološka ispitivanja odabrala dva spoja najvećeg toksičnog učinka. Stanice HeLa sam inkubirala u tripsinu i resuspendirala u hranjivom mediju DMEM te ih zatim nasadila u pločice s 96 bunarića (3 × 10<sup>5</sup> stanica u 180 μL medija DMEM po bunariću). 24 sata od nasađivanja stanice sam tretirala novosintetiziranim spojevima prethodno pripremljenih koncentracija (20 μL po bunariću). Učinak svake koncentracije spojeva ispitivala sam u kvadriplikatu. Nakon 72 sata stanicama sam uklonila medij te im dodala po 40 μL 10x razrijeđene

otopine MTT-a (5 mg/mL). Nakon tri sata inkubacije, stanicama sam dodala po 170  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO, engl. *dimethyl sulfoxide*) u svrhu otapanja nastalih kristala formazana. Apsorbanciju sam izmjerila pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 600 nm.

Test MTT sam zatim koristila za istraživanje širine opsega antitumorskog djelovanja dva odabrana heterobimetalna kompleksa korištenjem tri dodatne, ljudske tumorske linije stanica: MDA-MB-435, RPMI-7951, MES-OV te za ispitivanje potencijalne preferencijalne toksičnosti odabranih spojeva za tumorske u odnosu na normalne stanice korištenjem linije ljudskih fibroblasta. Stanice sam tripsinizirala i resuspendirala u hranjivom mediju te nasadila u pločice s 96 bunarića (fibroblasti:  $5 \times 10^3$  u 180  $\mu$ L medija DMEM po bunariću, RPMI-7951 i MDA-MB-435:  $1 \times 10^4$  u 180  $\mu$ L medija DMEM po bunariću te MES-OV:  $2,5 \times 10^3$  u 180  $\mu$ L medija McCoy po bunariću). Stanice sam zatim tretirala s dva odabrana heterobimetalna kompleksa prethodno pripremljenih raspona koncentracija. Učinak svake koncentracije oba spoja ispitivala sam u kvadrilikatu. Nakon 72 sata inkubacije, koristila sam test MTT na prethodno opisan način.

Test MTT sam također koristila za provjeru moguće uloge glutaciona u detoksifikaciji dva odabrana heterobimetalna kompleksa. Stanice HeLa nasadila sam u dvije pločice s 96 bunarića. Na jednoj sam ih pločici predtretirala sa specifičnim inhibitorom sinteze glutaciona, L-butionin sulfoksiminom (BSO, engl. *buthionine sulfoximine*) koncentracije 0,001 mM, a na drugoj pločici sa prekursorom u sintezi glutaciona, N-acetil cisteinom (NAC, engl. *N-acetylcysteine*) koncentracije 5 mM. Stanice predtretirane sa BSO inkubirala sam preko noći, dok sam stanice predtretirane sa NAC inkubirala dva sata. Nakon navedenih inkubacija, stanice sam tretirala s dva odabrana heterobimetalna kompleksa prethodno pripremljenih raspona koncentracija. Učinak svake koncentracije oba spoja ispitivala sam u kvadrilikatu. Nakon 72 sata inkubacije, koristila sam test MTT na prethodno opisan način.

### 3.2.3. Analiza ciklusa stanica protočnom citometrijom

Za analizu ciklusa stanica, u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm nasadila sam  $3 \times 10^5$  stanica HeLa u ukupno 4 mL hranjivog medija DMEM. Nakon 24 sata, stanice sam tretirala s tri različite koncentracije: s 20%, 50% i 80% maksimalne inhibitorne koncentracije odabranih heterobimetalnih kompleksa, odnosno koncentracijama  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  te  $IC_{80}$  u svrhu istraživanja učinka kompleksa u ovisnosti o njihovoj koncentraciji. Odabrane koncentracije za kompleks **7<sub>Ni</sub>** redom iznose: 2  $\mu$ M ( $IC_{20}$ ), 3,5  $\mu$ M ( $IC_{50}$ ) te 5,5  $\mu$ M ( $IC_{80}$ ), odnosno za kompleks **8<sub>Ni</sub>**: 3, 8 te 15

$\mu\text{M}$ . Drugi dio Petrijevih zdjelica s jednako nasadenim stanicama HeLa tretirala sam samo s koncentracijom  $\text{IC}_{50}$  oba odabrana heterobimetalna kompleksa, odnosno s  $3,5 \mu\text{M}$  kompleksom  $7_{\text{Ni}}$  te  $8 \mu\text{M}$  kompleksom  $8_{\text{Ni}}$  radi proučavanja učinka kompleksa na ciklus stanica u ovisnosti o vremenu trajanja tretmana. Za proučavanje učinka spojeva u ovisnosti o njihovoj koncentraciji, stanice sam sakupila nakon tretmana od 48 sati, dok sam u svrhu proučavanja učinka spojeva u ovisnosti o vremenu izlaganja, stanice sakupila nakon 48, 72 i 96 sati. Netretirane stanice HeLa koristila sam kao kontrolu. Nakon navedenih inkubacija, stanice sam sakupila na sljedeći način: prvo sam ih tripsinizirala, zatim resuspendirala u mediju u kojem su stanice rastle (kako bih prikupila i mrtve stanice iz svakog uzorka). Stanice sam centrifugirala 10 minuta na 1200 rpm-a, dekantirala supernatant te talog stanica isprala dva puta u 3 mL ohlađenog fosfatnog pufera (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) uz 5 minuta centrifugiranja na 1200 rpm-a. Nakon ispiranja, talog stanica sam resuspendirala u 1 mL ohlađenog PBS-a i stavila na led ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Suspenzijama stanica sam zatim pažljivo dodala po 4 mL 96% etanola uz lagano vorteksiranje (prvi mL 96 % etanola dodala sam kap po kap, preostala 3 mL nešto brže, ali pažljivo kako ne bi došlo do agregacije stanica). Stanice fiksirane etanolom mogu se čuvati pri  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  najmanje 6 sati, a najduže 6 mjeseci. Na dan analize protočnim citometrom, stanice fiksirane etanolom sam centrifugirala 5 minuta na 1500 rpm-a te sam zatim pažljivo, pipetom maknula supernatant. Talog stanica sam isprala u 2 mL PBS-a te centrifugirala 5 minuta na 1200 rpm-a. Dekantirala sam supernatant te talogu stanica dodala po 200  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene otopine ribonukleaze A (RNase A, engl. *ribonuclease A*) ( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) uz resuspendiranje. Uzorke sam zatim inkubirala 20 minuta u vodenoj kupelji pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije, uzorcima sam dodala po 200  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene otopine propidij jodida (PI, engl. *propidium iodide*) ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) uz resuspendiranje. Uzorke sam zatim prebacila u epruvete za mjerenje protočnim citometrom. Epruvete sa uzorcima sam stavila na led i inkubirala u mraku, najmanje 30 minuta. Nakon analize uzoraka protočnom citometrijom, rezultate sam obradila korištenjem računalnog programa Flowlogic (Inivai Technologies, Mentone, Australija).

#### 3.2.4. Analiza smrti stanica protočnom citometrijom

Za analizu smrti stanica, u pločice sa šest bunarića nasadila sam po  $1 \times 10^5$  stanica HeLa u ukupno 2 mL hranjivog medija DMEM (po bunariću). Nakon 24 sata, stanice sam tretirala različitim koncentracijama ( $\text{IC}_{20}$ ,  $\text{IC}_{50}$  te  $\text{IC}_{80}$ ) odabranih heterobimetalnih kompleksa  $7_{\text{Ni}}$  i  $8_{\text{Ni}}$ . Nakon 48 sati tretmana spojevima, stanice sam tripsinizirala, resuspendirala u svježem mediju, dodala prethodno sakupljenom hranjivom mediju u kojem su rastle te ih zatim centrifugirala 10 minuta na 1200 rpm-a. Supernatant sam dekantirala te talogu stanica dodala 1 mL svježeg medija



DMEM. Stanice sam nakon 10 minuta inkubacije u svježem mediju centrifugirala 5 minuta na 1200 rpm-a. Nakon dekantiranja supernatanta, talog stanica sam resuspendirala u 1 mL PBS-a te prebacila u epruvete za mjerenje protočnim citometrom. U svaki uzorak dodala sam 500  $\mu$ L 1x pufera za vezanje aneksina V-FITC (ABB, engl. *annexin-binding buffer*). Uzorke sam centrifugirala 5 minuta na 1200 rpm-a, dekantirala supernatant te talogu stanica dodala 100  $\mu$ L otopine aneksina V označenog fluorescein izotiocijanatom (FITC) i PI-a koje sam prethodno pripremila u mraku prema Tablici 5. Negativne i pozitivne kontrole također sam napravila prema Tablici 5. Uzorcima sam nakon 15 minuta inkubacije u mraku dodala 400  $\mu$ L 1x ABB-a. Uzorke sam odmah zatim analizirala protočnom citometrijom te obradila rezultate korištenjem računalnog programa Flowlogic (Inivai Technologies, Mentone, Australija).

**Tablica 5.** Priprema otopina za mjerenje smrti stanica protočnom citometrijom

	Oznaka uzorka	Otopina
<b>Kontrole</b> (negativna/pozitivna)	<b>O</b>	100 $\mu$ L 1 $\times$ ABB
	<b>A</b>	7,5 $\mu$ L aneksina + 292,5 $\mu$ L 1 $\times$ ABB
	<b>PI</b>	10 $\mu$ L PI + 90 $\mu$ L 1 $\times$ ABB
	<b>A + PI</b>	25 $\mu$ L aneksina + 100 $\mu$ L PI + 875 $\mu$ L 1 $\times$ ABB
<b>Tretirani uzorci</b>	<b>A + PI</b>	

### 3.2.5. Analiza ekspresije proteina

#### 3.2.5.1. Izolacija proteina

U svrhu određivanja ekspresije proteina, u pločice sa šest bunarića nasadila sam po  $2,6 \times 10^5$  stanica HeLa u ukupno 2 mL hranjivog medija DMEM (po bunariću). Stanice sam 24 sata nakon nasadivanja tretirala odabranim koncentracijama ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  te  $IC_{80}$ ) heterobimetalnih kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . Nakon 48 sati inkubacije, sakupila sam suhe taloge stanica na način da sam stanice prvo tripsinizirala i resuspendirala u svježem hranjivom mediju. Suspenzije stanica sam zatim prebacila u plastične epruvete od 15 mL te centrifugirala 5 minuta na 1200 rpm-a. Supernatante sam dekantirala, taloge stanica resuspendirala u po 1 mL PBS-a te prebacila u mikroepuvete od 1,5 mL. Stanice resuspendirane u PBS-u sam centrifugirala 5 min na 1200 rpm-a te sam zatim pipetom uklonila PBS. Dobivene suhe taloge stanica sam pohranila pri  $-20$  °C. Na dan

analize, uzorcima sam dodala PBS te ih sonicirala tri puta po 10 sekundi u svrhu fragmentacije DNA u uzorcima, kako ne bi interferirala s detekcijom proteina.

### 3.2.5.2. *Određivanje koncentracije proteina*

Koncentraciju proteina u uzorcima odredila sam metodom bicinkonične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid assay*) korištenjem kompleta BCA Protein Assay koji uključuje BCA reagens A, BCA reagens B i albuminski standard (2 mg/mL). Radnu otopinu BCA pripremila sam miješanjem reagensa A i reagensa B u omjeru 50 : 1. Zatim sam pripremila serijska razrjeđenja standarda goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. *bovine serum albumin*) sljedećih koncentracija: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 i 25 µg/mL. U jažice mikrotitarske pločice s 96 bunarića ispipetirala sam po 10 µL pripremljenih razrjeđenja standarda u duplikatima. Zatim sam u jažice mikrotitarske pločice ispipetirala po 10 µL 4x i 8x razrjeđenih uzoraka u duplikatima. Mikrotitarsku sam pločicu (nakon dodavanja po 200 µL pripremljene radne otopine BCA u svaku jažicu) inkubirala 30 minuta pri 37 °C. Apsorbanciju sam izmjerila pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 545 nm, te sam dobivene rezultate obradila u računalnom programu Excel kako bi konačnici izračunala volumen PBS-a s kojim je potrebno razrijediti uzorke kako bi bili približno iste koncentracije pri nanošenju na poliakrilamidni gel.

### 3.2.5.3. *Elektroforeza*

Nakon određivanja koncentracije proteina, napravila sam poliakrilamid gel elektroforezu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). Gelove (za sabijanje i razdvajanje) sam napravila prema tablicama 6 i 7. Za polimerizaciju oba gela bilo je potrebno 20-30 minuta. Gustoću gela za razdvajanje odredila sam prema molekularnoj masi proteina od interesa: 10% za poli(ADP-riboza) polimerazu (PARP, engl. *poly (ADP-ribose)polymerase*) (116 kDa), 12% za Bcl-2 (30 kDa). Prvo sam pripremila gel za razdvajanje tijekom čije polimerizacije sam pripremila gel za sabijanje. Uzorke sam za vrijeme polimerizacije gela za sabijanje pomiješala sa 6x koncentriranim puferom za uzorke (2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 mL glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 mL 2-merkaptotanol u 10 mL biH<sub>2</sub>O) kako bih dobila konačnu koncentraciju pufera od 1x te ih zagrijala 5 minuta pri 96 °C. Uzorke sam zatim nanijela u jažice poliakrilamidnog gela za sabijanje te pokrenula elektroforezu u 1x Tris-glicinskom puferu (10x Tris-glicinski pufer: 72,1 g glicin; 15,1 g Tris; 5 g 10% SDS u 500 mL biH<sub>2</sub>O). Do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje elektroforezu sam provodila na 80 V jedan sat, nakon toga sam povećala napon na 100 V.

**Tablica 6.** Priprema SDS poliakrilamidnih gelova (za analizu ekspresije proteina PARP).

	Gel za sabijanje (mL)	Gel za razdvajanje (mL)
	5%	10%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,7	5,9
<b>30 % smjesa akrilamida-bisakrilamida</b>	0,67	5,0
<b>Tris</b>	0,5**	3,8***
<b>10 % SDS</b>	0,04	0,15
<b>10 % APS</b>	0,04	0,15
<b>TEMED</b>	0,004	0,006

\*\* 1,0 M Tris (pH 6,8), \*\* 1,5 M Tris (pH 8,8)

**Tablica 7.** Priprema SDS poliakrilamidnih gelova (za analizu ekspresije proteina Bcl-2).

	Gel za sabijanje (mL)	Gel za razdvajanje (mL)
	5%	12%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,7	6,6
<b>30 % smjesa akrilamida-bisakrilamida</b>	0,67	8,0
<b>Tris</b>	0,5**	5,0***
<b>10 % SDS</b>	0,04	0,2
<b>10 % APS</b>	0,04	0,2
<b>TEMED</b>	0,004	0,008

\*\* 1,0 M Tris (pH 6,8), \*\* 1,5 M Tris (pH 8,8)

#### 3.2.5.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Nakon završene elektroforeze, gelove sam izvadila iz sustava za elektroforezu te uklonila gel za sabijanje. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu napravila sam koristeći Towbin pufer za prijenos proteina (200 mL MeOH + 100 mL 10 % SDS + 700 mL deH<sub>2</sub>O), aparaturu TransBlot Turbo Transfer System i princip polu-suhog prijenosa. Nakon 11 minuta, prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu bio je završen. Membranu sam zatim obojala s bojom Ponceau Red kako bih provjerila uspješnost prijenosa proteina. Nakon toga, membranu sam isprala u 1x TBS-T puferu (0,788 g 10 mM Tris-HCl, 4,38 g 150 mM NaCl, 0,5 mL 0,1 % Tween 20 u 500 mL biH<sub>2</sub>O).

### 3.2.5.5. *Imunodetekcija proteina*

U svrhu blokiranja membrane, pripremila sam 5% nemasno mlijeko u 1x TBS-T puferu u kojem sam inkubirala membranu 1 sat. Blokiranje se radi u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela na membranu. Nakon blokiranja, membranu sam isprala u 1x TBS-T puferu te je inkubirala preko noći s odgovarajućim primarnim protutijelom čije sam razrjeđenje prethodno napravila u 5% nemasnom mlijeku u 1x TBS-T puferu. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membranu sam isprala pet puta po pet minuta u 1x TBS-T puferu te sam je zatim inkubirala dva sata s odgovarajućim sekundarnim protutijelom vezanim s peroksidazom iz hrena čije sam razrjeđenje prethodno napravila u 5% nemasnom mlijeku u 1x TBS-T puferu. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membranu sam isprala pet puta po pet minuta u 1x TBS-T puferu. Proteine sam vizualizirala pomoću komercijalnog kompleta *Western Lightning Plus ECL* koristeći uređaj Uvitec.

### 3.2.6. *Statistička analiza*

Rezultate analize citotoksičnosti izrazila sam kao srednju vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  vrijednost standardne devijacije. Statističku značajnost (vrijednost P) razlike između preživljenja tretiranih i netretiranih stanica izračunala sam u programu GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD) korištenjem student T-testa (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Rezultate Western Blot analize sam također analizirala student T-testom.

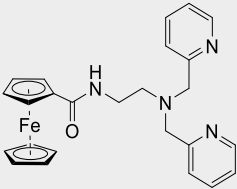
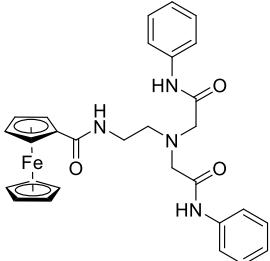
## 4. REZULTATI

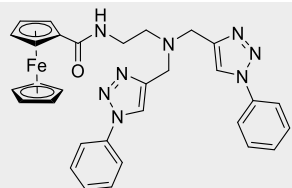
### 4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa

#### 4.1.1. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ odabrani za daljnja biološka ispitivanja

Pomoću testa MTT i linije stanica HeLa, cilj je bio ispitati citotoksičnost 20 sintetiziranih derivata ferocena i njihovih metalnih kompleksa u svrhu izdvajanja dva spoja najveće toksičnosti za daljnja biološka ispitivanja. Zbog nemogućnosti otapanja nekih od spojeva, koncentracija  $IC_{50}$  uspješno je određena za 11 novosintetiziranih spojeva (Tablica 8). Također, neki su od ispitivanih spojeva u dodiru s medijem stvarali kristale, među kojima su i neki od spojeva s izračunatim  $IC_{50}$  vrijednostima poput spojeva **2**, **3**, **4**, **5** i **6** (Tablica 8). Za daljnja biološka ispitivanja odabrani su heterobimetalni kompleksi nikla s aminoferocenskim ligandima ( $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ ) zbog dobre topljivosti, citotoksičnosti, stabilnosti (vidljive po standardnim devijacijama između uzoraka i eksperimenata (Tablica 8) te strukturne sličnosti (detaljnije opisano u poglavlju 5).

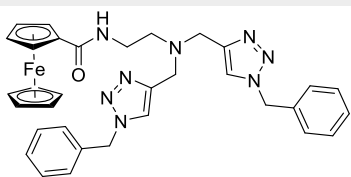
**Tablica 8.** Citotoksičnost 11 novosintetiziranih spojeva ispitana na liniji stanica HeLa te prikazana kao vrijednost  $IC_{50} \pm SD$ .

Strukturna formula spoja	Nomenklatura	$IC_{50} \pm SD$ (HeLa)/ $\mu M$
	<i>N</i> -(2-(bis(2-pikolil)amino)etil)ferocencarboksamid ( <b>1</b> )	$66,3 \pm 14,3$
	<i>N</i> -(2-(bis( <i>N</i> -fenilacetamid)amino)etil)ferocencarboksamid ( <b>2</b> )	$14,5 \pm 2,1$



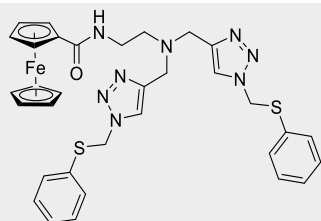
*N*-(2-(bis((1-phenyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)ethyl)ferrocenkarboksamid  
(3)

37 ± 8,5



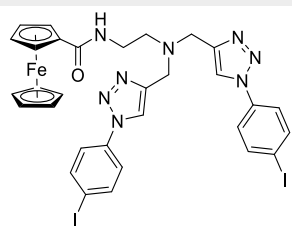
*N*-(2-(bis((1-benzyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)ethyl)ferrocenkarboksamid  
(4)

28,3 ± 15,5



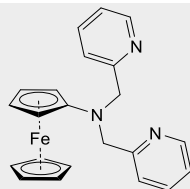
*N*-(2-(bis((1-(phenylthio)methyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)ethyl)ferrocenkarboksamid  
(5)

21,5 ± 3,5



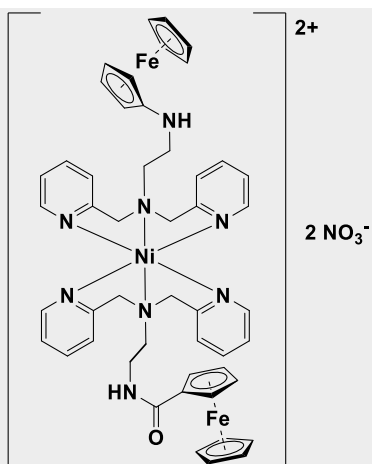
*N*-(2-(bis((1-(4-iodophenyl)-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)ethyl)ferrocenkarboksamid  
(6)

6,5 ± 1,1



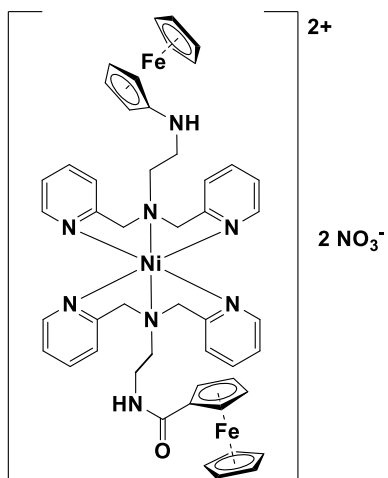
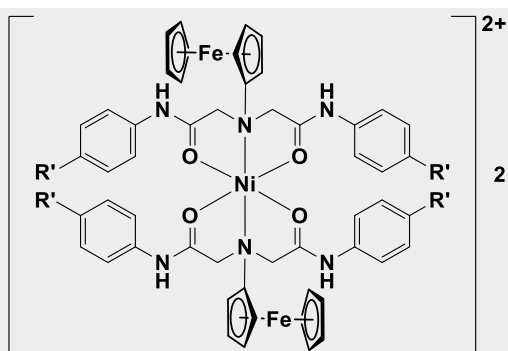
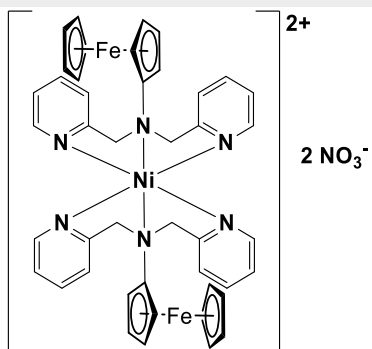
*N,N*-di(2-pikolil)aminoferocen (8)

1,2 ± 35



[Cu(1)<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 1Cu

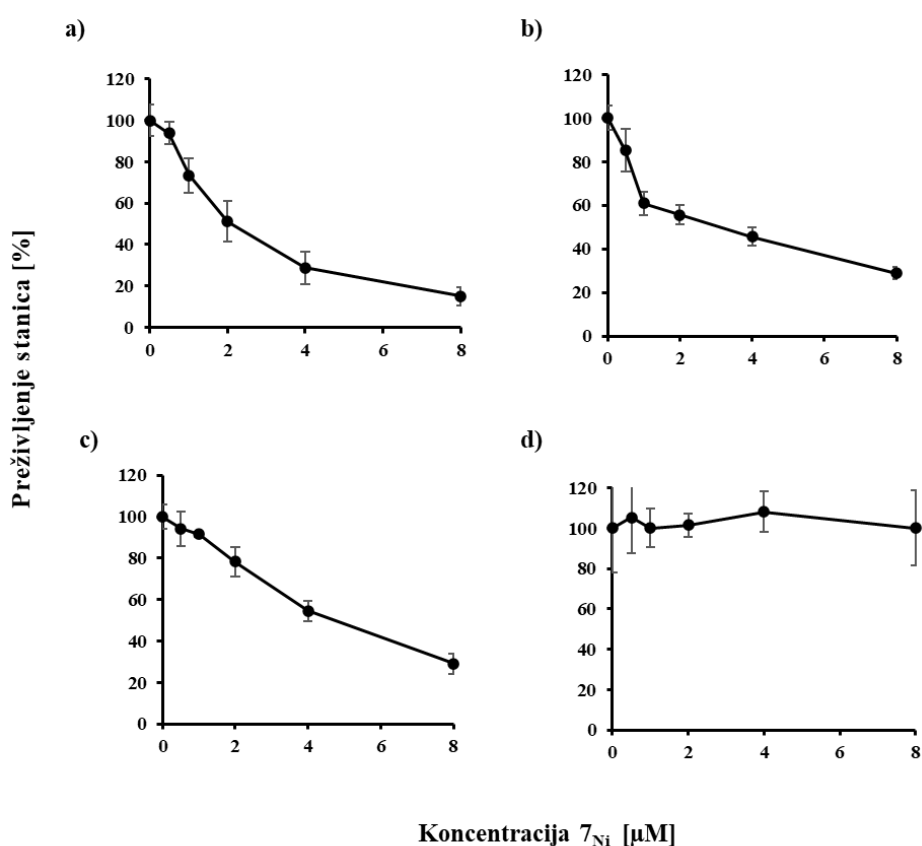
2,3 ± 23,5


 $1,7 \pm 85$ 

 $3,5 \pm 2,7$ 

 $8 \pm 4$ 

#### 4.1.2. Heterobimetalni kompleksi $\mathbf{7}_{\text{Ni}}$ i $\mathbf{8}_{\text{Ni}}$ pokazuju selektivno djelovanje i širok opseg antitumorskog djelovanja

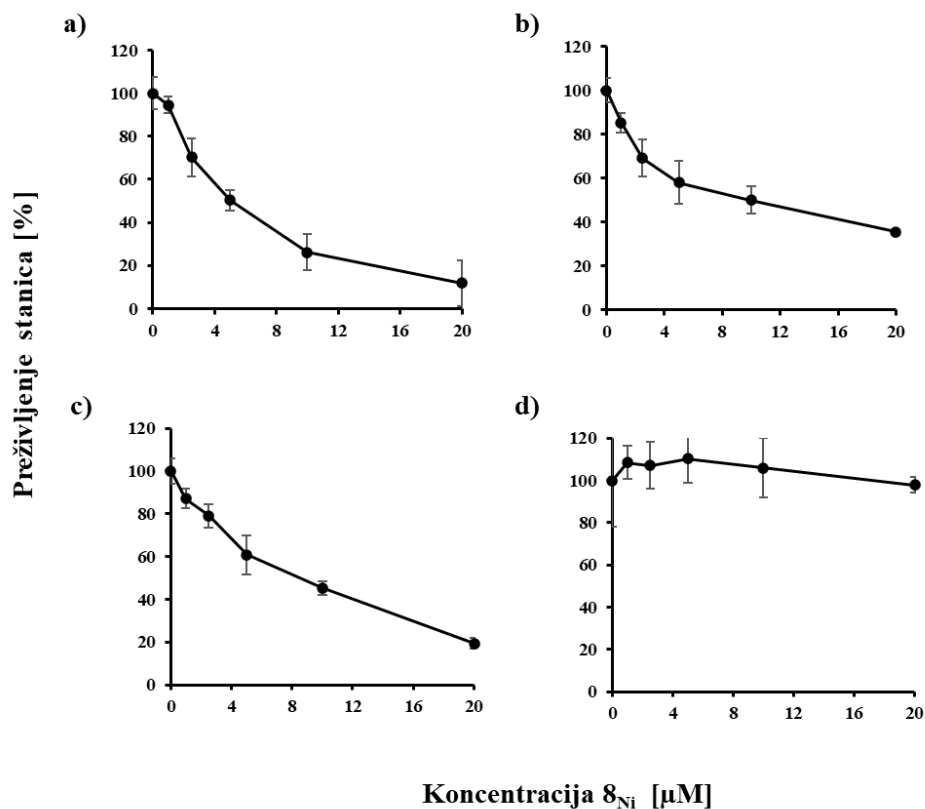
Test MTT korišten je i za istraživanje antitumorskog djelovanja dva odabrana heterobimetalna kompleksa korištenjem tri linije stanica tumora: MES-OV, RPMI-7951 i MDA-MB-435 te za ispitivanje potencijalne preferencijalne toksičnosti odabranih spojeva za stanice tumora u odnosu na normalne stanice korištenjem fibroblasta. Navedene su linije stanica 24 sata nakon nasađivanja tretirane s različitim koncentracijama spoja  $\mathbf{7}_{\text{Ni}}$  (0,5, 1, 2, 4 i 8  $\mu\text{M}$ ), odnosno s različitim

koncentracijama spoja  $8_{Ni}$  (1, 2,5, 5, 10 i 20  $\mu M$ ). Nakon 72 sata, korištenjem testa MTT analizirano je preživljenje stanica te je određena  $IC_{50}$  koncentracija spojeva (pri kojoj je postignut pad vijabilnosti stanica za 50%). Rezultati pokazuju da su heterobimetalni kompleksi  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  toksični za sve ispitivane linije stanica tumora (Slika 8a-c, Slika 9a-c). Koncentracija  $IC_{50}$  kompleksa  $7_{Ni}$  za linije stanica MES-OV, RPMI-7951 i MDA-MB-435 redom iznosi: 2, 3,525 te 4,8  $\mu M$  dok za spoj  $8_{Ni}$  redom iznosi: 5, 9,25 te 10,5  $\mu M$ . Kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  nije bilo moguće odrediti  $IC_{50}$  vrijednosti nakon tretmana fibroblasta (Slika 8d i Slika 9d). Dobiveni rezultati pokazuju da odabrani heterobimetalni kompleksi  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  imaju širok opseg antitumorskog djelovanja te selektivno djeluju na linije stanica tumora u odnosu na normalne stanice.



**Slika 8.** Preživljenje različitih linija stanica tretiranih heterobimetalnim kompleksom  $7_{Ni}$ . Stanice su 24 sata nakon nasadivanja tretirane različitim koncentracijama spoja  $7_{Ni}$  (0,5, 1, 2, 4 i 8  $\mu M$ ). Nakon 72 sata preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti kompleksa  $7_{Ni}$  na linijama stanica MES-OV (a), RPMI-7951 (b), MDA-MB-435 (c) i fibroblastima (d) izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  vrijednost standardne devijacije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri ponovljena eksperimenta.



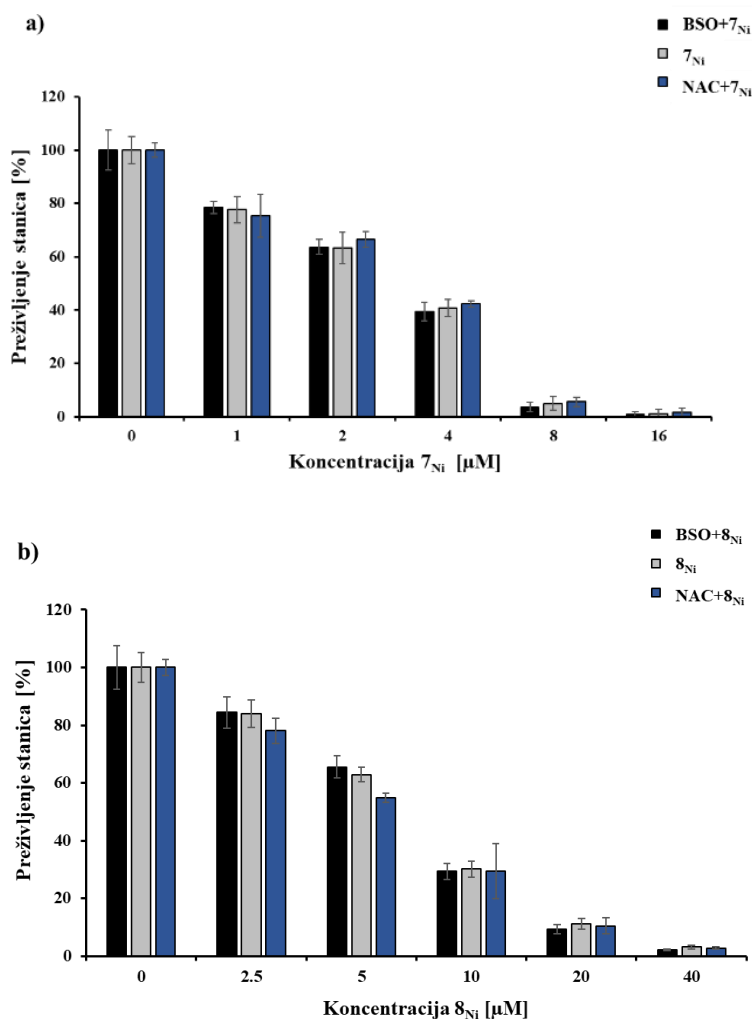


**Slika 9.** Preživljenje različitih linija stanica tretiranih heterobimetalnim kompleksom  $8_{Ni}$ . Stanice su 24 sata nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama spoja  $8_{Ni}$  (1, 2,5, 5, 10 i 20  $\mu M$ ). Nakon 72 sata preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Rezultati analize citotoksičnosti kompleksa  $8_{Ni}$  na linijama stanica MES-OV (a), RPMI-7951 (b), MDA-MB-435 (c) i fibroblastima (d) izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  vrijednost standardne devijacije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri ponovljena eksperimenta.

#### 4.1.3. Citotoksično djelovanje heterobimetalnih kompleksa $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ ne ovisi o količini glutaciona u stanici

Za provjeru moguće uključenosti glutaciona u obrambeni odgovor stanica HeLa na tretman heterobimetalnim kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ , korišten je specifični inhibitor sinteze glutaciona, BSO i prekursor u sintezi glutaciona, NAC. Stanice su nakon nasađivanja, a prije tretiranja različitim koncentracijama odabranih kompleksa, predtretirane s BSO koncentracije 0,001 mM i inkubirane preko noći, ili s NAC koncentracije 5 mM tijekom dva sata. Nakon navedenih inkubacija, stanice su tretirane s kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  prethodno pripremljenih koncentracija. Nakon 72 sata tretmana,

korištenjem testa MTT mjereno je preživljenje stanica. Rezultati dobiveni MTT-om (Slika 10) pokazuju da različite količine glutationa unutar stanice modulirane s BSO i NAC nemaju utjecaj na citotoksično djelovanje odabranih heterobimetalnih kompleksa u odnosu na stanice tretirane samo kompleksima.

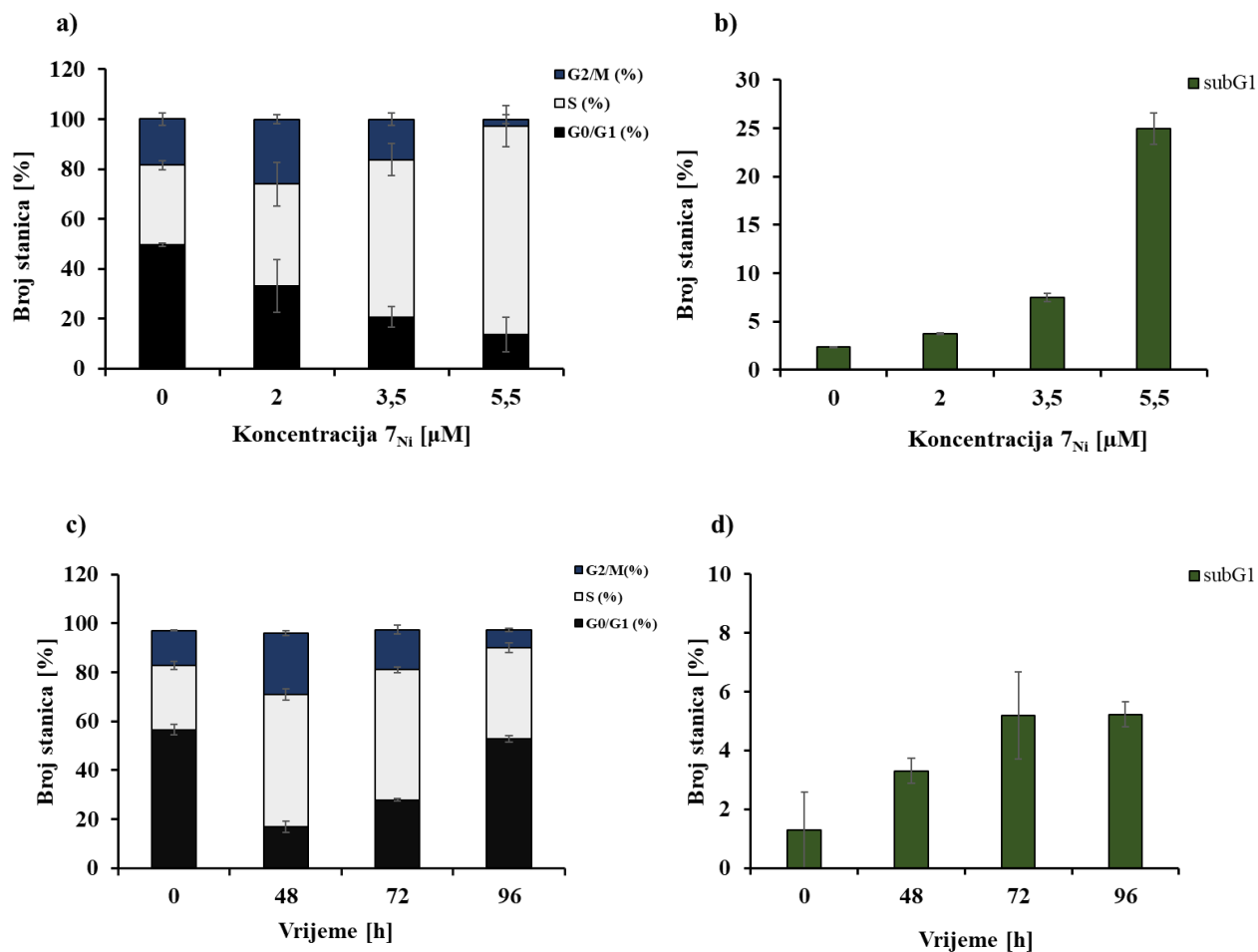


**Slika 10.** Preživljenje HeLa stanica tretiranih spojevima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  u kombinaciji ili bez modulatora količine glutationa u stanici. Stanice HeLa su nakon predtretmana s BSO koncentracije 0,001 mM preko noći ili s NAC koncentracije 5 mM dva sata, tretirane naznačenim koncentracijama spoja  $7_{Ni}$  (a) i  $8_{Ni}$  (b). Nakon 72 sata preživljenje stanica je izmjereno korištenjem testa MTT. Statistička značajnost provjerena je korištenjem student T-testa (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Dobiveni rezultati nisu statistički značajni. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri ponovljena eksperimenta.

## 4.2. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ potiču nakupljanje stanica u G0/G1 i S fazi ciklusa stanice

Nakon analiza citotoksičnosti kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ , protočnom citometrijom analiziran je ciklus stanica HeLa tretiranih navedenim kompleksima u svrhu boljeg shvaćanja mehanizma njihovog djelovanja. Napravljena su dva tipa eksperimenta: jedan u svrhu analize učinka spojeva  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  u ovisnosti o njihovoj koncentraciji, a drugi u svrhu analize njihovog učinka u ovisnosti o duljini trajanja tretmana. Za potrebe prvog tipa eksperimenta, stanice HeLa tretirane su tijekom 48 sati s tri različite koncentracije ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$ ) spojeva  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  koje za spoj  $7_{Ni}$  redom iznose: 2, 3,5 i 5,5  $\mu M$ , odnosno za spoj  $8_{Ni}$ : 3, 8 i 15  $\mu M$ . Za potrebe drugog tipa eksperimenta, stanice HeLa tretirane su tijekom 48, 72 i 96 sati jednom koncentracijom ( $IC_{50}$ ), koja iznosi 3,5  $\mu M$  za spoj  $7_{Ni}$ , odnosno 8  $\mu M$  za spoj  $8_{Ni}$ . Ciklus stanica analiziran je mjerenjem fluorescencije PI-a protočnim citometrom.

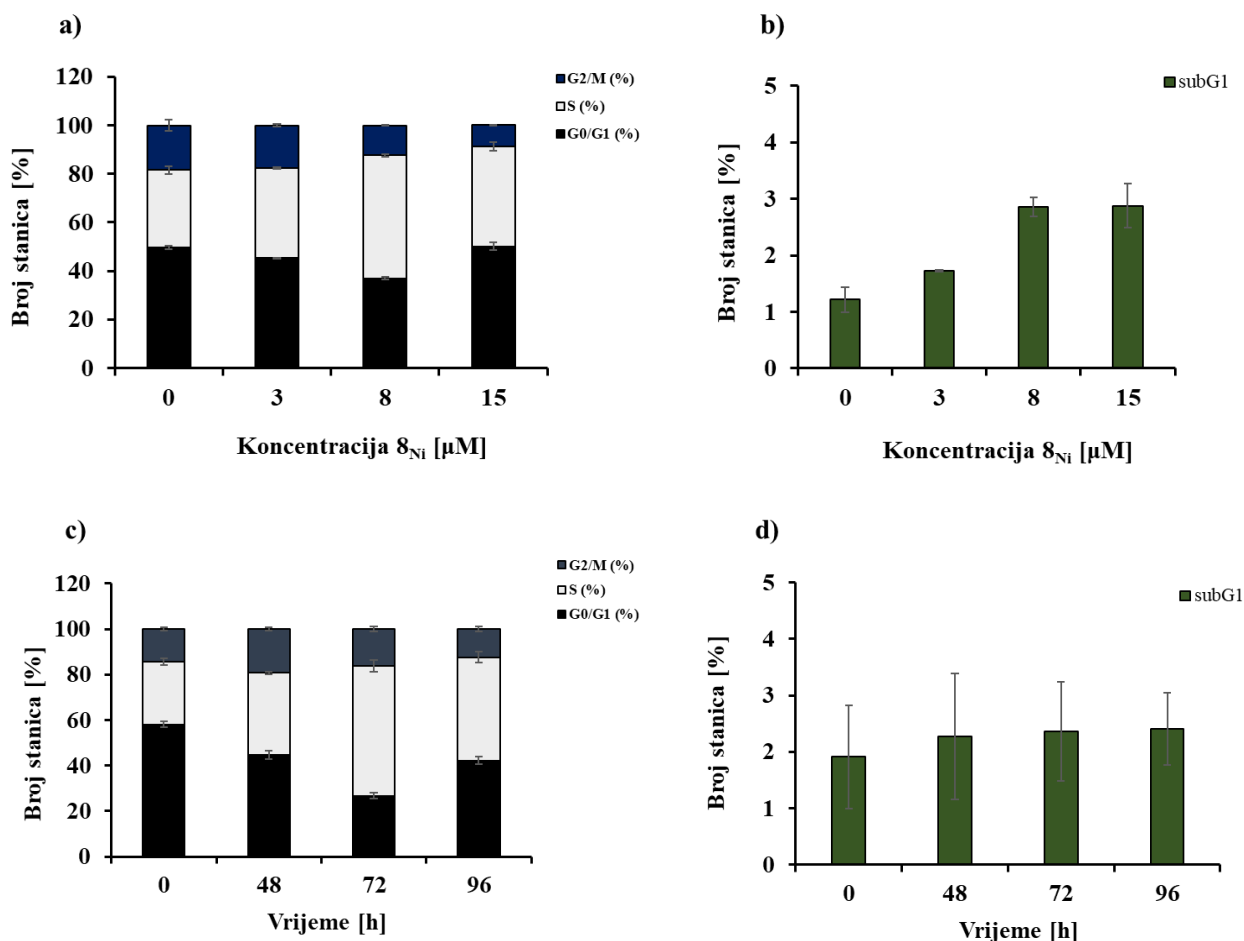
Rezultati eksperimenta (Slika 12a) pokazuju da heterobimetalni kompleks  $7_{Ni}$  uzrokuje nakupljanje stanica u fazi S ciklusa stanice u ovisnosti o koncentraciji. Odnosno, dolazi do povećanja broja stanica u fazi S ciklusa stanice proporcionalno porastu koncentracije kompleksa  $7_{Ni}$ . Također, rezultati eksperimenta (Slika 12b) pokazuju da kompleks  $7_{Ni}$  uzrokuje povećavanje subG1 populacije stanica, odnosno mrtvih stanica, u ovisnosti o koncentraciji. Nadalje, rezultati također pokazuju da heterobimetalni kompleks  $7_{Ni}$  nakon 48 sati inkubacije uzrokuje nakupljanje stanica u fazi S ciklusa stanica (u odnosu na kontrolni uzorak) (Slika 12c), što potvrđuje rezultate dobivene prethodnim eksperimentom. Međutim, dulje izlaganje stanica stresu uzrokovanom kompleksom  $7_{Ni}$  (72 i 96 sati) dovodi do nakupljanja stanica i u fazi G0/G1 te smanjenja broja stanica u fazi S ciklusa stanica. Nadalje, rezultati pokazuju da heterobimetalni kompleks  $7_{Ni}$  dovodi do povećanja subG1 populacije stanica u ovisnosti o duljini trajanja tretmana dosegnuvši svoj maksimum tijekom 72 satne inkubacije (Slika 12d).



**Slika 12.** Analiza ciklusa stanica HeLa tretiranih heterobimetalnim kompleksom  $7_{Ni}$ . Za analizu učinka kompleksa  $7_{Ni}$  u ovisnosti o njegovoj koncentraciji (a,b), stanice HeLa tretirane su sa tri koncentracije kompleksa  $7_{Ni}$  ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$ ) koje redom iznose: 2, 3,5 i 5,5  $\mu M$  tijekom 48 sati. Za analizu učinka kompleksa  $7_{Ni}$  u ovisnosti o duljini trajanja tretmana (c,d) stanice HeLa tretirane su sa jednom koncentracijom ( $IC_{50}$ ) koja iznosi 3,5  $\mu M$  tijekom 48, 72 i 96 sati. 0 predstavlja kontrolni uzorak (netretirane stanice sakupljene nakon 48h). Ciklus stanica i subG1 populacija stanica analizirani su mjerenjem fluorescencije PI-a protočnom citometrijom.

Rezultati pokazuju da heterobimetalni kompleks  $8_{Ni}$  uzrokuje postupno nakupljanje stanica u fazi S ciklusa stanica u ovisnosti o koncentraciji, što se uočava pri koncentracijama  $IC_{20}$  i  $IC_{50}$ , no veća koncentracija kompleksa ( $IC_{80}$ ) uzrokuje smanjenje broja stanica u fazi S ciklusa stanice (Slika 13a). Kompleks  $8_{Ni}$  uzrokuje povećavanje subG1 populacije stanica u ovisnosti o koncentraciji (Slika 13b). Nadalje, heterobimetalni kompleks  $8_{Ni}$  uzrokuje nakupljanje stanica u fazi S ciklusa stanica u ovisnosti o duljini trajanja tretmana (48 i 72 sata), što potvrđuje prethodno dobivene rezultate. Produljen tretman stanica s kompleksom  $8_{Ni}$  (96 sati) dovodi do blagog

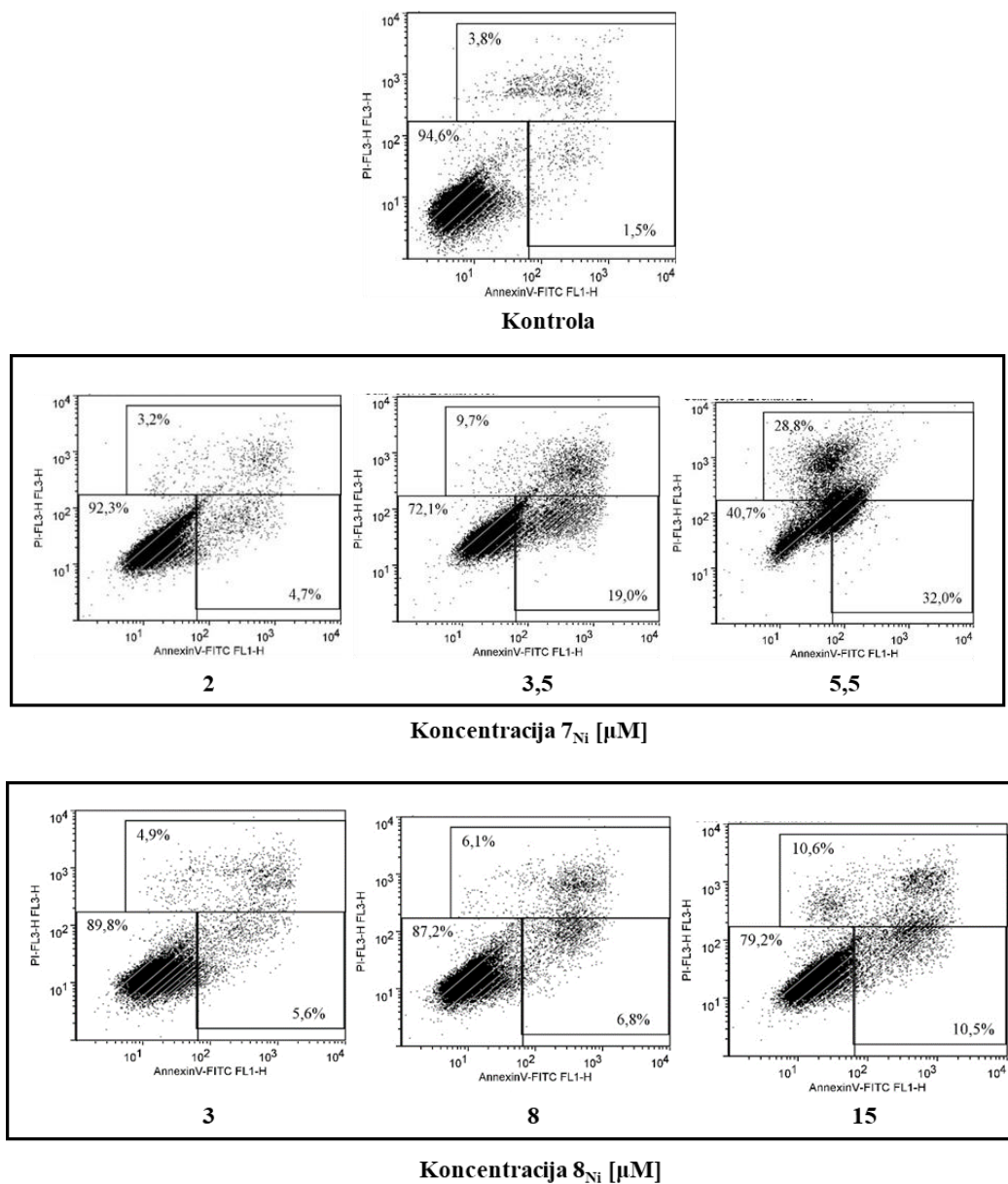
smanjenja broja stanica u fazi S te povećanog nakupljanja stanica u fazi G0/G1 ciklusa stanica (Slika 13c). Također, rezultati pokazuju da kompleks  $\mathbf{8}_{Ni}$  uzrokuje povećanje subG1 populacije stanica u ovisnosti o duljini trajanja tretmana (Slika 13d).



**Slika 13.** Analiza ciklusa stanica HeLa tretiranih heterobimetalnim kompleksom  $\mathbf{8}_{Ni}$ . Za analizu učinka kompleksa  $\mathbf{8}_{Ni}$  u ovisnosti o njegovoj koncentraciji (a,b), stanice HeLa tretirane su s tri koncentracije kompleksa  $\mathbf{8}_{Ni}$  ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$ ) koje redom iznose: 3, 8 i 15  $\mu\text{M}$  tijekom 48 sati. Za analizu učinka kompleksa  $\mathbf{8}_{Ni}$  u ovisnosti o duljini trajanja tretmana (c,d) stanice HeLa tretirane su jednom koncentracijom ( $IC_{50}$ ), koja iznosi 8  $\mu\text{M}$ , tijekom 48, 72 i 96 sati. 0 predstavlja kontrolni uzorak (netretirane stanice sakupljene nakon 48h). Ciklus stanica i subG1 populacija stanica analizirani su mjerenjem fluorescencije PI-a protočnom citometrijom.

### 4.3. Heterobimetalni kompleksi $7_{Ni}$ i $8_{Ni}$ potiču programiranu smrt stanice

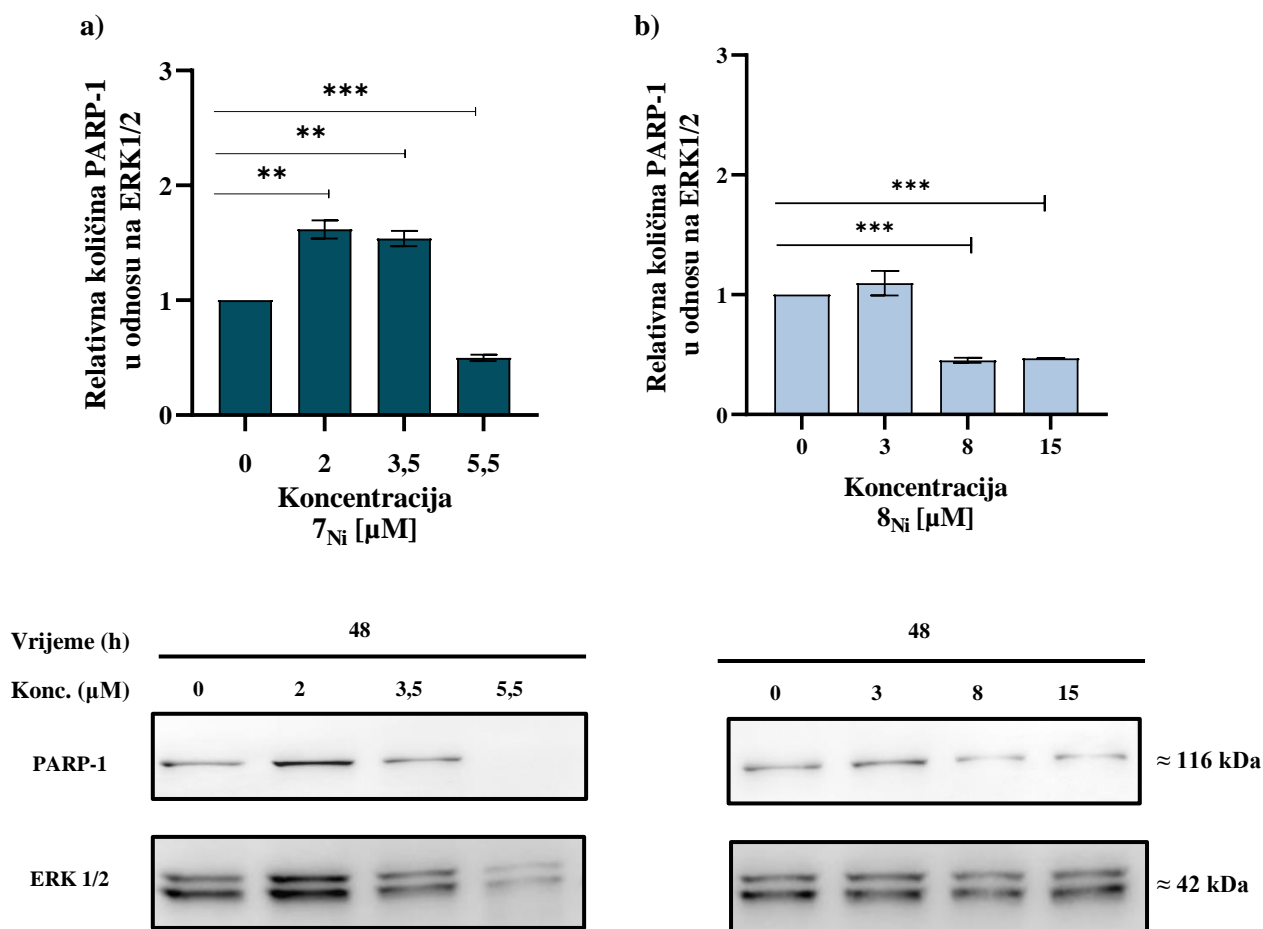
Kao što je prethodno opisano, analizom ciklusa stanica tretiranih kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ , utvrđeno je nakupljanje subG1 populacije stanica. U svrhu određivanja tipa smrti stanice, stanice HeLa su tretirane s koncentracijama  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$ ; 2, 3,5 i 5,5  $\mu M$  za kompleks  $7_{Ni}$ , odnosno 3, 8 i 15  $\mu M$  za kompleks  $8_{Ni}$ . Netretirane stanice predstavljaju kontrolni uzorak. Stanice su sakupljene nakon 48 satnog tretmana, obojane PI-om i Aneksin V-FITC-om, čije su fluorescencije izmjerene protočnom citometrijom. Rezultati prikazani na Slici 14 pokazuju da broj stanica u apoptozi proporcionalno raste porastom koncentracije kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ .



**Slika 14.** Analiza smrti stanica tretiranih heterobimetalnim kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . Stanice HeLa tretirane su sa koncentracijama  $IC_{20}$  (b),  $IC_{50}$  (c) te  $IC_{80}$  (d) koje redom iznose: 2, 3,5 i 5,5  $\mu M$  za kompleks  $7_{Ni}$ , odnosno 3, 8 i 15  $\mu M$  za kompleks  $8_{Ni}$ . Kontrolni uzorak predstavljaju netretirane stanice HeLa. Nakon 48 sati inkubacije, stanice su sakupljene i obojane PI-om i Aneksin V-FITC-om čije su fluorescencije izmjerene protočnim citometrom pomoću FL-3H, odnosno FL1-H lasera. Žive stanice koje su negativne i na PI i Aneksin V-FITC smještene su u donjem lijevom kvadrantu, stanice u ranoj apoptozi koje su negativne na PI, a pozitivne na Aneksin V-FITC smještene su u donjem desnom kvadrantu dok su stanice u kasnoj apoptozi koje su pozitivne i na PI i Aneksin V-FITC smještene u gornjem kvadrantu.

Kako bismo potvrdili da stanice zaista umiru apoptozom, dio stanica HeLa, nakon tretmana s kompleksima **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**, izdvojen je za analizu metodom *Western Blot* kojom je ispitana ekspresija/cijepanje proteina PARP-1, specifičnog biljega programirane smrti stanice. Stanice su tretirane s koncentracijama IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>80</sub> kompleksa **7<sub>Ni</sub>**, odnosno **8<sub>Ni</sub>** te su sakupljene nakon 48 sati inkubacije. Ukupni stanični proteini transferirani na membranu su inkubirani s anti-PARP-1 protutijelom. Za kontrolu nanošenja uzoraka korišten je protein ERK 1/2, čija je ekspresija u stanicama neovisna o tretmanu. Proteini su vizulizirani pomoću *Western Lightning Plus ECL* reagensa koristeći uređaj Uvitec. Rezultati pokazuju da tretmani kompleksima **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** ne dovode do cijepanja PARP-a u stanicama jer je u oba slučaja detektiran samo nepocijepani oblik proteina (Slika 15a,b). U uzorku tretiranom s IC<sub>80</sub> koncentracijom spoja **7<sub>Ni</sub>** (5,5 μM) vjerojatno je došlo do proteolitičke degradacije proteina. Kako bi se uzorci mogli kvantitativno usporediti, intenziteti proteinskih vrpce su denzitometrijski kvantificirani pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Rezultati dobiveni denzitometrijskom kvantifikacijom pokazuju da tretiranje stanica koncentracijom IC<sub>80</sub> (5,5 μM) kompleksa **7<sub>Ni</sub>** te koncentracijama IC<sub>50</sub> (8μM) i IC<sub>80</sub> (15 μM) kompleksa **8<sub>Ni</sub>** dovodi do pada u količini nepocijepanog proteina PARP u odnosu na kontrolni uzorak (netretirane stanice).

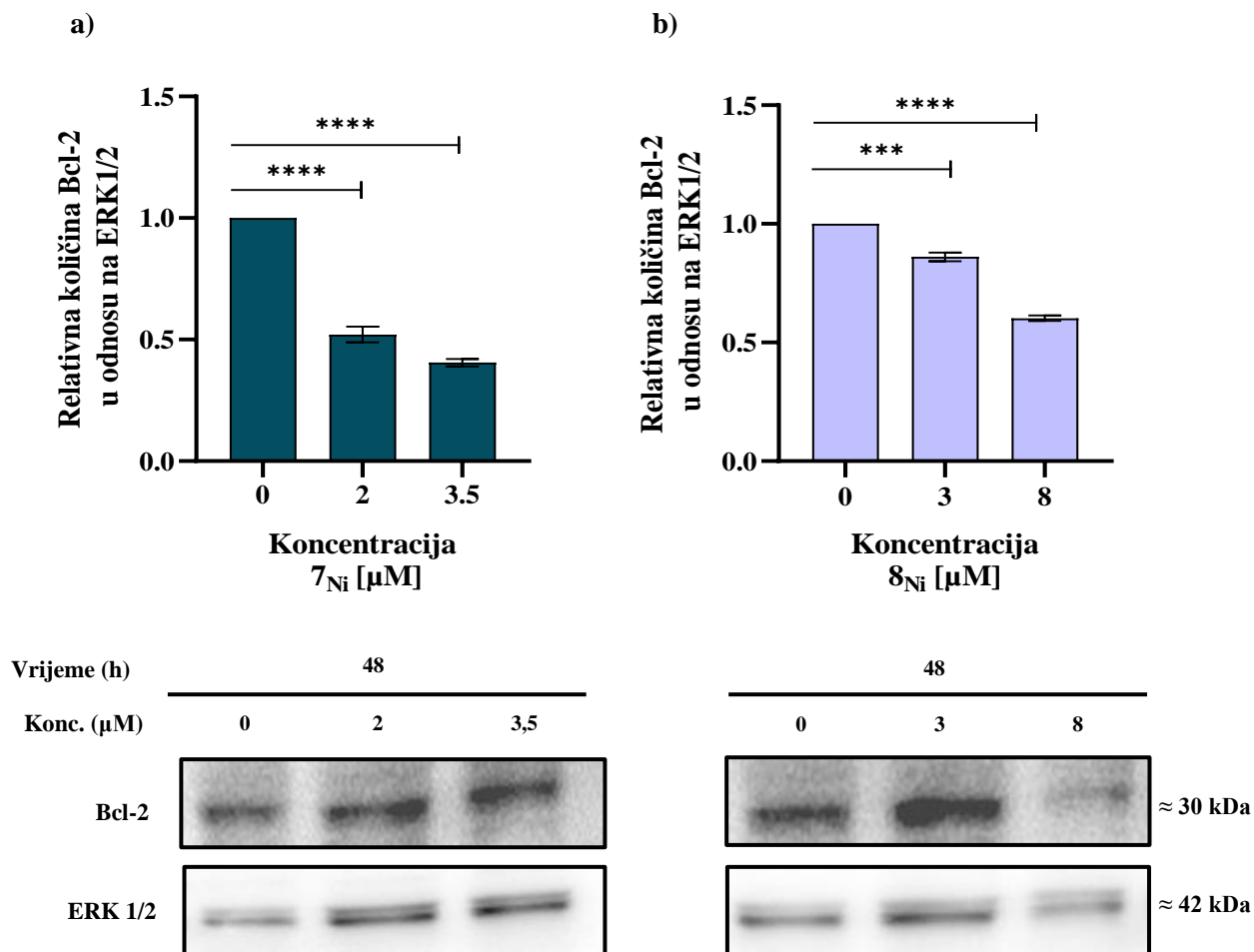




**Slika 15.** Ekspresija proteina PARP nakon tretmana heterobimetalnim kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . Stanice HeLa tretirane su koncentracijama  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$  spoja  $7_{Ni}$  koje redom iznose: 2, 3,5 i 5,5  $\mu M$  za spoj  $7_{Ni}$  (a), odnosno 3, 8 i 15  $\mu M$  za spoj  $8_{Ni}$  (b) te su sakupljene nakon 48 sati inkubacije. Izolirani su ukupni stanični proteini koji su zatim inkubirani s anti-PARP-1 protutijelom. Netretirani uzorak predstavlja bazalnu (konstitutivnu) razinu ekspresije proteina u netretiranim stanicama, dok je za kontrolu nanošenja uzoraka korišten ERK 1/2. Rezultati su statistički obrađeni korištenjem student T-testa (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

Kako rezultati protočne citometrije upućuju na to da stanice HeLa umiru apoptozom nakon tretmana heterobimetalnim kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ , a prethodno opisani rezultati pokazuju da ne dolazi do cijepanja proteina PARP, mjerena je ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2. Za analizu ekspresije proteina Bcl-2 korišteni su uzorci tretirani s  $IC_{20}$  i  $IC_{50}$  koje iznose 2 i 3,5  $\mu M$  za kompleks  $7_{Ni}$ , odnosno 3 i 8  $\mu M$  za kompleks  $8_{Ni}$ . Ukupni stanični proteini su inkubirani s anti-Bcl-2 protutijelom. Za kontrolu nanošenja uzoraka korišten je ERK 1/2. Proteini su vizulizirani pomoću *Western Lightning Plus ECL* reagensa koristeći uređaj Uvitec. U stanicama je detektirana razina

ekspresije proteina Bcl-2. Intenziteti proteinskih vrpce su denzitometrijski kvantificirani pomoću programa ImageJ. Rezultati dobiveni denzitometrijskom kvantifikacijom pokazuju da povećanjem koncentracije kompleksa **7**<sub>Ni</sub> i **8**<sub>Ni</sub> dolazi do pada u količini proteina Bcl-2 (Slika 16a,b).



**Slika 16.** Ekspresija proteina Bcl-2 nakon tretmana heterobimetalnim kompleksima **7**<sub>Ni</sub> i **8**<sub>Ni</sub>. Stanice HeLa tretirane su s koncentracijama IC<sub>20</sub> i IC<sub>50</sub> koje iznose 2 i 3,5 μM za kompleks **7**<sub>Ni</sub> (a) odnosno 3 i 8 μM za kompleks **8**<sub>Ni</sub> (b). Stanice su nakon 48 sati inkubacije sakupljene te su izolirani ukupni stanični proteini koji su zatim inkubirani s anti-Bcl-2 protutijelom. Netretirani uzorak predstavlja bazalnu (konstitutivnu) razinu ekspresije proteina u netretiranim stanicama, dok je za kontrolu nanošenja uzoraka korišten ERK 1/2. Rezultati su statistički obrađeni korištenjem student T-testa (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001)

## 5. RASPRAVA

Potreba za razvojem novih lijekova za liječenje tumora, bolesti koja pripada vodećim uzrocima smrtnosti ljudske populacije, izrazito je velika. Prema Karges i sur. (2021), 50% svih kemoterapeutika korištenih za kliničko liječenje onkoloških pacijenata je na bazi platine. Međutim, postoje određeni nedostaci takvih kemoterapeutika, koji uključuju otpornost određenih vrsta tumora na tretman te stvaranje ozbiljnih nuspojava kao što je primjerice nefrotoksičnost. Iz tog je razloga neophodna sinteza novih lijekova, veće selektivnosti i učinkovitosti. Jedno od područja anorganske kemije koje se sve više razvija je primjena metalnih iona i njihovih kompleksa (Mjos i Orvig 2014). Metali imaju ulogu u brojnim biokemijskim procesima u stanicama živih organizama, primjerice u vodenim otopinama mogu reagirati s negativno nabijenim biološkim molekulama zahvaljujući stvaranju pozitivno nabijenih iona (Frezza i sur., 2010).

U posljednje vrijeme organometalni kompleksi predmet su velikog interesa u svrhu njihove primjene kao potencijalnih antitumorskih lijekova. Neki od njih su trenutno u kliničkim ispitivanjima. Unatoč činjenici da su lijekovi odobreni za kliničku primjenu uglavnom organski spojevi, ovakvi intermedijeri između klasičnih organskih i anorganskih derivata, imaju određene prednosti u odnosu na organske lijekove, što ih čini potencijalnim kandidatima za liječenje tumora (Parveen i sur. 2019). Neke od prednosti takvih spojeva su raznolika stereokemija, varijacije strukture i naboja, lipofilnost, kinetička stabilnost, redoks svojstva te sposobnost interakcije i koordinacije s biološkim molekulama zahvaljujući sposobnosti izmjene liganada. Konjugati na bazi ferocena (sadrže derivate ferocena povezane sa drugim spojevima) pokazuju puno nižu toksičnost i veću antiproliferativnu sposobnost u usporedbi s poznatim antitumorskim lijekovima (Jakopec i sur. 2022). U sklopu ovog rada, istražena su biološka svojstva dva heterobimetalna kompleksa nikla s aminoferocenskim ligandima (**7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**) (Tablica 1) sintetizirana u laboratoriju prof. dr. Raić-Malić na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Najprije je na liniji stanica HeLa kao eksperimentalnom modelu ispitana citotoksičnost 20 novosintetiziranih spojeva s ferocenskom skupinom od kojih su za daljnja istraživanja odabrana dva spoja (**7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**). Odabrani spojevi su pokazali visoku citotoksičnost u odnosu na veliki broj novosintetiziranih spojeva s ferocenskom skupinom s  $IC_{50}$  vrijednostima 3,5  $\mu$ M za kompleks **7<sub>Ni</sub>** te 8  $\mu$ M za kompleks **8<sub>Ni</sub>**. Iako su neki od ispitanih spojeva navedenih u Tablici 8 pokazali veću citotoksičnost u odnosu na komplekse **7<sub>Ni</sub>** ili **8<sub>Ni</sub>**, nisu odabrani zbog loše stabilnosti, kao npr. spoj **1<sub>Ni</sub>** ili sklonosti stvaranja kristala u vodenoj otopini kao npr. spoj *N*-(2-(bis((1-(4-jodfenil)-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)etil)ferocenkarboksamid (**6**). Nadalje, kompleksi **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** pokazuju strukturne

sličnosti: sadrže prijelazni metal nikal te su derivati aminoferocena korištenog kao liganda u njihovoj kemijskoj strukturi. Nadalje, derivati aminoferocena su zbog otežane kemijske sinteze kao i loše stabilnosti aminoferocena i njegovog prekursora, slabo istraženi (Sethi i sur. 2016) što je dodatno potaknulo naš interes za daljnje istraživanje opisanih kompleksa. Sve se češće za sintezu potencijalnih kemoterapeutika koristi ugradnja metalocena, kao što je ferocen, u konvencionalne ligande vezane za prijelazne metale kao što su npr. bakar, rutenij i nikal (Patra i Gasser 2017). Za sintezu spojeva ispitivanih u ovom radu korišteni su tridentatni iminodiacetamidski (imda) i bis-pikolilaminski (bpa) ligandi koji se, unatoč svojoj strukturnoj sličnosti, razlikuju u stereokemijskoj sklonosti za stvaranje kompleksa  $ML_2$  (bpa ligandi imaju sklonost stvaranja *cis-fac* izomera, dok imda ligandi gotovo uvijek tvore *trans-fac* izomere) (Juraj i sur. 2020). Ligand odabranog kompleksa  $7_{Ni}$  je iminodiacetamidski, dok je ligand kompleksa  $8_{Ni}$  bis-pikolilaminski. Iz tog razloga bi odabrani kompleksi  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  unatoč svojoj strukturnoj sličnosti, trebali imati različitu stereokemiju: *trans-fac* za kompleks  $7_{Ni}$  te *cis-fac* za kompleks  $8_{Ni}$ . Trenutno je stereokemija razriješena i potvrđena za kompleks  $8_{Ni}$ , dok se stereokemija za kompleks  $7_{Ni}$  može pretpostaviti prema strukturnoj sličnosti s prije opisanim kompleksima, npr. heksakoordiniranim Ni(II) kompleksima s imda ligandima opisanim u radu Juraj i sur. 2019.

Općenito, brojni kemijski spojevi sintetizirani kao potencijalni kemoterapeutici pokazuju određenu vrstu djelovanja u biološkom sustavu. No obično samo nekolicina ima nužna svojstva i zadovoljava vrlo stroge uvjete koje je potrebno zadovoljiti da bi se razmatrala njihova eventualna klinička primjena. Toksičnost spoja, kao i njegov utjecaj na druge molekule u stanici, mora biti svedena na minimum. Također, mogući problemi su različita citotoksičnost spoja u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, što uvelike otežava i usporava razvoj, a time i potencijalnu primjenu metalnih kompleksa u klinici (Chellan i Sadler 2020; Berg i sur. 2013). Također, spojevi koji se proučavaju za potencijalnu primjenu u kemoterapiji, moraju imati koncentraciju  $IC_{50}$  izraženu u  $\mu M$ , ili još bolje nM koncentraciji. Kao što je prethodno navedeno, za komplekse  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  vrijednosti  $IC_{50}$  dobivene ispitivanjem njihovog učinka na stanicama HeLa, iznose  $3,5 \mu M$  za kompleks  $7_{Ni}$  te  $8 \mu M$  za kompleks  $8_{Ni}$ , što možemo usporediti s vrijednosti  $IC_{50}$  široko korištenog kemoterapeutika cisplatine na stanicama HeLa koja prema Stojanović i sur. (2019) iznosi  $16,3 \mu M$ . Navedene vrijednosti  $IC_{50}$  ukazuju na veću citotoksičnost ovdje proučavanih novosintetiziranih heterobimetalnih kompleksa u odnosu na cisplatinu u istim eksperimentalnim uvjetima (Stojanović i sur. 2019). Učinkovitost i antitumorski potencijal heterobimetalnih kompleksa platine (II) sa  $\beta$ -aminoetilferocenom ispitana je u radu Nieto i sur. 2012, prema kojem navedeni kompleks pokazuje znatno veću citotoksičnost za liniju ljudskih stanica karcinoma debelog crijeva (WidR) s vrijednosti  $IC_{50} 2.3 \mu M \pm 0.52$ , u odnosu na cisplatinu s vrijednosti  $IC_{50} 26 \mu M \pm 5.6$ . U zadnje se

vrijeme također intezivno proučava i antitumorski potencijal organometalnih kompleksa rutenija (III) kao moguća zamjena kemoterapeutika na bazi platine. Trenutno su u kliničkim ispitivanjima kompleks  $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(1H\text{-indazol})_2]$  poznat pod oznakom NKP-1339 i kompleks  $\text{ImH}[\text{trans-RuCl}_4(\text{dmsO})(\text{Im})]$  poznat pod oznakom NAMI-A. Kompleks NAMI-A nije pokazao citotoksičnost *in vitro*, dok se *in vivo* pokazao kao vrlo dobar antimetastatski agens. Changhua i sur. (2016) pokazali su da dodavanje ferocena opisanom kompleksu NAMI-A pokazuje citotoksičnost u uvjetima *in vitro*. Citotoksičnost nastalog heterobimetalnog kompleksa  $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{dmsO})\{1\text{-ferocenil-2-(4-piridil)eten}\}]$  poznatog pod oznakom Fc-NAMI kao i spoja u kojem je ferocenska skupina zamijenjena fenilnom (koji je služio kao kontrola) ispitane su na ljudskoj liniji stanica karcinoma debelog crijeva SW480. Kompleks Fc-NAMI pokazao je znatno veći citotoksični učinak ( $\text{IC}_{50}=35 \mu\text{M}$ ) u odnosu na kontrolni uzorak ( $\text{IC}_{50}>400 \mu\text{M}$ ). Prema Talancón i sur. (2013), sintetizirani ciklometilirani Pt(II) kompleks sa ferocen iminoalkoholnim ligandom također je primjer heterobimetalnog kompleksa s jakim antitumorskim djelovanjem. Navedeni kompleks je pokazao 20x jače djelovanje na liniji stanica karcinoma debelog crijeva HCR116 u odnosu na cisplatinu. Također je pokazano kako navedeni heterobimetalni kompleks ima puno veću toksičnost prema ispitivanim tumorskim linijama stanica ( $\text{IC}_{50}=2\text{--}8 \mu\text{M}$ ) u odnosu na slobodni ferocen iminoalkohol ( $\text{IC}_{50} >100 \mu\text{M}$ ). Navedeni literaturni podaci ukazuju na veliki antitumorski potencijal takvih heterobimetalnih kompleksa s ferocenom, kao i potrebu za daljnjim istraživanjima u svrhu njihove moguće kliničke primjene.

Da bi se novosintetizirani kompleks smatrao potencijalnim antitumorskim spojem treba zadovoljiti svojstvo neselektivnosti za različite vrste stanica tumora. Stoga su kompleksima **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** tretirane dodatne tri linije stanica tumora: stanice seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja (MES-OV) i dvije različite linije stanica melanoma (RPMI-7951 i MDA-MB-435). Dobiveni rezultati potvrdili su veću citotoksičnost kompleksa **7<sub>Ni</sub>** u odnosu na **8<sub>Ni</sub>** kod svih ispitanih linija stanica. Najveća osjetljivost na djelovanje kompleksa **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** uočena je kod linije stanica raka jajnika, MES-OV. Nadalje, da bi se novosintetizirani spoj smatrao potencijalno interesantnim za istraživanje u antitumorskom kontekstu mora imati i izraženo selektivno djelovanje na tumorske u odnosu na normalne stanice. U tu svrhu u ovom je istraživanju ispitana toksičnost odabranih kompleksa **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** korištenjem normalne linije ljudskih fibroblasta. Pokazano je da su oba kompleksa manje citotoksična za fibroblaste u odnosu na stanice tumora što ukazuje na njihovo selektivno djelovanje.

Mehanizmi djelovanja takvih heterobimetalnih kompleksa su vrlo slabo istraženi zbog ograničenosti većine istraživanja na sintezu spojeva i analizu njihove citotoksičnosti *in vitro* (Patra

i Gasser 2017; Gericke i sur. 2012). Prema Patra i Gasser (2017), heterobimetalni kompleksi s ferocenom svoje antitumorsko djelovanje ostvaruju ciljanjem više različitih organela unutar stanice ili zahvaljujući aditivnom ili sinergističkom učinku različitih metala koje sadrže, mogu ostvariti multimodalna terapijska djelovanja. Jedno od obilježja tumora je promjena homeostaze ROS-a, koja se odnosi na njihovu povećanu razinu u stanicama tumora što ju čini vrlo privlačnom metom za terapiju raka. Takvi lijekovi djeluju na principu povećanja koncentracija ROS-a u tumorskim stanicama do tolike koncentracije da tumorske stanice više ne mogu preživjeti, odnosno dolazi do njihove smrti. Također, veliki je izazov kod ovakvih lijekova postići selektivnost za tumorske u odnosu na normalne stanice što je vrlo bitno zbog visoke citotoksičnosti ROS-a (Özkan i sur. 2022; Marzenell i sur. 2013). Općenito, metalni kompleksi prije interakcije s ciljnom biološkom molekulom mogu stupiti u interakciju s različitim molekulama u citosolu kao i na membrani stanice. Jedna od takvih molekula je antioksidans glutation, koji potencijalno može imati ulogu u obrambenom odgovoru stanica HeLa na ispitivane metalne komplekse. Svoje djelovanje može ostvariti detoksifikacijom spoja ili stabilizacijom oksidacijsko-redukcijskog sustava stanice stvaranjem ROS-a uslijed tretmana. Kako bismo ispitali sudjeluje li glutation u odgovoru HeLa stanica na stres uzrokovan tretmanom kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  napravljeni su predtretmani stanica s BSO koji je inhibitor sinteze glutationa te s NAC koji je prekursor u sintezi glutationa. Ukoliko citotoksično djelovanje kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  ovisi o količini dostupnog glutationa u stanici (neovisno na koji način glutation ostvaruje svoje djelovanje) očekivano bi bilo različito preživljenje ispitivanih tumorskih stanica sa ili bez inhibitora zbog varijacija u količini glutationa. Odnosno, očekivano bi bilo manje preživljenje stanica predtretiranih s BSO koji inhibira sintezu glutationa te bi time stanice bile osjetljivije na tretman kompleksima te veće preživljenje stanica predtretiranih s NAC koji dovodi do veće sinteze glutationa te bi time stanice bile otpornije na tretman kompleksima. Međutim, dobiveni rezultati pokazuju da citotoksično djelovanje kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  ne ovisi o količini glutationa u stanici. Marzenell i sur. (2016) pokazali su da prolijekovi na bazi aminoferocena uzrokuju jaki oksidativni stres koji uzrokuje smrt humane leukemijske linije stanica HL-60. Takvi su prolijekovi na bazi aminoferocena u stanicama tumora stupili u kemijsku reakciju s ROS-ovima, što je uzrokovalo njihovu aktivaciju. Nastala su dva citotoksična produkta od kojih je jedan (kinon-metid) uzrokovao inhibiciju antioksidativnog sustava, a drugi (aminoferocen sa željezo (II) ionom) je uzrokovao stvaranje visoke koncentracije ROS-a. Nadalje, pokazano je da derivat ferocena, hidroksiferocifen, djeluje citotoksično na način da smanjuje koncentraciju glutationa inhibirajući na taj način antioksidativni sustav i uzrokujući smrt stanica karcinoma dojke (Marzenell i sur. 2013). Moguće je da se kompleksi  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  vežu na DNA te stvarajući oštećenja DNA dovode do smrti stanice. Nadalje, s obzirom da u stanicama postoje i druge molekule koje

osim glutationa sudjeluju u stabilizaciji ROS-a (Lushchak 2012) namjera nam je da u budućem istraživanju direktno mjerimo ROS.

Daljnje analize odabranih kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  bile su usmjerene na proučavanje njihovog učinka na ciklus i smrt stanica. Rezultate analize ciklusa stanica tretiranih kompleksom  $7_{Ni}$  pokazuju da kompleks  $7_{Ni}$  potiče nakupljanje stanica u fazi S ciklusa u ovisnosti o dozi. Odnosno, proporcionalno vremenu tretman kompleksom  $7_{Ni}$  potiče nakupljanje stanica u G0/G1 fazi ciklusa. Moguće je da kompleks  $7_{Ni}$  uzrokuje više tipova oštećenja (rano i kasno) što bi moglo objasniti različit učinak na ciklus stanica u ovisnosti o trajanju tretmana. Također je moguće da stanice tijekom replikacije DNA u fazi S ciklusa zbog nastalih oštećenja ne prolaze drugu kontrolnu točku (S/G2) čime dolazi do zaustavljanja diobe stanice. Nadalje, pokazano je da kompleks  $7_{Ni}$  uzrokuje povećanje subG1 populacije stanica u ovisnosti o dozi i vremenu tretmana. Kompleks  $8_{Ni}$  također uzrokuje nakupljanje stanica u fazi S ciklusa te porastom duljine tretmana dolazi do nakupljanja stanica u G0/G1 fazi. Kompleks  $8_{Ni}$  uzrokuje porast subG1 populacije stanica u ovisnosti o dozi i duljini trajanja tretmana. Dobiveni rezultati ukazuju na slično citotoksično djelovanje oba istraživana kompleksa.

Kako su prethodno opisani rezultati analize učinka kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  na ciklus stanica uzrokovali nakupljanje populacije stanica subG1, daljnje je istraživanje bilo usmjereno na analizu tipa stanične smrti uzrokovane tretmanom navedenim kompleksima. Nekroza i apoptoza su dvije najčešće vrste stanične smrti. Neodgovarajuća regulacija oba procesa može rezultirati nizom bolesti, uključujući rak (Fink i Cookson 2005). Tijekom nekroze, za razliku od apoptoze, dolazi do narušavanja integriteta stanične membrane, izlivanja staničnog sadržaja te upale, što može vrlo negativno utjecati na ostala tkiva i organizam (Hassan i sur. 2014; Fink i Cookson 2005). Sa svrhom razlikovanja između nekrotične i apoptotske stanične smrti, stanice HeLa su tretirane kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  i bojane s Aneksin-V-FITC i PI-om. Rezultati su pokazali da oba kompleksa uzrokuju apoptozu.

Kako bi se dodatno potvrdila smrt stanica apoptozom, analizirana je ekspresija/cijepanje proteina PARP-1 nakon tretmana stanica HeLa kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . To je enzim koji sudjeluje u popravku oštećenja DNA i predstavlja jednu od meta kaspaze 3 tijekom apoptoze. Pri apoptozi dolazi do njegovog cijepanja što se smatra specifičnim biljgom programirane smrti stanice (Agarwal i sur. 2009). Rezultati pokazuju da tretmani kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  ne uzrokuju cijepanje proteina PARP-1 u stanicama jer je detektiran samo nepocijepani oblik proteina. Neki od mogućih objašnjenja su da protein PARP-1 nije uključen u apoptozu uzrokovanu istraživanim kompleksima ili da se radi o apoptozi koja je neovisna o kaspazama. Zanimljiv primjer heterobimetalnog

kompleksa je kompleks platine (II) sa ferocenom koji, kako navode Link i sur. (2014), aktivira kaspaze i posljedično programiranu smrti stanice što je detektirano smanjenom ekspresijom prokaspaze 3 i povećanom ekspresijom pocijepanog oblika proteina PARP-1. Također je pokazano da ovaj kompleks s ferocenom, interferiranjem s enzimom AKT dovodi do translokacije transkripcijskog faktora FOXO3a iz citosola u jezgru gdje ostvaruje svoje tumor supresorsko djelovanje (pokazano je da je u tumorskim stanicama FOXO3a često translociran u citoplazmu zbog pojačane regulacije enzima AKT koji fosforilacijom FOXO3a potiče njegovu translokaciju).

Nadalje, kako naši rezultati protočne citometrije upućuju na to da stanice HeLa umiru apoptozom nakon tretmana kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ , a prethodno opisani rezultati pokazuju da ne dolazi do cijepanja proteina PARP, analizirana je ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 nakon tretmana stanica HeLa kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . Overekspresija proteina Bcl-2 uočena je u brojnim tumorima te se povezuje s nastankom, napredovanjem i razvojem otpornosti na antitumorske lijekove što je u skladu sa činjenicom da je supresija apoptoze jedna od osnovnih karakteristika tumora (Campbell i Tait 2018; Garc i sur. 2018). Naši rezultati pokazuju da povećanjem koncentracije kompleksa  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$  dolazi smanjenja ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl-2. Rezultati ukazuju na mogući mitohondrijski put aktivacije apoptoze kompleksima  $7_{Ni}$  i  $8_{Ni}$ . Međutim, daljnja istraživanja možemo usmjeriti na detekciju drugih anti- i pro-apoptotskih proteina kao što su Bax i Bak (karakteristični za unutarnji put apoptoze/mitohondrijalni put) ili Fas (karakterističan za vanjski put apoptoze/receptorski put). Također, mjerenje aktivnosti kaspaza 8, 9 i 3 su nužna za bolje razumijevanje programirane smrti stanice uzrokovane ovim kompleksima.

Sinteza i proučavanje heterobimetalnih kompleksa prijelaznih metala s ligandima na bazi ferocena u svrhu iskorištavanja aktivnosti dva različita metala u zadnje vrijeme predstavljaju veliki predmet interesa brojnih znanstvenika zbog njihove potencijalne primjene u kemoterapiji. Kako navode Patra i Gasser (2017), potentnost ovakvih heterobimetalnih kompleksa s ferocenom uvelike ovisi o slučaju, primjerice o tipu tumorskih linija stanica korištenih za ispitivanje učinka ovakvih kompleksa što predstavlja manu u shvaćanju mehanizama njihovog djelovanja. Također, istraživanja treba usmjeriti i na proučavanje mogućih nuspojava uzrokovanih korištenjem ovakvih spojeva kao što je npr. preopterećenje organizma željezom (što može uzrokovati oštećenje jetre) u svrhu procjene njihove primjene kod ljudi. U ovom su radu prvi put opisani biološki učinci dva novosintetizirana heterobimetalna kompleksa nikla s aminoferocenskim ligandima. Ispitivani su kompleksi pokazali određena svojstva bitna za daljnja ispitivanja i potencijalnu kliničku primjenu, koja uključuju širok opseg antitumorskog djelovanja i selektivnost za tumorske u odnosu na normalne stanice. S obzirom da su rezultati pokazali da citotoksično djelovanje ispitivanih



kompleksa ne ovisi o količini glutationa u stanici, zbog čega pretpostavljamo da ovi kompleksi ne uzrokuju stvaranje ROS-a (jednog od mehanizama djelovanja antitumorskih lijekova preko kojeg se inducira smrt tumorskih stanica), daljnja istraživanja treba usmjeriti na otkrivanje točnog mehanizma njihovog djelovanja kao i specifične biološke mete ispitivanih kompleksa.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Ispitana je stabilnost i citotoksičnost 20 novosintetiziranih derivata ferocena i njihovih metalnih kompleksa na staničnoj liniji HeLa. Zbog veće stabilnosti i toksičnosti izabrana su dva heterobimetalna kompleksa nikla s aminoferocenskim ligandima (**7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**) za daljnja biološka ispitivanja.
2. Kompleksi **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** pokazuju antitumorsko djelovanje i selektivno citotoksično djelovanje na tumorske u odnosu na normalne stanice fibroblasta.
3. Istražena je citotoksičnost kompleksa **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** na tumorskim staničnim linijama MES-OV, RPMI-7951 i MDA-MB-435 od kojih linija MES-OV pokazuje najveću osjetljivost na djelovanje kompleksa **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**.
4. Kompleks **7<sub>Ni</sub>** je toksičniji prema svim ispitivanim tumorskim staničnim linijama u odnosu na kompleks **8<sub>Ni</sub>**.
5. Glutation ne sudjeluje u odgovoru stanica HeLa na tretman kompleksima **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>**.
6. Kompleksi **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** uzrokuju nakupljanje stanica u fazama ciklusa G0/G1 i S.
7. Kompleksi **7<sub>Ni</sub>** i **8<sub>Ni</sub>** potiču programiranu smrt stanice, odnosno apoptozu.

## 7. LITERATURA

1. Agarwal A., Mahfouz R.Z., Sharma R.K., Sarkar O., Mangrola D., Mathur P.P. (2009): Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reproductive Biology Endocrinology* **7**: 143.
2. Alam A., Farooq U., Singh R., Dubey V.P., Kumar S., Kumari R., Kumar K. (2018): Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A review. *Open Access Journal of Toxicology* **2**: 555-600.
3. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A. (2010): *Essential cell biology*. 3rd edition, Garland science, Taylor & Francis Group, New York.
4. Anand U., Dey A., Singh A.K., Sanyal R., Mishra A., Kumar D. (2022): Cancer chemotherapy and beyond: Current status , drug candidates , associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases* **9**: 1-35.
5. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. 5<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman And Company, New York.
6. Boulikas T, Vougiouka M. (2003): Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports* **10**: 1663-1682.
7. Astruc D. (2017): Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 6-29.
8. Brozovic A., Osmak M. (2010): The relationship between cisplatin-induced reactive - oxygen species , glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* **40**: 347–359.
9. Campbell K.J., Tait S.W.G. (2018): Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology* **8**: 1-11.
10. Chabner B.A., Roberts TG Jr. (2005): Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* **5**: 65-72.
11. Changhua M., Chang S.W., Prosser K.E., Leung A.W.Y., Santacruz S., Jang T., Thompson J.R., Yapp, Jeffrey D.T., Warren T., Bally M.B., Beischlag T., Walsby C.J. (2016) . Induction of cytotoxicity in pyridine analogues of the anti-metastatic Ru (III) complex NAMI-A by ferrocene functionalization. *Inorganic Chemistry* **55**: 177–190.
12. Chellan P., Sadler P.J. (2020): Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chemistry-A European Journal* **26**: 8676-8688.
13. Chu E. (2008): A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research* **68**: 8643-8653.

14. Cooper G. M., Hausman R. E. (2004). *The cell: a molecular approach*. 3rd edition, Sunderland, Mass., ASM Press, Washington, D.C.
15. Debela D.T., Muzazu S.G.Y., Heraro K.D., Ndalama M.T., Mesele B.W., Haile D.C., Kitui S.K., Manyazewal T. (2021): New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAFE Open Medicine* **9**: 1-10.
16. Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., Cascante M. (2013): Pharmacology & Therapeutics Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **138**: 255-271.
17. Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495-516.
18. Fink S.L., Cookson B.T. (2005): Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **73**: 1907-1916.
19. Frezza M., Hindo S., Chen D., Davenport A., Schmitt S., Tomco D., Dou QP. (2010) Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy, *Current Pharmaceutical Design* **16**: 1813-1825.
20. Fricker S.P., Fricker S.P. (2007): Metal based drugs : from serendipity to design *Dalton Transactions* **43**: 4903-4917.
21. Garc M., Elisabet P., Redondo M. (2018): Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 3950.
22. Gasser G., Ott I., Metzler-nolte N. (2011): Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 3-25.
23. Gericke, H. J., Muller, A. J. & Swarts, J. C. Electrochemical illumination of intramolecular communication in ferrocene-containing tris- $\beta$ -diketonato aluminum (III) complexes; cytotoxicity of  $\text{Al}(\text{FcCOCHCOCF}_3)_3$ . *Inorganic Chemistry* **51**: 1552-1561.
24. Han Y.H., Park W.O.O.H. (2009): The effects of N-acetyl cysteine , buthionine sulfoximine , diethyldithiocarbamate or 3-amino-1 , 2 , 4-triazole on antimycin A-treated Calu-6 lung cells in relation to cell growth , reactive oxygen species and glutathione. *Oncology Reports* **22**: 385-391.
25. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646–674.
26. Hassan M., Watari H., Abualmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. (2014): Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International* **2014**: 150845.
27. Hassanpour S.H., Dehghani M. (2017): Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* **4**: 127-129.

28. Jakopec S., Juraj N.P., Peri B., Rai S. (2022): Ferrocene conjugates linked by 1, 2, 3-triazole and their Zn (II) and Cu (II) complexes: Synthesis , characterization and biological activity. *Applied Organometallic Chemistry* **36**: 1-22.
29. Juraj N.P., Miletić G.I., Perić B., Popović Z., Smrečki N., Kirin S.I (2019): Stereochemistry of hexacoordinated Zn (II), Cu (II), Ni (II) and Co (II) complexes with iminodiacetamide ligands. *Inorganic Chemistry* **58**: 16445-16457.
30. Juraj N.P., Muratovi S., Peric B., Sijakovic N., Vianello R., Žili D., Jaglicic Z., Kirin S.I. (2020): Structural Variety of Isopropyl-bis (2-picolyl) amine Complexes with Zinc (II) and Copper (II). *Crystal Growth & Design* **20**: 2440-2453.
31. Karges J., Stokes R.W., Cohen S.M. (2021): Metal complexes for therapeutic applications. *Trends in Chemistry* **3**: 523-534.
32. Lamothe R.R.-, Sherratt D.J. (2019): The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 467-478.
33. Link W., Ruiz D., Centelles J.J., Quirante J., Cascante M. (2014): PAPER A novel cyclometallated Pt ( II )– ferrocene complex induces nuclear FOXO3a localization and apoptosis and synergizes with cisplatin to. *Metallomics* **6**: 622-633.
34. Links D.A. (2011): Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New Journal of Chemistry* **35**: 1973-1985.
35. Loktionov A. (2004): Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Letters* **208**: 1-33.
36. Lushchak V.I. (2012): Glutathione Homeostasis and Functions : Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids* **2012**: 736837.
37. Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., Baradaran B. (2017): The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **7**: 339-348.
38. Marzenell P., Hagen H., Sellner L., Zenz T., Grinyte R., Pavlov V., Mokhir A. (2013): Aminoferrocene-Based Prodrugs and Their Effects on Human Normal and Cancer Cells as Well as Bacterial Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**: 6935-6944.
39. Melounková L., Syková M., Jirásko R., Jambor R., Havelek R., Peterová E., Honzíček J., and Vinklárěk J. (2021): Heterobimetallic platinum(ii) complexes with increased cytotoxicity against ovarian cancer cell lines. *New Journal of Chemistry* **45**: 19506-19514.
40. Mjos K.D., Orvig C. (2014): Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews* **114**: 4540-4563.

41. Moisan F., Francisco EB., Brozovic A., Duran GE., Wang YC., Chaturvedi S., Seetharam S., Snyder LA., Doshi P., Sikic BI. (2014). Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers. *Molecular Oncology* **8**: 1231–1239.
42. Nieto D., González-Vadillo A. M., Bruña S., Pastor C. J., Ríos-Luci C., León L.G., Padrón J.M., Navarro-Ranninger C., Cuadrado I. (2012): Heterometallic platinum (II) compounds with  $\beta$ -aminoethylferrocenes: synthesis, electrochemical behaviour and anticancer activity. *Dalton Transactions* **41**: 432-441.
43. Okada H., Mak T.W. (2004): Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells **4**: 592–603.
44. Opferman J.T., Kothari A. (2017): Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Nature* **25**: 37-45.
45. Özkan H.G., Thakor V., Xu H., Bila G., Bilyy R. Anticancer Aminoferrocene Derivatives Inducing Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Chemistry – A European Journal* **28**.
46. Parveen S., Arjmand F., Tabassum S. (2019): Development and future prospects of selective organometallic compounds as anticancer drug candidates exhibiting novel modes of action. *European Journal of Medicinal Chemistry* **175**: 269-286.
47. Patra M., Gasser G. (2017): The medicinal chemistry of ferrocene. *Nature Reviews Chemistry* **1**: 1-12.
48. Ponder B.A.J. (2001): Cancer genetics. *Nature* **411**: 336-341.
49. Reliene R, Schiestl R.H. (2006): Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis* **27**: 240-244.
50. Schirrmacher V. (2019): From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International Journal of Oncology* **54**: 407-419.
51. Schnerch D., Yalcintepe J., Schmidts A., Becker H., Follo M., Wäsch R. (2015): Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *The American Journal of Cancer Research* **2**: 508-528.
52. Sethi S., Das P.K., Behera N. (2016): The chemistry of aminoferrocene,  $\text{Fe}\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{NH}_2)(\eta^5\text{-Cp})\}$ : Synthesis, reactivity and applications. *Journal of Organometallic Chemistry* **824**: 140-165.
53. Siddiqui I.A., Sanna V., Ahmad N., Sechi M., Mukhtar H. (2015): Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1348**: 20-31.

54. Stojanović N., Urankar D., Brozović A., Ambriović-Ristov A., Osmak M., Košmrlj J. (2013): Design and Evaluation of Biological Activity of Diazenecarboxamide-extended Cisplatin and Carboplatin Analogues. *Acta Chimica Slovenica* **60**: 368-37.
55. Tait S.W.G., Ichim G., Green D.R. (2014): Die another way-non-apoptotic mechanisms of cell death. **3**: 2135-2144.
56. Talancón D., López C., Font-bardía M., Calvet T., Calvis C., Messeguer R., Cortés R., Cascante M., Baldomà L., Badia J. (2013): Diastereomerically pure platinum (II) complexes as antitumoral agents. The influence of the mode of binding {(N), (N,O)<sup>-</sup> or (C, N)}<sup>-</sup> of (1*S*, 2*R*) - [(η<sup>5</sup> -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>) Fe{(η<sup>5</sup> -C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>) - CH=N -CH(Me) - CH(OH) - C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>}] and the arrangement of the auxiliary ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **118**: 1-12.
57. Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M., Marengo B., Furfaro A.L., Pronzato M.A., Marinari U.M., Domenicotti C. (2013): Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**.
58. Umar A., Dunn B.K., Greenwald P. (2012): Future directions in cancer prevention. *Nature Reviews Cancer* **12**: 835-848.
59. Visconti R., Monica R. Della, Grieco D. (2016): Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **35**: 153.
60. Wang X., Zhang H., Chen X. (2019): Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance* **2**: 141-160.
61. Weinberg R., (2007): *The biology of cancer*. Second edition, Garland Science, New York.
62. Yi J., Shi S., Shen Y., Wang L., Chen H., Zhu J., Ding Y. (2015): Myricetin and methyl eugenol combination enhances the anticancer activity, cell cycle arrest and apoptosis induction of cis-platin against HeLa cervical cancer cell lines. **8**: 1116-1127.
63. Zari A.T., Zari T.A., Hakeem K.R. (2021): Anticancer Properties of Eugenol: A Review. *Molecules* **26**: 7407.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9. 1. 1998. godine u Osijeku. Nakon završene osnovne škole, upisala sam II. gimnaziju u Osijeku. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja s odličnim uspjehom, upisala sam preddiplomski studij Biologije (s modulom kemije) na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom preddiplomskog studija, bila sam demonstrator na kolegijima Zoologija i Biokemija 1 i 2, predsjednica Studentskog zbora Odjela za biologiju, jedan od predstavnika studenata u Vijeću Odjela za biologiju te član Studentskog zbora Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera Osijeku. Također sam sudjelovala u radu Udruge studenata biologije ZOA, brojnim manifestacijama kao što je “Tjedan mozga”, kongresu HDIR-6 (6. konferencija Hrvatskog društva za istraživanje raka), konferenciji “Women Who are Changing Science” te organizaciji Sveučilinih smotri kao i smotri Odjela za biologiju. Preddiplomski studij Biologije završila sam odličnim uspjehom 2020. godine i stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij Molekularne biologije u trajanju od dvije godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u trajanju jednog semestra na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Na zadnjoj godini diplomskog studija odradila sam izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada u laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Anamarije Brozović. Tijekom izrade ovog diplomskog rada imala sam priliku steći vještine rada u staničnoj kulturi, različitim molekularnim metodama kao je test preživljenja MTT, *Western Blot* te mjerenje ciklusa i smrti stanice protočnim citometrom. Studij Molekularne biologije završavam izradom ovog diplomskog rada te se nadam daljnjem nastavku rada u području istraživanja raka. Uz materinji hrvatski, aktivno govorim engleski jezik, a tijekom srednjoškolskog obrazovanja stekla sam osnove talijanskog i njemačkog jezika.