

Biološka aktivnost derivata ciprofloksacina određena na HeLa i HaCaT staničnim linijama

Teskera, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:787848>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Nikolina Teskera

**BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA
CIPROFLOKSACINA ODREĐENA NA HeLa I
HaCaT STANIČNIM LINIJAMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Kristine Radošević te uz pomoć Martine Bagović Kolić, mag. ing.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković.

Prije svega želim zahvaliti svojoj dragoj mentorici prof.dr.sc. Kristini Radošević na prenesenom znanju, pristupačnosti te nadasve ugodnoj suradnji.

Hvala i svim mojim prijateljima od kojih većina još uvijek ne zna točan naziv mog smjera, ali su zato uvijek glasno navijali i bili stvarno velika podrška.

Zasigurno najveće hvala zaslužuje moja obitelj – mama, tata, brat i Ante. Ovaj uspjeh posvećujem upravo vama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA ODREĐENA NA HeLa I HaCaT STANIČNIM LINIJAMA

Nikolina Teskera, univ. bacc. ing. biotechn.

0058215152

Sažetak: Ciprofloksacin osim antibakterijske aktivnosti posjeduje i antitumorski potencijal. Iz tog razloga je u ovom radu ispitana *in vitro* aktivnost triju derivata ciprofloksacina koji u svojoj strukturi sadrže molekulu ferocena čijom konjugacijom nastaju spojevi koje odlikuje povećana bioaktivnost. Antitumorski učinak ispitan je na HeLa i HaCaT stanicama praćenjem stanične vijabilnosti i klonogenom analizom, dok je antimikrobna aktivnost određena disk-difuzijskom metodom. Ispitani derivati imaju inhibitorni učinak na rast HeLa i HaCaT stanica, ali su djelotvorniji na HeLa stanicama. Pri tome najjače citotoksično djelovanje pokazuje spoj XIV-39, a najslabije XIV-51, što je potvrđeno klonogenom analizom. Svi derivati posjeduju antibakterijsku aktivnost, a najučinkovitijim se istaknuo XIV-51. Iz navedenog se može zaključiti da su derivati ciprofloksacina zadržali antimikrobnu aktivnost te da imaju antitumorski potencijal.

Ključne riječi: derivati ciprofloksacina, *in vitro* testovi, citotoksičnost, HeLa stanična linija

Rad sadrži: 43 stranice, 14 slika, 4 tablice, 63 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Martina Bagović Kolić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. prof. dr. sc. Senka Djaković (član)
4. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić (zamjenski član)

Datum obrane: 19. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF CIPROFLOXACIN DERIVATIVES DETERMINED ON HeLa AND HaCaT
CELL LINES

Nikolina Teskera, univ. bacc. ing. biotechn.

0058215152

Abstract: Ciprofloxacin, in addition to its antibacterial activity, also exhibits antitumor potential. For this reason, this study investigated the *in vitro* activity of three ciprofloxacin derivatives that incorporate a ferrocene molecule into their structure, resulting in conjugates characterized by enhanced bioactivity. The antitumor effect was evaluated on HeLa and HaCaT cells by assessing cell viability and performing clonogenic assays, while the antimicrobial activity was determined using the disk diffusion method. The tested derivatives demonstrated inhibitory effects on the growth of HeLa and HaCaT cells, with greater efficacy observed on HeLa cells. Among them, compound XIV-39 exhibited the strongest cytotoxic effect, while XIV-51 showed the weakest, as confirmed by clonogenic analysis. All derivatives retained antibacterial activity, with XIV-51 being the most effective. Therefore, it can be concluded that ciprofloxacin derivatives maintain their antimicrobial properties and have potential as antitumor agents.

Keywords: ciprofloxacin derivatives, *in vitro* tests, cytotoxicity, HeLa cell line

Thesis contains: 43 pages, 14 figures, 4 tables, 63 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Kristina Radošević, Full professor

Technical support and assistance: MSc. Martina Bagović Kolić, Scientific assistant

Reviewers:

1. Ksenija, Markov, PhD, Full professor (president)
2. Kristina, Radošević, PhD, Full professor (mentor)
3. Senka, Djaković, PhD, Full professor (member)
4. Jasmina, Lapić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 19th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ANTIBIOTIK CIPROFLOKSACIN	2
2.1.1. Kemijska struktura i svojstva ciprofloksacina	2
2.1.2. Mehanizam djelovanja ciprofloksacina.....	4
2.1.3. Primjena u kliničkom liječenju i potencijalne nuspojave	5
2.2. RAZVOJ ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE I NJEN UTJECAJ NA SINTEZU DERIVATA CIPROFLOKSACINA	6
2.2.1. Rezistencija na fluorokinolone	6
2.2.2. Primjeri derivata ciprofloksacina	8
2.3. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA	11
2.3.1. Primjena kulture stanica u <i>in vitro</i> ispitivanjima lijekova	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Stanične linije	16
3.1.2. Derivati ciprofloksacina.....	17
3.1.3. Mikroorganizmi	17
3.1.4. Hranjive podloge.....	17
3.1.5. Kemikalije	18
3.1.6. Uređaji i oprema	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Uzgoj staničnih linija HeLa i HaCaT.....	20
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	20
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina primjenom staničnih linija HeLa i HaCaT pomoću MTS metode.....	21
3.2.4. Klonogena analiza	22
3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti derivata disk-difuzijskom metodom	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Učinak derivata ciprofloksacina na preživljenje HeLa i HaCaT stanične linije.....	25
4.2. Klonogena analiza učinka derivata ciprofloksacina na HeLa staničnu liniju	28
4.3. Antimikrobna aktivnost ciprofloksacina i njegovih derivata	31
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Ciprofloksacin je često korišten sintetski antibiotik iz skupine fluorokinolona, a poznat je po svom učinkovitom djelovanju protiv širokog spektra patogenih mikroorganizama. Iako ciprofloksacin pokazuje značajnu terapijsku učinkovitost, njegova dugotrajna primjena dovela je do problema s razvojem bakterijske rezistencije, što izaziva potrebu za sintezom novih, poboljšanih derivata ovog lijeka, odnosno nužna je modifikacija strukture postojećih fluorokinolona.

Osim toga, ciprofloksacin pokazuje i antiproliferacijski učinak na nekoliko staničnih linija raka, a to znači da ima sposobnost spriječiti razmnožavanje tumorskih stanica. Zbog visoke smrtnosti od tumora, znanstvenici ulažu velike napore u razvoj novih antitumorskih lijekova, kojima nastoje prevladati otpornost tumorskih stanica na postojeće lijekove, ali i činjenicu da mnogi od njih uzrokuju brojne nuspojave zbog niske specifičnosti djelovanja (Liu i sur., 2017).

Jedna od mogućih modifikacija uključuje ugradnju 1,2,3-triazola kao poveznicu između dvaju farmakofora - ciprofloksacina i ferocena. Ferocen je organometalni spoj s brojnim pozitivnim svojstvima, a njegova konjugacija s biomolekulama rezultira spojevima koji se odlikuju visokom stabilnošću, niskom toksičnošću i pojačanom bioaktivnošću. Budući da se ugradnja ferocena u pojedine lijekove pokazala kao uspješna strategija, nastavljaju se intenzivna istraživanja na tom području kako bi se razvili učinkovitiji lijekovi u budućnosti (Idlas i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je ispitati *in vitro* biološku aktivnost derivata ciprofloksacina koji su novosintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, na način da su dobiveni biokonjugati ferocena i ciprofloksacina povezani 1,2,3-triazolnim prstenom. Derivatima je ispitan citotoksični učinak pomoću MTS metode, i to na dvije stanične linije: HeLa i HaCaT, a provedena je i klonogena analiza učinka derivata na HeLa stanicama. Disk difuzijskom metodom analizirana je antimikrobna aktivnost te je uspoređena s aktivnošću koju posjeduje originalni ciprofloksacin.

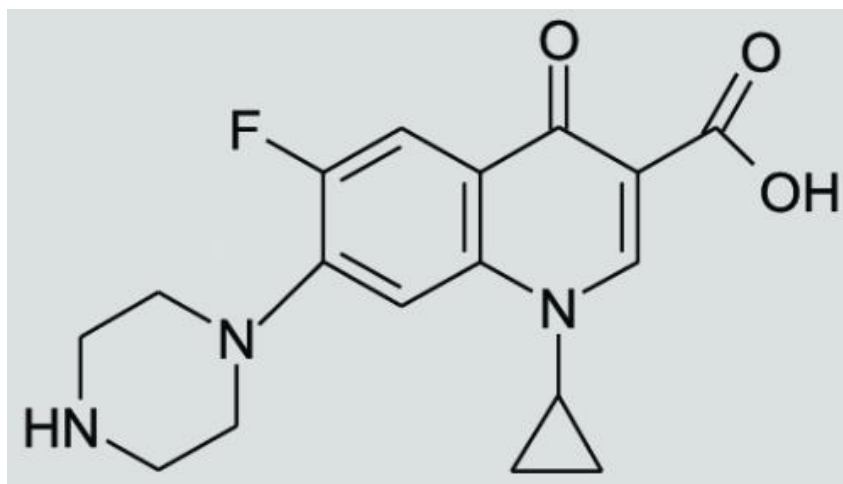
2. TEORIJSKI DIO

2.1. ANTIBIOTIK CIPROFLOKSACIN

2.1.1. Kemijska struktura i svojstva ciprofloksacina

Ciprofloksacin (CIP) je sintetski protuupalni lijek koji pripada drugoj generaciji fluorokinolonskih antibiotika. Ima široki antimikrobni spektar i jak baktericidni učinak pri niskim koncentracijama te se koristi za liječenje različitih bakterijskih infekcija. Neke od njih su: infekcije mokraćnog sustava, osteomijelitis uzrokovan bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae*, infekcije grla, uha, nosa i različite gonokokne infekcije. Lijek je prvi put stavljen na tržište 1987. godine, a nekoliko godina ranije patentirala ga je tvrtka Bayer te ga nalazimo pod više od 300 različitih tvorničkih imena (Ilgwegbe i sur., 2021).

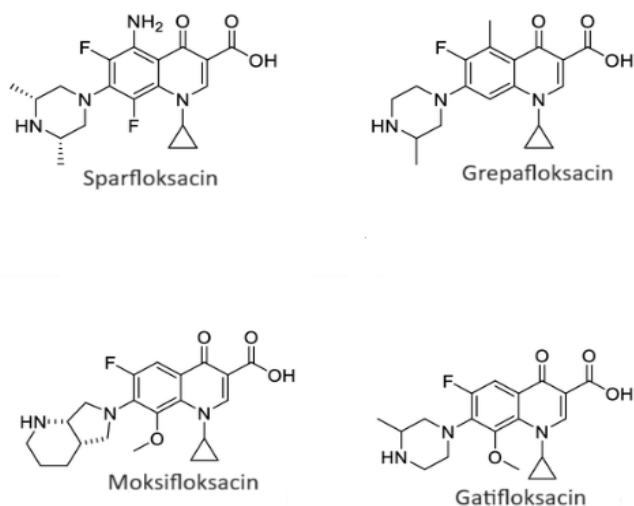
1-ciklopropil-6-fluoro-4-okso-7-(piperazin-1-il)-kinolin-3-karboksilna kiselina naziv je ciprofloksacina po IUPAC-u. Molekulska masa mu je $331,4 \text{ g mol}^{-1}$, molekulska formula $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$ te ima različite funkcijske skupine: ciklopropilnu, karboksilnu, fluoro i piperazin-1-ilnu na pozicijama 1, 3, 6 i 7, a njegova kemijska struktura prikazana je na slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura ciprofloksacina (*prema* Kassab i sur., 2005)

Ciprofloksacin postoji u obliku bijelog praha, gorkog je okusa, a najčešće se primjenjuje *per os*, no moguća je i primjena intravenozno ili dermalno. Temperatura taljenja mu je između $313\text{-}315 \text{ }^\circ\text{C}$, a kako bi se spriječila fotolitički inducirana degradacija, potrebno ga je skladištiti na tamnom mjestu pri temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ciprofloksacin je dobro topiv u octenoj kiselini, a slabo topiv u vodi te metanolu, etanolu i acetonu (organskim otapalima). U molekuli ciprofloksacina prisutne su dvije ionizirajuće funkcijske skupine: 6-karboksilna skupina i 4-*N* pozicija piperidinskog supstituenta (Sharma i sur., 2010).

Fluorokinoloni su antibakterijski agensi širokog spektra djelovanja koji su dobiveni iz nalidiksinske kiseline, a otkriveni su slučajno 1962. te se od tada koriste u liječenju bakterijskih infekcija (Kassab i sur., 2005). Nalidiksinska kiselina je nusprodukt koji nastaje prilikom sinteze klorokina, antimalarijskog lijeka. Od ostalih nusprodukata, istaknula se zbog svoje umjerene antibakterijske aktivnosti spram gram-negativnih bakterija (osim protiv *Pseudomonas aeruginosa*), uključujući bakteriju *Escherichia coli*, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Nekoliko godina kasnije, nalidiksinska kiselina puštena je u kliničku upotrebu, ali je zbog uskog spektra djelovanja i slabe apsorpcije u gastrointestinalnom traktu upotreba bila ograničena na liječenje urinarnih infekcija čiji je uzročnik bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (Palo-Zimmerman i sur., 2010). Osim toga, zbog porasta rezistencije bakterija, a s ciljem poboljšanja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, razvijena je cijela klasa novih spojeva: derivata 4-kinolona. Međutim, niti jedan od derivata nije pokazivao značajno veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na ishodnu nalidiksinsku kiselinu. Stoga su znanstvenici unaprijedili derivate na način da su prvo uveli atom fluora u molekulu 4-kinolona na poziciju 6, što je dalo prve naznake da modifikacije osnovne kemijske strukture mogu poboljšati aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija. Zatim se uveo piperazinski supstituent na poziciju 7 čime je nastao fluorokinolon. Takvi spojevi pripadaju u fluorokinolone druge generacije, a u odnosu na prvu generaciju imaju širi spektar djelovanja, produljeno vrijeme polueliminacije, bolji farmakokinetički profil, smanjeno vezanje na proteine plazme te poboljšanu distribuciju u tkiva. Narednih godina razvijeni su spojevi treće i četvrte generacije fluorokinolona u cilju poboljšanja terapijskih svojstava zbog brzog razvoja mehanizama otpornosti bakterija na kinolone, a neki od njih su prikazani na slici 2 (Ezelarab i sur., 2018).

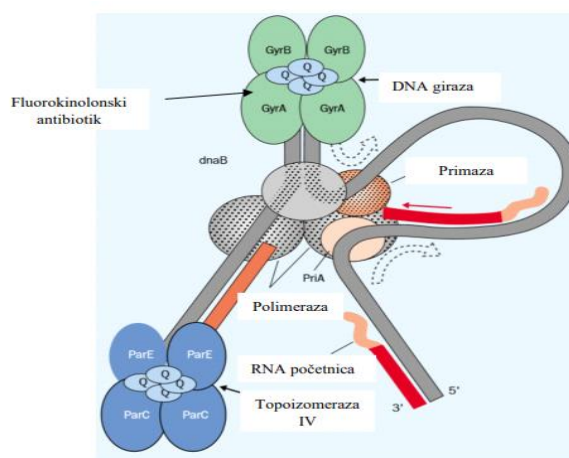


Slika 2. Kemijska struktura fluorokinolina treće i četvrte generacije (prema Dube i sur., 2022)

2.1.2. Mehanizam djelovanja ciprofloksacina

Mehanizam djelovanja ciprofloksacina i ostalih fluorokinololnih antibiotika je kompleksan, a temelji se na inhibiciji sinteze bakterijske DNA. Pri tome fluorokinoloni ciljaju dva ključna bakterijska enzima – topoizomerazu II (poznata i kao DNA giraza) i topoizomerazu IV. Navedeni enzimi imaju važnu ulogu u replikaciji, transkripciji te segregaciji kromosoma. DNA giraza, osim što ima mehanizam za otkrivanje promjena u okolišu, sudjeluje i u procesu smatanja DNA pa time omogućuje pakiranje genetičkog materijala u kompaktnu strukturu nukleotida (Drlica i Malik, 2003).

Prilikom replikacije, dva lanca dvostruke uzvojnice DNA moraju biti razdvojena, pri čemu dolazi do pozitivnog superuzvijanja lanca DNA ispred točke razdvajanja. Topoizomeraze uklanjaju tu mehaničku prepreku replikaciji DNA cijepajući lanac ispred replikacijske pukotine i provlačeći nadolazeći dio kroz nastali otvor, što dovodi do negativnog superuzvijanja molekule DNA prije mjesta replikacije. DNA giraza cijepa veze šećer - fosfat u oba lanca DNA i tako onemogućuje njezino superuzvijanje. Topoizomeraza IV razdvaja lance DNA nakon replikacije i time omogućuje pravilnu segregaciju kromosoma. Strukturno gledano, oba enzima su heterotetramerne molekule s dvije podjedinice, pri čemu je giraza sastavljena kao GyrA₂GyrB₂, a topoizomeraza IV kao ParC₂ParE₂ kod gram-negativnih te kao GrlA₂GrlB₂ kod gram-pozitivnih bakterija. Podjedinica GyrA je homologna podjedinicama ParC i GrlA, a GyrB je homologna s ParE i GrlB. GyrA i njeni homolozi u aktivnom mjestu sadrže tirozinski ostatak koji se kovalentno veže na 5'-kraj DNA tijekom cijepanja, dok GyrB i njegovi ekvivalenti sadrže ATP-aznu i TOPRIM domenu, koje vežu dvovalentne metalne ione koji su uključeni u cijepanje i ligaciju DNA (Aldred i sur., 2014). Na slici 3 shematski je prikazan mehanizam djelovanja fluorokinolona.



Slika 3. Stvaranje kompleksa između fluorokinolona, topoizomeraze II i IV te bakterijske DNA (prema Hooper, 2002)

Topoizomeraze II i IV uvode dvolančane lomove u bakterijski kromosom kako bi dalje obavljale svoje funkcije. Kada se replikacijske vilice ili transkripcijski kompleksi sudare s kompleksima topoizomeraza-DNA, dolazi do tzv. „gap-ova“ koji pokreću SOS odgovor i ostale mehanizme popravka DNA. Kinoloni to iskorištavaju tako što se nekovalentno vežu u aktivno mjesto zaduženo za cijepanje/ligaciju i interkaliraju se u DNA na obje strane loma. Na taj način stvaraju fizičku prepreku ligaciji, što dovodi do povećanog broja dvolančanih lomova i samim time do smrti stanice (Bush i sur., 2020).

Zanimljivo je da ljudi također imaju topoizomeraze II – α i β . Kako fluorokinoloni razlikuju bakterijske topoizomeraze od ljudskih? Tijekom evolucije su se geni koji kodiraju za podjedinice A i B spojili, što je rezultiralo jedinstvenim polipeptidnim lancem pa ljudski enzimi funkcioniraju kao homodimeri. Osim toga, fluorokinoloni imaju veći afinitet za bakterijske topoizomeraze. Iako postoje načini razlikovanja, sličnost ovih enzima predstavlja problem pri dizajniranju lijekova koji su slični kinolonima, a kojima je cilj prevladati bakterijsku rezistenciju na lijekove (Aldred i sur., 2014).

2.1.3. Primjena u kliničkom liječenju i potencijalne nuspojave

Budući da je Bayerov patent istekao 2004. godine, ciprofloksacin je postao široko rasprostranjen antibiotik te se nalazi na listi osnovnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije. Uvođenjem atoma fluora na poziciju 6 te piperazinskog supstituenta na poziciju 7, postigla se bolja biodostupnost te su poboljšane farmakokinetičke karakteristike: apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (Bush i sur., 2020). Ciprofloksacin se lako apsorbira, ali se obično ne postiže potpuna apsorpcija. Postotak biodostupnosti varira između 70 i 80 %, a El-Sabawi i sur. (2019) došli su do zanimljivog zaključka da se apsorpcija ciprofloksacina može smanjiti konzumiranjem mliječnih proizvoda. Unatoč slaboj biodostupnosti, distribucija ovog antibiotika bolja je od distribucije drugih fluorokinona jer se u manjoj mjeri veže za proteine plazme, a nakon oralne primjene prodire u različita tkiva. Značajna koncentracija antibiotika zabilježena je u jetri, bubrezima, prostati, plućima, a posebno u urinu pa se najčešće koristi za liječenje infekcija urinarnog trakta (Aminimanizani i sur., 2001). Ciprofloksacin se pokazao uspješnim i kod liječenja cistične fibroze kod mladih pacijenata koji boluju od infekcija donjih dišnih puteva, a čiji je uzročnik *P. aeruginosa*. Osim toga, koristi se i za antimikrobnu prevenciju kod visokorizičnih pacijenata koji su podvrgnuti kemoterapiji, kao i kod primatelja transplantirane koštane srži. Osim mogućeg razvoja rezistencije, postoje i različite nuspojave, no one su rijetke i javljaju se kod svega 2 % pacijenata, a uglavnom su vezane za gastrointestinalne probleme, kao što je dijareja.

2.2. RAZVOJ ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE I NJEN UTJECAJ NA SINTEZU DERIVATA CIPROFLOKSACINA

2.2.1. Rezistencija na fluorokinolone

Otpornost na antibiotike jedan je od najvećih problema s kojima se svijet i medicina suočavaju. Rezistentni mikroorganizmi predstavljaju opasnost zato što se brzo šire i zato što se pojavljuju u obliku novih sojeva koje je teže liječiti, a neuspješno liječenje može dovesti do visoke stope smrtnosti. Budući da se i fluorokinoloni u velikoj mjeri koriste u kliničkoj medicini, i oni se suočavaju s navedenim problemom pa je fokus znanstvenika usmjeren na razumijevanje mehanizama razvoja otpornosti. Postoje 3 mehanizma otpornosti na ciprofloksacin: ciljane mutacije u genima koji kodiraju za DNA girazu i topoizomerazu IV, plazmidi koji štite stanicu od letalnih učinaka antibiotika te mutacije koje ograničavaju nakupljanje lijeka.

Otpornost na fluorokinolone najčešće je povezana s ciljanim mutacijama u genima za girazu i topoizomerazu IV. Mutacije koje uzrokuju otpornost nalaze se u regiji QRDR - determinirajućoj regiji za rezistenciju na kinolone (engl. *quinolone-resistance-determining-region*). Ta regija postoji i u jednom i u drugom enzimu, a najčešće su mutirani serinski i kiselinski ostaci. Mutacije na serinskom ostatku ne smanjuju ukupnu katalitičku aktivnost enzima, dok mutacije na kiselinskim ostacima uzrokuju smanjenje i do 10 puta, što objašnjava česte mutacije serina i njegovu dobru očuvanost među bakterijama. Njihova uloga je stabilizacija ionskog mosta između vode i metala, a postoji pretpostavka da upravo disrupcija ionskog mosta uzrokuje otpornost na fluorokinolone. Carter i sur. (2023) su u svrhu dokazivanja navedene pretpostavke proveli istraživanje u kojem su najprije potvrdili da je pročišćeni oblik divljeg tipa enzima u *E. coli* osjetljiv na ciprofloksacin, dok su mutirani enzimi rezistentni. Pri povećanim koncentracijama antibiotika, divlji tip enzima pokazao je povećanu razinu lomova DNA te je svoj maksimum dosegao pri koncentraciji od 10 μM ciprofloksacina. Enzimi s jednom mutacijom pokazali su manju osjetljivost na antibiotik te je postignuto duplo manje lomova pri koncentraciji od 500 μM . S druge strane, enzimi s dvije mutacije nisu bili osjetljivi na ciprofloksacin, čak ni pri 500 μM . Mutacije dovode do smanjena vezanja između enzima i lijeka, no ovim istraživanjem je pokazano da se otpornost ne postiže samo na taj način iz razloga što se povećanjem koncentracije lijeka ne mogu nadvladati mutacije kako bi se dostigla razina divljeg tipa enzima. Osim toga, mutacije mogu uzrokovati smanjenu mogućnost inhibicije DNA ligacije, ali i formiranja ternarnog kompleksa enzim-DNA-antibiotik.

Plazmidi koji nose gene za rezistenciju na fluorokinolone također su istaknuti kao jedan od kliničkih problema koji dovode do stvaranja otpornosti. Gen za rezistenciju na kinolone posredovan plazmidom (PMQR, engl. *plasmid-mediated quinolone resistance*) prvi put je

identificiran u SAD-u u bakteriji *Klebsiella pneumoniae*, a prenosi se i horizontalnim i vertikalnim putem (Shariati i sur., 2022). PMQR geni sastoje se od tri različite obitelji gena: prva skupina su qnr geni, zatim protein AAC(6')-Ib-cr, a treća skupina proteina sastoji se od efluksnih pumpi: oqxAB, qepA i qaqBIII. Plazmidni geni qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS i qnrVC kodiraju za proteine (duljine oko 200 aminokiselina) koji su dio obitelji pentapeptidnih ponavljajućih proteina, a njihova uloga je zaštita DNA giraze i topoizomeraze IV od inhibicije. Spomenuti proteini su homologni s mimeticima DNA – McbG i MfpA pa se natječu za vezanje na DNA girazu i topoizomerazu IV i djeluju na način da smanjuju vezanje enzima na DNA (Aldred i sur., 2014). Osim toga, proteini se mogu vezati na enzime i time destabilizirati kompleks između enzima, DNA i fluorokinolona te dovesti do otpuštanja fluorokinolona, ponovne ligacije DNA i, u konačnici, do regeneracije aktivne topoizomeraze. AAC(6')-Ib-cr kodira za aminoglikozid acetiltransferazu, a karakteriziraju je dvije supstitucije aminokiselina (Asp179Tyr i Trp102Arg), od kojih su obje potrebne za acetiliranje fluorokinolona i to onih koji imaju piperazinski prsten s dušikom kao što je ciprofloksacin. Zamjena Asp179Tyr bitna je za uspostavljanje pi-interakcija s prstenom kako bi se olakšalo vezanje fluorokinolona, dok zamjena Trp102Arg ima ulogu fiksiranja fluorokinolona uspostavljanjem vodikovih veza s njegovom karboksilnom ili keto skupinom (Machuca i sur., 2016). Kada su qnrA i AAC(6')-Ib-cr istovremeno prisutni u stanici, tada je razina otpornosti četiri puta veća u odnosu na otpornost koju daje sam qnrA, pri čemu je MIC vrijednost blizu kliničke prijelomne točke za osjetljivost od $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Geni koji kodiraju za AAC(6')-Ib-cr su široko rasprostranjeni te ih obično nalazimo u kasetama kao dio integrona u plazmidu (Park i sur., 2006).

Posljednji mehanizam razvijanja otpornosti na ciprofloksacin predstavljaju efluksne pumpe. Skoro sve bakterije imaju proteine integrirane u membrani koje djeluju kao transporteri, a jednaku ulogu imaju i efluksne pumpe. Činjenica da ih imaju skoro sve bakterije ukazuje na to da su elementi koji su bili kodirani u genomu puno prije upotrebe antibiotika. U stanici obično postoji sustav efluksnih pumpi kojeg pokreće hidroliza ATP-a ili gradijent protona, a zadatak im je ukloniti teške metale, metabolite, organske zagađivače, ali i antibiotike (Blanco i sur., 2016). Inaktivacijom pumpi dolazi do prevelike osjetljivosti na fluorokinolone, dok pojačana ekspresija dovodi do slabe otpornosti, a uzrok su joj mutacije koje povećavaju razinu transkripcije strukturnih gena za pumpe (Hooper, 2002). Identificirana su tri proteina koja imaju ulogu efluksne pumpe: OqxAB – prisutan u životinjskim infekcijama te QeoA1 i QepA2 – pronađeni u ljudi. QepA je pumpa posredovana plazmidom koju karakterizira smanjenje osjetljivosti na hidrofilne fluorokinolone, osobito na ciprofloksacin. Ovisno o razini ekspresije gena qepA, postoje razlike u otpornosti na fluorokinolone. OqxAB je pumpa otkrivena kao uzročnik rezistencije na antibiotik olakvindoks koji se koristi kao promotor rasta kod svinja.

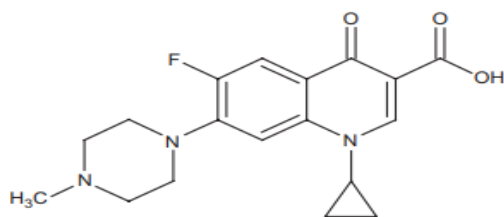
Nađena je na plazmidima kod kliničkih izolata *K. pneumoniae* i *E. coli*, ali i kod bakterije *S. enterica* (Yuan i sur., 2018).

2.2.2. Primjeri derivata ciprofloksacina

Problem razvoja rezistencije na antibiotik ciprofloksacin nastoji se prevladati sintezom njegovih derivata. Iscrpna istraživanja omogućila su bolje razumijevanje funkcionalnih skupina smještenih oko farmakofora fluorokinolonskih antibiotika koja omogućuju smanjenu rezistenciju te uspješnu kliničku primjenu. Molekulske modifikacije antibiotika postižu se grananjem bočnih lanaca, izosteričkim zamjenama, uvođenjem homologije te prilagodbom stereokemije. Različiti derivati istraživani su kao antimalarijski, antibakterijski te antitumorski agensi, a neki od primjera navedeni su u nastavku.

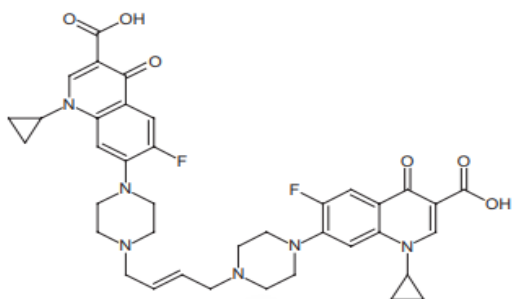
Konjugacija antibiotika i polimera stabilnom kovalentnom vezom dovodi do promjene bioloških svojstava antibiotika zbog veličine i prirode polimerske osnove. Istraživanja su pokazala da modifikacije koje se temelje na kovalentno vezanim polimerima uzrokuju smanjenu toksičnost, bolju topljivost i povećanu stabilnost. Romanovska i sur. (2021) objavili su rad u kojem su konjugirali ciprofloksacin s amfifilnim poli-2-oksazolin blok kopolimerima kako bi se ustanovilo jesu li antibiotici aktivniji zbog potaknute aktivnosti membrane. Konjugati su bili aktivni protiv *Staphylococcus aureus* i *E. coli* koji imaju razvijenu rezistenciju na CIP, a pokazali su visoku aktivnost i protiv drugih patogenih bakterija, i to zbog optimalne ravnoteže hidrofobnog i hidrofilnog dijela polimernog repa. Znanstvenici su uočili da derivatizacija CIP-a koja je potrebna za konjugaciju polimera smanjuje afinitet antibiotika prema topoizomerazi IV. Međutim, pretpostavka je da su konjugati koncentrirani u bakterijskoj citoplazmi pa je smanjeni afinitet zanemariv, a rezultat je visoka antibakterijska aktivnost. Ustanovljeno je da konjugati nisu citotoksični za ljudske matične stanice i ne liziraju krvne stanice u zasićenoj otopini.

Vila i sur. (2006) ispitili su niz derivata ciprofloksacina i testirali ih na bakterije koje pokazuju otpornost na fluorokinolone uzrokovanu mutacijama: *E. coli*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii* i *Stenotrophomonas maltophilia*. Pri tome je derivat 4-metil-7-piperazin CIP pokazao minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) od 50 %, što je bilo 16 puta manje od CIP-a za višerezistentnu bakteriju *A. baumannii*, odnosno 8 puta manje za *S. maltophilia* (slika 4). Supstitucija metilne skupine s etilnom, butilnom ili heptilnom skupinom na položaju 4 u piperazinskom prstenu dovodi do smanjenja aktivnosti protiv *S. maltophilia*.



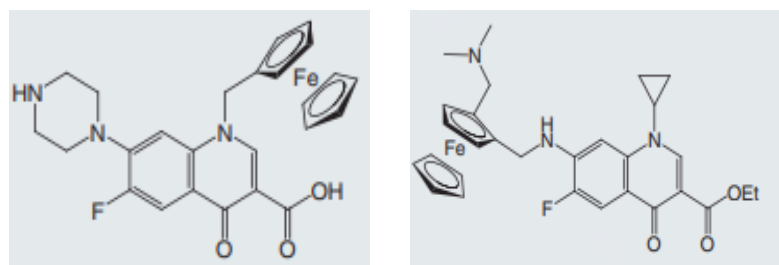
Slika 4. Kemijska struktura derivata 4-metil-7-piperazin CIP (prema Sharma i sur., 2010)

Kerns i sur. (2003) analizirali su niz simetričnih i asimetričnih dimera ciprofloksacina povezanih piperazinilom pri čemu je specifični dimer CIP-a povezan trans-butenilom pokazao jako antibakterijsko djelovanje na rezistentne sojeve *S. aureus* (slika 5).



Slika 5. Kemijska struktura derivata (prema Kerns i sur., 2003)

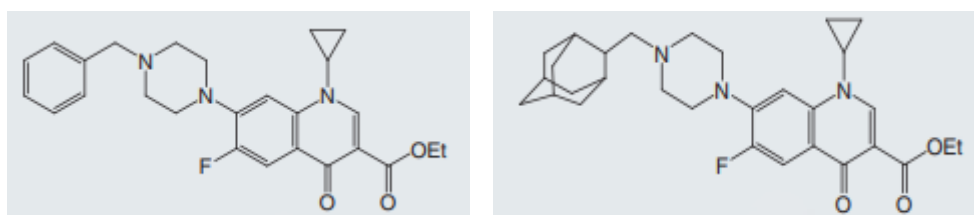
Nadalje, Navarro i sur. (2012) sintetizirali su derivate koji u sebi imaju ferocensku podjedinicu (slika 6). Ferocen je spoj iz skupine metalocena koji se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena međusobno povezana atomom željeza u tzv. „sendvič strukturi“. Ujedno je i malena, lipofilna molekula koja lagano prolazi kroz staničnu membranu, a njegovi kompleksi imaju jak antiplazmodijalni učinak na rezistentnu protozou *Plasmodium falciparum*. Primjena takvih derivata rezultirala je boljom antimalarijskom aktivnošću u odnosu na ciprofloksacin, ali i u odnosu na uobičajene lijekove koji u sebi sadrže kinin, klorokin i artesunat.



Slika 6. Kemijske strukture derivata (prema Castro i sur., 2013)

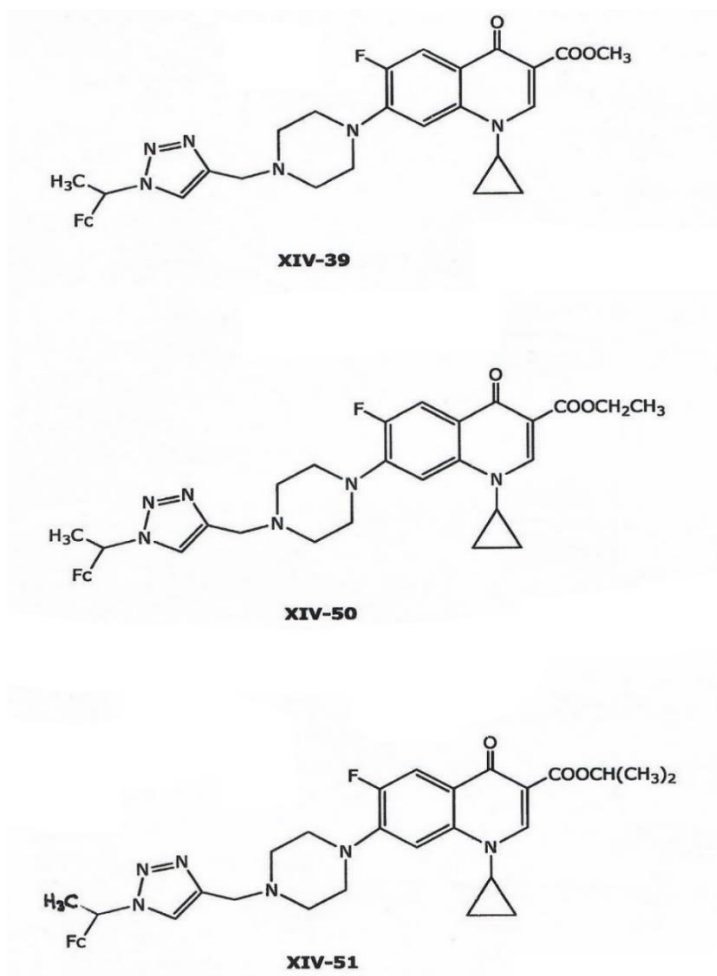
S obzirom da ferocen omogućuje prolaz lijekova kroz membranu, Navarro i sur. (2012) sintetizirali su nove derivate s fenilom i adamantanilom kao supstituentima, a prikazani su na

slici 7. Navedeni supstituenti su mimetici ferocenske podjedinice. Oni sprječavaju katalizu Fenton reakcije kojom nastaju slobodni hidroksilni radikali te ih karakterizira veća aktivnost na *P. falciparum* u odnosu na CIP i njegov feroceniilni derivat.



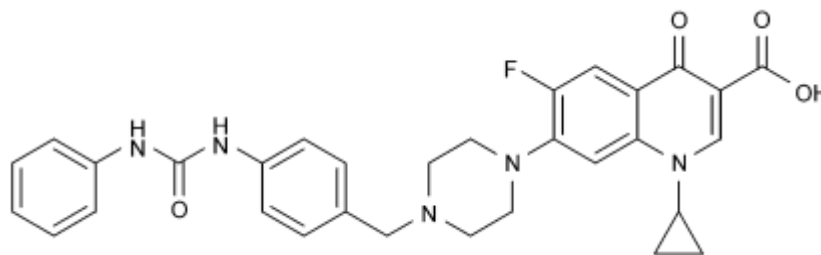
Slika 7. Kemijske strukture derivata (prema Castro i sur., 2013)

Budući da ferocen ima povoljna svojstva, u svrhu ovog istraživanja sintetizirani su hibridi ferocena i modificiranog ciprofloksacina koji imaju 1,2,3-triazolnu premosnicu: XIV-39, XIV-50 i XIV-51, a koji se međusobno razlikuju jedino po esterskoj funkciji ciprofloksacinskog prstena (slika 8). Navedena sinteza provedena je u sklopu diplomskog rada studenta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu Jurice Ljubasa (2024).



Slika 8. Kopulati ferocena i modificiranog ciprofloksacina koji imaju 1,2,3-triazolnu premosnicu (Ljubas, 2024)

German i sur. (2008) proveli su istraživanje u kojem su nastojali otkriti strategiju kojom će supstrate efluksne pumpe širokog spektra pretvoriti u inhibitore pumpe širokog spektra, jer je jedan od načina prevladavanja rezistencije upravo istodobna primjena inhibitora efluksa i antibiotika. U tu svrhu su procjenjivali derivate koji imaju bis-urea supstituent na poziciji 7 piperazinskog prstena (slika 9) te su došli do zaključka da je kemijska modifikacija supstrata pumpe dobar pristup za identificiranje novih inhibitora pumpe.



Slika 9. Kemijska struktura derivata (prema German i sur., 2008)

2.3. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kulture stanica uvelike se primjenjuju u znanstvenim istraživanjima u cijelom svijetu. Metode kojima se stanicama omogućuje rast i održavanje izvan matičnog organizma razvijale su se tijekom 20. stoljeća. Utemeljiteljem i začetnikom kulture stanica smatra se Ross Harrison, znanstvenik koji je izolirao i uspješno kultivirao dio tkiva žabljeg embrija. 1951. godine uspostavljena je prva humana stanična linija – HeLa te je narednih godina izvedeno tisuće staničnih linija koje predstavljaju većinu spektra raka kod ljudi (Knight, 2008).

Kultura životinjskih stanica je laboratorijska tehnika kojom se u umjetnom hranjivom mediju uzgajaju stanice prethodno izolirane iz različitih životinjskih i humanih tkiva. Ako je kultura stanica pripravljena iz tkiva ili organa koji su uzeti neposredno iz organizma, onda je riječ o primarnoj kulturi. Takve kulture zadržavaju specifične funkcije i svojstva tkiva iz kojeg su potekle te stoga najbolje odražavaju uvjete *in vivo*. Subkultivacijom (precjepljivanjem) uspostavlja se stanična linija, a prednost je dobivanje velike količine jednolikog materijala koji je pogodan za dugotrajnu uporabu. Nakon nekoliko subkultiviranja konačna stanična linija odumire ili se prevodi u kontinuiranu (besmrtnu) kao rezultat genotipskih promjena. Promjene se mogu postići postupcima imortalizacije stanica, od kojih se najčešće koriste transfekcija viralnim genima ili transdukcija virusima. Pozitivne strane kontinuirane stanične linije očituju se u promijenjenoj morfologiji stanica, povećanoj brzini rasta, povećanoj učinkovitosti kloniranja te neograničenom životnom vijeku. S druge strane, tijekom dugotrajnog *in vitro*

uzgoja dolazi do promjena u biokemijskim procesima u stanicama jer se nakupljaju metaboliti što rezultira nastajanjem produkata koji inhibiraju rast stanica. Najveći nedostatak kontinuiranih staničnih linija je kromosomska nestabilnost koja uzrokuje fenotipske promjene u odnosu na izvorno tkivo te gubitak specifičnih tkivnih markera (Slivac i sur., 2016).

Sve stanične linije koje se koriste u tehnologiji životinjskih stanica dijele se ovisno o tome je li im za rast potrebna čvrsta podloga za prihvaćanje ili ne. Adherentne stanične linije, kao što su HeLa i HaCaT stanice korištene u ovom radu, trebaju površinu za prihvaćanje, širenje i proliferaciju. Pri tome je vrlo važna vrsta površine na koju će se vezati stanice. Bitno je da su materijali inertni i netoksični poput stakla, želatine ili plastike te da pružaju mehaničku sigurnost.

Kulture stanica imaju vrlo široku primjenu te se koriste u proizvodnji umjetnih tkiva, za sintezu visokovrijednih proizvoda u većoj količini kao što su virusna cjepiva i monoklonska protutijela, zatim u području proteomike i toksikologije. Mogu se koristiti i kao modelni sustavi u staničnoj i molekularnoj biologiji za proučavanje fiziologije ili biokemijskih procesa u stanicama.

Imaju iznimnu važnost u farmakologiji i toksikologiji za ispitivanje citotoksičnosti i djelovanja lijekova koji se nalaze u razvojnoj, odnosno pretkliničkoj fazi. Ispitivanja se najčešće provode na tumorskim staničnim linijama koje se mogu naći u američkoj (ATCC, engl. *American Type Culture Collection*) ili europskoj banci stanica (ECACC, engl. *European Collection of Animal Cell Culture*). Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (NCI, engl. *National Cancer Institute*) sadrži popis od 60 različitih humanih tumorskih staničnih linija koje se koriste za ispitivanje djelovanja raznih spojeva u točno definiranom rasponu koncentracija, kako bi se ustanovio stupanj inhibicije ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju (Boyd i Paull, 1995).

Prednosti primjene kulture stanica su bolja kontrola staničnog okoliša: temperature, pH, kisika, proizvoda metabolizma i hranjivih tvari. Osim toga, prednosti su značajan stupanj standardizacije koja omogućuje reproducibilnost rezultata, razumijevanje staničnih procesa, manja količina reagensa, a treba istaknuti i smanjenje broja pokusnih životinja što je važno s etičkog stajališta. Ipak, nemoguće je u potpunosti izbjeći *in vivo* testove na životinjama, jer je na ovaj način teško opisati farmakokinetiku ispitivanog spoja, ali se postizanjem zadovoljavajuće korelacije između rezultata dobivenih *in vitro* i *in vivo* testovima, broj pokusnih životinja može smanjiti. Neki od nedostataka su visoki troškovi početnih ulaganja, nabava medija i seruma za uzgoj. Uz to, potrebno je znanje i iskustvo te posebno obučeno osoblje za rad s kulturama stanicama.

2.3.1. Primjena kulture stanica u *in vitro* ispitivanjima lijekova

Prije nego što se neki novi spoj ili potencijalni lijek, u ovom slučaju derivat antibiotika, krene primjenjivati u terapijske svrhe, nužno je provjeriti biološku aktivnost *in vitro* na staničnim linijama, odnosno na bakterijskim kulturama, ako je riječ o komponenti koja ima potencijalno antimikrobno djelovanje. Biološka aktivnost definira se kao blagotvorni ili toksični učinak na sustav domaćina, a može se odvijati na nivou receptora, enzima, stanica, tkiva ili organa. Hoće li lijek biti blagotvoran ili toksičan, ovisi o njegovom molekularnom sastavu, ali i o koncentraciji. Utemeljitelj moderne toksikologije i farmacije, Paracelsus, izjavio je sljedeće: „Sola dosis facit venenum“. Odnosno, on je smatrao kako svaka tvar može biti otrov, a primijenjena doza određuje granicu između ljekovitosti i otrovnosti neke tvari. Iako navedena izjava datira iz 16. st., mnogi rezultati ispitivanja toksičnosti prirodnih ili sintetiziranih komponenata potvrđuju ovu tezu (Nantassenamat i sur., 2010). Dakle, prije bilo kakve kliničke primjene pojedinog antibiotika, potrebno je ispitati postoji li citotoksičan učinak na stanice, a istraživanja je poželjno provesti na većem broju različitih staničnih linija kako bi se utvrdilo na koje ciljne stanice određeni spoj najbolje djeluje i koja je koncentracija spoja djelotvorna.

Struga i sur. (2023) u svom su radu sintetizirali različite derivate ciprofloksacina na način da su modificirali C7 piperazinski ostatak s halogeniranim acilnim kloridom. Ispitana je antibakterijska aktivnost konjugata na velikom broju gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Većina derivata bila je aktivna protiv različitih sojeva stafilokoka te su bili čak i do 10 puta učinkovitiji od izvornog CIP-a. Alkanoilni derivati bili su uspješniji protiv kliničkih sojeva *E. coli* i *Enterobacter cloacae* u odnosu na CIP. Neki od derivata u potpunosti su inhibirali rast stanica *P. aeruginosa* i *E. coli* te su u određenoj mjeri uništili biofilm kojeg su formirali gram-negativni patogeni. Pri nižim koncentracijama došlo je do produljenja jedne od faza mikrobnog rasta (lag, stacionarna, eksponencijalna) zbog čega se narušio metabolizam bakterijskih stanica. Osim dobre antibakterijske aktivnosti, novosintetizirani derivati imaju i iznimnu citotoksičnu aktivnost na PC3 stanicama. PC3 je stanična linija karcinoma prostate. Uspostavljena je izolacijom metastatskih lezija karcinoma iz kosti te ima visok metastatski potencijal (Lima i sur., 2018). Ispitana citotoksičnost bila je jača u odnosu na lijek cisplatin te je visokoselektivna u odnosu na normalne keratinocite, odnosno HaCaT stanice. Derivati su gotovo u potpunosti blokirali proliferaciju u PC3 stanicama, pri čemu se nije smanjio postotak preživljenja HaCaT stanica, a protočnom citometrijom je ustanovljeno da konjugati u velikoj mjeri induciraju apoptozu u stanicama raka prostate. Dakle, modifikacije CIP-a su i u ovom slučaju povećale njegov antibakterijski spektar i citotoksičnu moć protiv stanica raka.

Mohammed i sur. (2016) objavili su rad u kojem su dokazali da derivati ciprofloksacina mogu povećati razinu ekspresije p53 i p21 te smanjiti razinu ekspresije gena koji kodiraju za

ciklin B1 i Cdc2 – proteine važne za modulaciju G2/M faze staničnog ciklusa u ljudskim stanicama raka pluća nemalih stanica (NSCLC stanična linija). Derivati ciprofloksacina pri tome nemaju utjecaj na razinu ekspresije navedenih proteina u zdravim stanicama, što je pokazano protočnom citometrijom. Zaključeno je da derivati induciraju zaustavljanje G2/M faze te da ciprofloksacin može imati antiproliferacijski učinak reguliranjem procesa staničnog ciklusa. Beberok i sur. (2018a) izvijestili su da ciprofloksacin inducira fragmentaciju DNA u oligonukleosomima pri najvišoj koncentraciji od 1,0 mM, što je ukazivalo na indukciju apoptoze mitohondrijskim putem, od kojih se ističe disrupcija potencijala mitohondrijske membrane. Iste godine su Beberok i suradnici (2018b) pokazali da liječenje ciprofloksacinom potiče gubitak mitohondrijskog potencijala do kojeg dolazi zbog djelovanja proteina Bax i Bcl2. Navedeni proteini uzrokuju apoptozu u humanim trostruko negativnim stanicama raka dojke MDA-MB-231.

Budući da ciprofloksacin, osim citotoksične aktivnosti, ima i antibakterijski, antitumorski te proapoptotički učinak, znanstvenici sve više rade na sintezi njegovih derivata koji će pokazivati pojačanu citotoksičnost. Jedan od novijih derivata je C7-piperazinil ciprofloksacin koji sadrži Mannich bazu (CMB) u svojoj strukturi, a koja mu omogućuje povećanu citotoksičnost na različitim staničnim linijama raka. Citotoksična aktivnost derivata CMB ispitana je na staničnim linijama OVCAR-3 i A-549 te je dokazano da CMB smanjuje preživljenje stanica, pri čemu je citotoksični učinak veći na OVCAR-3 stanicama nego na A-549. Pojačano djelovanje može se objasniti hipotezom da uključivanje naftilne skupine od N-4-piperazinil Mannich baze smanjuje topljivost CIP-a u vodi mijenjanjem zwitter-ionske prirode izvornog CIP-a (Fawzy i sur., 2023).

Abdel-Rahman i sur. (2021) također su proveli istraživanje s derivatima koji u sebi sadrže Mannich bazu, a testirali su ih na 60 različitih staničnih linija. Od svih derivata, najviše su se izdvojili oni koji u strukturi imaju naftol te su pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost u odnosu na ostale. Osim toga, navedeni derivati imaju i odličnu antibakterijsku aktivnost, osobito protiv bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa*, što se može pripisati pojačanoj lipofilnosti koja je povezana s uvođenjem naftilnog ostatka.

Chrzanowska i sur. (2020) objavili su rad kojem je cilj bio ispitati citotoksična i antimikrobna svojstva konjugata ciprofloksacina izvedenih iz zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Kako bi se osigurala različitost strukturama derivata, kiseline su bile različitih duljina, stupnja nezasićenosti te su predstavljeni različiti geometrijski izomeri. Ispitivanja su proveli na nekoliko različitih staničnih linija: SW480, SW620, PC3 i HaCaT. Ispitivani konjugati nisu pokazali citotoksični učinak na normalnim HaCaT stanicama, a polinezasićeni spojevi koji sadrže sorbinsku, oleinsku i elaidinsku kiselinu bili su najaktivniji na PC3 stanicama. Osim

toga, kratkolančani E-izomeri krotanske i sorbinske kiseline pokazali su najveću antimikrobnu aktivnost protiv sojeva *Staphylococca* i *E. coli*, pri čemu su bili jednako učinkoviti kao i referentni antibiotik doksorubicin. Znanstvenici su istaknuli i da derivati s najnižom lipofilnošću iskazuju najveću antibakterijsku aktivnost. Konjugacijom ciprofloksacina postigao se bolji terapijski učinak u odnosu na izvorni CIP. Uz to što sorbinska, oleinska i elaidinska kiselina same po sebi pokazuju antitumorska i antibakterijska svojstva, mogu djelovati i sinergistički te na taj način dodatno pojačati citotoksični učinak.

2008. godine Hu i suradnici otkrili su novi derivat s antitumorskim djelovanjem. Sintetiziran je na način da je karboksilna skupina na trećem ugljikovom atomu ciprofloksacina zamijenjena s heterocikličkim prstenom čime nastaje ciklopropilni aminotiazoloni fluorokinolon. Novodobiveni spoj zatim reagira s aromatskim aldehydima kako bi se dobili spojevi Schiffove baze. Analize su pokazale da 11 derivata koji su supstituirani tiadiazolom pokazuje potencijalno citotoksično djelovanje na stanične linije raka, a pokazana je i antitumorska aktivnost protiv staničnih linija MMC-7721, HL60 i L1210.

Iz svega navedenog o različitim biološkim aktivnostima derivata ciprofloksacina i puno mogućnosti primjene navedenih spojeva, proizlazi da su derivati CIP-a još uvijek zanimljivo područje znanstvenih istraživanja, a tome je posvećen i ovaj diplomski rad.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanične linije

U ovom istraživanju koristile su se dvije humane stanične linije: tumorska stanična linija (HeLa) i stanična linija izolirana iz zdravih stanica (HaCaT). Obje stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

HeLa je prva uspostavljena humana stanična linija u kulturi. Stanice su izolirane iz tumorskog tkiva vrata maternice pacijentice Henriette Lacks 1951. godine. *In situ* hibridizacijom kromosoma utvrđena su mjesta integracije virusne DNA humanog papiloma virusa 18 (HPV 18), čime je dokazan uzrok tumora (Kochetkov i sur., 2007). HeLa je besmrtna stanična linija koja se dijeli svaka 23 sata. Uzgajana je u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u pločicama s jažicama u inkubatoru s 95 % zraka i 5 % CO₂ pri temperaturi od 37 °C. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *Fetal Bovine Serum*) i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika. DMEM je jedan od standardnih hranjivih medija za uzgoj stanica *in vitro*, a sadrži puferiranu otopinu glukoze, vitamina, aminokiselina i anorganskih soli. Ova stanična linija sadrži 82 kromosoma umjesto tipičnih 46 te 4 HeLa kromosomska markera (M1, M2, M3 i M4). Primjena i rad na HeLa stanicama doprinijeli su testiranju cjepiva i istraživanju malignih tumora, a zbog dugovječnosti i izdržljivosti, kultura je do danas postala najčešće korištena u brojnim istraživanjima širom svijeta.

HaCaT je transformirana aneuploidna stanična linija humanih keratinocita te prva epitelna stanična linija izolirana iz odraslog ljudskog organizma. Ima sposobnost spontane *in vitro* transformacije, pri čemu zadržava normalna diferencijacijska svojstva, ali i strukturu nakon transplantacije *in vivo* (Boukamp i sur., 1988). HaCaT stanice uzgajaju se statično u sterilnim Petrijevim zdjelicama, u standardnom hranjivom mediju DMEM uz dodatak 10 % (v/v) FBS i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika. Uzgoj se odvija u inkubatoru pri 37 °C i vlažnoj atmosferi od 95 % zraka i 5 % CO₂. Budući da je uloga keratinocita u fiziološkim uvjetima popravak i obrana kože, ova stanična linija predstavlja vrlo pouzdan stanični model za istraživanje toksičnih učinaka raznih spojeva, kao i regenerativnih svojstava kože jer su stanice monoklonske, netumorigenične i pokazuju specifične markere diferencijacije (Deyrieux i Wilson, 2007).

3.1.2. Derivati ciprofloksacina

U ovom diplomskom radu ispitana je biološka aktivnost derivata ciprofloksacina koji su prethodno sintetizirani u sklopu diplomskog rada studenta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu Jurice Ljubasa (2024). Ispitano je djelovanje tri sintetizirana derivata (XIV-39, XIV-50 i XIV-51) na HeLa i HaCaT stanične linije.

3.1.3. Mikroorganizmi

Kako bi se ispitalo antimikrobno i antimikotsko djelovanje novosintetiziranih derivata ciprofloksacina, korištena su četiri test-mikroorganizma: tri bakterije i jedan kvasac. Korištene bakterijske vrste *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 te kvasac *Candida albicans* 86 dobiveni su iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Bakterijske kulture čuvaju se u hranjivom bujonu s 30 % (v/v) glicerola, dok se kultura kvasca čuva u sladovini s 30 % (v/v) glicerola na -20 °C.

3.1.4. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 korišten je hranjivi bujon, dok je za praćenje antimikrobnog utjecaja derivata na bakterije korišten hranjivi agar. Podloge se pripremaju iz dehidratiranih podloga u prahu suspendiranjem u 1000 mL destilirane vode, a nakon otapanja steriliziraju se u autoklavu na 121 °C kroz 15 minuta.

Sastav hranjivog bujona:

- mesni ekstrakt (3 g L⁻¹)
- pepton (5 g L⁻¹)
- pH 6,5

Sastav hranjivog agara:

- mesni ekstrakt (3 g L⁻¹)

- pepton (5 g L⁻¹)
- agar (15 g L⁻¹)
- pH 6,5

Za uzgoj kvasca *Candida albicans* 86 korištena je sladovina, dok je za praćenje antimikotskog utjecaja derivata na kvasac korišten sladni agar.

Sastav sladovine:

- sladni ekstrakt (20 g L⁻¹)
- glukoza (20 g L⁻¹)
- pepton (6 g L⁻¹)
- pH 5,5

Sastav sladnog agara:

- sladni ekstrakt (20 g L⁻¹)
- glukoza (20 g L⁻¹)
- agar (15 g L⁻¹)
- pepton (6 g L⁻¹)
- pH 5,5

3.1.5. Kemikalije

- Etanol (Kemika, Zagreb, RH)
- Hranjivi bujon i hranjivi agar (Biolife, Milan, Italija)
- Sladni bujon i sladni agar (Biolife, Milan, Italija)
- DMSO (dimetilsulfoksid) (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- 0,25 % Tripsin-EDTA (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK)
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK)
- Fetalni teleći serum (FBS) (GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland)

- Kristal violet (Kemika, Zagreb, RH)
- MTS reagens [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil) 2Htetrazolijevasol] (Promega, SAD)
- Tripan-plavo (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- PBS pufer (GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland)
- Deionizirana voda

3.1.6. Uređaji i oprema

- Hladnjak (4 °C) (Gorenje, Slovenija)
- Komora za sterilni rad (Kambič, Slovenija)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (Kambič, Slovenija)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica (Buffalo, NY, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Ploče s 6 jažica (Corning, SAD)
- Ploče s 96 jažica (Corning, SAD)
- Laboratorijski pribor i aparatura (mikropipete, nastavci za mikropipete, Petrijeve zdjelice, štapići po Drigalskom, stalci za epruvete, stalci za kivete, ravnalo)
- Diskovi od filter papira (ø 6 mm) (Macherey-Nagel GmbH, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vibromikser Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
- Denzitometar (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska)
- Čitač mikrotitarskih pločica (TECAN, Švicarska)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj staničnih linija HeLa i HaCaT

I HeLa i HaCaT stanice čuvaju se zamrznute u mediju na temperaturi od -80 °C pa ih je prije korištenja nužno odmrznuti stavljanjem ampule sa stanicama u inkubator na 37 °C. Nakon odmrzavanja stanica, cijeli se sadržaj krioampule prenosi u Petrijevu zdjelicu te se održava u inkubatoru na temperaturi od 37 °C uz atmosferu s 95 % zraka i 5 % CO₂. Uzgoj se svakodnevno kontrolira pod inverznim svjetlosnim mikroskopom kako bi se pratila brojnost stanica, morfologija i adhezija za podlogu. Stanice je potrebno precijepiti kada pokrivenost podloge prijeđe 80 % kako bi se spriječio ulazak stanica u stacionarnu fazu rasta zbog kontaktne inhibicije. S obzirom da i HeLa i HaCaT stanice rastu pričvršćene za podlogu, prije same subkultivacije potrebno ih je odvojiti od površine, a u tu svrhu koristi se otopina proteolitičkog enzima tripsina.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

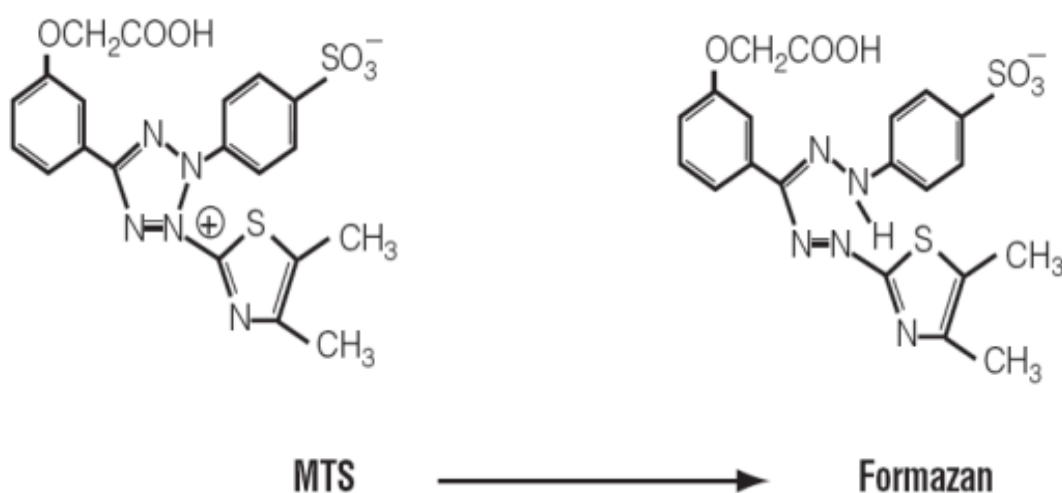
Kako bi se odredio broj stanica, koristi se metoda bojanja otopinom tripan-plavo. Pri tome će se obojati u plavu boju samo mrtve stanice čija je membrana propusna za molekule reagensa, dok žive stanice ostaju neobojane. Za brojanje se koristi Neubauerova komorica. Uzorak za brojenje priprema se na način da se ukloni hranjivi medij, stanice se ispiru 1 mL PBS-a te se dodaje 1 mL tripsina koji odvaja stanice od podloge. Kako bi se ubrzao postupak tripsinizacije, stanice je potrebno držati u inkubatoru nekoliko minuta. Uspješnost odvajanja prati se inverznim mikroskopom, a kada se stanice zaokruže i u potpunosti odvoje od podloge dodaje se medij sa serumom koji zaustavlja djelovanje tripsina jer sadrži inhibitore proteaza. Stanice se resuspendiraju i uzima se 20 µL suspenzije stanica te 20 µL boje tripan-plavo. Od tako pripremljenog uzorka, uzima se alikvot od 20 µL i nanosi na Neubauerovu komoricu koja se sastoji od četiri velika kvadrata, a unutar svakog se nalazi po 16 malih kvadrata. Broj stanica po mL suspenzije određuje se iz navedenog izraza:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj stanica u četiri velika kvadrata} * 5000 \quad [1]$$

3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina primjenom staničnih linija HeLa i HaCaT pomoću MTS metode

Nakon što se stanice izbroje, računa se koliki je volumen suspenzije potreban kako bi se nacijepile u ploču s 96 jažica u početnoj koncentraciji $3 \cdot 10^4$ st mL^{-1} . U svaku jažicu dodaje se 100 μL suspenzije stanica te se ploča stavlja na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata kako bi se stanice prihvatile za površinu i nastavile rasti. Nakon inkubacije stanice se tretiraju s tri različita uzorka novosintetiziranih derivata u koncentracijama od 5; 10; 50 i 100 μM . Kontrolne jažice nisu tretirane, a za svaku koncentraciju derivata postavljene su tri paralele. Stanice su vraćene na inkubaciju tijekom 72 sata, nakon čega je određen učinak derivata na stanice primjenom *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation assay* (skraćeno MTS metoda).

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje broja živih stanica prilikom istraživanja citotoksičnog djelovanja spojeva. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS reagens koji sadržava tetrazolijevu sol MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolij] i PES (fenazinetosulfat) koji poboljšava stabilnost reagensa. MTS sol se u živim stanicama reducira pomoću mitohondrijskih dehidrogenaza u ljubičasto obojeni produkt formazan koji je topljiv u staničnom mediju, a konverzija se vrši pomoću NADH i NADPH (slika 10).



Slika 10. Strukturni prikaz tetrazolijeve soli (MTS) i reduciranog produkta formazana (prema Anakok, 2010)

Nakon 72-satne inkubacije dodaje se po 10 μL MTS reagensa u svaku jažicu, a ploče se vraćaju na inkubaciju sljedeća 4 sata. Intenzitet razvijene boje mjeri se spektrofotometrijski pomoću čitača ploča te je izražen kao apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm. Izmjerena

apsorbancija proporcionalna je količini nastalog formazana, odnosno broju živih stanica u jažici. Preživljenje stanica izražava se kao postotak omjera apsorbancije tretiranih stanica i kontrole, a računa se prema izrazu:

$$\text{Preživljenje stanica} = \frac{\text{srednja vrijednost A490 tretiranih stanica}}{\text{srednja vrijednost A490 kontrole}} * 100 \quad [2]$$

3.2.4. Klonogena analiza

Prema definiciji, test formiranja kolonija ili klonogeni test je *in vitro* metoda kojom se određuje preživljenje stanica temeljeno na sposobnosti pojedinačne stanice da formira koloniju. Pri tome je kolonija definirana kao skup od najmanje 50 stanica. Test ispituje sposobnost neograničenog rasta svake stanice u kulturi, što je karakteristično obilježje tumorskih stanica. Pomoću ove metode moguće je mjeriti utjecaj ionizirajućeg zračenja na proliferaciju stanica i sposobnost formiranja kolonija, ali i odrediti učinkovitost ostalih citotoksičnih agenasa pa se kao takva koristi kako bi predvidjela ponašanje tumorskih staničnih linija na nove kemoterapeutske agense.

Postupak započinje naciepljivanjem prethodno uzgojenih HeLa i HaCaT stanica na dvije ploče sa 6 jažica (100 st mL^{-1} po jažici). Stanice je potrebno inkubirati 24 sata, a nakon toga ih se tretira derivatima u koncentraciji od $100 \mu\text{M}$. Osim toga, nužno je imati i kontrolne netretirane stanice. Tri dana nakon tretmana ukloni se hranjivi medij te se zamijeni svježim, a stanice se vrata na inkubaciju do porasta vidljivih kolonija, za što je potrebno 2-3 tjedna. U ovom radu formirane kolonije bile su vidljive 15 dana nakon naciepljivanja. Zatim slijedi bojanje stanica, odnosno poraslih kolonija bojom kristal violet, a provodi se tako da se ukloni medij te se stanice isperu PBS puferom. Potom se dodaje metanol za fiksaciju stanica, koji se uklanja nakon 10 minuta. Ploču je potrebno ostaviti na zraku kako bi se u potpunosti osušila. Nakon sušenja dodaje se boja kristal violet i inkubira se 10 minuta. Na kraju se ukloni boja te se jažice isperu s PBS puferom i deioniziranom vodom nakon čega se može izbrojati broj poraslih kolonija u svim uzorcima. Na temelju broja poraslih kolonija računa se učinkovitost naciepljivanja (PE, engl. *plating efficiency*), tj. omjer broja poraslih kolonija u kontroli u odnosu na broj stanica koje smo naciepili. Osim toga, izračunata je i frakcija preživljenja (engl. *surviving fraction*, SF), to jest udio stanica koje su formirale kolonije nakon tretmana ispitivanim spojevima.

$$\text{Učinkovitost naciepljivanja (PE)} = \frac{\text{broj kolonija poraslih u kontroli}}{\text{broj stanica koje smo naciepili}} * 100 \quad [3]$$

$$\text{Frakcija preživljenja (SF)} = \frac{\text{broj kolonija poraslih nakon tretmana}}{\text{broj stanica koje smo nacijepili} * \text{PE}} * 100$$

[4]

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti derivata disk-difuzijskom metodom

Disk-difuzijska metoda (poznata i kao Kirby-Bauerov test) se zbog svoje jednostavnosti rutinski koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Osim što je jeftina i jednostavna za izradu, ova metoda relativno brzo daje potrebne podatke (18 – 24 h nakon izolacije i identifikacije bakterija) te omogućuje ispitivanje osjetljivosti bakterije na više antibiotika istovremeno.

Prije samog pokusa, kulture mikroorganizama porasle na čvrstim hranjivim podlogama korištene su za pripremu suspenzije određenih McFarlandovih jedinica (engl. *McFarland units*). Biomasa pojedine mikrobne kulture je resuspendirana u ampulicama pomoću mikrobiološke ušice u mediju za pripremu suspenzija. Gustoće pripremljenih suspenzija mjerene su na denzitometru, a iznosile su 0,4 i 0,5 jedinica za sve suspenzije mikroorganizama. Princip rada denzitometra zasniva se na mjerenju zamućenosti suspenzije stanica, pri čemu rezultate prikazuje u digitalnom obliku – McFarland jedinicama.

Pokus određivanja antimikrobne aktivnosti ciprofloksacina i njegovih derivata započinje na način da se 0,1 mL suspenzije pojedine kulture mikroorganizma (pripremljene na prethodno opisan način) nacijepi na površinu hranjivog agara (bakterije), odnosno sladnog agara (kvasac) u Petrijevim zdjelicama, pritom radeći u aseptičnim uvjetima. Nacijepljena suspenzija mikroorganizma se potom ravnomjerno razmaže po površini hranjive podloge koristeći štapić po Drigalskom. Nakon što se suspenzija upije u hranjivu podlogu, diskovi od filter papira (promjera 6 mm) natope se s ispitivanim spojem te se zatim postave na obilježena mjesta na površinu čvrste hranjive podloge, i to u dvije paralele. Kontrolne uzorke predstavljali su filter diskovi umočeni u otopinu DMSO. Antimikrobna aktivnost ciprofloksacina i njegovih derivata ispitivana je za koncentraciju od 1 mg mL⁻¹. Nakon postavljanja pokusa, Petrijeve zdjelice s uzorcima bakterijskih vrsta stavljene su na inkubaciju u termostat na 37 °C kroz 24 h, dok su Petrijeve zdjelice s uzorcima kvasca stavljene na inkubaciju pri 28 °C. Ispitivana tvar polako difundira iz diska u agar, pri čemu inhibira rast test-mikroorganizma pa se formira tzv. zona inhibicije – svjetlije područje na kojem nema rasta mikroorganizma, tako da posljednji korak podrazumijeva mjerenje promjera zone inhibicije oko diskova.

4. REZULTATI I RASPRAVA

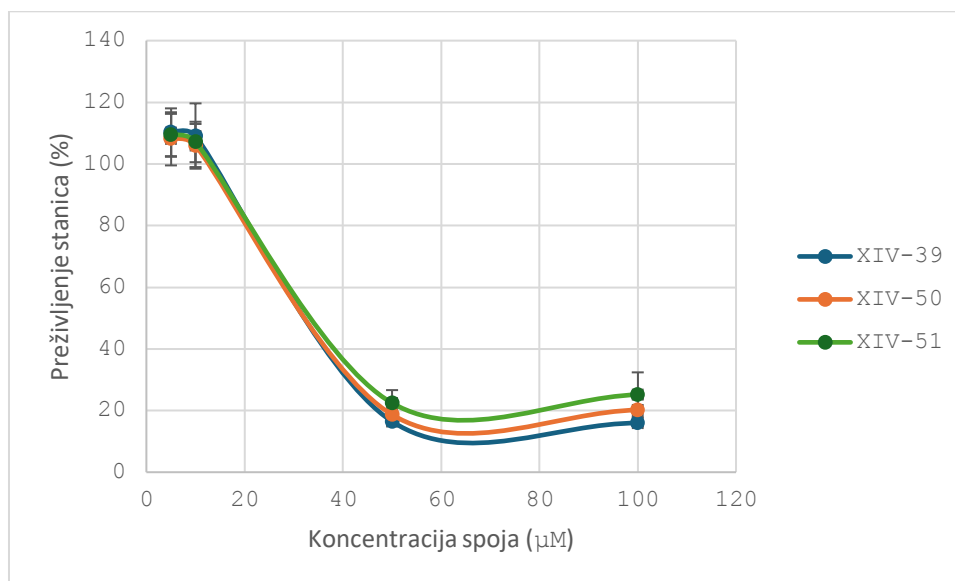
Ciprofloksacin ima važnu ulogu u liječenju bakterijskih infekcija. Njegova izražena antimikrobna aktivnost, izvrsna farmakokinetička svojstva i mali broj nuspojava doveli su do njegove učestale primjene, a samim time i do razvoja bakterijske rezistencije koja ga čini sve manje učinkovitim. Iz tog razloga postoji potreba za sintezom novih derivata ciprofloksacina koji će učinkovitije liječiti bakterijske infekcije (Ji i sur., 2015), a veliki broj je već pokazao obećavajući potencijal.

Tumori također predstavljaju značajan zdravstveni problem širom svijeta budući da se broj pacijenata s dijagnozom raka povećava iz godine u godinu te se znanstvenici suočavaju s izazovom razvoja sigurnih, učinkovitih i ekonomski pristupačnih antitumorskih lijekova (Hay i sur., 2014). Osim toga, mnogi trenutno dostupni lijekovi imaju nisku specifičnost i također su skloni razvoju rezistencije. Antitumorski lijekovi koji sadrže ferocen predstavljaju zanimljivo područje istraživanja. Ovi spojevi djeluju kroz tri glavna mehanizma: redoks aktivnosti, interkalacija s DNA molekulama i inhibicija enzima. Iako su istraživanja ferocenskih spojeva u kontekstu liječenja tumora još uvijek u prekliničkim fazama, rezultati su obećavajući jer *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazuju da mnogi derivati ferocena posjeduju snažno antitumorsko djelovanje.

S obzirom na navedeno, u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, sintetizirani su novi derivati ciprofloksacina koji u sebi sadrže ferocensku podjedinicu, kao i 1,2,3-triazolni prsten te im je ispitana biološka aktivnost. MTS metodom ispitan je citotoksični učinak na HeLa i HaCaT staničnoj liniji te je izračunata pripadajuća IC_{50} vrijednost. Osim toga, ispitan je i učinak na klonogeni rast HeLa stanica, definiran frakcijom preživljenja stanica, koji također ukazuje na antitumorski potencijal ispitivanih spojeva. Disk difuzijskom metodom i mjerenjem promjera zona inhibicije ispitana je antimikrobna aktivnost novosintetiziranih derivata ciprofloksacina spram gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te kvasca.

4.1. UČINAK DERIVATA CIPROFLOKSACINA NA PREŽIVLJENJE HeLa I HaCaT STANIČNE LINIJE

HeLa i HaCaT stanice prethodno su uzgojene, a zatim su naciijepljene u mikrotitarsku ploču sa 96 jažica. Inkubirane su 24 sata nakon čega ih se tretiralo derivatima ciprofloksacina u koncentracijama od 5, 10, 50 i 100 μM . Preživljenje stanica određeno je 72 sata od tretmana, i to primjenom MTS metode. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji primijenjenog spoja (slika 11 i 12).



Slika 11. Utjecaj derivata ciprofloksacina na preživljenje HeLa stanične linije

Iz grafa (slika 11) je vidljivo da svi ispitani derivati pri nižim koncentracijama (5 i 10 μM) postižu preživljenje veće od 100 %, no taj podatak nije neobičan za MTS metodu s obzirom na to da se ona temelji na metaboličkoj aktivnosti stanica. Točnije, ovom metodom se mjeri stanično disanje, a njegova indukcija može ukazivati na stanični stres. Osim toga, MTS je sklon spojevima koji ometaju stanični metabolizam, a to može dovesti do povećanja i od 200 % u odnosu na bazalnu aktivnost. Zbog navedenih razloga se preživljenja veća od 100 % ne interpretiraju na način da derivati potiču rast stanica, nego da jednostavno nemaju citotoksično djelovanje.

Nadalje, kod svih derivata dolazi do izražaja njihov inhibički učinak na rast HeLa stanične linije, ali tek pri većim koncentracijama. Pri tome je najjači inhibički učinak pokazao derivat XIV-39 kojem je postotak preživljenja pri najvećoj koncentraciji od 100 μM bio 15,94 %, a slijede ga XIV-50 i XIV-51, koji je pokazao slabije citotoksično djelovanje u odnosu na ostale derivate. Razlika u preživljenju HeLa stanica pri većim koncentracijama je minimalna za sve derivate. Na temelju eksperimentalnih podataka moguće je grafički i/ili matematički odrediti

IC₅₀ vrijednost (engl. *half-maximal inhibitory concentration*). IC₅₀ označava koncentraciju pri kojoj je preživljenje 50 %. Što je vrijednost niža, spoj je učinkovitiji budući da je potrebna manja koncentracija kako bi se postigla inhibicija. Sukladno tome, derivat XIV-39 koji se pokazao kao najdjelotvorniji spoj, inhibira 50 % stanica pri koncentraciji od 31,6 μM (tablica 1).

Tablica 1. IC₅₀ vrijednosti za derivate ciprofloksacina

	HeLa	HaCaT
Ispitivani spoj	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
XIV-39	31,60	36,50
XIV-50	32,66	39,61
XIV-51	36,05	93,84

S obzirom da je riječ o novosintetiziranim spojevima, njihova biološka aktivnost je u ovom radu prvi put ispitana. Međutim, u dostupnoj literaturi ispitana je biološka aktivnost drugih konjugata pa se tako pokazalo da su derivati CIP-a korišteni u ovom radu učinkovitiji od ferocen-1H-1,2,3-triazolskih konjugata izatina koje su sintetizirali Kumar i suradnici (2014). Navedenim spojevima su znanstvenici ispitali antiplazmodijalnu aktivnost protiv *P. falciparum*, ali i citotoksičnost na HeLa staničnoj liniji. Njihovi rezultati su pokazali da konjugati koji u sebi sadrže halogeni supstituent na položaju C-5 izatinskog prstena i propilni lanac imaju najjaču antimalarijsku aktivnost, ali pri tome nisu citotoksični te im IC₅₀ iznosi više od 80 μM.

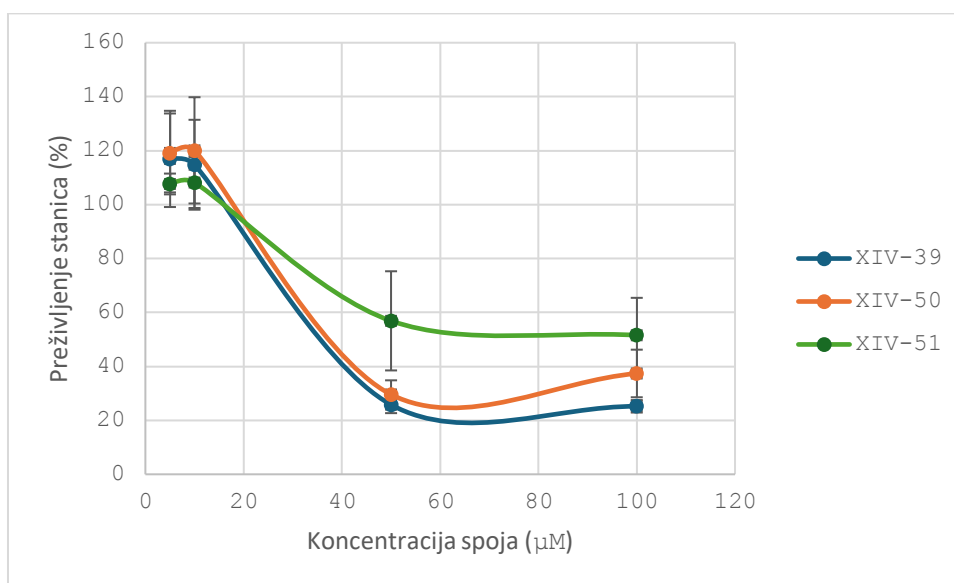
Djaković i sur. (2020) proveli su istraživanje s mono- i bis-konjugatima ferocena i 5'-derivata uracila koji sadrže triazolni prsten kao poveznicu. Derivati bis-ferocenil uracila pokazali su bolje antiproliferativno djelovanje od svojih mono-ferocenil analoga, a najjači inhibični učinak na HeLa stanice imali su derivati kojima kao poveznica služi CH(CH₃). Njihov IC₅₀ iznosio je 5,6 μM te su kao takvi učinkovitiji od derivata koji su se ispitivali u ovom radu.

Iste godine su Fathy i sur. (2020) pripremili dva spoja alkilacijom ciprofloksacina i acetiliranih derivata kalkona, a zatim su istražili njihov utjecaj na preživljenje HeLa stanica. Razlika između pripremljenih spojeva je da jedan ima fenilnu skupinu bez supstituenata (spoj 1), dok drugi na tom dijelu molekule ima tri metoksi grupe na različitim pozicijama (spoj 2). Zanimljivo je da je spoj 1 imao slab citotoksični utjecaj (IC₅₀ > 100 μM), dok je spoj 2 snažno inhibirao rast HeLa stanica (IC₅₀ = 4,4 μM). Iz toga proizlazi da derivati XIV-39, XIV-50 i XIV-51 pokazuju umjerenu biološku aktivnost u usporedbi s derivatima iz rada Fathyja i suradnika (2020).

Dobiveni rezultati su u korelaciji s rezultatima koje su objavili Szczupak i sur. (2019). Oni su, između ostalog, sintetizirali organometalne konjugate CIP-a koji u svojoj strukturi

sadrže rutenocenij. U navedenom istraživanju preživljenje stanica određeno je nakon 24 sata na HeLa staničnoj liniji, a IC_{50} je iznosio $36 \pm 3,5 \mu\text{M}$, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Iz grafičkog prikaza (slika 12) može se vidjeti da i na HaCaT staničnoj liniji svi ispitani derivati pri nižim koncentracijama (5 i 10 μM) postižu preživljenje veće od 100 % odnosno, ne pokazuju citotoksični učinak.



Slika 12. Utjecaj derivata ciprofloksacina na preživljenje HaCaT stanične linije

Kod sva tri ispitana spoja vidljivo je da je inhibicija rasta proporcionalna povećanju koncentracije ispitivanog derivata. To znači da im je učinak ovisan o dozi, ali vrijedi samo za prvi dio grafa (do 50 μM) budući da su postotci preživljenja podjednaki pri 50 i 100 μM . Najjači inhibitorski učinak opet je pokazao derivat XIV-39 kojem je postotak preživljenja pri najvećoj koncentraciji od 100 μM bio 25,21 %. Dakle, redoslijed derivata po učinkovitosti inhibicije jednak je kao i kod HeLa stanične linije: XIV-39, XIV-50 te naposljetku XIV-51 koji ovaj put značajnije odstupa od ostalih derivata te mu IC_{50} iznosi čak 93,84 μM . Općenito su svi derivati pokazali slabiji inhibitorski učinak na HaCaT staničnoj liniji nego na HeLa stanicama.

Uzimajući u obzir značajke masnih kiselina kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost te činjenicu da stanice raka apsorbiraju više masnih kiselina iz svoje okoline nego normalne stanice, znanstvenici su zaključili kako bi njihovo kombiniranje s lijekovima moglo poboljšati biodostupnost, a samim time i citotoksičnost lijekova. Stoga je cilj Chrzanowske i suradnika (2020) bio povezati CIP sa zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama te im ispitati citotoksičnost na staničnim linijama raka, ali i na HaCaT stanicama. Za razliku od derivata XIV-39 i XIV-50, koji su pokazali citotoksični učinak, derivat XIV-51 je

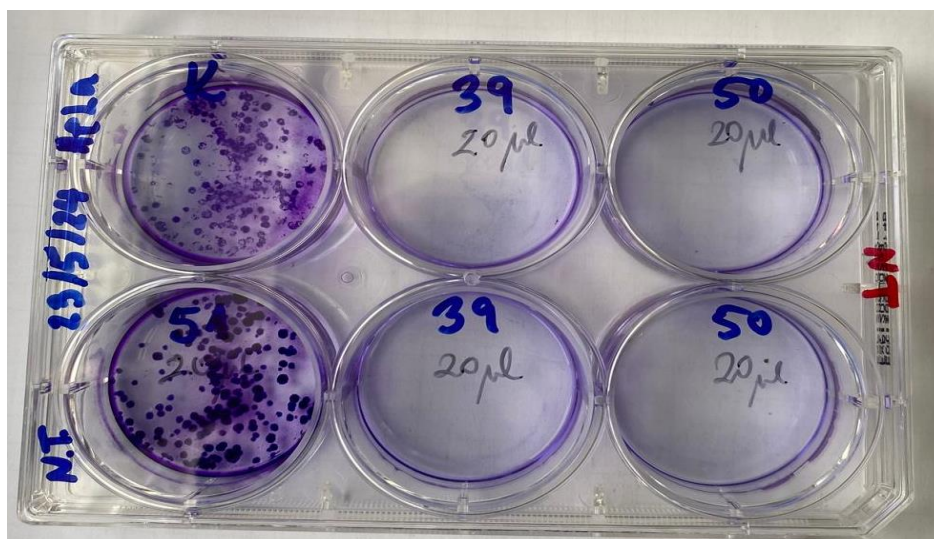
pokazao slične rezultate kao i konjugati u radu Chrzanowska i sur. (2020) te nije iskazao citotoksične učinke u normalnim keratinocitima (HaCaT).

Szostek i sur. (2022) su monoterpene, točnije mentol i timol, kemijski pridodali CIP-u tako da su ih povezali preko različitih karboksilnih skupina. Derivati koji u sebi sadrže timol pokazali su slab citotoksični učinak prema normalnim stanicama, dok se analozi mentola mogu smatrati citotoksičnima. Razlika među derivatima je što hidroksilna skupina mentola, iako polarna, ne stvara iste vrste interakcija koje stvara fenolna skupina, odnosno mentol lakše prolazi kroz lipidne membrane. Rezultati ovog istraživanja nisu u korelaciji s rezultatima u radu Szostek i sur. (2022) jer se iz tablice 1. može uočiti da najlipofilnija molekula pokazuje najmanju citotoksičnost, dok su kod Szosteka i suradnika rezultati bili obrnuti – najlipofilnija molekula je bila najsnažniji citotoksični agens.

Uspoređujući rezultate između HeLa i HaCaT stanične linije, može se uočiti kako svi derivati imaju jači inhibitorni učinak na HeLa staničnoj liniji. Iako nema značajnije razlike između ova tri spoja, budući da pri jednakim koncentracijama imaju sličan učinak, derivat XIV-39 se istaknuo kao najučinkovitiji zbog najmanje IC_{50} vrijednosti. S druge strane, XIV-51 ima najveću IC_{50} vrijednost od čak 93,84 μ M, što ga čini najmanje djelotvornim derivatom.

4.2. KLONOGENA ANALIZA UČINKA DERIVATA CIPROFLOKSACINA NA HeLa STANIČNU LINIJU

Test formiranja kolonija ili klonogeni test je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica koja se temelji na mogućnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju. U ovom eksperimentalnom radu metoda se koristila kako bi se ispitalo djelovanje derivata ciprofloksacina na sposobnost tumorskih HeLa stanica da formiraju kolonije. Kao što je opisano u poglavlju 3.2.4., stanice su nacijeppljene u ploču sa 6 jažica te su nakon 24 sata tretirane s derivatima ciprofloksacina u koncentraciji od 100 μ M. Nakon 15 dana uzgoja došlo je do pojave vidljivih kolonija u jažicama te su stanice potom obojane bojom kristal violet, a porasle kolonije izbrojane su golim okom (slika 13). Na temelju broja izbrojanih kolonija za kontrolu te svaki uzorak (prikazani u tablici 2), izračunate su učinkovitost nacijeppljivanja (PE) i frakcija preživljenja (SF), prikazane u tablici 3.



Slika 13. Rezultati klonogene analize nakon tretmana s derivatima XIV-39, XIV-50 i XIV-51 u koncentraciji od 100 μM (vlastita fotografija)

Tablica 2. Broj poraslih kolonija nakon tretiranja stanica derivatima u koncentraciji od 100 μM

Kontrola	Koncentracija (μM)	XIV-39	XIV-50	XIV-51
132	100	0	0	100
	100	0	0	-

Tablica 3. Učinkovitost naciepljivanja i frakcija preživljenja

PE (%)	SF (XIV-39)	SF (XIV-50)	SF (XIV-51)
66	0	0	0,7576
	0	0	-

Vrijednosti u tablici 2 prikazuju broj poraslih kolonija nakon provođenja klonogene analize za ispitivane derivate ciprofloksacina, pri čemu su stanice tretirane derivatima u koncentraciji od 100 μM . Dobiveni rezultati pokazuju najveći broj poraslih kolonija u kontrolnim, odnosno netretiranim jažicama, što pokazuje uspješnost naciepljivanja stanica te potvrđuje uspješnost provedene analize. Najveći broj poraslih kolonija izbrojan je za jažicu koja je sadržavala derivat XIV-51, što je u korelaciji s rezultatima preživljenja stanica dobivenih MTS

metodom. U jažicama u kojima su dodani derivati XIV-39 i XIV-50 uopće nema poraslih kolonija.

Tablica 3 prikazuje izračunate vrijednosti učinkovitosti nacjepljivanja za kontrolne stanice (PE), ali i frakcije preživljenja za stanice koje su tretirane derivatima ciprofloksacina (SF). Mogući raspon SF vrijednosti je 0-1. Veća SF vrijednost podrazumijeva veću sposobnost stvaranja kolonija nakon djelovanja ispitivane tvari, odnosno derivata ciprofloksacina koji su korišteni u ovom eksperimentalnom radu. SF vrijednost za derivate XIV-39 i XIV-50 jednaka je nuli, što znači da spojevi u potpunosti inhibiraju klonogeni rast tumorskih HeLa stanica. Najveća vrijednost izračunata je za spoj XIV-51, što je u skladu s očekivanjima budući da navedeni derivat ima inhibicijsko djelovanje na HeLa stanice, ali je slabije u odnosu na ostala dva derivata.

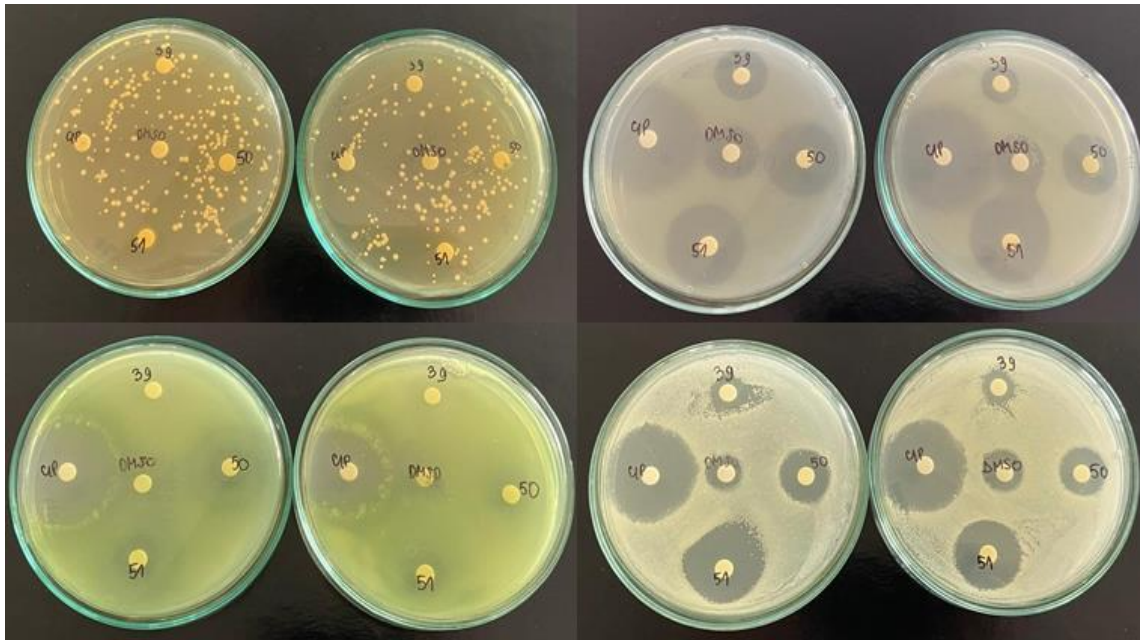
Fathy i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su sintetizirali 7-[4-(*N*-supstituirani karbamoilmetil) piperazin-1-il] ciprofloksacin – novi derivat ciprofloksacina, a cilj njihovog rada, između ostalog, bio je provesti klonogenu analizu učinka na HeLa staničnu liniju. U usporedbi s kontrolnim stanicama, spoj je također značajno smanjio sposobnost stvaranja kolonija, pri čemu je učinak ovisio o dozi. Odnosno, SF vrijednost bila je najniža pri 10 μ M, a najviša pri koncentraciji od 2,5 μ M. Dobiveni rezultati pokazali su da i derivati korišteni u ovom radu, i novosintetizirani derivat korišten u radu Fathyja i suradnika (2020) imaju potencijal sprječavanja metastaziranja tumorskih stanica. To je moguće zbog uvođenja ferocenskog, odnosno *N*-4-piperazinijskog ostatka, budući da oni poboljšavaju fizikalno-kemijska svojstva izvornog ciprofloksacina.

4.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST CIPROFLOKSACINA I NJEGOVIH DERIVATA

Disk difuzijska metoda predstavlja jednostavnu, ekonomičnu i brzu tehniku s lako razumljivim rezultatima. Međutim, nije prikladna za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) tvari, niti za razlikovanje spojeva s mikrobiostatskim od onih s mikrobiocidnim djelovanjem (Balouiri i sur., 2016). U ovom radu navedena metoda je korištena da se uspoređi antimikrobna aktivnost novosintetiziranih derivata ciprofloksacina s izvornim antibiotikom. Svi pokusi provedeni su u tri paralele, a rezultati promjera zona inhibicije prikazani su kao aritmetička sredina dobivenih vrijednosti iz sva tri ponavljanja te se nalaze u tablici 4.

Tablica 4. Zone inhibicije rasta mikroorganizama u prisutnosti antibiotika ciprofloksacina i njegovih derivata pri koncentraciji 1 mg mL⁻¹

Ispitivani spoj	McFarland jedinice	Promjer zone inhibicije (mm)			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Ciprofloksacin (CIP)	0,4	30	30	35	-
	0,5	30	32	33	-
Dimetil-sulfoksid (DMSO)	0,4	9	-	21	-
	0,5	13	-	17	-
XIV-39	0,4	-	-	13	-
	0,5	12	-	13	-
XIV-50	0,4	12	9	24	-
	0,5	18	12	22	-
XIV-51	0,4	19	13	26	-
	0,5	25	12	25	-



Slika 14. Zone inhibicije rasta pri 0,5 McF jedinica: *C. albicans* 86 (gore lijevo), *E. coli* 3014 (gore desno), *P. aeruginosa* 3024 (dolje lijevo), *S. aureus* 3048 (dolje desno) (vlastita fotografija)

Rezultati prikazani u tablici 4 te slika 14 pokazuju da je bakterija *Staphylococcus aureus* osjetljiva na prisutnost svih testiranih derivata ciprofloksacina (XIV-39, XIV-50 i XIV-51), ali u manjoj mjeri u odnosu na izvorni ciprofloksacin. Pri tome se najuspješnijim pokazao derivat XIV-51 koji je uzrokovao najveću zonu inhibicije. Kod bakterije *S. aureus* uočena je osjetljivost i na otapalo DMSO koje je služilo kao kontrola. DMSO se često koristi kao otapalo u mikrobiološkim istraživanjima zato što je pri malim koncentracijama relativno netoksičan za brojne bakterije. Međutim, pri koncentracijama višim od 2 – 5 % može imati toksičan učinak jer povećava propusnost membrane, što može dovesti do inhibicije rasta stanica. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima koje su iznijeli Szczupak i suradnici (2019). Oni su u svome istraživanju pokazali da organometalni konjugati ciprofloksacina imaju dobru antibakterijsku aktivnost prema različitim sojevima bakterije *S. aureus*. Točnije, feročenilni derivati ciprofloksacina su bili aktivni, ali u manjoj mjeri u odnosu na izvorni CIP. Osim toga, Bartzatt i sur. (2010) ispitali su učinak CIP-a i njegova tri derivata koji sadrže estersku skupinu (metilnu, etilnu, propilnu) umjesto izvorne karboksilne na *S. aureus*. Zanimljivo je da se pri tome koeficijent propusnosti kroz kožu (K_p) povećavao s produljenjem esterskog lanca, što ukazuje na činjenicu da bi takva vrsta estera mogla postizati bolje prodiranje u kožu te samim time veću učinkovitost u liječenju bakterijskih kožnih infekcija, uključujući i bakteriju *S. aureus* kao uzročnika.

Derivati XIV-50 i XIV-51 pokazuju slabije antimikrobno djelovanje prema *Pseudomonas aeruginosa* u odnosu na izvorni CIP, dok ga kod XIV-39 uopće nema. Kao što je spomenuto,

XIV-39 umjesto karboksilne skupine sadrži metilnu skupinu, dok derivati XIV-50 i XIV-51 redom imaju etilnu, odnosno izopropilnu skupinu. Iz literature je poznato da su esterske skupine obično lipofilnije u odnosu na karboksilne kiseline te da se produljenjem esterskog lanca dodatno povećava lipofilnost molekula, što može poboljšati sposobnost lijeka da prolazi kroz lipidne membrane, uključujući stanične membrane i kožnu barijeru. Budući da je jedina razlika među ispitivanim derivatima duljina esterskog lanca na ciprofloksacinskom prstenu, moguće je da je upravo kratka metilna skupina razlog izostanka antimikrobne aktivnosti. Jubie i sur. (2010) u svom su radu ugradili 1,2,4-triazol u piperazinski prsten CIP-a putem Mannich reakcije te su tako dobivenim komponentama analizirali antimikrobnu aktivnost. Većina komponenti bila je jednako učinkovita protiv *P. aeruginosa* kao i referentni CIP. Dvije godine kasnije, Jubie i sur. (2012) modificirali su karboksilnu skupinu CIP-a, ali su ju zamijenili s amino merkaptotriazolom, a zatim su sintetiziranim derivatima ispitali antimikrobnu aktivnost. Tako modificiran ciprofloksacin pokazao je dobru antibakterijsku aktivnost protiv gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

Ciprofloksacin je spram svih ispitanih mikroorganizama pokazao najjaču antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *Escherichia coli*, što je i očekivano budući da je pokazano da su fluorokinolni antibiotici učinkovitiji protiv gram-negativnih bakterija (Castro i sur., 2013). Osim toga, uočena je osjetljivost na DMSO, što je moguće zbog viših koncentracija otapala koje može imati toksičan učinak i inhibirati rast stanica. Svi ispitani derivati pokazali su antimikrobno djelovanje prema *E. coli*, ali je ono bilo slabije u odnosu na izvorni ciprofloksacin. Najmanja zona inhibicije izmjerena je za XIV-39, što ukazuje na to da je i osjetljivost na spomenuti derivat najmanja. Derivati XIV-50 i XIV-51 pokazali su jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na XIV-39, budući da im je izmjerena zona inhibicije skoro 2 puta veća u usporedbi s XIV-39. Ovi rezultati su u skladu s onima koje su objavili Assali i sur. (2016) u svom radu u kojem su sintetizirali tri nova derivata na način da su proveli esterifikaciju ciprofloksacina s mono-, di- i trietilen glikolom. Esterifikacijom su postigli transformaciju ciprofloksacina u predlijek – lijek koji se primjenjuje u nedjelotvornom obliku te koji terapijske učinke postiže tek nakon metaboličkih procesa, u ovom slučaju primjenom esteraza. Kako bi potvrdili da se derivati mogu u potpunosti hidrolizirati i da ciprofloksacin pri tome zadržava svoju aktivnost, znanstvenici su ispitali antimikrobno djelovanje novosintetiziranih derivata na *E. coli*, i to u prisutnosti i odsutnosti enzima esteraze. Rezultati su pokazali da derivati imaju slabije antimikrobno djelovanje kada esteraza nije prisutna. S druge strane, dodavanje enzima uzrokuje povećanje aktivnosti i do 40 % zato što se cijepanjem esterske veze između karboksilne skupine u CIP-u i etilen glikola oslobađa karboksilna skupina koja doprinosi formiranju vodikovih veza s bakterijskim enzimima, kao što su DNA giraza i topoizomeraza IV. Ova interakcija omogućava ciprofloksacinu da inhibira replikaciju i popravak bakterijske DNA, što dovodi do baktericidnog

učinka. Uz to, Al-Soud i Al-Masoudi (2003) proveli su istraživanje u kojem su sintetizirali različite derivate CIP-a tako što su njegovu karboksilnu skupinu zamijenili s 1,2,4-triazolilom, 1,3,4-oksadiazolilom, α -amino esterom i s hidrazidnim derivatima aldoza. Navedenim derivatima su zatim ispitali antibakterijsku aktivnost protiv *E. coli* te su došli do zaključka da nijedna od nabrojanih supstitucija nema utjecaja na antibakterijsku aktivnost budući da su derivati pokazali slab ili nikakav učinak protiv bakterije. Već spomenuti Szczupak i sur. (2019) u svom radu su ispitali i aktivnost organometalnih konjugata na *E. coli*. Kao i kod *S. aureus*, derivati su bili aktivni, ali slabije u usporedbi s CIP-om.

Niti ciprofloksacin, niti njegovi derivati nisu pokazali antimikrobnu učinkovitost prema kvascu *Candida albicans*, što je očekivano s obzirom na to da je ciprofloksacin antibiotik koji se primjenjuje u liječenju bakterijskih infekcija. Njegov mehanizam djelovanja uključuje inhibiciju DNA giraze i topoizomeraze IV, enzima koji su ključni za replikaciju i održavanje bakterijske DNA. Budući da kvasci imaju drugačiju strukturu stanica i drugačije enzime, ciprofloksacin ne može učinkovito djelovati na njih. Za infekcije uzrokovane kvascima koriste se antimikotici kao što su flukonazol ili ketokonazol. Oni ciljaju specifične komponente kvašćevih stanica - staničnu membranu ili sintezu ergosterola, koje su ključne za preživljavanje kvasaca. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima koje su Siddiqui i sur. (2007) izložili u svom radu. Oni su ispitali antifungalni učinak derivata CIP-a kojima je vodik s piperazinskog ostatka na poziciji 7 zamijenjen s različitim acilnim skupinama. Učinak su ispitali na više različitih kvasaca, između ostalog i na *C. albicans*. Niti jedna od sintetiziranih komponenti nije pokazala učinak *C. albicans*. Budući da se znanost neprekidno razvija i proširuje granice našeg znanja, posljednjih nekoliko godina sintetizirani su derivati CIP-a koji su postigli zadovoljavajuće rezultate na području antifungalne aktivnosti. Tako su Rabbani i sur. (2011) sintetizirali nove derivate ciprofloksacina dodavanjem acetilne, odnosno benzoilne skupine u njegovu strukturu. Pri tome su svi derivati pokazali antifungalni učinak protiv *C. albicans*, i to u jačoj mjeri u odnosu na izvorni lijek. Godinu nakon su Jubie i sur. (2012) karboksilnu skupinu zamijenili triazolom, što se pokazalo učinkovitim budući da je oko *C. albicans* izmjerena zona inhibicije od $70 \pm 0,00$ mm. Panda i Jain (2013) su u fluorokinolone ugradili heterocikličke amine te su tako dobiveni fluorokinoloni pokazali dobru aktivnost prema *C. albicans*. Njihovi rezultati ukazuju na to da, za razliku od antibakterijske aktivnosti, karboksilna skupina na 3. ugljikovom atomu nije nužna za antifungalnu aktivnost.

Naposljetku, Mohammed i sur. (2023) uspješno su priredili dvije vrste različitih derivata CIP-a tako što su ga hibridizirali s kalkonom, odnosno pirimidinom. Spojevima su zatim ispitali aktivnost protiv istih mikroorganizama koji su korišteni i u ovom radu: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *C. albicans*. Zanimljivo je da su svi hibridi pokazali jače antibakterijsko djelovanje prema gram-pozitivnim nego prema gram-negativnim bakterijama. I jedna i druga vrsta hibrida

koja je u sebi sadržavala atom klora, odnosno atom fluora, izrazila je antifungalnu aktivnost koja se može usporediti s učinkovitošću koju ketokonazol ima prema *C. albicans*. Znanstvenici su proveli analizu te zaključili da prisutnost elektron-akceptorskih skupina na fenilnom prstenu kalkonskog ostatka povećava antibakterijsku aktivnost, dok ju prisutnost elektron-donorskih skupina smanjuje. Što se tiče pirimidinskih hibrida, ustanovljeno je da supstituenti na fenilnom prstenu koji je direktno vezan za pirimidin ne određuju aktivnost.

Tri derivata ciprofloksacina ispitana u ovom radu pokazala su manju aktivnost na bakterije u odnosu na osnovni antibiotik, dok je aktivnost kod kvasca u potpunosti izostala. Pri usporedbi inhibicije rasta test-mikroorganizama, *E. coli* se pokazala najosjetljivijom bakterijom na sve derivate, a slijede ju *S. aureus* pa *P. aeruginosa*. Najveći promjer zone inhibicije rasta kod bakterija zabilježen je za derivat XIV-51 pri 0,4 McFarlanda upravo kod *E. coli*, a iznosio je 26 mm. Općenito su najveći promjeri zone inhibicije rasta zabilježeni kod derivata XIV-51 koji ima najdulji esterski lanac na ciprofloksacinskom prstenu zbog čega ima najveću lipofilnost i samim time najbolju mogućnost prolaska kroz lipidne membrane. Kako bi se ispitala učinkovitost antibiotika ovisno o McFarland jedinicama, trebao bi se koristiti veći raspon McF jedinica, budući da su razlike za 0,4 i 0,5 minimalne. Iako se derivati u ovom radu nisu pokazali učinkovitima protiv *C. albicans*, iz literature je vidljivo da se određenim strukturnim modifikacijama može postići antifungalna aktivnost, a njihova upotreba u kliničkoj praksi trebala bi biti predmet daljnjih istraživanja kako bi se osigurala učinkovitost i sigurnost.

Ispitani derivati ciprofloksacina pokazuju antiproliferativno djelovanje na humane stanične linije te imaju antitumorski potencijal. Najpoželjnijim derivatom pokazao se XIV-51. Budući da pokazuje najjaču antimikrobnu aktivnost te ima citotoksično djelovanje na stanicama raka, ali ne i na normalnim stanicama, mogao bi poslužiti kao vodeći spoj za daljnja istraživanja i razvoj. S obzirom na prikazane rezultate sintetiziranih derivata ciprofloksacina i njihovog djelovanja, ohrabreni smo za nastavak istraživanja s mogućnošću razvoja novog antibiotika bez problema rezistencije te potencijalno razvoja antitumorskog lijeka.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivani derivati ciprofloksacina imaju inhibitorni učinak na rast HeLa i HaCaT stanica, s izraženijim učinkom na HeLa staničnoj liniji. Najjače citotoksično djelovanje pokazuje derivat XIV-39, a najslabije XIV-51, što je izraženije na HaCaT stanicama.
2. Klonogenom analizom pokazano je da ispitani derivati utječu na smanjenu sposobnost HeLa stanica da formiraju kolonije, pri čemu su derivati XIV-39 i XIV-50 učinkovitiji.
3. Bakterijski test-mikroorganizmi pokazali su osjetljivost na ispitane derivate ciprofloksacina, dok učinak na kvasac *C. albicans* nije zamijećen. Kao najosjetljivija bakterija istaknula se *E. coli*, a slijede ju *S. aureus* pa *P. aeruginosa*. Najjaču antimikrobnu aktivnost pokazao je derivat XIV-51.
4. Ispitani derivati ciprofloksacina pokazuju antiproliferativno djelovanje na HeLa i HaCaT stanicama te imaju antitumorski potencijal. Najpoželjnijim derivatom pokazao se XIV-51 budući da ima najjaču antimikrobnu aktivnost te pokazuje citotoksično djelovanje na stanicama raka, ali ne i na normalnim stanicama.

6. LITERATURA

- Abdel-Rahman IM, Mustafa M, Mohamed SA, Yahia R, Abdel-Aziz M, Abuo-Rahma GEDA, i sur. (2021) Novel Mannich bases of ciprofloxacin with improved physicochemical properties, antibacterial, anticancer activities and caspase-3 mediated apoptosis. *Bioorg Chem* **107**. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104629>
- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* **53**, 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Al-Soud YA, Al-Masoudi NA (2003) A new class of dihaloquinolones bearing N'-aldehydoglycosylhydrazides, mercapto-1, 2, 4-triazole, oxadiazoline and α -amino ester precursors: synthesis and antimicrobial activity. *J Brazil Chem Soc* **14**, 790-796. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000500014>
- Aminimanizani A, Beringer P, Jelliffe R (2001) Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Clin pharmacokinet* **40**, 169-187. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140030-00003>
- Anakok OF (2010) Serrulatanes from *Eremophila Neglecta*: Their Spectrum of Antibacterial Activity, Cytotoxicity and Mode of Action (doktorski rad), Sveučilište Južne Australije u Adelaideu, Adelaide.
- Assali M, Joulani M, Awwad R, Assad M, Almasri M, Kittana N, i sur. (2016) Facile synthesis of ciprofloxacin prodrug analogues to improve its water solubility and antibacterial activity. *ChemistrySelect* **1**, 1132-1135. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201600091>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J pharmaceut biomed* **6**, 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bartzatt R, LG Cirillo S, D. Cirillo J (2010) Design of ciprofloxacin derivatives that inhibit growth of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). *Med Chem* **6**, 51-56.
- Beberok A, Wrzesniok D, Minecka A, Rok J, Delijewski M, Rzepka Z, i sur. (2018a) Ciprofloxacin-mediated induction of S-phase cell cycle arrest and apoptosis in COLO829 melanoma cells. *Pharmacol Rep* **70**, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.07.007>
- Beberok A, Wrzeńskiok D, Rzepka Z, Respondek M, Buszman E (2018b). Ciprofloxacin triggers the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells via the p53/Bax/Bcl-2 signaling pathway. *Int J Oncol* **52**, 1727-1737. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4310>

Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, i sur. (2016) Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **4**, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>

Boyd MR, Paull KD (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Develop Res* **34**, 91-109. <https://doi.org/10.1002/ddr.430340203>

Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A (2020) Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules* **25**, 5662. <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>

Carter HE, Wildman B, Schwanz HA, Kerns RJ, Aldred KJ (2023) Role of the Water–Metal Ion Bridge in Quinolone Interactions with Escherichia coli Gyrase. *Int J Mol Sci* **24**, 2879. <https://doi.org/10.3390/ijms24032879>

Castro W, Navarro M, Biot C (2013) Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives. *Future Med Chem* **5**, 81-96. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.181>

Chrzanowska A, Roszkowski P, Bielenica A, Olejarz W, Stępień K, Struga M (2020) Anticancer and antimicrobial effects of novel ciprofloxacin fatty acids conjugates. *Eur J Med Chem* **185**. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111810>

Deyrieux AF, Wilson VG (2007) In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* **54**, 77-83. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>

Djaković S, Glavaš-Obrovac L, Lapić J, Maračić S, Kirchofer J, Knežević M, i sur. (2020) Synthesis and biological evaluations of mono-and bis-ferrocene uracil derivatives. *Appl Organomet Chem* **35**. <https://doi.org/10.1002/aoc.6052>

Drlica K, Malik M (2003) Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* **3**, 249-282. <https://doi.org/10.2174/1568026033452537>

Dube PS, Legoabe LJ, Beteck RM (2023) Quinolone: a versatile therapeutic compound class. *Mol Divers* **27**, 1501-1526. <https://doi.org/10.1007/s11030-022-10581-8>

El-Sabawi D, Abu-Dahab R, Zalloum WA, Ijbara F, Hamdan II (2019) The effect of ferrous ions, calcium ions and citric acid on absorption of ciprofloxacin across caco-2 cells: practical and

structural approach. *Drug Dev Ind Pharm* **45**, 292-303.
<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1539495>

Ezelarab HAA, Abbas SH, Hassan HA, Abuo-Rahma GEDA (2018) Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Arch Pharm* **351**.
<https://doi.org/10.1002/ardp.201800141>

Fathy M, Sun S, Zhao QL, Abdel-Aziz M, Abuo-Rahma GEDA., Awale S, i sur. (2020) A new ciprofloxacin-derivative inhibits proliferation and suppresses the migration ability of HeLa cells. *Anticancer Res* **40**, 5025-5033. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14505>

Fawzy MA, Abu-Baih RH, Abuo-Rahma GEDA, Abdel-Rahman IM, El-Sheikh AA, Nazmy MH (2023) In vitro anticancer activity of novel ciprofloxacin Mannich base in lung adenocarcinoma and high-grade serous ovarian cancer cell lines via attenuating MAPK signaling pathway. *Molecules* **28**. <https://doi.org/10.3390/molecules28031137>

German N, Wei P, Kaatz GW, Kerns RJ (2008) Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. *Eur J Med Chem* **43**, 2453-2463. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.01.042>

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

Hooper DC (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* **2**, 530-538.

Hu GQ, Wu XK, Wang X, Zhang ZQ, Xie SQ, Huang WL, i sur. (2008) Synthesis and antitumor activity of C3 heterocyclic-substituted fluoroquinolone derivatives (I): ciprofloxacin aminothiodiazole Schiff-bases. *Acta Pharm Sin* **43**, 1112-1115.

Idlas P, Lepeltier E, Jaouen G, Passirani C (2021) Ferrocifen loaded lipid nanocapsules: A promising anticancer medication against multidrug resistant tumors. *Cancers* **13**, 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>

Igwegbe CA, Oba SN, Aniagor CO, Adeniyi AG, Ighalo JO (2021) Adsorption of ciprofloxacin from water: a comprehensive review. *J Ind Eng Chem* **93**, 57-77. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.09.023>

Ji C, Miller PA, Miller MJ (2015) Syntheses and antibacterial activity of N-acylated ciprofloxacin derivatives based on the trimethyl lock. *ACS Med Chem Lett* **6**, 707-710.

Jubie S, Sikdar P, Kalirajan R, Gowramma B, Gomaathy S, Sankar S, i sur. (2010) Synthesis and antimicrobial activity of some novel ciprofloxacin analogues. *J Pharma Res* **3**, 511-513.

Jubie S, Kalirajan R, Yadav P (2012) Design, synthesis and docking studies of a novel ciprofloxacin analogue as an antimicrobial agent. *J Chem* **9**, 980-987. <https://doi.org/10.1155/2012/340451>

Kassab NM, Singh AK, Kedor-Hackmam ERM, Santoro MIRM (2005) Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. *Rev Bras Cienc Farm* **41**, 507–513. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322005000400014>

Kerns RJ, Rybak MJ, Kaatz GW, Vaka F, Cha R, Grucz RG, i sur. (2003) Piperazinyl-linked fluoroquinolone dimers possessing potent antibacterial activity against drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1745-1749. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00208-7)

Knight KL (2008) The evolution of tissue culture. *Nat Med* **14**, 710–710. <https://doi.org/10.1038/nm0708-710>

Kochetkov DV, Ilyinskaya GV, Komarov PG, Strom E, Agapova LS, Ivanov AV, i sur. (2007) Transcriptional inhibition of the human papilloma virus reactivates tumor suppressor p53 in cervical carcinoma cells. *Mol Biol* **41**, 459–466. <https://doi.org/10.1134/s0026893307030120>

Kumar K, Pradines B, Madamet M, Amalvict R, Benoit N, Kumar V (2014) 1H-1, 2, 3-triazole tethered isatin-ferrocene conjugates: Synthesis and in vitro antimalarial evaluation. *Eur J of Med Chem* **87**, 801-804. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.024>

Lima AR, Araújo AM, Pinto J, Jerónimo C, Henrique R, de Lourdes Bastos M, i sur. (2018) Discrimination between the human prostate normal and cancer cell exometabolome by GC-MS. *Sci Rep* **8**, 5539. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23847-9>

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

Ljubas, J. (2024) Priprava i spektralna analiza biokonjugata ferocena i derivata ciprofloksacina povezanih 1,2,3-triazolom (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Machuca J, Ortiz M, Recacha E, Díaz-De-Alba P, Docobo-Perez F, Rodríguez-Martínez JM, i sur. (2016) Impact of AAC (6')-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemoth* **71**, 3066-3071. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw258>

Mbaba M, Mabhula AN, Boel N, Edkins AL, Isaacs M, Hoppe HC, i sur. (2017) Ferrocenyl and organic novobiocin derivatives: Synthesis and their in vitro biological activity. *J Inorg Biochem* **172**, 88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.014>

Mohammed HH, Abd El-Hafeez AA, Abbas SH, Abdelhafez ESM, Abuo-Rahma GEDA (2016) New antiproliferative 7-(4-(N-substituted carbamoylmethyl) piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin induce cell cycle arrest at G2/M phase. *Bioorgan Med Chem* **24**, 4636-4646. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.070>

Mohammed HH, Ali DME, Badr M, Habib AG, Mahmoud AM, Farhan, SM, i sur. (2023). Synthesis and molecular docking of new N 4-piperazinyl ciprofloxacin hybrids as antimicrobial DNA gyrase inhibitors. *Mol Divers* **27**, 1751-1765. <https://doi.org/10.1007/s11030-022-10528-z>

Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V (2010) Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin Drug Dis* **5**, 633-654. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.492827>

Navarro M, Castro W, Biot C (2012) Bioorganometallic compounds with antimalarial targets: inhibiting hemozoin formation. *Organometallics* **31**, 5715-5727. <https://doi.org/10.1021/om300296n>

Pallo-Zimmerman LM, Byron JK, Graves TK (2010) Fluoroquinolones: then and now. *Compend Contin Educ Vet* **32**.

Panda SS, Jain SC (2013) New trifluoromethyl quinolone derivatives: Synthesis and investigation of antimicrobial properties. *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 3225-3229. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.120>

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006) Prevalence in the United States of aac (6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Ch* **50**, 3953-3955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>

Rabbani MG, Islam MR, Ahmad M, Hossion AML (2011) Synthesis of some NH-derivatives of ciprofloxacin as antibacterial and antifungal agents. *Bangladesh J Pharmac* **6**, 8-13. <https://doi.org/10.3329/bjp.v6i1.7720>

Romanovska A, Keil J, Tophoven J, Oruc MF, Schmidt M, Breisch M, i sur. (2021) Conjugates of ciprofloxacin and amphiphilic block copoly (2-alkyl-2-oxazolines) s overcome efflux pumps and are active against CIP-resistant bacteria. *Mol Pharm* **18**, 3532-3543. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00430>

Shariati A, Arshadi M, Khosrojerdi MA, Abedinzadeh M, Ganjalishahi M, Maleki A., i sur. (2022) The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Front Public Health* **10**. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633>

Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Yar MS (2010) Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *J Enzym Inhib Med Ch* **25**, 577-589. <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>

Siddiqui R, Sultana N, Khan KM, Akbar N, Ali M, Arayne (2007) Effects of skeletal modifications of ciprofloxacin on antibacterial, antifungal and cytotoxic activities. *J Chinese Clin Med* **21**, 188-195.

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

Struga M, Roszkowski P, Bielenica A, Otto-Ślusarczyk D, Stępień K, Stefańska J, i sur. (2023) N-Acylated ciprofloxacin derivatives: Synthesis and in vitro biological evaluation as antibacterial and anticancer agents. *ACS omega* **8**, 18663-18684. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00554>

Szczupak Ł, Kowalczyk A, Trzybiński D, Woźniak K, Mendoza G, Arruebo M, i sur. (2019) Organometallic ciprofloxacin conjugates with dual action: synthesis, characterization, and antimicrobial and cytotoxicity studies. *Dalton T* **49**, 1403-1415. <https://doi.org/10.1039/C9DT03948A>

Szostek T, Szulczyk D, Szymańska-Majchrzak J, Koliński M, Kmiecik S, Otto-Ślusarczyk D, i sur. (2022) Design and synthesis of menthol and thymol derived ciprofloxacin: Influence of structural modifications on the antibacterial activity and anticancer properties. *Int J Mol Sci* **23**. <https://doi.org/10.3390/ijms23126600>

Vila J, Sánchez-Céspedes J, Sierra JM, Piqueras M, Nicolas E, Freixas J, i sur. (2006) Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Ag* **28**, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.02.013>

Yuan L, Zhai YJ, Wu H, Sun HR, He ZP, Wang YB, i sur. (2018) Identification and prevalence of RND family multidrug efflux pump *oqx* AB genes in Enterococci isolates from swine manure in China. *J Med Microbiol* **67**, 733-739. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000736>

Zhang GF, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu ML (2018). Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem* **146**, 599-612.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.07>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Nikolina Teskera izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Nikolina Teskera

Vlastoručni potpis