

# Antiproliferativni i antioksidativni učinci strukturnih analoga morskog prirodnog spoja granulatamida B

---

Lovrović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:650131>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Iva Lovrović

Antiproliferativni i antioksidativni učinci strukturnih analoga morskog  
prirodnog spoja granulatamida B

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Iva Lovrović

Antiproliferativni i antioksidativni učinci strukturnih analoga morskog  
prirodnog spoja granulatamida B

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Dean Marković

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Biotechnology in medicine

Iva Lovrović

Antiproliferative and antioxidant effects of structural analogues of a marine  
natural compound granulamide B

Master's thesis

Rijeka, 2021.

Diplomski rad obranjen je dana 22. rujna 2021. pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić
2. izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić
3. prof. dr. sc. Dean Marković
4. izv. prof. dr. sc. Gabriela Ambrožić

Rad ima 63 stranice, 9 slika, 6 tablica i 45 literaturnih navoda

Diplomski rad je dijelom izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja Odjela za biotehnologiju te se zahvaljujem pristupu znanstvenoj opremi koja je korištena za njegovu izradu nabavljenoj projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci (RISK)“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn. Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Bioprospecting Jadranskog mora“ te uz financijsku pomoć istraživačkih potpora Sveučilišta u Rijeci, UNIRI-biomed-18-133 (1277) i UNIRI-prirod-18-102. te HRZZ projekta „In-silico potpomognut dizajn supstrata za hvatanje CO<sub>2</sub> u katalitičkoj formaciji karbonata i karbamata“ (IP-2019-04-8846).

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Deanu Markoviću te komentorici izv. prof. dr. sc. Gabrieli Ambrožić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem doktorandu Dariju Matulji na uloženom vremenu, angažiranosti i strpljenju u izradi ovog diplomskog rada te doktorandici Petri Grbčić na provođenju MTT eseja.*

*Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na brizi i podršci za svo vrijeme mog školovanja.*

## Sažetak

Jedna od strategija prilagodbi ekstremnom okolišu koju su razvili morski organizmi je sinteza sekundarnih metabolita. Ti spojevi nisu neophodni za rast, razvoj i razmnožavanje organizma već imaju adaptivnu, obrambenu, signalnu ili neku drugu ulogu. Sjedilački organizmi poput spužvi i koralja izvor su brojnih biološki aktivnih spojeva zbog čega je *bioprospecting* mora važan za farmaceutsku, kozmetičku i druge industrije. Spojevi izolirani iz koralja *Eunicella sp.* mogu se klasificirati u tri skupine: terpenoidi, steroli te alkaloidi i nukleozidi. Jedan od tih spojeva je indolni alkaloid granulatamid B koji je pokazao potencijalan inhibicijski učinak prema različitim ljudskim tumorskim stanicama. S obzirom da je važnost strukture indolnog prstena već prepoznata od strane farmaceutske industrije, sintetizirano je pet strukturnih analoga granulatamida B kojima su ispitani antioksidativni i antiproliferativni učinci koristeći redom ABTS i DPPH te MTT eseje. Spojevi su sintetizirani konjugacijom triptamina i nezasićenih masnih kiselina s ciljem nastanka amidne veze. Korištene masne kiseline su arahidonska, retinoična, palmitoleinska, oleinska i alfa-linolenska kiselina. Sinteza spojeva je potvrđena infracrvenom (IR) spektroskopijom, ultraljubičastom/vidljivom (UV-Vis) spektrofotometrijom, spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrijom masa (MS). ABTS esej je ukazao na smanjenje antioksidativne aktivnosti kao posljedica vezanja masno-kiselinskog lanca osim u slučaju *N*-retinoilriptamina. Potonje se može objasniti uz pretpostavku doprinosa sustava konjugiranih dvostrukih veza retinoične kiseline u inhibiciji spomenutog radikala. Nasuprot toga, DPPH esejom nisu uspješno utvrđena antioksidativna svojstva sintetiziranih spojeva. Dodatno, MTT esejom je uočeno kako svi sintetizirani spojevi pokazuju inhibitorni učinak prema staničnim linijama, među kojima je najaktivniji bio *N*-retinoilriptamin. S druge strane, derivat alfa-linolenske kiseline je imao najslabiji učinak na normalnu staničnu liniju zbog čega bi oba navedena spoja trebalo dodatno strukturno modificirati.

Ključne riječi: *bioprospecting* mora, *Eunicella* koralj, granulatamid B, antioksidativna aktivnost, antiproliferativna aktivnost

## Summary

One of the adaptation strategies to the extreme environment developed by the marine organism is the synthesis of secondary metabolites. These compounds are not necessary for the growth, development and reproduction of the organisms but have an adaptive, defensive, signaling or some other roles. Sessile marine organisms, such as sponges and corals, present a source of numerous biologically active compounds, making sea bioprospecting important for the pharmaceutical, cosmetic and other industries. Compounds isolated from the corals of *Eunicella sp.* can be classified into three groups: terpenoids, sterols as well as alkaloids and nucleosides. One of these compounds is the indole alkaloid granulamide B which has exerted a potential inhibitory activity towards various human cancer cell lines. Since the importance of the indole ring structure has already been recognized by the pharmaceutical industry, five structural analogs of granulamide B have been synthesized, followed by evaluation of antioxidant and antiproliferative activities by DPPH/ABTS and MTT assays, respectively. The fatty acids which were used are: arachidonic, retinoic, palmitoleic, oleic and alpha-linolenic acids. The synthesis of the compounds was confirmed by infrared (IR) spectroscopy, ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry and mass (MS) spectrometry. The antioxidant activity of synthesized compounds decreased as shown by ABTS assay as a consequence of fatty acids binding, except for *N*-retinoyltryptamine. The latter can be explained by the presence of conjugated double bonds in retinoic acid. Contrary, none of the examined analogues has been active in inhibition of DPPH radical. Furthermore, the results of MTT assay revealed that all analogues displayed antiproliferative activity against cancer cell lines, with *N*-retinoyltryptamine being the most active. However, derivative of alpha-linolenic acid was the least active against normal, non-transformed cell lines, therefore, both mentioned compounds should be considered for the further structural modification.

Key words: sea bioprospecting, *Eunicella* coral, granulamide B, antioxidant activity, antiproliferative activity



## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1	<i>Bioprospecting</i> mora .....	1
1.2	Morski bioaktivni spojevi .....	3
1.2.1	Antioksidativna aktivnost morskih bioaktivnih spojeva .....	3
1.2.2	Protutumorska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva .....	7
1.3	<i>Bioprospecting</i> koralja roda <i>Eunicella</i> .....	9
1.4	Strukturne značajke granulatamida B .....	12
1.5	Bioeseji za ispitivanje antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti	15
1.5.1	ABTS i DPPH eseji .....	15
1.5.2	MTT esej .....	17
2.	CILJ RADA .....	18
3.	MATERIJALI I METODE.....	19
3.1	Kemikalije i reagensi.....	19
3.2	Metode karakterizacije spojeva .....	21
3.3	Sinteze spojeva.....	22
3.3.1	Sinteza granulatamida B .....	22
3.3.2	Sinteza spojeva.....	22
3.4	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	25
3.4.1	ABTS esej .....	25
3.4.2	DPPH esej .....	26
3.5	Ispitivanje antiproliferativnog učinka MTT esejom.....	27
4.	REZULTATI.....	28

4.1	Evaluacija antioksidativne aktivnosti .....	28
4.2	MTT esej .....	30
5.	RASPRAVA .....	33
6.	ZAKLJUČAK .....	38
7.	LITERATURA: .....	39
8.	DODATAK .....	44
9.	ŽIVOTOPIS .....	64

# 1. UVOD

## 1.1 *Bioprospecting* mora

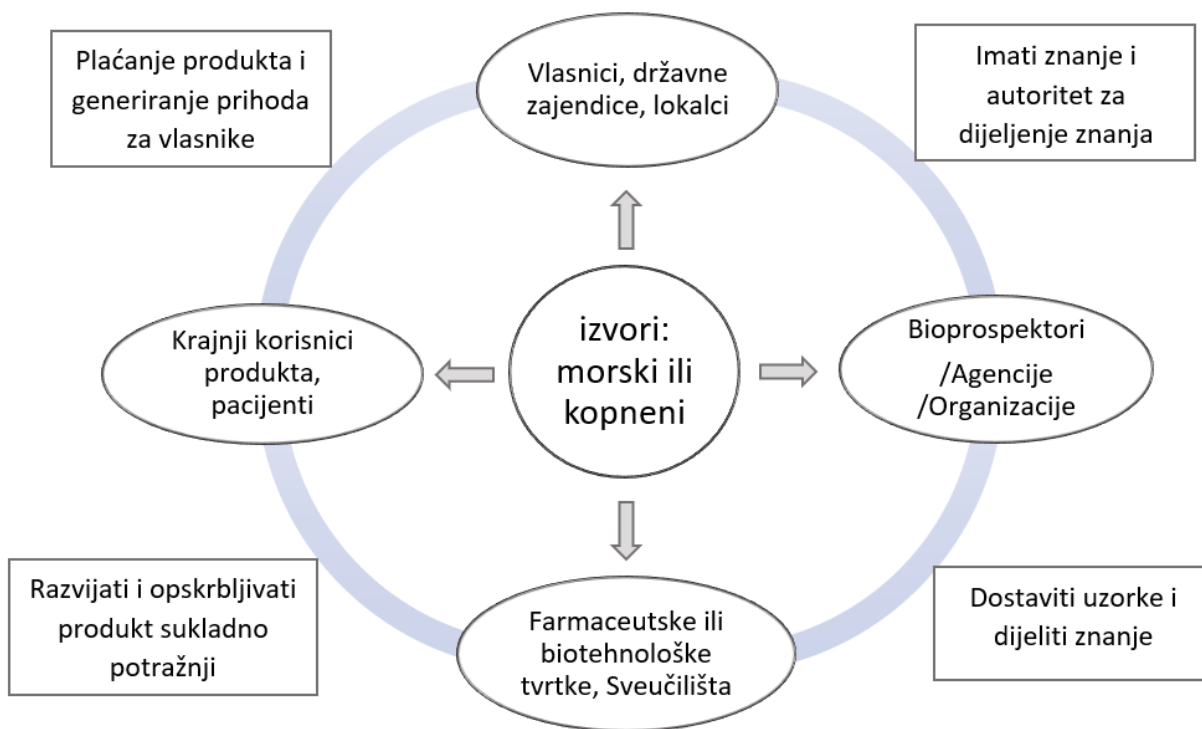
Za razliku od kopnenih, morski organizmi morali su se prilagoditi ekstremnom morskom okolišu i njegovim uvjetima kao što su visok tlak, visoka koncentracija soli, niska koncentracija nutrijenata, niska temperatura (izuzev blizine podzemnih vulkana) te smanjena izloženost sunčevoj svjetlosti. Posljedično, morski su organizmi razvili jedinstvene kemijske i biološke karakteristike po kojima se razlikuju od kopnenih organizama. To se može uočiti kod stvaranja sekundarnih metabolita koji su karakteristični po višem stupnju oksigenacije (prisutnost hidroksilnih ili acetilnih skupina, eterskih mostova i slično) te vezanim halogenim atomima (fluor, brom, klor ili jod). Prilagodba morskom okolišu zahtjeva prikladan metabolizam, ponašanje, prijenos informacija i druge strategije prilagodbe. (1) Grana znanosti u kojoj se morski organizmi ili njihovi metabolički produkti koriste u specifične svrhe naziva se biotehnologija mora (plava biotehnologija). Poznavanje fizioloških i biokemijskih svojstava morskih organizama moglo bi doprinesti identifikaciji prirodnih produkata sa značajnom ulogom u biomedicini. (2) Posljednjih godina je iz morskih mikroorganizama, algi i beskralježnjaka izolirano više od 20 000 metabolita od kojih mnogi sadrže farmakološka svojstva. (1,2) Dok su se neki produkti izolirani iz morskih organizama već pokazali uspješnima u kasnim fazama kliničkih ispitivanja mnogi tek trebaju biti otkriveni i istraženi za potencijalne primjene. (3)

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), *bioprospecting* je sistemsko pretraživanje i razvoj novih izvora kemijskih spojeva, gena, mikroorganizama, makroorganizama i drugih korisnih produkata iz prirode. Morski biomi su bogati jedinstvenim oblicima života zbog čega su atraktivna meta *bioprospecting*-a za identifikaciju i razvoj potencijalnih lijekova. Sustav

moderne medicine nastoji iskoristiti morsku floru i faunu na nekoliko mogućih načina. Osim što ti organizmi posjeduju jedinstvenu skupinu gena sa potencijalno terapeutskim svojstvima, mogu se koristiti i kao modelni organizmi u svrhu razumijevanja temeljnih fenomena života. Primjer modelnog organizma je riba zebrica (eng. *zebrafish*) čiji su se embriji koristili za objašnjenje procesa razvoja kralježnjaka. Postoje četiri glavne faze provođenja aktivnosti *bioprospecting*-a :

1. prikupljanje uzoraka (kopneni, morski ili oboje)
2. identifikacija, izolacija, karakterizacija i proizvodnja specifičnog spoja
3. istraživanje potom potvrđivanje biološke aktivnosti
4. razvoj proizvoda i testiranje, komercijalizacija

Ukupni proces *bioprospecting*-a sastoji se od raznih komponenti uključujući vlasnike morskih genetskih izvora, bioprospektore, istraživačke i razvojne skupine i krajnjeg korisnika (slika 1).



**Slika 1.** Međusobna povezanost sudionika u aktivnostima *bioprospecting*-a. Preuzeto i prilagođeno prema (4).

Osim provođenja ekspedicija u svrhu identificiranja novih izvora za farmaceutske potrebe, istraživanja se često baziraju i na tradicionalnom znanju lokalnih stanovnika koje se prenosilo generacijama. Dobiveni spojevi od interesa zaštićeni su raznim zakonima o intelektualnom vlasništvu, najčešće patentom. (4)

## **1.2 Morski bioaktivni spojevi**

Različito izoliranih kemijskih struktura sa obećavajućom biološkom aktivnošću veliki je faktor koji utječe na nastavak potrage za novim morskim produktima sa potencijalnom primjenom u području biomedicine. Ti spojevi su podijeljeni u sedam skupina s obzirom na njihovu kemijsku strukturu: terpenoidi, steroidi, alkaloidi, eteri, fenoli, strigolaktini i peptidi. Morski prirodni produkti sintetiziraju se u organizmu kao sekundarni metaboliti. Oni nisu neophodni za rast, razvoj i razmnožavanje organizma već se smatraju diferencijacijskim spojevima sa adaptivnom, obrambenom, signalnom ili nekom drugom ulogom. Razni otkriveni spojevi već su ispitivani kao izvori za antitumorska, antimikrobna, antivirusna te protuupalna djelovanja kao i za terapiju raznih bolesti. (5,6)

### **1.2.1 Antioksidativna aktivnost morskih bioaktivnih spojeva**

Reaktivne vrste kisika (ROS) je skupni naziv za superoksidne radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikale ( $\bullet OH$ ) i singlet (atomarni) kisik ( $^1O_2$ ). Oni nastaju kao nusprodukti metabolizma u biološkim sustavima. Procesi poput fosforilacije proteina, aktivacije nekoliko transkripcijskih faktora, apoptoze, imunološkog odgovora i diferencijacije zavise o ravnotežnoj koncentraciji ROS radikala u stanici koja mora biti održavana na niskoj razini.

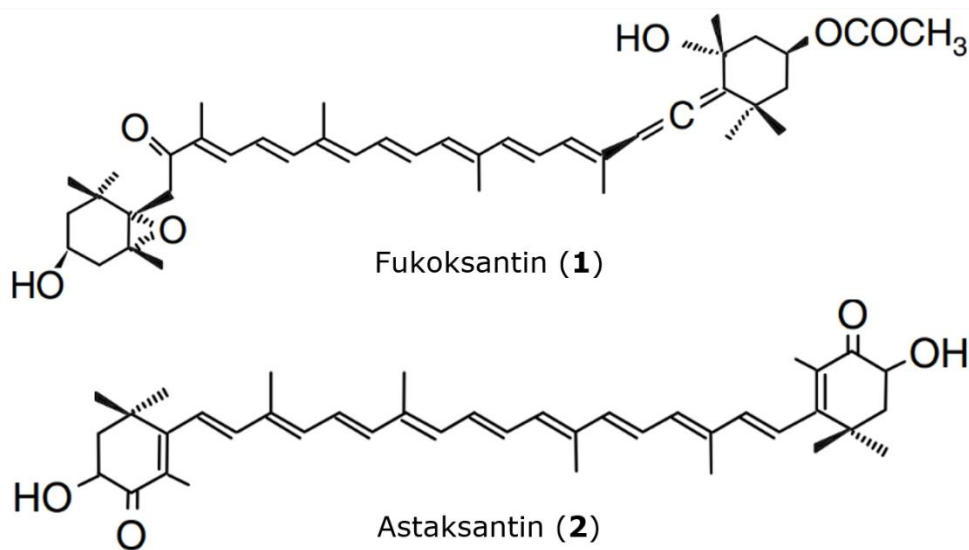
Usred povećane proizvodnje ROS radikala, počinju se pokazivati štetni učinci na važne stanične strukture kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Proizvodnja reaktivnih vrsta kisika se uglavnom odvija u mitohondrijima, gdje  $O_2^{\bullet-}$  može nastati procesom staničnog disanja, lipoksigenazama (LOX) i ciklooksigenazama (COX), tijekom metabolizma arahidonske kiseline te od strane endotelnih i upalnih stanica. Obrambeni sustav stanica od oksidativnog oštećenja se većinom bazira na enzimatskim komponentama kao što su superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAD) i glutation peroksidaza (GPx). Slobodni radikali nastaju iz endogenih i egzogenih izvora. Aktivacija imunoloških stanica, upala, ishemija, infekcija, rak, prekomjerno vježbanje, mentalni stres i starenje su procesi odgovorni za proizvodnju endogenih radikala. Egzogeni radikali nastaju kao posljedica izlaganja onečišćenom okolišu, teškim metalima (Cd, Hg, Pb, Fe, i As), određenim lijekovima (ciklosporin, gentamicin i bleomicin), kemijskim otapalima, dimu cigareta, alkoholu i radijaciji. Ulaskom egzogenih spojeva u tijelo stvaraju se slobodni radikali kao nusprodukti metabolizma. Pri niskoj ili umjerenj razini ROS radikali imaju pozitivno djelovanje na organizam: sudjeluju u sintezi nekih staničnih struktura, imunološki sustav domaćina ih koristi za borbu protiv patogena te sudjeluju u indukciji mitogenog odgovora. U suvišku, slobodi radikali i oksidansi dovode do oksidativnog stresa, štetnog procesa koji negativno utječe na nekoliko staničnih struktura: membrane, lipide, proteine, lipoproteine i deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Do oksidativnog stresa dolazi uslijed neravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanice za njihovo uklanjanje. Ukoliko nije strogo kontroliran, oksidativni stres može biti odgovoran za razvoj nekoliko bolesti, kroničnih i degenerativnih, kao i za ubrzavanje starenja. Poznato je da djelovanjem oksidativnog stresa nastaju oksidativna oštećenja DNK. Posljedično, dolazi do kromosomskih abnormalnosti i aktivacije onkogena čime se doprinosi razvoju raka. Osim raka, oksidativni stres ima ulogu u mnogim drugim bolestima, kao na primjer:

ateroskleroza, respiratorne bolesti (COPB, astma), neurološke bolesti (Parkinsonova i Alzheimerova bolest, multipla skleroza, amiotrofična lateralna skleroza), reumatoidni artritis, bolesti bubrega te spolnom sazrijevanju. (7)

Koncept bioloških antioksidansa se odnosi na sve spojeve koji pri niskim koncentracijama u usporedbi sa oksidirajućim supstratom imaju mogućnost odgoditi ili spriječiti oksidaciju supstrata. Antioksidansi utječu na smanjenje oksidativnog stresa, DNK mutacije, maligne transformacije i druge parametre staničnog oštećenja. Njihovo djelovanje se sastoji od prekidanja lančane reakcije radikala donacijom vodika, inhibicijom singlet kisika, razgradnjom peroksida, inhibicijom oksidativnih enzima ili apsorpcijom UV zračenja. Redoks homeostaza stanice se održava zahvaljujući kompleksnom endogenom antioksidativnom obrambenom sustavu, koji uključuje antioksidativne enzime (SOD, CAD, GPx), ne-enzimatske strukture kao što su glutation, proteini (ferritin, transferin, ceruloplasmin, albumin) te molekule male mase (koenzim Q, lipoična i mokraćna kiselina). Egzogeni antioksidansi, primjerice vitamini C i E prisutni u voću i povrću te  $\beta$ -karoten, doprinose endogenom antioksidativnom obrambenom sustavu. (8)

Prirodni antioksidanti mogu se naći u raznim morskim organizmima, uključujući morske alge, beskralježnjake, ribe, školjke i morske bakterije. Istraživanje metabolita morskih beskralježnjaka otkrilo je da se metaboliti koji u strukturi sadrže benzenoidne i terpenoidne dijelove nalaze među najaktivnijim antioksidativnim tvarima u morskim beskralježnjacima. Primjer takvih struktura su ilimakvinon, (+)-kurkufenol i (+)-kurkudiol izolirani iz morskih spužvi. Morske bakterije također proizvode tvari sa antioksidativnim djelovanjem poput astaksantina i 4-ketozeaksantina iz *Agrobacterium auranticum*, scitonemina iz *Scytonema spp.* te 3,4-dimetoksifenola iz *Ruditapes phillipinarum* bakterijskih izolata. (9)

Antioksidativno djelovanje morskih algi može proizlaziti iz pigmenata kao što su klorofili i karotenoidi, vitamina i vitaminskih prekursora uključujući niacin, tiamin,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten i askorbinsku kiselinu, zatim fenola, fosfolipida, fosfatidilkolina, terpenoida, peptida i drugih antioksidativnih spojeva. (9) Karotenoidi su tijekom posljednjeg desetljeća stekli posebno zanimanje zbog njihovih antioksidativnih, antiproliferativnih i protuupalnih efekata. To su prirodni pigmenti opskrbljeni sustavom visoko konjugiranih  $\pi$ -veza koji pružaju prirodne žute, narančaste ili crvene boje raznim organizmima. (10) Primjeri karotenoida izoliranih iz algi su fukoksantin i astaksantin (slika 2).



**Slika 2.** Strukture morskih karotenoida fukoksantina (1) i astaksantina (2). Preuzeto i prilagođeno prema (11).

Fukoksantin je jedan od najzastupljenijih karotenoida na čiju antioksidativnu aktivnost utječu alenska veza i 5,6-monoepoksid u strukturi molekule. Astaksantin je topiv i u vodi i u mastima te je 80 puta jači antioksidans od vitamina E i 10 puta jači od  $\beta$ -karotena. Također se pokazao učinkovitijim od  $\beta$ -karotena u sprječavanju peroksidacije masnih kiselina u kemijskim otopinama i odgađanju peroksidacije lipida u modelima membrana. (9, 11)



### **1.2.2 Protutumorska aktivnost morskih bioaktivnih spojeva**

Tumor je termin koji opisuje grupu bolesti kod kojih dolazi do nekontroliranog dijeljenja nekih stanica u organizmu koje imaju mogućnost prodiranja ili migriranja u druge dijelove tijela. (12) Tijekom života, stanice su podvrgnute raznim napadima na genom. Opasnosti od potencijalnih oštećenja dolaze iz egzogenih izvora (hipoksija, prehrambeni kancerogeni) i endogenih (proizvodnja slobodnih radikala, pogreške u replikaciji DNK). U zdravim stanicama postoji funkcionalan odgovor na nastala oštećenja u DNK koji se sastoji od mnogo signalnih puteva i puteva popravaka značajnih za dugotrajno funkcioniranje stanica i zdravlje organa. Gubitak mogućnosti stanice da popravi pogreške u genomu može rezultirati nakupljanjem mutacija koje promoviraju onkogene transformacije. (13)

Iako su postignuti značajni napredci, još uvijek ne postoji u potpunosti efikasna terapija za borbu protiv tumora. Heterogenost tumora i mogućnost razvoja rezistencije na protutumorske lijekove su jedni od najvećih problema koje treba savladati pri dizajnu lijekova. Stoga je u nastojanju izlječenja ključan razvoj lijekova za specifične mete povezane s tumorom kao i razumijevanje povezanosti lijeka i biologije tumora. (14) Do danas je odobreno nekoliko lijekova morskog porijekla (Tablica 1) te se još nekolicina njih nalazi u raznim fazama kliničkih istraživanja (15).

**Tablica 1.** Lista nekoliko odobrenih protutumorskih lijekova. Preuzeto i prilagođeno prema (15).

Naziv	Opis
Citarabin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spoj: nukleozidi spongotimidin i spongouridin izolirani iz spužve <i>Tethya crypta</i></li> <li>• Za liječenje leukemije</li> <li>• Odobren 1969. godine (FDA)</li> <li>• Nuspojave: gastrointestinalna toksičnost, proljev, oralni mukozitis</li> <li>• Mehanizam djelovanja: inhibicija sinteze DNK</li> </ul>
Trabektedin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spoj: alkaloid koji pripada grupi tetrahidroizokinolini, izoliran iz <i>Ecteinascidia turbinata</i></li> <li>• Za liječenje raka jajnika i sarkoma mekog tkiva</li> <li>• Odobren 2007. godine (EU), 2015. godine (FDA)</li> <li>• Hematološke nuspojave i hepatotoksičnost</li> <li>• Mehanizam djelovanja: inhibicija transkripcije, utjecaj na mikrookoliš tumora</li> </ul>
Eribulin mezilat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spoj: sintetski analog halikondrina B izoliranog iz spužvi <i>Halichondria okadai</i> i <i>Lyssodendoryx sp.</i></li> <li>• Za liječenje metastatskog raka dojke</li> <li>• Odobren 2010. godine (FDA) 2011. godine (EU)</li> <li>• Nuspojave: neutropenija, periferna neuropatija, kašalj i umor</li> <li>• Mehanizam djelovanja: utječe na dinamiku mikrotubula, onemogućava prijelaz iz G2 u M fazu staničnog ciklusa i uzrokuje apoptozu</li> </ul>

<p>Brentuksimab vedotin</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spoj: konjugat monometil auristatina E (sintetski analog dolastatina izoliranog iz <i>Dolabella auricularia</i>) i monoklalnog protutijela</li> <li>• Za liječenje Hodgkin-ovog limfoma i sistemskog anaplastičnog velikostaničnog limfoma</li> <li>• Odobren 2011.godine (FDA)</li> <li>• Nuspojave: umor, niska razina trombocita, proljev i hepatotoksičnost</li> <li>• Mehanizam djelovanja: sprječava polimerizaciju mikrotubula, onemogućava prijelaz iz G2 u M fazu staničnog ciklusa i uzrokuje apoptozu</li> </ul>
---------------------------------	--

### 1.3 *Bioprospecting* koralja roda *Eunicella*

Koralji su organizmi sa sjedilačkim načinom života koji mogu preživjeti teške uvjete u morskom okolišu. Glavni razlog zbog kojih proizvode razne sekundarne metabolite je obrana od predatnih vrsta. *Eunicella sp.* koralji pripadaju redu Alcyonacea, obitelji Gorgoniidae. Gorgonije su poznate i pod imenom meki koralji, karakteriziraju ih razgranate strukture širine i do 2 metra. Koralji *Eunicella sp.* su geografski široko rasprostranjeni, mogu biti pronađeni na mekom i tvrdom podmorju mediteranskog, tropskog i subtropskog područja. Imaju važne strukturalne i funkcionalne uloge u morskom okolišu pomoću kojih doprinose i drugim morskim organizmima. Velika raznolikost simbiotskih mikroorganizama ima utjecaj na zdravlje i otpornost koralja. Primjer endosimbiotskog odnosa je onaj između roda *Endozoicomonas* (Proteobakterija) i *Eunicellae cavolinii* (žuta rožnjača, Koch, 1887). U takvom se okruženju koralju olakšava proces adaptacije i

aklimatizacije, dok on bakteriji pruža površinu za rast, zaštitu, CO<sub>2</sub>, te metabolite i nutrijente. *Eunicella cavolini* i *Eunicella singularis* (uspravna rožnjača, Esper, 1791) su najčešći koralji iz obitelji gorgonija u Jadranskom moru. (16, 17)

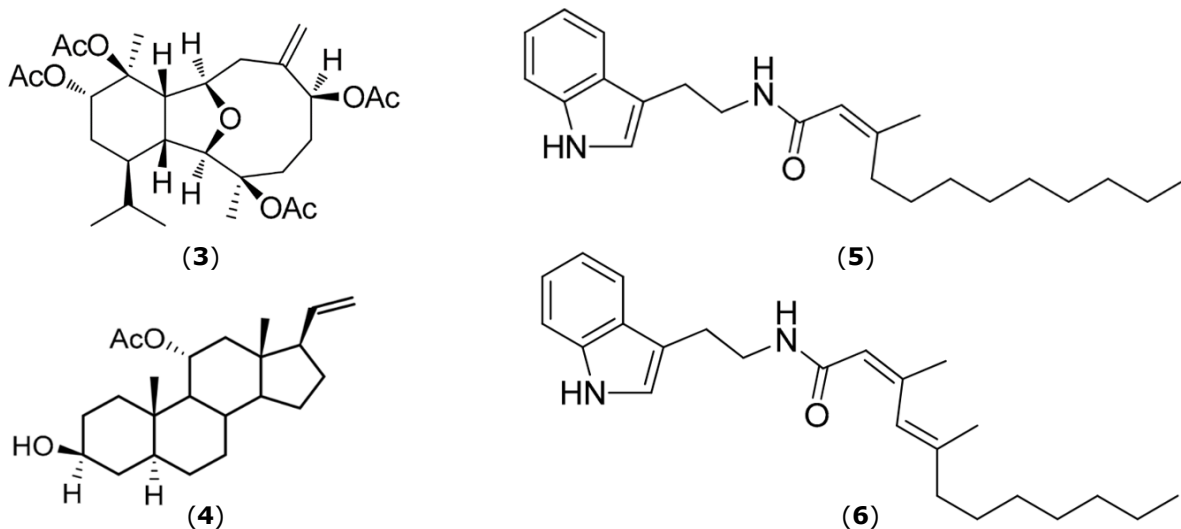
*E. cavolini* (slika 3) je oktokoralj, rasprostranjen od obale Tunisa do Egejskog mora, kojeg se može prepoznati po kolonijama narančaste boje. Stanište im se prostire i do 150 metara dubine gdje formiraju veće, razgranatije kolonije zahvaljujući stabilnosti okoliša. (17, 18)



**Slika 3.** Oktokoralj *Eunicella cavolini* (žuta rožnjača). Preuzeto sa: [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/361538?lg=en](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/361538?lg=en)

Gorgonije su se pokazale bogatim izvorom novih, bioaktivnih sekundarnih metabolita i time su privukle pažnju znanstvenika iz područja kemije, farmakologije i ekologije. Ti metaboliti imaju razna bioaktivna djelovanja kao što su antitumorska, antituberkulozna, protuupalna, antiplazmodijska, antivirusna i antioksidativna. (19)

Spojevi izolirani iz *Eunicella sp.* mogu se klasificirati u tri skupine: (1) terpenoidi, (2) steroli te (3) alkalodi i nukleozidi. Od svih spojeva izoliranih iz gorgonija, najveću *in vitro* aktivnost protiv tumorskih staničnih linija pokazali su spojevi koji pripadaju skupini terpenoida. *Eucinella sp.* proizvode tip diterpenoida slične eunicelinu (slika 4 (3)), spoju sa četiri acetilne skupine vezane na kladielanski kostur. Do danas je izolirano više od 40 takvih spojeva iz raznih vrsta gorgonija. Spojevi iz skupine steroida, od kojih prevladavaju steroli (slika 4 (4)), međusobno se razlikuju po stupnju oksigenacije, kao i uzorcima bočnih lanaca što bi mogao biti razlog njihove raznolike *in vitro* i *in vivo* aktivnosti. Oko 2% svih metabolita izoliranih iz gorgonija sadrže atom dušika uključujući alkaloidne, nukleozide, amide te derivate triptamina. Kao i u slučaju sa steroidima i terpenoidima, spojevi koji u svojoj strukturi sadrže dušik doprinose obrani organizma od negativnih vanjskih utjecaja. Između ostalih, u skupini alkaloida nalaze se i spojevi granulamid A (slika 4 (5)) i granulamid B (slika 4 (6)). Oni u svojoj strukturi sadrže triptaminski dio na koji je vezan lanac masne kiseline. Razlika između navedenih spojeva je u broju dvostrukih veza na alifatskom lancu. Oba spoja su pokazala umjereni učinak na tumorskim staničnim linijama *in vitro*. (17)



**Slika 4.** Primjeri struktura spojeva izoliranih iz *Eunicella sp.* Terpenoid eunicelin (3), steroid 11a-acetoksi-5a-pregn-20-en-3b-ol (4), alkalodi: granulamid A (5) i granulamid B (6). Preuzeto i prilagođeno prema (17).

## 1.4 Strukturne značajke granulatamida B

Alkaloidi predstavljaju veliku i strukturalno veoma raznoliku grupu sekundarnih metabolita. Definira ih se kao cikličke organske spojeve koji sadrže dušik u negativnom oksidativnom stanju i ograničene su distribucije među živim bićima. Granulatamid B spada u skupinu indolnih alkaloida, spojeva koji sadrže dušikov atom unutar indolnog prstena. Indolna jezgra je jedna od najvažnijih prstenastih sustava za farmaceutski razvoj. Često je povezana sa djelovanjem na G-protein vezane receptore, posebno sa modulacijom transmisije neuronskog signala pomoću receptora za serotonin. Također je zabilježen veliki broj različitih učinaka na druge molekularne mete, primjerice ljudsku protein-tirozin fosfatazu, CXCR4 kemokini receptor, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu, β-sekretazu i druge. Zabilježena su citotoksična, antineoplastična, antifungalna, antiplazmodijska i antiinsekticidna djelovanja spojeva sa indolnom strukturom. Osim što ima mogućnost djelovanja kao donor vodikove veze kroz slobodnu NH skupinu, visoka gustoća π-elektrona i visoka HOMO (najviša popunjena molekulska orbitala) energija planarnog indolnog kostura omogućavaju interakcije s nukleobazama, posebice protoniranim. Neki proteini pokazali su visoku specifičnost vezanja za indolne jezgre. Elektronska svojstva skupa sa relativno niskom rezonancijskom energijom peteročlanog prstena utječu na kemijsko ponašanje indola i njegovih mnogih derivata. Prema tome, elektrofilna supstitucija ili oksidativna transformacija su, djelomično zbog gubitka aromatske stabilnosti, najvažnije za ovu skupinu spojeva. Jednostavni indolni alkaloidi su većinom derivati triptofana ili njegovog direktnog prekursora indola. Identificirano je nekoliko indola morskog porijekla sa citotoksičnim, antineoplastičnim, antibakterijskim i antimikrobnim biološkim aktivnostima, kao i djelovanjem na ljudske enzime i receptore. (20, 21)

Triptamin je aminoalkilindol koji se sastoji od 2-aminoetil grupe vezane na trećem ugljikovom atomu indolnog prstena. (22) U strukturi granulatamida B na triptaminski dio je vezana nezasićena masna kiselina amidnom vezom. Za amidnu vezu je karakteristična visoka stabilnost zahvaljujući rezonanciji. Zbog preklapanja orbitala između slobodnog elektronskog para dušika i protuveznih orbitala karbonilne grupe, C-N veza ima djelomična svojstva dvostruke veze. Ta delokalizacija elektrona ograničava rotaciju i inducira planarnost veze čime posljedično smanjuje elektrofilnost ugljikovog atoma amidne grupe. (17, 23)

Masne kiseline su monokarboksilne kiseline koje sadrže dugački ugljikovodični lanac. Mogu se razvrstati u skupine s obzirom na zasićenost. Zasićene masne kiseline su ravnolančane sa 14, 16 i 18 ugljikovih atoma, mononezasićene sadrže 10 do 30 ugljikovih atoma sa jednom cis-dvostrukom vezom te polinezasićene koje sadrže više dvostrukih veza. Razlika između omega-3 i omega-6 masnih kiselina je u položaju prve dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu. Ona se nalazi ili na trećem ili na šestom ugljiku počevši od metilnog kraja lanca. Većina omega-6 masnih kiselina se konzumira u obliku linolne kiseline, najčešće iz biljnih ulja, ali i u manjoj količini unosi se arahidonska kiselina dobivena iz mesa. Omega-3 masne kiseline se isto mogu pronaći u biljnim uljima u obliku  $\alpha$ -linolenske kiseline te u većim količinama u ribama kao eikosapentaenoična kiselina ili dokosaheksaenoična kiselina. I omega-3 i omega-6 masne kiseline mogu biti inkorporirane u fosfolipide stanične membrane što dovodi do narušavanja njene strukture i fluidnosti. (24, 25)

Omega-3 polinezasićene masne kiseline su nužne za sazrijevanje tkiva i njihovo normalno fiziološko funkcioniranje te imaju blagotvorno djelovanje na zdravlje čovjeka. Imaju ulogu i u kemoterapijama. Ključni mehanizam za kemosenzibilizaciju ili poništavanje kemorezistencije na više lijekova se bazira na njihovoj sposobnosti da utječu na strukturu stanične membrane i time protok lijekova te aktivnost transportera. Osim toga, konzumacija omega-3 masnih kiselina može usporiti rast tumora induciranjem procesa

apoptoze u tumorskim stanicama ili inhibicijom angiogeneze. Također, pojačavaju efikasnost kemoterapijskih lijekova i mogu smanjiti nuspojave dok su istovremeno povezane sa visokom razinom sigurnosti. (25)

Zahvaljujući ugljikovodičnom lancu i reaktivnoj karboksilnoj skupini, masne kiseline se mogu koristiti za proizvodnju farmakološki zanimljivih spojeva pomoću jednostavnih transformacija. Uobičajena strategija je konjugiranje karboksilnog kraja lipida sa hidroksilnom ili amino skupinom lijeka za dobivanje stabilnog estera ili amidne veze. Navedene modifikacije se koriste kako bi se povećala lipofilnost hidrofilnih lijekova te poboljšala njihova kompatibilnost sa lipofilnim staničnim membranama i komponentama nosača lijekova. Takvi konjugati masnih kiselina i lijekova u obliku emulzija ili micela pokazali su nekoliko prednosti uključujući poboljšanu oralnu bioraspodjelivost i smanjenu toksičnost protutumorskih lijekova. Tumorske stanice imaju veći unos prirodnih masnih kiselina koje koriste kao izvor energije i za opskrbu biokemijskim prekursorima u raznim procesima. Lipofilni prolijekovi se koriste i za postizanje produljenog oslobađanja lijeka na način da sudjeluju u metabolizmu lipida i stoga mogu izbjeći hidrolizu i pokazati povećane interakcije sa staničnim membranama. Konjugacijom masnih kiselina s biološki aktivnim spojevima nastaju nove hibridne molekule sa širokim spektrom pojačanih bioloških aktivnosti. Derivati masnih kiselina povezani su s raznim biološkim svojstvima kao što su protuupalna i antioksidativna. U području liječenja karcinoma, otkrivaju se razne modificirane masne kiseline kao molekule s obećavajućim djelovanjem. (25)

Prethodno su ispitana citotoksična svojstva granulatamida B na 16 različitih tumorskih staničnih linija pomoću sulforodamin B kolorimetrijskog eseja. Niska GI<sub>50</sub> vrijednost (koncentracija inhibicije rasta) od 3,5 μM detektirana je testiranjem na LN-caP staničnim linijama raka prostate. (17)

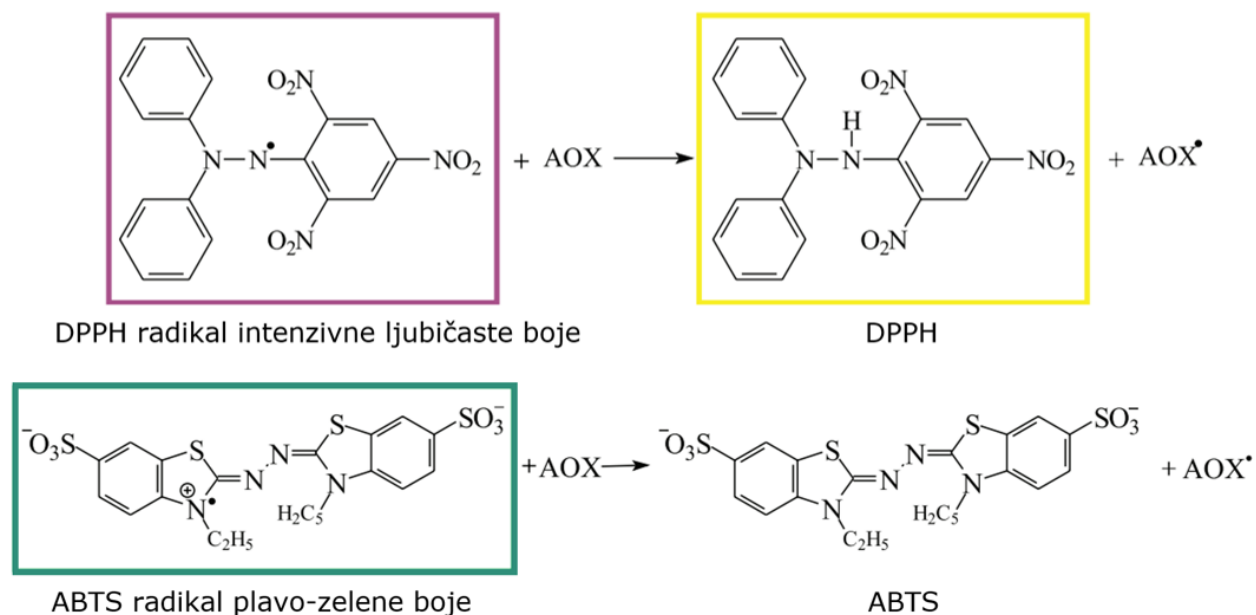


## **1.5 Bioeseji za ispitivanje antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti**

### **1.5.1 ABTS i DPPH eseji**

Antioksidativni eseji mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe s obzirom na mehanizam reakcije: prijenos atoma vodika (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT) i prijenos elektrona (eng. *electron transfer*, ET). Esezima baziranim na HAT mjeri se sposobnost antioksidansa za prijenos vodikovih atoma na peroksil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) radikale. Eseji bazirani na prijenosu ET simuliraju antioksidativno djelovanje odgovarajućom probom s redoks potencijalom, odnosno antioksidansi reagiraju sa fluorescentnom ili obojenom probom (oksidacijskim sredstvom). Spektrofotometrijski ET eseji mjere kapacitet antioksidansa za redukciju oksidansa koji mijenja boju kao posljedica redoks reakcije. Stupanj promjene boje (povećanje ili smanjenje apsorbancije probe na određenoj valnoj duljini) je u korelaciji sa koncentracijom antioksidansa u uzorku. (26)

Spektrofotometrijske tehnike su jednostavne, brze i jeftine što utječe na učestalost njihove upotrebe u ispitivanju antioksidativnih svojstava. Dva često korištena slobodna radikala bazirana za procjenu antioksidativne aktivnosti su 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). ABTS i DPPH su sintetski organski radikali sa plavo-zelenom odnosno ljubičastom bojom koji se mogu reducirati u prisutnosti antioksidansa i posljedično dekolozirati (slika 5). Antioksidativni kapacitet procjenjuje se smanjenjem apsorpcije na određenoj valnoj duljini. (27, 28)



**Slika 5.** Prikaz reakcija ABTS i DPPH spektrofotometrijskih esejja. Preuzeto i prilagođeno prema 28.

ABTS esej mjeri relativnu sposobnost antioksidansa da veže ABTS<sup>•+</sup> radikal koji nastaje u vodenoj fazi, u usporedbi sa Trolox-om (analog vitamina E topiv u vodi). Reakcijom jake oksidirajuće tvari (kalijev persulfat ili kalijev permanganat) sa ABTS soli nastaje ABTS<sup>•+</sup> radikal. Redukcija plavo-zelene otopine ABTS radikala donacijom vodika od strane antioksidansa mjeri se smanjenjem intenziteta karakterističnog apsorpcijskog spektra pri 734 nm. ABTS metoda ima dodatnu prednost iz razloga što se može koristiti pri različitim pH vrijednostima. (27)

DPPH je stabilni, komercijalno dostupan, dušikov radikal intenzivne ljubičaste boje. Reakcijom sa drugim radikalima, reducirajućim tvarima ili spojevima sposobnima za transfer atoma vodika, DPPH gubi karakteristično ljubičasto obojenje pri 515 nm. Kao i u slučaju ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> reagira s donorima elektrona i s donorima vodika. U slučaju DPPH, reakcije su sporije i prisutno je steričko ometanje mjesta na kojem se nalazi radikal. DPPH esej je tehnički jednostavan, ali postoje nedostaci koji limitiraju njegovu upotrebu. Osim

mehaničke razlike u odnosu na HAT reakciju koja se obično javlja između antioksidansa i peroksilnih radikala, DPPH je dugotrajni dušikov radikal koji nema nikakve sličnosti s visoko reaktivnim i nestabilnim peroksilnim radikalima. Mnogi antioksidansi koji brzo reagiraju s peroksilnim radikalima, u slučaju DPPH će reagirati sporo ili biti inertni. (26, 29)

### 1.5.2 MTT esej

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazol bromid) esej je baziran na pretvorbi MTT-a u kristale formazana pomoću metabolizma živih stanica. (30) To je kolorimetrijski esej čiji biokemijski mehanizam uključuje mitohondrijski enzim NAD(P)H-ovisnu staničnu oksidoreduktazu za redukciju žutog, u vodi topivog MTT-a u netopivi formazan (slika 6). Nastali formazan se može otopiti dimetil sulfoksidom (DMSO) kako bi se dobilo ljubičasto obojenje sa karakterističnom apsorpcijom pri 540 nm. Između metaboličke aktivnosti stanica i nastalog ljubičastog obojenja postoji linearan odnos iz kojeg se mogu precizno kvantificirati promjene u stopi stanične smrti ili proliferacije. Zdrave stanice imaju visoku stopu redukcije MTT-a u formazan dok mrtve ili neaktivne stanice nemaju tu mogućnost. Intenzivno ljubičasto obojenje označava visoku vitalnost stanica dok nedostatak ljubičaste boje ukazuje na smanjeni broj živih stanica i time se potvrđuje potencijal inhibicije stanične proliferacije za neki ispitivani spoj. (31, 32)



**Slika 6.** Reakcija redukcije MTT-a u ljubičasti formazan. Preuzeto i prilagođeno prema 32.

## 2. CILJ RADA

Svrha: sinteza novih strukturnih analoga spoja granulatamida B te ispitivanje njihovih antioksidativnih i antiproliferativnih aktivnosti.

Hipoteza: sintetski analozi granulatamida B pokazati će *in vitro* inhibitorne učinke prema tumorskim staničnim linijama i dvama radikalima.

Ciljevi:

- 1) Sinteza 5 analoga granulatamida B modifikacijom pobočnog lanca korištenjem nezasićenih masnih kiselina
- 2) Karakterizacija novih spojeva primjenom analitičkih metoda i tehnika (UV-Vis, IR, NMR, MS)
- 3) Ispitivanje antioksidativnog učinaka spojeva pomoću ABTS i DPPH eseja
- 4) Ispitivanje antiproliferativnih učinaka spojeva i korištenih masnih kiselina pomoću MTT eseja na 4 tumorske stanične linije i jednoj normalnoj ne-transformiranoj liniji

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Kemikalije i reagensi

**Tablica 2.** Popis kemikalija i reagensa

<b>Kemikalija, reagens</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Država porijekla</b>
Triptamin, 98%	Acros Organics	Kina
Alfa-linolenska kiselina, 99%	Acros Organics	Belgija
Palmitoleinska kiselina, 99+%		
Trolox, 97%	Acros Organics	Slovačka
1-(3-dimetilaminopropil)-3- etilkarbodiimid hidroklorid, >98%	Alfa Aesar	Njemačka
Retinoična kiselina, 97%		
Trietilamin, >99%		
1-hidroksibenzotriazol hidrat, ≥97%	Sigma Aldrich	Švicarska
Arahidonska kiselina, >95%		
2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- sulfonska kiselina) diamonijeva sol, 98%		
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil		
Etil-acetat, >99,5%	BDH Prolabo	Ujedinjeno Kraljevstvo
Cikloheksan, >99,5%		
Kalijev peroksidisulfat		
Dimetilformamid, >99,8%		
Oleinska kiselina, 79%		
Limunska kiselina		
Natrijev hidrogen karbonat		

Diklormetan, 99,9%	VWR Chemicals	SAD
Metanol, 99,9%		
Natrijev klorid	Gram-Mol d.o.o.	Hrvatska
Natrijev sulfat	T.T.T. d.o.o.	Hrvatska
DMEM (eng. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )	Capricorn Scientific	Njemačka
FBS (eng. <i>Fetal bovine serum</i> )		
L-glutamin		
Penicilin		
Streptomycin		

### 3.2 Metode karakterizacije spojeva

**Tankoslojna kromatografija:** uspješnost provedene sinteze provjeravana je tankoslojnom kromatografijom. Korištene su TLC ploče prethodno presvučene silika gelom ALUGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub> proizvođača Macherey-Nagel. Za pomoć pri vizualizaciji korištena je UV lampa sa izvorom svjetlosti valnih duljina 254 i 365 nm.

**Flash kromatografija:** za pročišćavanje produkata korišten je Flash kromatograf CombiFlash Rf+ proizvođača Teledyne ISCO te kolone za kromatografiju visoke djelotvornosti istog proizvođača. Kao otapala su korišteni cikloheksan i etil-acetat u različitim omjerima.

**IR spektroskopija:** IR spektri su snimljeni Cary 630 FTIR spektrometrom proizvođača Agilent Technologies.

**UV-Vis spektrofotometrija:** UV-Vis spektri su snimljeni na Cary 60 UV-Vis spektrofotometru proizvođača Agilent Technologies, u kvarcnim kivetama duljine 1 cm.

**NMR:** NMR spektri su snimljeni na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pomoću NMR spektrometar VARIAN INOVA 400. Deuterirani kloroform je korišten za otapanje spojeva i snimanje spektara.

**MS:** Za potvrdu sintetiziranih spojeva upotrebljen je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC Agilent 1260 serije) povezan na Agilent 6460 trostruki kvadropolni (QQQ) maseni spektrometar opremljen sa elektrosprej raspršivačem (AJS ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Snimljen je MS Scan u pozitivnom i negativnom modu nakon čega je napravljena fragmentacija (Product Ion Scan) koristeći različite kolizijske energije.

Opća napomena: spektri sintetiziranih spojeva se mogu pronaći u Dodacima.

### 3.3 Sinteze spojeva

#### 3.3.1 Sinteza granulatamida B

Granulatamid B ((2Z,4E)-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-3,5-dimetildodeka-2,4-dienamid) sintetiziran je u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja od strane doktoranda Daria Matulje. Totalna sinteza provedena je prema protokolu kojeg su razvili Sun i Fürstner (33), a sastoji se od pripreme 2-pirona pomoću oktanoil-klorida i etil-3,3-dimetilakrilata te posljedičnog otvaranja prstena s Grignard-ovim reagensom u reakciji kataliziranoj željezom s ciljem dobivanja nezasićene masne kiseline. Potonja je potom korištena za pripravu amidne veze s triptaminom i konačnog dobivanja granulatamida B čiji su spektri bili usporedivi s literaturnima.

#### 3.3.2 Sinteza spojeva

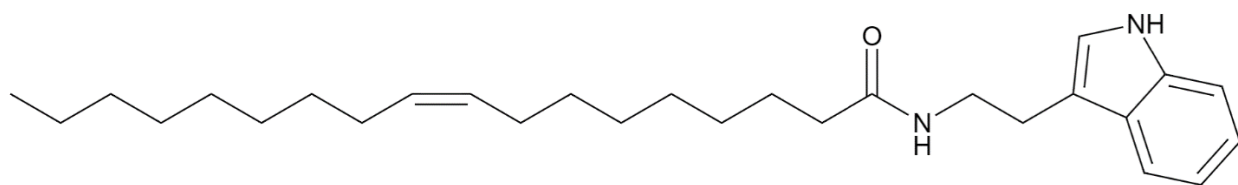
Reprezentativni postupak: sinteza N-arahidonoiltriptamina (**1**). Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i arahidonske kiseline (91,34 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena flash kromatografijom. Spojevi **2-5** (**7-11**) (Slika 7) pripremljeni su analogno postupku sinteze spoja **1** (Tablica 3).



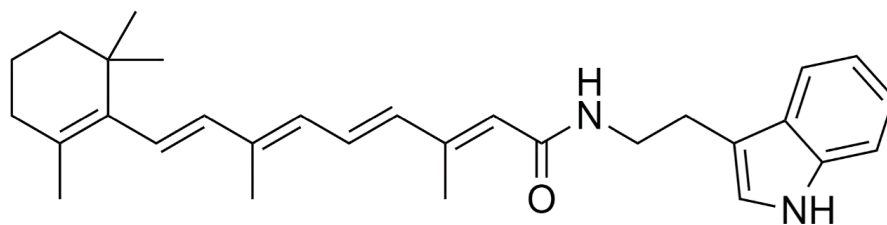
**Tablica 3.** Sintetizirani spojevi **1-5** (masa nastalih produkata, iskorištenje reakcije, boja i agregatno stanje).

<b>Spoj</b>	<b>Masa /mg</b>	<b>Iskorištenje reakcije</b>	<b>Boja/ Agregatno stanje</b>
N-arahidonoiltriptamin <b>(1)</b>	85,7	63,96%	Blijedo-žuta krutina
N-retinoiltriptamin <b>(2)</b>	109,5	82,45%	Žuta krutina (prah)
N-palmitoleoiltriptamin <b>(3)</b>	75,3	63,30%	Svijetlo žuta krutina
N-oleoiltriptamin <b>(4)</b>	101,1	79,4%	Svijetlo žuta krutina
N-alfa-linolenoiltriptamin <b>(5)</b>	100,0	79,2%	Blijedo-žuta krutina

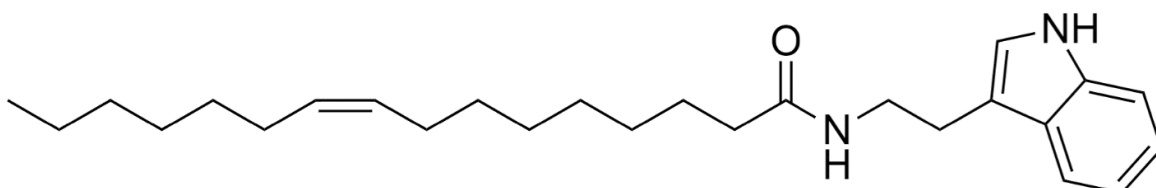
Opća napomena: detaljniji opis sinteze i karakterizacije spojeva nalazi se u Dodacima.



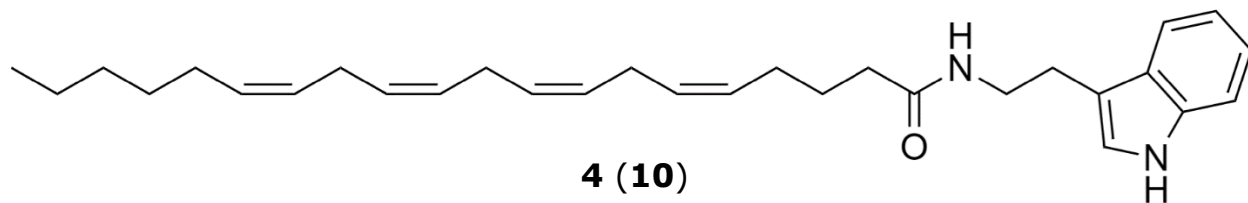
**1 (7)**



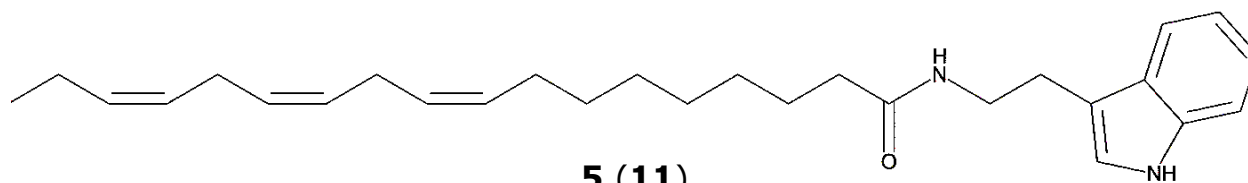
**2 (8)**



**3 (9)**



**4 (10)**



**5 (11)**

**Slika 7.** Struktura sintetiziranih spojeva **1-5 (7-11)**.

## 3.4 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

### 3.4.1 ABTS esej

Antioksidativna aktivnost sintetiziranih organskih spojeva (granulatamid B, spojevi **1-5**) ispitana je *in vitro* inhibicijom ABTS radikala. ABTS radikal je pripremljen miješanjem jednakog volumena ABTS otopine (7 mM) i otopine kalijevog persulfata (2,45 mM). Nakon inkubacije u mraku kroz noć na sobnoj temperaturi, otopina je razrjeđivana metanolom dok se nije dobila vrijednost apsorbancije od otprilike 0.7 pri 734 nm. Pomiješano je 100 µL sintetiziranih spojeva otopljenih u metanolu sa 100 µL otopine ABTS radikala. Raspon konačnih koncentracija spojeva bio je: 15,625-2000 µM. Apsorbancija uzoraka je mjerena pri 734 nm nakon 7 minuta inkubacije u mraku na 5°C pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan). Postotak inhibicije ABTS radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{uzorak}} \times 100$$

gdje je  $A_{kontrola}$  vrijednost apsorbancije otopine ABTS radikala i metanola, a  $A_{uzorak}$  vrijednost apsorbancije Trolox-a, triptamina, granulatamida B i sintetiziranih organskih spojeva otopljenih u metanolu pomiješanih s otopinom ABTS radikala.

Antioksidativna aktivnost spojeva **1-5** uspoređena je s Trolox-om kao pozitivnom kontrolom, triptaminom i granulatamidom B. Koncentracija otopljenog spoja u metanolu pri kojoj inhibicija ABTS radikala iznosi 50% (IC<sub>50</sub> vrijednost) određena je grafički. Za izradu grafa korištene su srednje vrijednosti dobivene iz triju neovisnih mjerenja.

### 3.4.2 DPPH esej

Antioksidativna aktivnost sintetiziranih organskih spojeva (**1-5**) ispitana je *in vitro* inhibicijom DPPH radikala. Pripremljen je DPPH radikal konačne koncentracije 0,2 mM otapanjem 133  $\mu$ L DPPH radikala koncentracije 15mM u 9,867 mL metanola. Pomiješano je 100  $\mu$ L sintetiziranih spojeva otopljenih u metanolu sa 100  $\mu$ L otopine DPPH radikala. Raspon konačnih koncentracija spojeva bio je: 15,625-2000  $\mu$ M. Apsorbancija uzoraka je mjerena pri 517 nm nakon 30 i 60 minuta inkubacije u mraku na 5°C pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan). Postotak inhibicije DPPH radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{uzorak}} \times 100$$

gdje je  $A_{kontrola}$  vrijednost apsorbancije otopine DPPH radikala i metanola, a  $A_{uzorak}$  vrijednost apsorbancije Trolox-a, triptamina i sintetiziranih organskih spojeva otopljenih u metanolu pomiješanih s otopinom DPPH radikala.

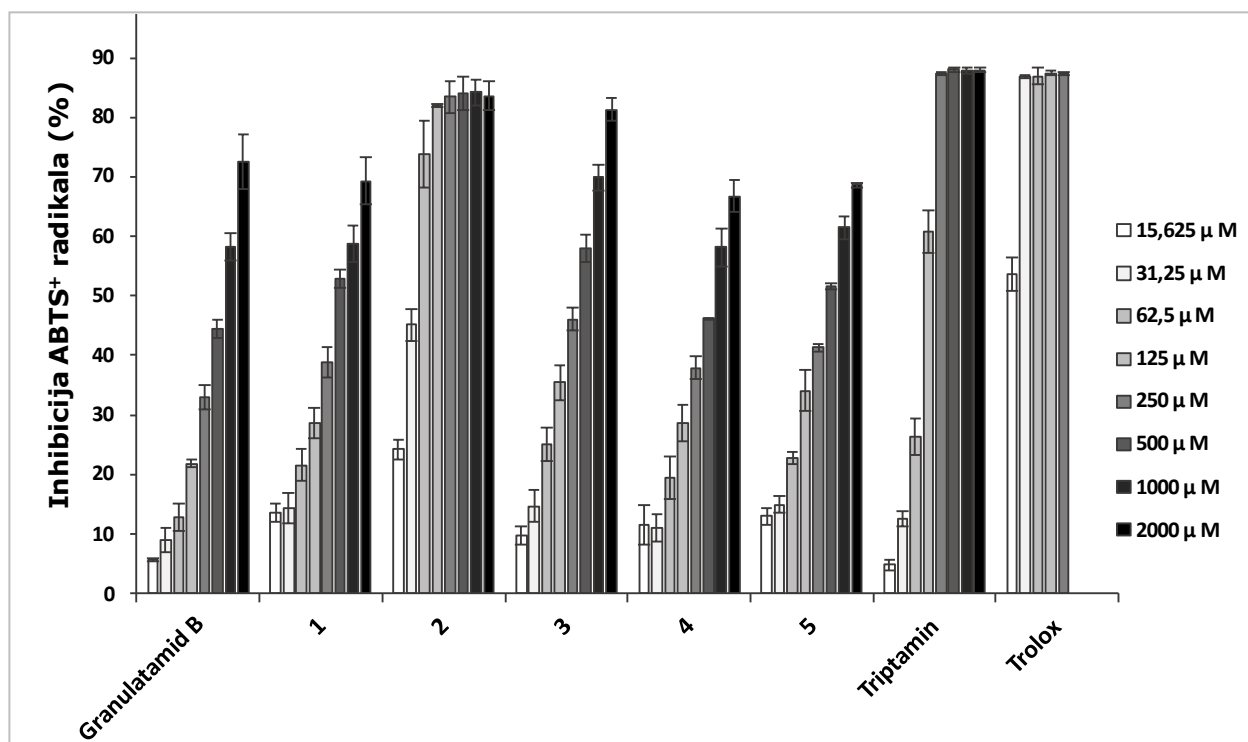
### 3.5 Ispitivanje antiproliferativnog učinka MTT esejom

Ljudske tumorske stanične linije MCF-7 (metastatski tumor dojke), SW620 (metastatski kolorektalni karcinom), CFPAC-1 (duktalni adenokarcinom gušterače), HepG2 (hepatocelularni karcinom) te HFF-1 (netransformirani ljudski fibroblasti) nabavljene su od ATCC (American Type Culture Collection) i kultivirane u Dulbecco modificiranom Eagle mediju (DMEM) u vlažnoj atmosferi s 5%-tnim CO<sub>2</sub> na 37°C. DMEM podloga je obogaćena s 10%-tnim fetalnim goveđim serumom, 2 mM L-glutaminom, 100 U/mL penicilinom i 100 µg/mL streptomycinom (Capricorn Scientific, Njemačka). Sintetizirani organski spojevi **1-5**, granulatamid B, triptamin te masne kiseline korištene za sintezu spojeva otopljeni su u mediju za rast koji je sadržavao 10%-tni DMSO. Zatim su otopljeni pomoću vorteksiranja i ultrazvučne kupelji, 30 minuta na 37 °C. Konačni raspon koncentracija spojeva razrijeđenih medijem za rast bio je 0,01–100 µM. Tumorske stanične linije i netransformirani ljudski fibroblasti su nasadjeni na pločicu s 96 jažica s gustoćom od 3,000 ili 5,000 stanica po jažici, ovisno o brzini dijeljenja tumorskih i netransformiranih staničnih linija. Stanice su inkubirane otopinama spojeva tijekom 72 sata. Brzina staničnog rasta je evaluirana pomoću MTT esejom u skladu sa uputama proizvođača. Postotak staničnog rasta je izračunat transformiranjem eksperimentalno određenih vrijednosti apsorbancija pomoću formula koje je predložio američki Nacionalni instituti za zdravlje. Koncentracije spojeva **1-5**, granulatamida B, triptamina i masnih kiselina potrebne za inhibiciju 50% staničnog rasta (IC<sub>50</sub> vrijednosti) i smrt 50% stanica (LC<sub>50</sub> vrijednosti) izračunate su iz krivulja odnosa doze i učinka pomoću linearno regresijskih analiza. Sva mjerenja su provedena u kvadruplikatu u trima neovisnim biološkim pokusima.

## 4. REZULTATI

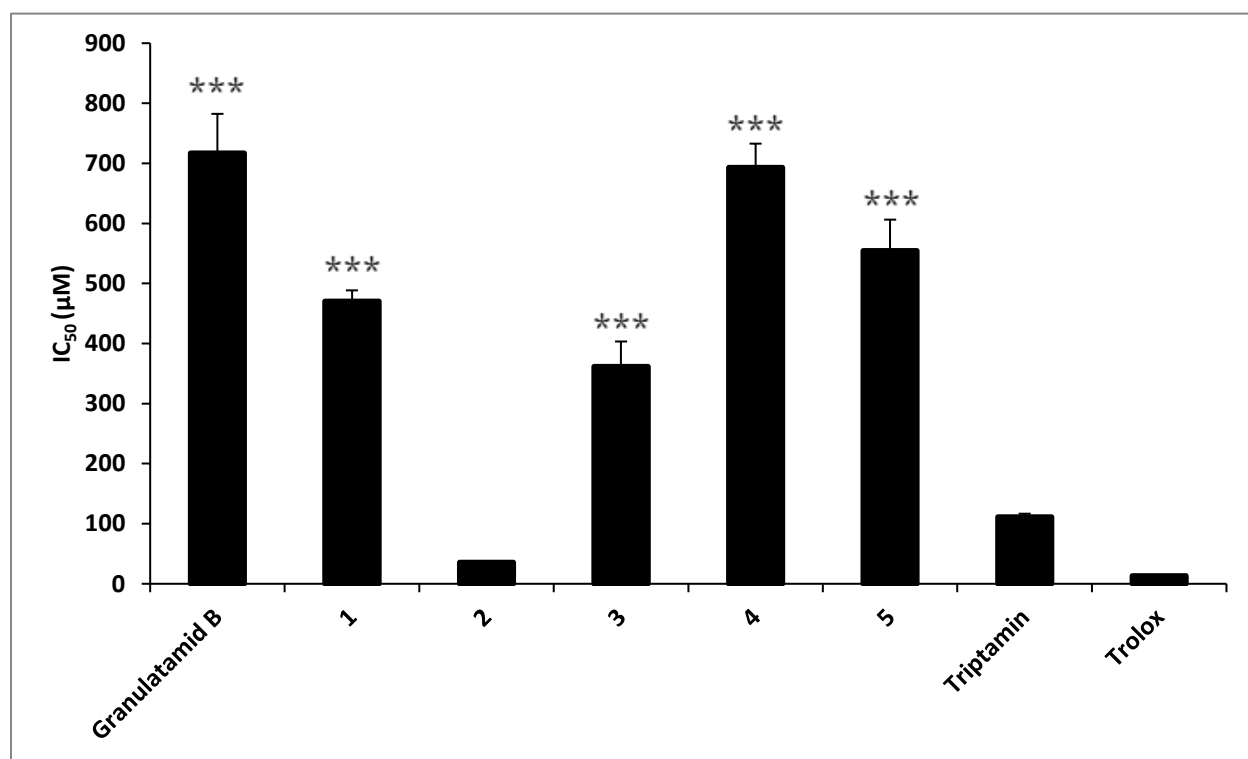
### 4.1 Evaluacija antioksidativne aktivnosti

Rezultati inhibicije ABTS<sup>•+</sup> radikala pokazuju ovisnost antioksidativne aktivnosti o koncentraciji spojeva. Posljedično, veća koncentracija pojedinog spoja rezultirala je jačim inhibicijskim učinkom na ABTS radikal. N-retinoiltriptamin (**2**) pokazao je znatno veću ABTS antiradikalnu aktivnost od ostalih spojeva, a najslabiju N-oleoiltriptamin (**4**). Granulatamid B je pokazao manju antiradikalnu aktivnost od svih sintetiziranih spojeva. S druge strane, pozitivni standard, Trolox te triptamin sa slobodnom amino skupinom su pokazali veću antiradikalnu aktivnost od svih spojeva (više od 80% inhibicije radikala pri višim koncentracijama). (slika 8)



**Slika 8.** ABTS antiradikalna aktivnost granulatamida B, sintetiziranih spojeva (**1-5**), triptamina i Troloxa, mjereno u koncentracijskim rasponima 15,625 - 2000 μM nakon 7 minuta inkubacije u mraku na 5°C. Dobivene vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija triju neovisnih mjerenja.

N-retinoiltriptamin (**2**) je imao najmanju  $IC_{50}$  vrijednost od ostalih sintetiziranih spojeva te je ona iznosila  $36 \pm 2 \mu M$ . Zatim redom slijede  $IC_{50}$  vrijednosti: N-palmitoleoiltriptamin (**3**)  $333 \pm 42 \mu M$ , N-arahidonoiltriptamin (**1**)  $450 \pm 18 \mu M$ , N-alfa-linolenoiltriptamin (**5**)  $496 \pm 52 \mu M$  i N-oleoiltriptamin (**4**)  $667 \pm 40 \mu M$ . Granulatamid B je imao najveću  $IC_{50}$  vrijednost, koja iznosi  $704 \pm 66 \mu M$ . Spojevi **1**, **3**, **4**, **5** te granulatamid B su imali značajno veće  $IC_{50}$  vrijednosti u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox kojoj je  $IC_{50}$  vrijednost iznosila  $14 \pm 1 \mu M$ .  $IC_{50}$  vrijednost triptamina je iznosila  $105 \pm 6 \mu M$  i time je veća od vrijednosti N-retinoiltriptamina, ali manja od ostalih triptaminskih derivata (slika 9).



**Slika 9.**  $IC_{50}$  vrijednosti ABTS antiradikale aktivnosti granulatamida B, sintetiziranih spojeva (**1-5**), triptamina i Trolox-a. Mjereno u koncentracijskim rasponima  $15,625 - 2000 \mu M$  nakon 7 minuta inkubacije u mraku na  $5^{\circ}C$ . Dobivene vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija triju neovisnih mjerenja.

\*\*\* označava statističku značajnost na razini  $p < 0.001$  u usporedbi sa Trolox-om kao pozitivnom kontrolom.

Izuzevši Trolox, niti jedan ispitani spoj nije pokazao 50% inhibiciju DPPH radikala ni 30 niti 60 minuta nakon inkubacije. Štoviše, postotak inhibicije pri najvišoj koncentraciji iznosio je oko ili manje od 10% (sukladno tome, grafički i/ili tablični rezultati nisu prikazani u ovome radu).

## 4.2 MTT esej

Svi spojevi su, uključujući granulatamid B, pokazali umjereni antiproliferativan učinak na svim tumorskim staničnim linijama te netransformiranim ljudskim fibroblastima (HFF-1), izuzev spojeva **1** i **4** na CFPAC-1 staničnim linijama ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Od sintetiziranih strukturnih analoga granulatamida B, spoj **2** je imao najveći postotak inhibicije staničnog rasta na svim tumorskim staničnim linijama te HFF-1 stanicama u rasponu od  $20.1 \pm 2.4$  do  $39.3 \pm 1.5 \mu M$ . Najslabiji učinak na HFF-1 liniju ostvaren je kod spoja **5** te iznosi  $65.4 \pm 6.0 \mu M$ . Triptamin je pokazao inhibitorni učinak na stanični rast samo na HFF-1 staničnim linijama (Tablica 4).

**Tablica 4.**  $IC_{50}$  vrijednosti granulatamida B, spojeva **1-5** i triptamina dobivenih MTT esejom na tumorskim staničnim linijama MCF-7, SW620, CFPAC-1, HepG2 te HFF-1 stanicama.

Spoj	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )				
	MCF-7	SW620	CFPAC-1	HepG2	HFF-1
<b>Granulatamid B</b>	$25.4 \pm 0.4$	$33.9 \pm 1.3$	$34.8 \pm 2.0$	$25.5 \pm 2.0$	$16.0 \pm 0.3$
<b>1</b>	$50.2 \pm 2.9$	$95.7 \pm 18.2$	>100	$41.4 \pm 1.7$	$41.8 \pm 10.7$
<b>2</b>	$25.4 \pm 1.4$	$32.4 \pm 2.1$	$39.3 \pm 1.5$	$20.7 \pm 1.3$	$20.1 \pm 2.4$
<b>3</b>	$31.1 \pm 5.4$	$37.6 \pm 6.3$	$53.1 \pm 15.0$	$29.0 \pm 4.4$	$35.8 \pm 6.0$
<b>4</b>	$58.0 \pm 9.9$	$81.4 \pm 23.0$	>100	$42.8 \pm 15.1$	$34.2 \pm 2.8$
<b>5</b>	$33.1 \pm 3.6$	$28.6 \pm 8.7$	$60.2 \pm 25.0$	$47.1 \pm 15.8$	$65.4 \pm 6.0$
<b>Triptamin</b>	>100	>100	>100	>100	$62.0 \pm 28.0$



Spojevi **1**, **4** i **5** te triptamin nisu imali citotoksičan učinak ( $LC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) prema niti jednoj staničnoj liniji (MCF-7, CFPAC-1, SW620, HepG2, HFF-1). Spoj **3** nije imao citotoksičan učinak na SW620 tumorsku staničnu liniju te na stanice netransformiranih ljudskih fibroblasta (HFF-1), dok je spoj **2** pokazao blagi citotoksičan učinak ( $LC_{50}$ :  $82.3 \pm 0.4$  do  $90.5 \pm 0.1$ ) prema svim staničnim linijama kao i granulatamid B (Tablica 5).

**Tablica 5.**  $LC_{50}$  vrijednosti spojeva **1-5** dobivenih MTT esejom na tumorskim staničnim linijama MCF-7, SW620, CFPAC-1, HepG2 te HFF-1 stanicama.

Spoj	$LC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )				
	MCF-7	CFPAC-1	SW620	HepG2	HFF-1
<b>Granulatamid B</b>	$80.0 \pm 1.6$	$80.8 \pm 0.4$	$80.3 \pm 0.4$	$78.7 \pm 0.1$	$74.6 \pm 0.9$
<b>1</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>2</b>	$82.3 \pm 0.4$	$86.7 \pm 2.3$	$90.5 \pm 0.1$	$90.0 \pm 0.8$	$85.6 \pm 1.0$
<b>3</b>	$85.9 \pm 15.2$	$96.8 \pm 19.0$	>100	$86.0 \pm 17.3$	>100
<b>4</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>5</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>Triptamin</b>	>100	>100	>100	>100	>100

Ispitivanje antiproliferativnog učinka masnih kiselina korištenih u sintezi spojeva **1–5** na MCF-7, CFPAC-1, SW620, HepG2 i HFF-1 staničnim linijama pokazalo je da samo retinoična kiselina (**RA**) pokazuje inhibitorne učinke na stanični rast s određenim IC<sub>50</sub> vrijednostima: 61.9 ± 8.2, 73.2 ± 1.3, 69.6 ± 12.0, 65.3 ± 3.2 te 51.6 ± 4.2 μM, redom. IC<sub>50</sub> vrijednosti arahidonske (**AA**), palmitoleinske (**POA**), oleinske (**OLA**) i alfa-linolenske (**AOLA**) masne kiseline iznosile su više od 100 μM (Tablica 6).

**Tablica 6.** IC<sub>50</sub> vrijednosti masnih kiselina (arahidonske – **AA**, retinoične – **RA**, palmitoleinske – **POA**, oleinske – **OLA** i alfa-linolenske – **AOLA**) dobivenih MTT esejom na tumorskim staničnim linijama MCF-7, SW620, CFPAC-1, HepG2 te HFF-1 stanicama.

Masna kiselina	IC <sub>50</sub> (μM)				
	MCF-7	CFPAC-1	SW620	HepG2	HFF-1
<b>AA</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>RA</b>	61.9 ± 8.2	73.2 ± 1.3	69.6 ± 12.0	65.3 ± 3.2	51.6 ± 4.2
<b>POA</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>OLA</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>AOLA</b>	>100	>100	>100	>100	>100

## 5. RASPRAVA

Morski organizmi su bogat izvor biološki aktivnih molekula koje se u njima sintetiziraju kao sekundarni metaboliti. (1) Koralji su organizmi sa sjedilačkim načinom života i glavni razlog zbog kojih proizvode razne sekundarne metabolite je obrana od predatornih vrsta. (17) Najveći udio tih metabolita ispitan je vezano uz protutumorsko i protuupalno potencijalno djelovanje dok je najmanje podataka proizašlo iz ispitivanja antioksidativnog djelovanja. (34) Stoga, veliki broj tih spojeva i njihovih strukturnih analoga je prepoznat od strane farmaceutske industrije. Mnogi se nalaze u raznim fazama kliničkih ispitivanja, dok su neki već u upotrebi za liječenje raznih bolesti. (2,3) Oktokoralji koji pripadaju *Eunicella* rodu (gorgonijski koralji) mogu se prepoznati po kolonijama narančaste, bijele ili crvene boje te su rasprostranjeni od obale Tunisa do Egejskog mora. (17) Istraživanja su pokazala da gorgonijski koralji sintetiziraju u najvećoj koncentraciji sterole (terpene) i derivate masnih kiselina, a u manjoj koncentraciji šećere, derivate fosforne kiseline te heterocikličke spojeve koji sadrže dušikov atom. (35) Od potonjih je prepoznatljiv primjer Granulatamid B kao indolni alkaloid izoliran iz *Eunicella sp.* Njegova se struktura sastoji od triptaminskog dijela na koji je peptidnom vezom povezan lanac nezasićene masne kiseline. U *in vitro* istraživanju je pokazao umjereno inhibicijsko djelovanje prema tumorskim staničnim linijama, ali je testiranjem na tumorskoj staničnoj liniji raka prostate sulforodamine B kolorimetrijskim esejom utvrđena relativno niska GI<sub>50</sub> vrijednost koja je iznosila 3,5 μM. (17) S obzirom da se indolna jezgra smatra jednom od najvažnijih prstenastih struktura u farmaceutskom razvoju, cilj ovog rada bio je sinteza novih strukturnih analoga granulatamida B pomoću različitih nezasićenih masnih kiselina te ispitivanje njihovih antiproliferativnih i antioksidativnih svojstava. (20)

Cilj postupka za sintezu spojeva **1–5** bila je konjugacija triptamina i nezasićene masne kiseline uz nastanak amidne veze. Iskorištenja provedenih reakcija su visoka. Najmanje iskorištenje reakcije je bilo 63,3% u slučaju sinteze spoja **3**, a najviše 82,5% u slučaju sinteze spoja **2**. UV-Vis spektrofotometrijom su dobiveni spektri karakteristični za spojeve, osim u slučaju spoja **2** gdje se vidi utjecaj sustava konjugiranih dvostrukih veza retinoične kiseline na spektar. Valne duljine maksimalnih apsorbancija nalaze se na 222, 280 i 290 nm što je usporedivo sa sličnim masnokiselinskim derivatima triptamina izoliranih iz kopnenih biljnih vrsta. (36, 37, 38) IR spektroskopijom spojeva dobiveni su karakteristični pikovi (oko 3300-3400 i 1630-1650  $\text{cm}^{-1}$ ) za strukture koje sadrže indolni prsten i amidnu vezu. Signali dobiveni NMR metodom za svaki spoj pojedinačno potvrđuju prisutnost triptaminske strukture (pikovi u aromatskom području  $^1\text{H}$  NMR spektra,  $\delta = 7-8$  ppm), amidne veze ( $\delta \approx 5,5$  ppm za N-H u  $^1\text{H}$  NMR spektru te 173 ppm za C=O u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru) i konjugiranih masnih kiselina. Pikovi dobiveni masenom spektrometrijom odgovaraju molekularnim formulama spojeva.

Ispitivanje antioksidativnih svojstava sintetiziranih spojeva ispitano je ABTS i DPPH esejima. ABTS esejom utvrđeno je kako spoj **2** pokazuje najjača antiradikalna svojstva. Njegova  $\text{IC}_{50}$  vrijednost je bila najmanja te je iznosila  $36 \pm 2$   $\mu\text{M}$ . Spojevi **1**, **3**, **4**, **5** te granulatamid B imali su statistički značajno veće  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox kojoj je  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosila  $14 \pm 1$   $\mu\text{M}$ .  $\text{IC}_{50}$  vrijednost triptamina je iznosila  $105 \pm 6$   $\mu\text{M}$  i time je veća od  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti spoja **2**, ali manja od svih ostalih sintetiziranih spojeva. Iz navedenog se može uočiti kako je konjugacija lanca masne kiseline sa triptaminom rezultirala smanjenjem antioksidativne aktivnosti, osim u slučaju spoja **2**, ukazujući na doprinos slobodne amino-skupine triptamina za inhibiciju radikala. Pretpostavka je da povećanoj antioksidativnoj aktivnosti spoja **2** doprinosi sustav konjugiranih dvostrukih veza retinoične kiseline. Retinoična kiselina spada u skupinu karotena kao

jakih antioksidansa prirodnog podrijetla kojima je najvažnija uloga u organizmu pružanje antioksidativnog odgovora i otpor oksidativnom stresu. (39) Zanimljivo je uočiti kako od svih strukturnih analoga, jedino spoj **2** postiže „plato“ inhibicijskog djelovanja pri koncentracijama većim od 250  $\mu\text{M}$  pokazujući obrazac djelovanja slično triptaminu i Trolox-u. Nadalje, iz razlike u  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti spoja **2** i granulatamida B može se pretpostaviti kako utjecaj na antiradikalnu aktivnost spojeva ima i duljina sustava dvostrukih veza. Dok granulatamid B koji je pokazao značajno slabiju aktivnost ima samo dvije konjugirane dvostruke veze, spoj **2** ima 4 konjugirane dvostruke veze. Dodatni prilog toj pretpostavci su morski karotenoidi fukoksantin i astaksantin (slika 2). Oni u svojoj strukturi posjeduju znatno dulji lanac dvostrukih konjugiranih veza od spoja **2** te su se u nekoliko ispitivanja pokazali kao iznimno jaki antioksidansi (9, 11).

Antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva **1-5** nije uspješno utvrđena DPPH esejom, što je suprotno rezultatima i zaključcima istraživanja u kojem je antioksidativna aktivnost N-masnih acil derivata 4,5-dimetoksi triptamina uspješno izmjerena DPPH esejom (40). Može se pretpostaviti da je postojeća razlika u strukturi spojeva **1-5** i spojeva sintetiziranih u spomenutom istraživanju dovoljno značajna, što posljedično ima utjecaj na uočenu slabiju inhibiciju DPPH• radikala. Također, jedan od potencijalnih razloga za slabiju inhibiciju DPPH• radikala je taj što se radi o dugotrajnom dušikovom radikalu, koji nema nikakve sličnosti s visoko reaktivnim i nestabilnim peroksilnim radikalima kao što je ABTS•<sup>+</sup> radikal. Mnogi antioksidansi koji brzo reagiraju sa peroksilnim radikalima, u ispitivanju DPPH esejom mogu reagirati sporo ili biti inertni. (29) Osim toga, važnu ulogu ima i ograničena sterička pristupačnost radikalnom centru DPPH• radikala zbog koje male molekule imaju bolji pristup radikalu i time viši antioksidativni kapacitet mjeren DPPH esejom. (41)

Antiproliferativna aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana je MTT esejom. Svi sintetizirani spojevi **1-5** pokazali su umjerenu antiproliferativnu aktivnost kao i granulatamid B. Nije uočena selektivnost prema određenoj staničnoj liniji izuzev spojeva **1** i **4** koji nisu djelovali na CFPAC-1 stanice dukalnog adenokarcinoma gušterače. Sam triptamin nije pokazao antiproliferativnu aktivnost prema tumorskim staničnim linijama iz čega se može zaključiti da je vezanje lanca nezasićene masne kiseline na triptamin dovelo do povećanja antiproliferativne aktivnosti i kao takvo je neophodno za postizanje uočene biološke aktivnosti. U prilog tome idu i rezultati antiproliferativnog ispitivanja slobodnih masnih kiselina pri čemu je djelovanje pokazala jedino retinoična kiselina, međutim slabije nego analog spoj **2**. Uočeno djelovanje može biti posljedica povećane lipofilnosti te poboljšane kompatibilnosti sa lipofilnim staničnim membranama i drugim staničnim komponentama. Tumorske stanice imaju potrebu za većim unosom prirodnih masnih kiselina koje koriste kao izvor energije i za opskrbu biokemijskim prekursorima u raznim procesima. Lipofilne bioaktivne molekule mogu sudjelovati u metabolizmu lipida i stoga mogu izbjeći hidrolizu i pokazati povećane interakcije sa staničnim membranama. (25) Spoj **2** je pokazao najveće antiproliferativno djelovanje, veoma slično granulatamidu B. Može se pretpostaviti da značajan utjecaj na jačinu antiproliferativnog djelovanja ima retinoična kiselina koju se koristilo pri sintezi spoja **2**, odnosno sustav konjugiranih dvostrukih veza. Naime, već se pokazala korisnom u farmaceutskom razvoju pri čemu su izomeri retinoične kiseline (tretinoin i izotretinoin) ispitivani za liječenje akni, akutne promijelocitne leukemije i neuroblastoma. (42, 43, 44) U već spomenutom ispitivanju antiproliferativnog učinka strukturno bliskih N-masnih acil derivata 4,5-dimetoksi triptamina, uočena je relativno slična antiproliferativna aktivnost, međutim jedina zajednička ispitana tumorska stanična linija je HepG2. (40) Dodatno, svi spojevi **1-5** pokazali su nepoželjan antiproliferativni učinak prema staničnoj liniji netransformiranih ljudskih

fibroblasta (HFF-1). Najslabiji učinak na HFF-1 stanice imao je spoj **5** zbog čega je on također potencijalno dobar kandidat (uz spoj **2**) za daljnju modifikaciju strukture u svrhu poboljšanja selektivnog djelovanja samo na tumorske stanice. Međutim, u prethodno spomenutom istraživanju gdje je određen antiproliferativni učinak strukturno sličnih spojeva korištena je HUVEC (normalne ljudske epitelne stanice pupčane vene) stanična linija kao kontrola. U tom je istraživanju prema HUVEC stanicama opažen mnogo slabiji antiproliferativni učinak u usporedbi sa HFF-1 stanicama u ovom slučaju. (40) Zbog navedene razlike u istraživanjima postoji mogućnost da antiproliferativni učinak na ne-tumorske stanice potencijalno ovisi i o tome koju se liniju zdravih stanica koristi kao kontrolu.

Konačno, spojevi **1**, **4** i **5** nisu imali citotoksičan učinak prema niti jednoj staničnoj liniji ( $LC_{50} > 100 \mu\text{m}$ ). Spoj **2** je pokazao blagi citotoksičan učinak prema svim staničnim linijama, a spoj **3** prema MCF-7, CFPAC-1 i HepG2 tumorskim staničnim linijama. Također, pretpostavka je da utjecaj na bolja antiproliferativna svojstva spojeva **1-5** može imati i prisutnost indolnog prstena te amidna veza koja je nastala konjugacijom kiseline i triptamina.

Veća odstupanja rezultata u nekim slučajevima mogu se pripisati niskoj razini sinkronizacije staničnog ciklusa, što je povezano s mogućnošću da faza staničnog ciklusa utječe na osjetljivost stanica raka na ispitivani spoj. (45)

## 6. ZAKLJUČAK

Za razliku od kopnenih, morski organizmi morali su se prilagoditi ekstremnom okolišu. Morski prirodni produkti sintetiziraju se u organizmu kao sekundarni metaboliti karakteristični po adaptivnoj, obrambenoj, signalnoj ili nekoj drugoj ulozi. Izvor su brojnih biološki aktivnih spojeva zbog čega je *bioprospecting* mora važan za doprinos farmaceutskoj industriji. Spojevi izolirani iz koralja *Eunicella sp.* mogu se klasificirati u tri skupine: terpenoidi, steroli te alkalodi i nukleozidi. Jedan od tih spojeva je indolni alkaloid granulatamid B. S obzirom da je indolni prsten prepoznat kao farmakološki važna struktura, sintetizirano je pet strukturnih analoga granulatamida B. Spojevi su sintetizirani konjugacijom triptamina i nezasićenih masnih kiselina s ciljem nastanka amidne veze te su potom evaluirana njihova antioksidativna i antiproliferativna svojstva. Antioksidativna svojstva sintetiziranih spojeva su ispitana ABTS i DPPH esejima. Iz rezultata dobivenih ABTS esejom može se zaključiti kako jedino N-retinoiltriptamin (spoj **2**) pokazuje antioksidativna svojstva uz pretpostavku da veliki utjecaj ima sustav konjugiranih dvostrukih veza retinoične kiseline. Suprotno tome, DPPH esejom nisu utvrđena antioksidativna svojstva. Mogući razlog je sterička zaklonjenost DPPH• radikala zbog koje relativno velike molekule (spojevi **1-5**) nisu dolazile u povoljan položaj za ostvarivanje reakcije s radikalom. Antiproliferativna svojstva su ispitana MTT esejom. Svi sintetizirani spojevi su pokazali inhibitorni učinak prema staničnim linijama, među kojima je najaktivniji bio spoj **2**. Uzimanjem u obzir najmanji antiproliferativni učinak spoja **5** na zdrave stanice, odnosno najistaknutiji antiproliferativni te citotoksičan učinak spoja **2**, ta dva strukturna analoga granulatamida B najviše obećavaju te je njihovu strukturu potrebno dalje prilagođavati u svrhu poboljšavanja bioaktivnosti.



## 7. LITERATURA:

1. Hu, G.P.; Yuan, J.; Sun, L.; She, Z.G.; Wu, J.H.; Lan, X.J.; Zhu, X.; Lin, Y.C.; Chen, S.P. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*. 2011;9:514-525.
2. Kumar, Jha R.; Zi-rong, X. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Marine Drugs*. 2004, 2, 123-146.
3. Donia, M.; Hamann, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet*. 2003; 3: 338–48
4. Bhatia, P.; Chugh, A. Role of marine bioprospecting contracts in developing access and benefit sharing mechanism for marine traditional knowledge holders in the pharmaceutical industry. *Global Ecology and Conservation*. 2015; 3: 176-187.
5. Shinde, P.; Banerjee, P.; Mandhare, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2019.
6. Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Raja, S.S.S.; Vijayakumar, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites [Internet]. *Secondary Metabolites – Sources and Applications 2018* [Cited 2021 June 12]. Available at: doi: 10.5772/intechopen.79766.
7. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 2017:8416763.
8. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55–74.

9. Shahidi, F.; Zhong, Y. Antioxidants from marine by-products. Maximising the Value of Marine By-Products. Woodhead Publishing Limited. 2006; 1: 397–412.
10. Sztretye, M.; Dienes, B.; Gönczi, M.; Czirják, T.; Csernoch, L.; Dux, L.; Szentesi, P.; Keller-Pintér, A. Astaxanthin: A Potential Mitochondrial-Targeted Antioxidant Treatment in Diseases and with Aging. Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019; 11;2019:3849692.
11. Miyashita, K. Marine antioxidants. Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods. 2014; 1: 219–235. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118855102.ch8>
12. Nigam, M.; Suleria, H.A.R.; Farzaei M.H.; Mishra A.P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019; 27(1):491–515.
13. Desai, A.; Yan, Y.; Gerson, S.L. Advances in therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer. DNA Repair. 2018; 66-67:24-29.
14. Rocha, D.H.A.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A. Seaweed Secondary Metabolites In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. Marine Drugs. 16(11):410.
15. Nigam, M.; Suleria, H.A.R.; Farzaei, M.H.; Mishra, A.P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019; 27:491–515.
16. Angiolillo, M.; Canese, S. Deep Gorgonians and Corals of the Mediterranean Sea. In Corals in a Changing World; Duque Beltran, C., Tello Camacho, E., Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2018; (3)29–49.
17. Matulja, D.; Kolympadi Marković M.; Ambrožić, G.; Leclef, S.; Kraljević Pavelić, S.; Marković, Dean. Secondary Metabolites from Gorgonian Corals of the Genus Eunicella: Structural Characterizations, Biological Activities, and Synthetic Approaches. Molecules. 2020; 25(1):129.

18. Cánovas-Molina, A. et al. From depth to regional spatial genetic differentiation of *Eunicella cavolini* in the NW Mediterranean. *Comptes Rendus Biologies*. 2018; (341):421-432.
19. Qi, S.-H. Bioactive Compounds from Marine Gorgonian Corals. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2012, 38: 325-351.
20. Netz, N.; Opatz, Till. Marine Indole Alkaloids. *Marine drugs*. 2015; 13, 4814-4914.
21. Kurek, J. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life [Internet]. *Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life*. 2019 [Cited: 2021 July 25]. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/66742>.
22. Tryptamine [Internet]. PubChem. [Cited: 2021 July 25]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptamine>.
23. Marković, K. M.; Marković, D.; Laclef, S. Amide Synthesis by Transamidation of Primary Carboxamides. *Synthesis*. 2020; 52(21): 3231-3242.
24. Selvaraj, J. Fatty Acids and Their Analogues as Anticancer Agents. *Fatty Acids*. 2017; 71-86.
25. Jóźwiak, M.; Filipowska, A.; Fiorino F.; Struga M. Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives. *European Journal of Pharmacology*. 2020; 15; 871: 172937.
26. Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(5):957-98.
27. Shalaby, E.A.; Shanab, S.M.M.; Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Marine Sciences*. 2013;42(5):556-64.

28. Becker, M.M.; Nunes, G.S.; Ribeiro, D.B.; Silva, F.E.P.S.; Catanante, G.; Marty, J.-L. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *The Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019;30(5):1108–14.
29. Huang, D.; Boxin, O.U.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(6):1841–56.
30. Van Meerloo, J.; Kaspers, G.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 2011;731(2nd):237–45.
31. Bahuguna, A.; Khan, I.; Bajpai, V.K.; Kang, S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2):115–8.
32. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(6):469–71.
33. Sun, C.-L.; Furstner, A. Formal Ring-Opening/Cross-Coupling Reactions of 2-Pyrones: Iron-Catalyzed Entry into Stereodefined Dienyl Carboxylates. *Angewandte Chemie*. 2013; 52, 13071 – 13075.
34. Sang, V. T. et al. Coral and Coral-Associated Microorganisms: A Prolific Source of Potential Bioactive Natural Products. *Marine Drugs*. 2019; 11;17(8):468.
35. Samorì, C.; Costantini, F.; Galletti, P.; Tagliavini, E.; Abbiati, M. Inter- and Intraspecific Variability of Nitrogenated Compounds in Gorgonian Corals via Application of a Fast One-Step Analytical Protocol. *Chemistry & Biodiversity*. 2018; 15, e1700449.
36. Chen, C.-Y.; Chang, F.-R.; Teng, C.-M.; Wu, Y.-C. Cheritamine, A New N-Fatty Acyl Tryptamine and Other Constituents from the Stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 1999; 46(1), 77–86.

37. Wu, Y.-C.; Chang, F.-R.; Chen, C.-Y. Tryptamine-Derived Amides and Alkaloids from the Seeds of *Annona atemoya*. *Journal of Natural Products*. 2005; 68(3), 406–408.
38. Chang, C. T.; Kao, C. L.; Yeh, H. C.; Fang, Z. Y.; Li, H. T.; Chen, C. Y. A New N-Fatty Acyl Tryptamine from *Annona atemoya*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2020; (56), 1100-1101.
39. Galasso, C.; Corinaldesi, C.; Sansone, C. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants*. 2017; 6(4), 96.
40. Venepally, V. et al. Synthesis and biological evaluation of some new N-fatty acyl derivatives of 4,5-dimethoxy tryptamine. *Indian J. Chem. -Section B*. 2017; 56B, 531–541.
41. Pyrzynska, K.; Pekal, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*. 2013; 5, 4288-4295.
42. Huang, M. E.; Ye, Y. C.; Chen, S. R.; Chai, J. R.; Lu, J. X.; Zhao, L.; Gu, L. J.; Wang, Z.Y. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1988; 72 (2): 567-572.
43. Tivnan, A. Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics. 2016; (11): p123-126.
44. Matthay, K. K. et al. Treatment of High-Risk Neuroblastoma With Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, And 13-Cis-Retinoic Acid. *The New England Journal of Medicine*. 1999; (341) 1165-1173.
45. Wyld, L.; Smith, O.; Lawry, J.; Reed, M.W.R.; Brown, N.J. Cell cycle phase influences tumour cell sensitivity to aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in vitro. *Br. J. Cancer* 1998, 78, 50–55, doi:10.1038/bjc.1998.441.

## 8. DODATAK

### Sinteza N-arahidonoiltriptamina (1)

Naziv spoja **1** prema IUPAC-u: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-ikoza-5,8,11,14-tetraenamid.

Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i arahidonske kiseline (91,34 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena *flash* kromatografijom. Dobiveni produkt je blijedo-žuta krutina (85,7 mg, 63,96%).

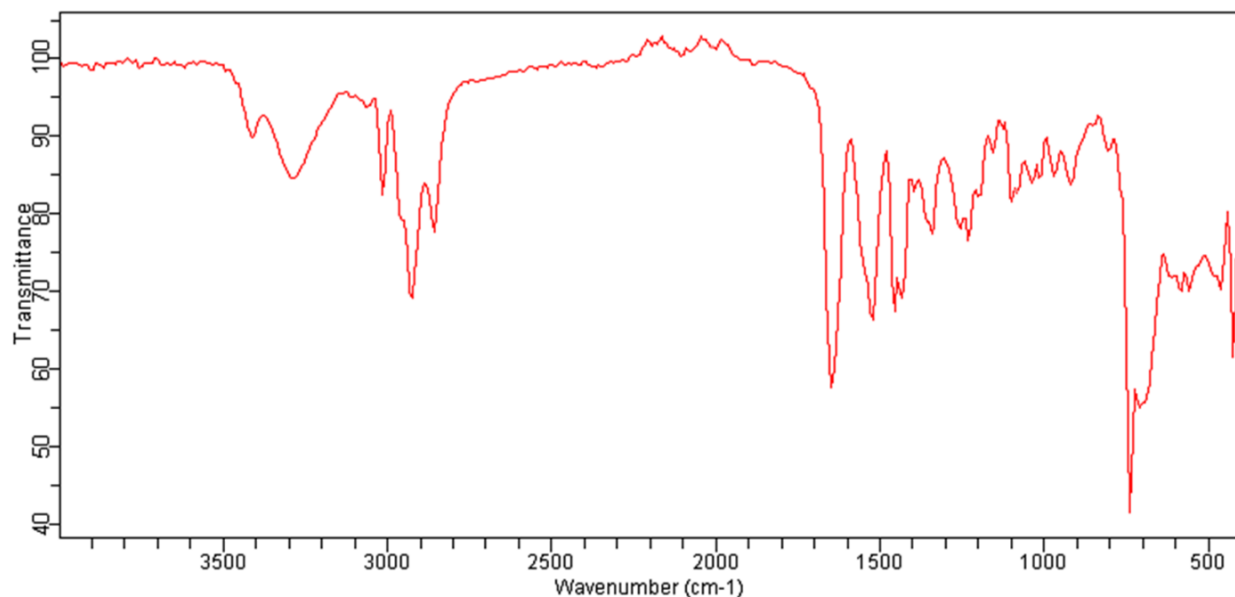
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,89 (t, J = 6,2 Hz, 3H), 1,34 (m, 6H), 1,69 (m, 2H), 2,08 (m, 6H), 2,80 (m, 6 H), 2,98 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,60 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 5,36 (m, 8H), 5,49 (br.s, 1H), 6,98 (s, 1H), 7,13 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 8,08 Hz, 1H), 8,13 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14,03; 22,54; 24,91; 25,38; 25,50; 25,62; 26,66; 27,21; 29,28; 31,47; 31,47; 36,18; 39,66; 111,21; 113,13; 118,71; 119,51; 121,92; 122,24; 127,32; 127,50; 127,84; 128,17; 128,57; 128,66; 128,66; 129,12; 130,49; 136,41; 172,69

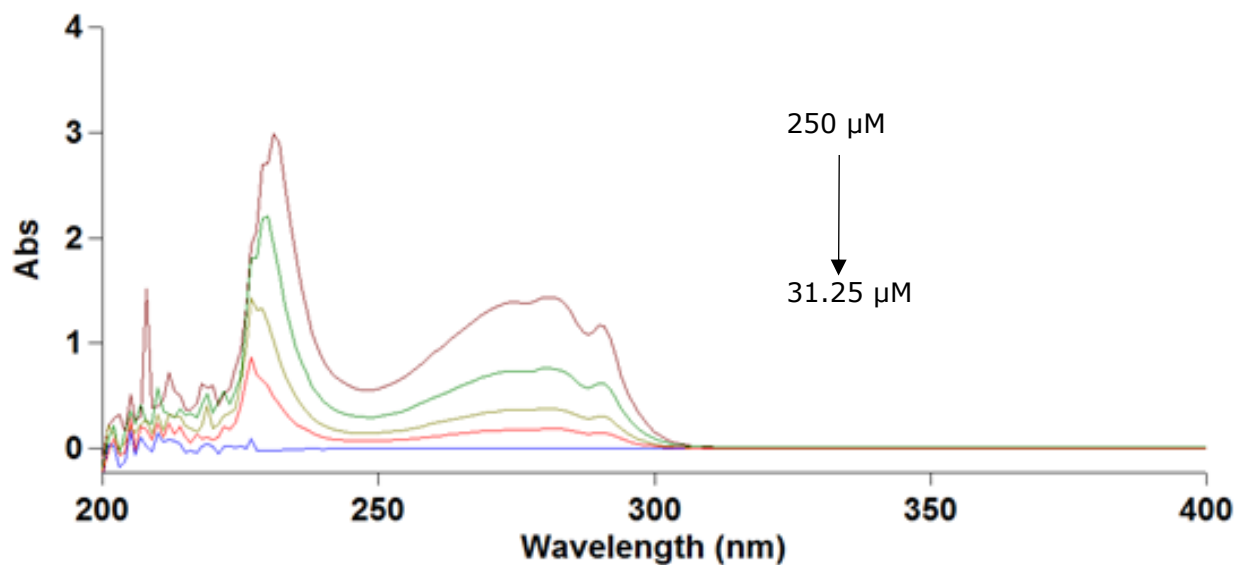
IR: 3412, 3285, 3017, 2928, 2861, 1655, 1528, 1461, 1349, 1260, 1104, 1044, 925, 746, 717, 590, 471, 434 cm<sup>-1</sup>

ESI-MS:  $m/z = 469, 447 ([M+H]^+), 326, 282, 235, 144, 110$

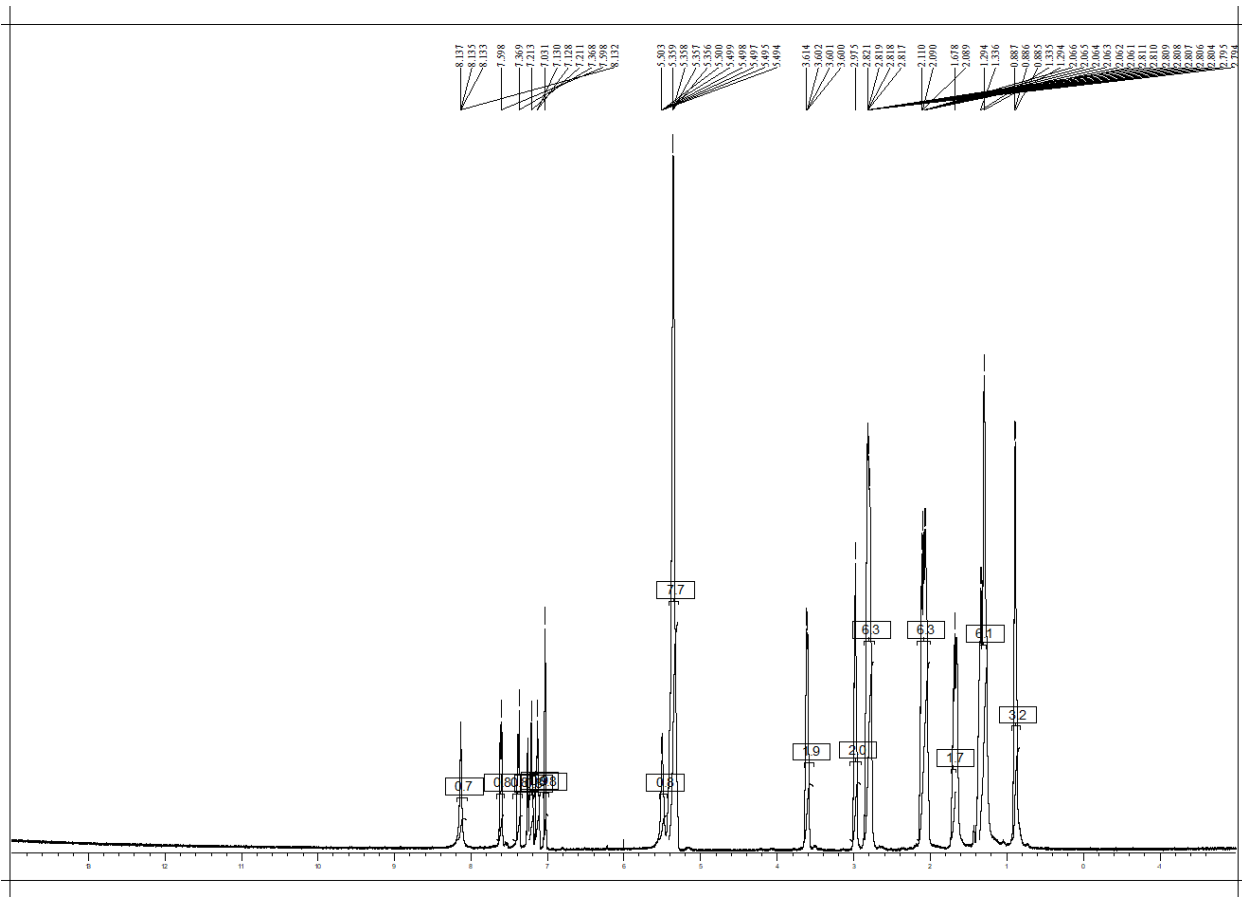
UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm} (\log \epsilon) = 228 (4,24), 280 (3,79), 290 (3,68)$



**Prilog 1.** Spektar spoja **1** dobiven IR spektroskopijom.

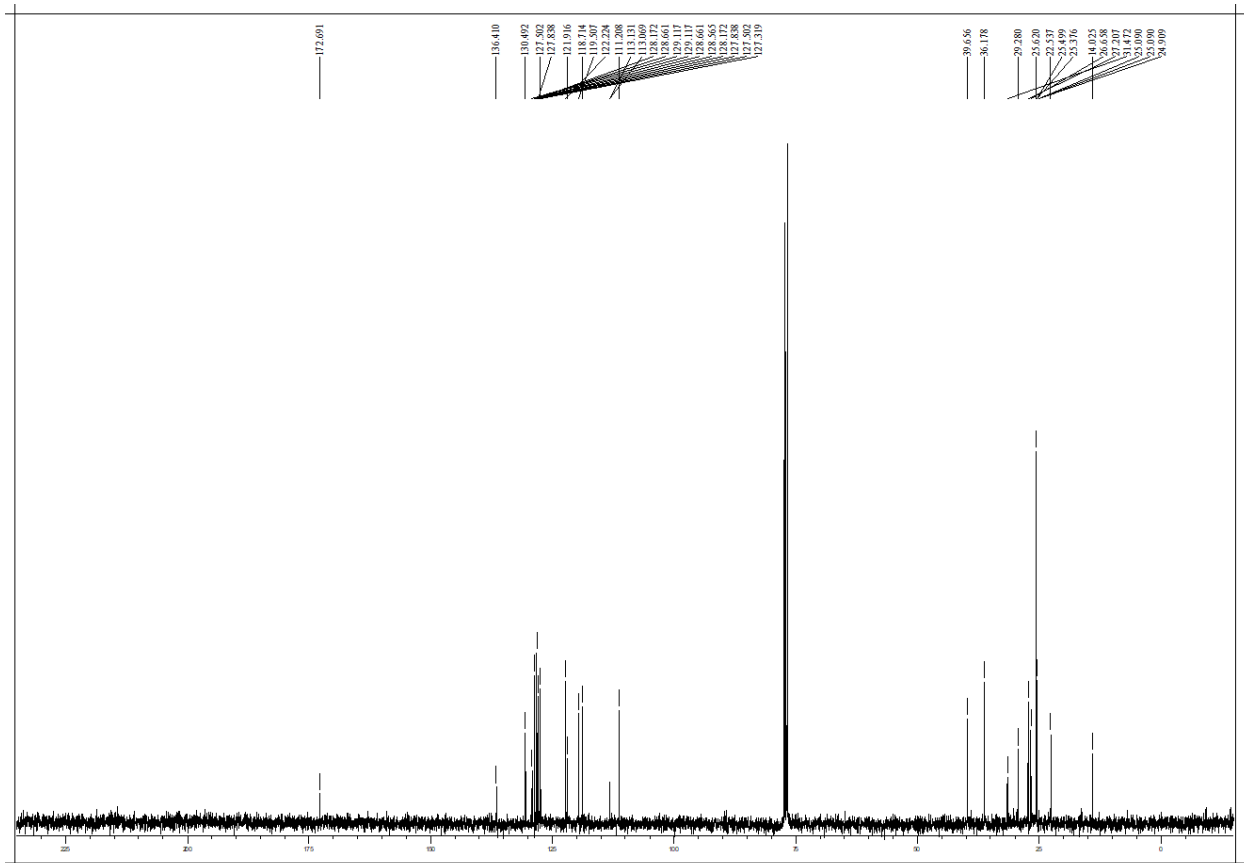


**Prilog 2.** Spektar spoja **1** dobiven UV-Vis spektrofotometrijom (koncentracijski raspon 31.25 – 250  $\mu\text{M}$ ).

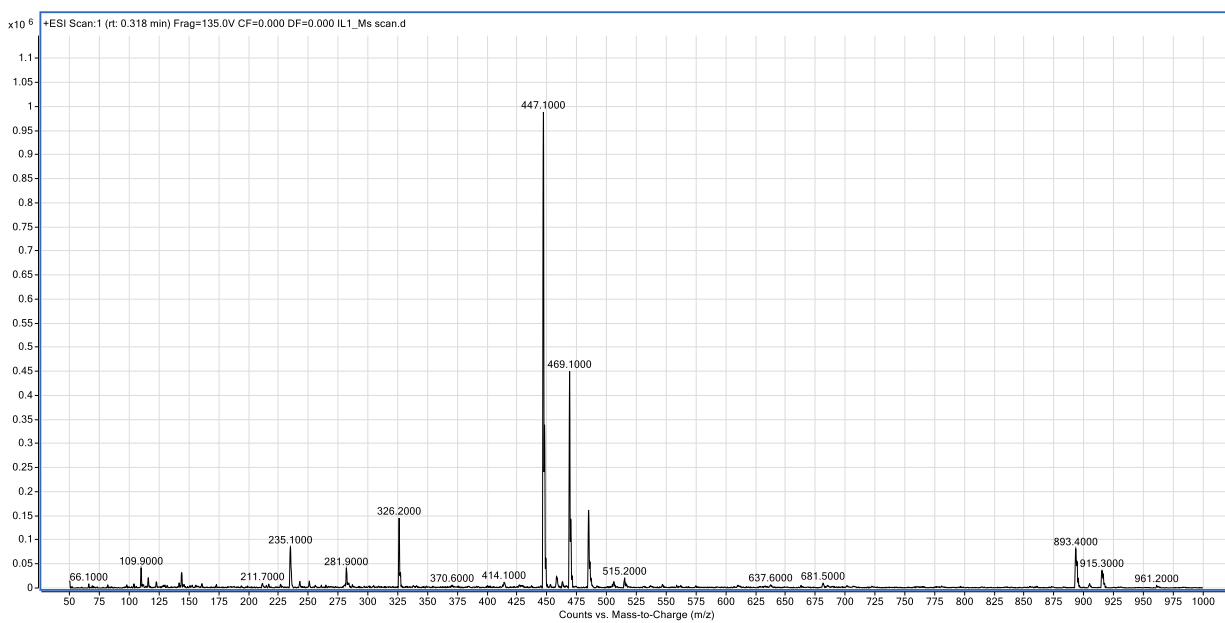


**Prilog 3.** Spektar spoja **1** dobiven  $^1\text{H}$  NMR-om.





**Prilog 4.** Spektar spoja **1** dobiven  $^{13}\text{C}$  NMR-om.



**Prilog 5.** Spektar spoja **1** dobiven MS (QQQ) metodom.

## Sinteza N-retinoiltriptamina (2)

Naziv spoja **2** prema IUPAC-u: (2E,4E,6E,8E)-N-(2-(1H-indol-3-il)etil)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamid.

Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i retinoične kiseline (90,1 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena *flash* kromatografijom. Dobiveni produkt je krutina (prah) žute boje (109,5 mg, 82,45%).

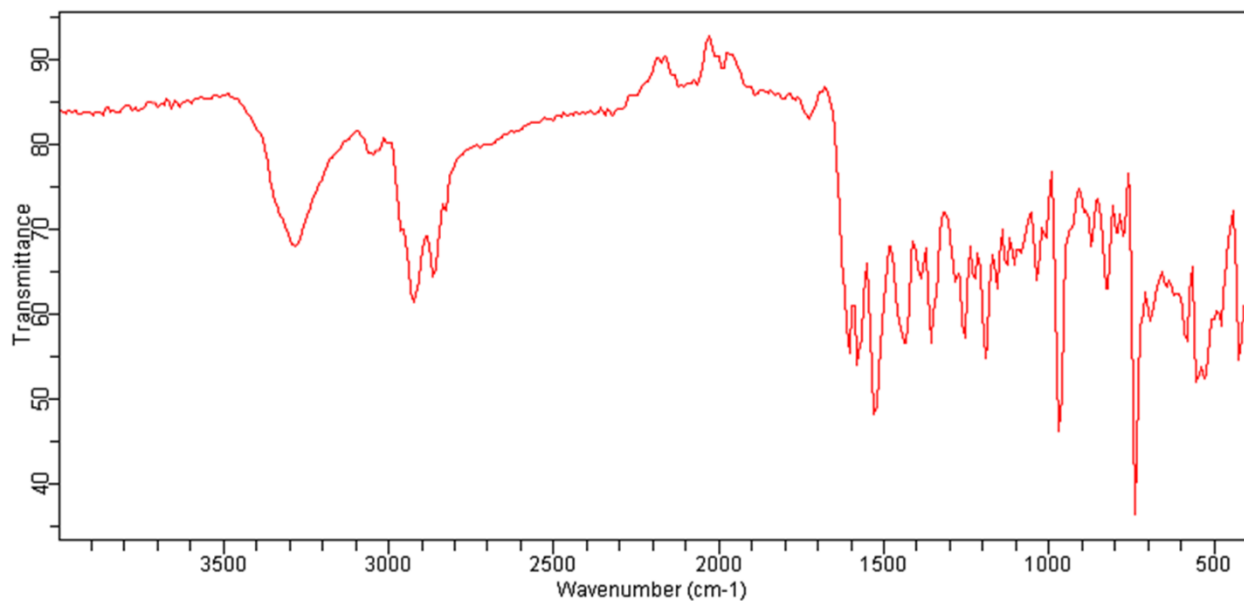
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,03 (s, 6H), 1,48 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 2,01 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,36 (s, 3H), 3,00 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,66 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 5,56 (s, 2H), 6,12 (m, 2H), 6,22 6,26 (s, 1H), (d, J = 8,9 Hz, 1H), 6,90 (dd, 1H), 7,04 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,13 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,18 (br.s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12,83; 13,56; 19,23; 21,69; 25,41; 28,93; 28,93; 33,08; 34,25; 39,56; 39,62; 111,21; 113,15; 118,76; 118,77; 119,47; 122,05; 122,16; 127,37; 128,14; 129,58; 129,73; 129,73; 135,55; 136,42; 137,30; 137,74; 138,59; 148,32; 167,04

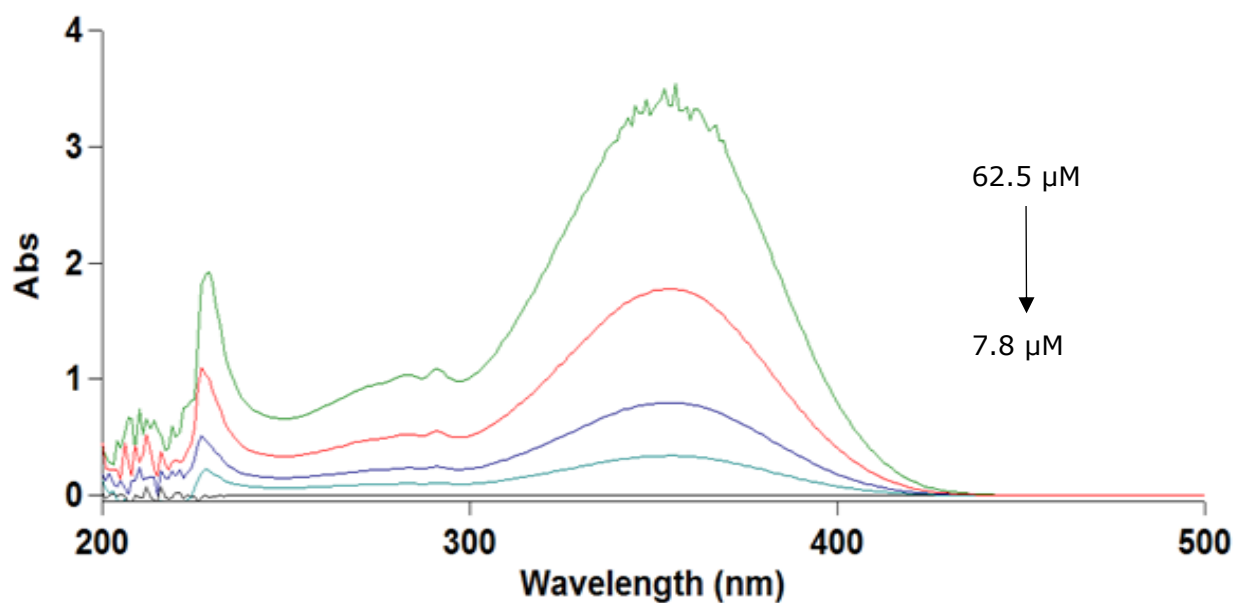
IR: 3285, 3047, 2928, 2868, 1610, 1536, 1439, 1394, 1364, 1290, 1260, 1230, 1201, 1163, 1134, 1044, 977, 828, 746, 702, 590, 560, 486, 434 cm<sup>-1</sup>

ESI-MS: *m/z* = 481, 443 ([M+H]<sup>+</sup>), 326, 282, 233, 144, 110

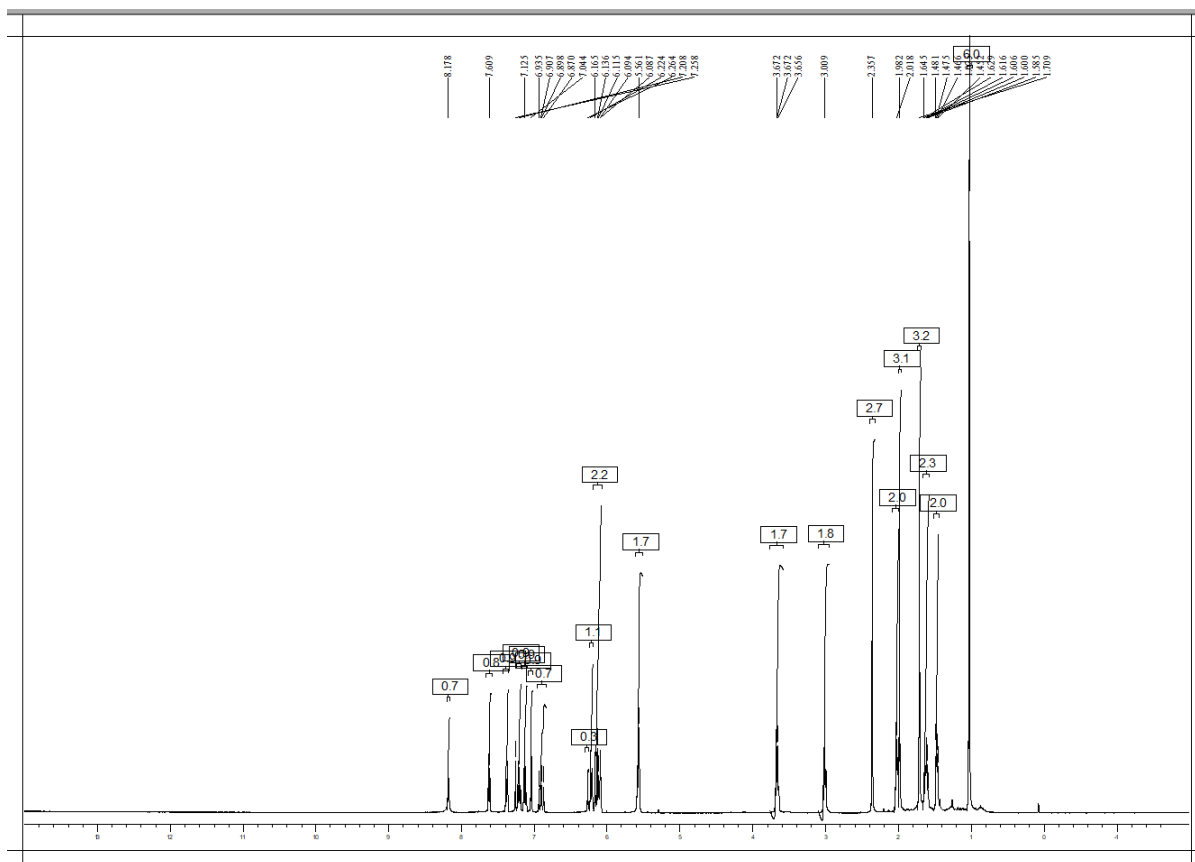
UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub>/nm (log ε) = 228 (4,54), 280 (4,21), 290 (4,23)



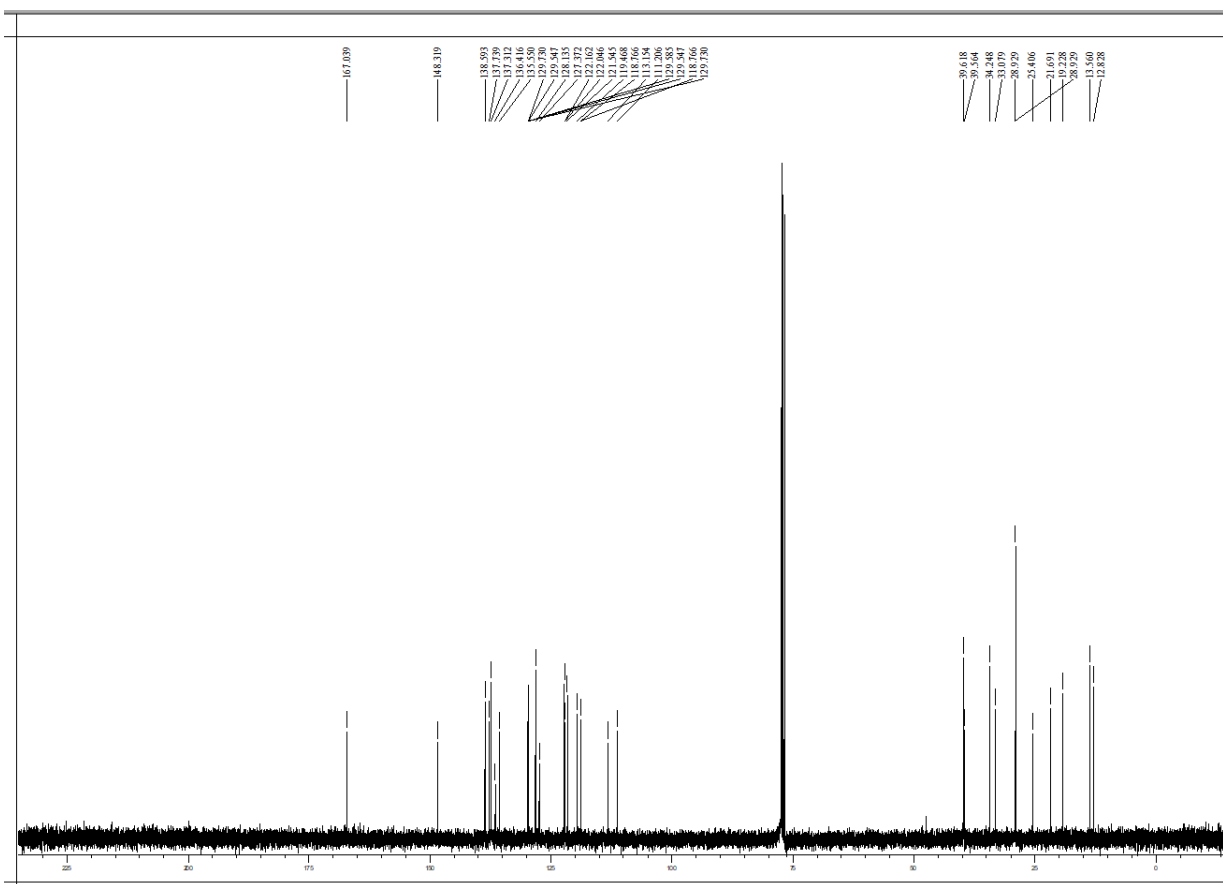
**Prilog 6.** Spektar spoja **2** dobiven IR spektroskopijom.



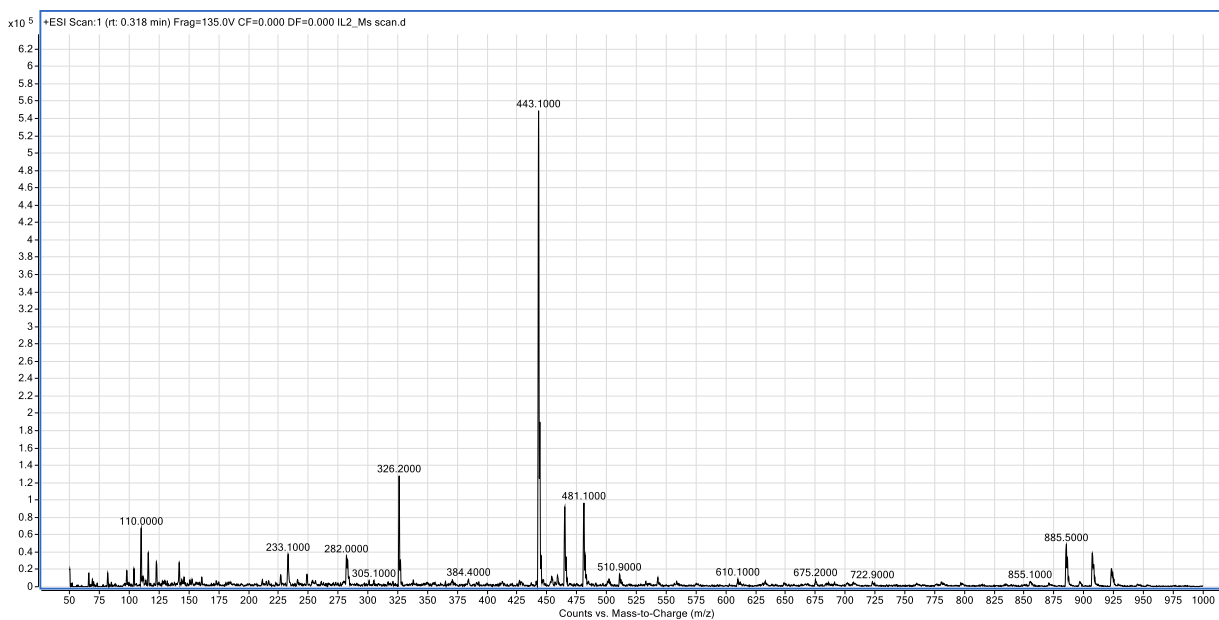
**Prilog 7.** Spektar spoja **2** dobiven UV-Vis spektrofotometrijom (koncentracijski raspon 7.8 – 62.5 μM).



**Prilog 8.** Spektar spoja **2** dobiven  $^1\text{H}$  NMR-om.



**Prilog 9.** Spektar spoja **2** dobiven  $^{13}\text{C}$  NMR-om.



**Prilog 10.** Spektar spoja **2** dobiven MS (QQQ) metodom.

### Sinteza N-palmitoleoiltriptamina (3)

Naziv spoja **3** prema IUPAC-u: (Z)-N-(2-(1H-indol-3-il)etil)heksadek-9-enamid.

Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i palmitoleinske kiseline (76,3 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena *flash* kromatografijom. Dobiveni produkt je krutina svijetlo žute boje (75,3 mg, 63,3%).

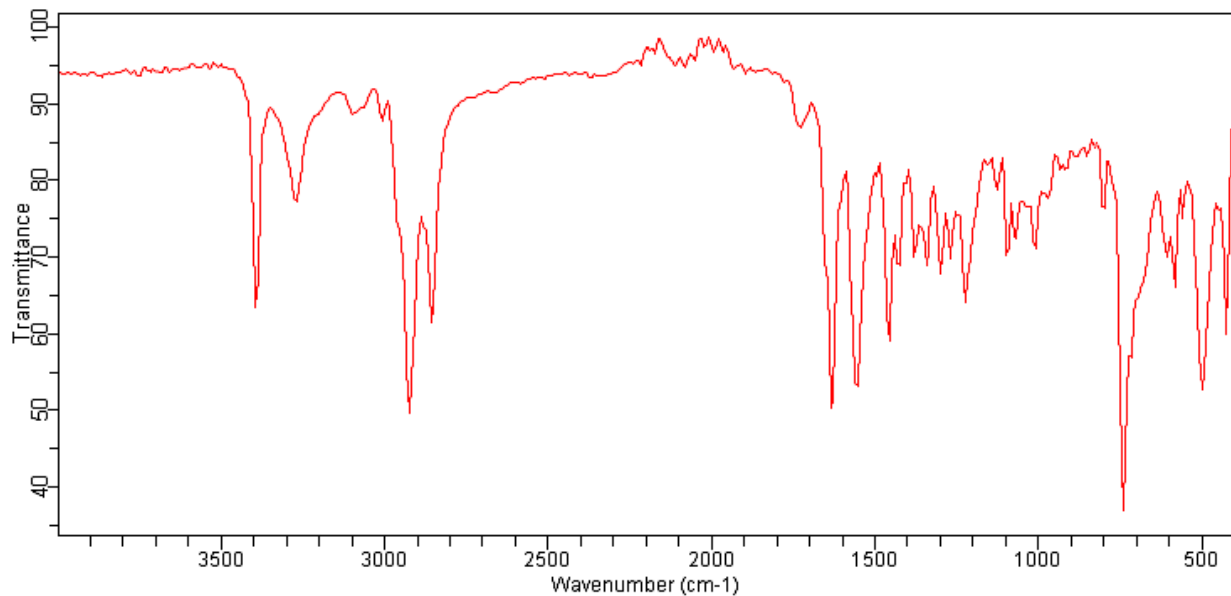
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,27 (m, 16H), 1,58 (m, 2H), 2,00 (m, 4H), 2,09 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,98 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,60 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 5,35 (m, 2H), 5,50 (br.s, 1H), 7,03 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,13 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,20 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,14 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14,06; 22,62; 25,36; 25,70; 27,15; 27,21; 28,95; 29,10; 29,22; 29,24; 29,67; 29,70; 31,75; 36,88; 39,64; 111,21; 113,14; 118,72; 119,48; 121,93; 122,20; 127,38; 129,75; 129,97; 136,41; 173,04

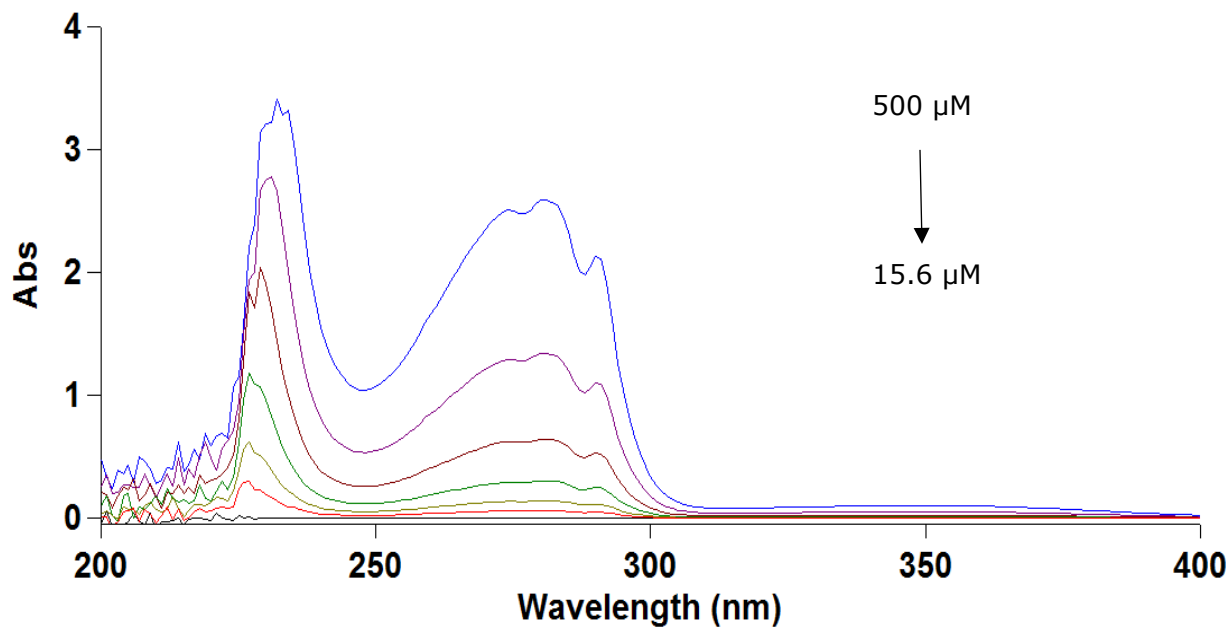
IR: 3397, 3270, 3099, 3010, 2928, 2861, 1640, 1553, 1461, 1431, 1387, 1349, 1305, 1275, 1230, 1134, 1104, 1074, 1014, 977, 940, 806, 746, 612, 508, 434 cm<sup>-1</sup>

ESI-MS: m/z = 419, 397 ([M+H]<sup>+</sup>), 326, 282, 210, 144

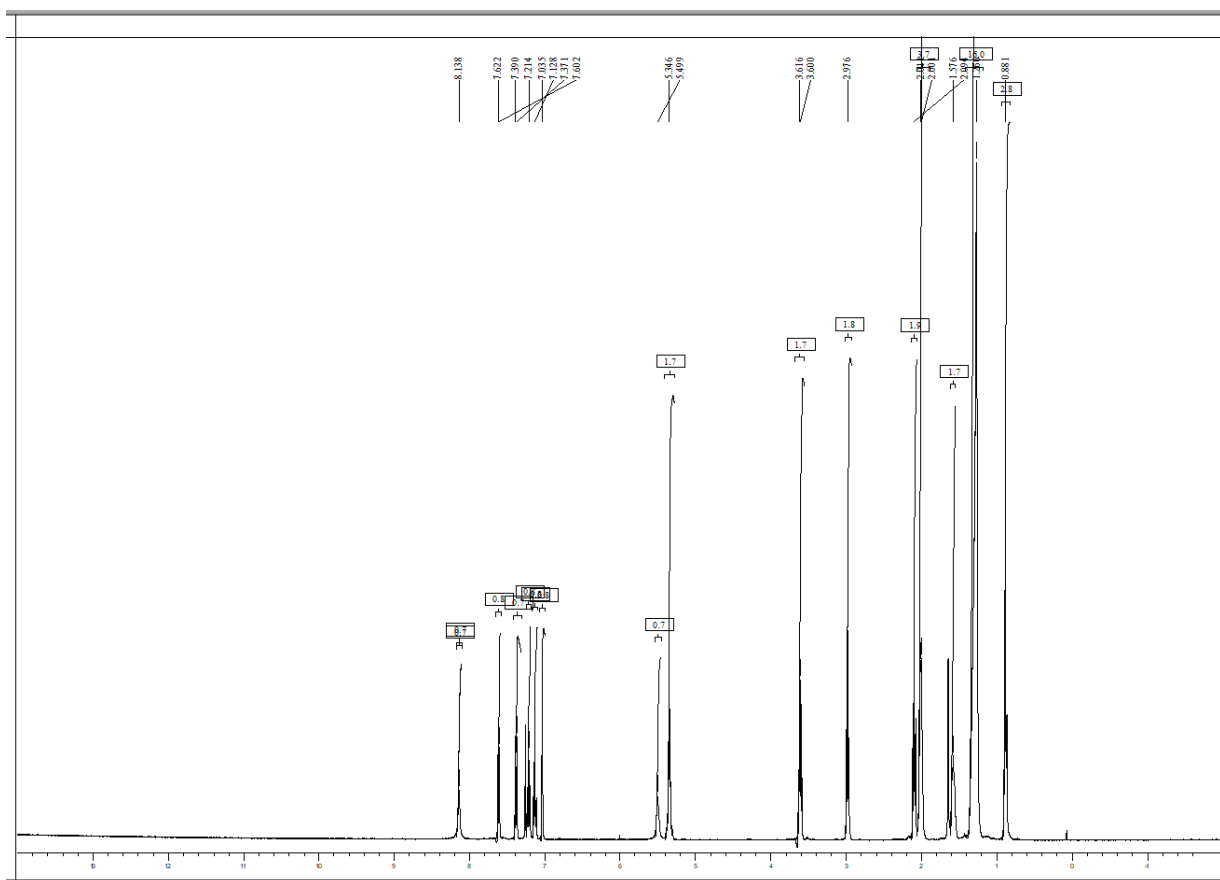
UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub>/nm (log ε) = 228 (4,19), 280 (3,70), 290 (3,62)



**Prilog 11.** Spektar spoja **3** dobiven IR spektroskopijom.

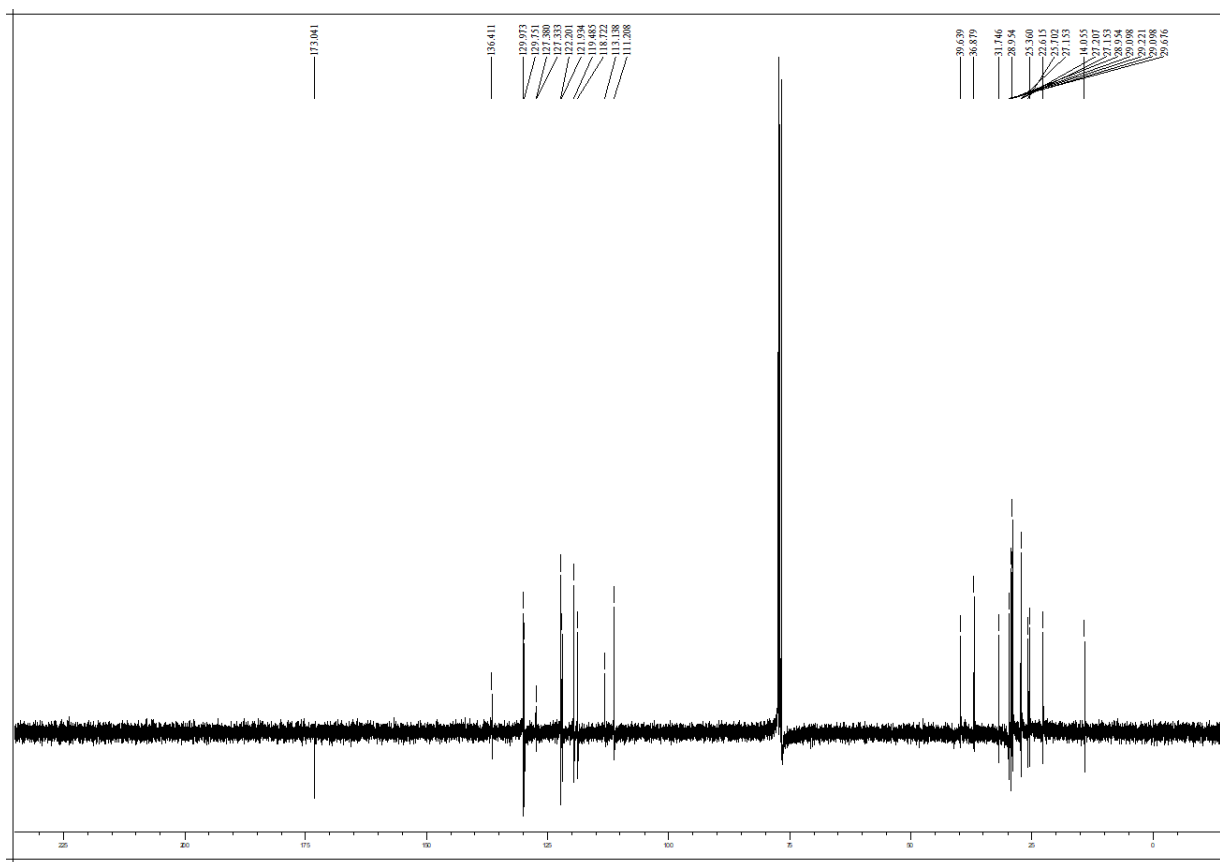


**Prilog 12.** Spektar spoja **3** dobiven UV-Vis spektrofotometrijom (koncentracijski raspon 15.6 – 500 μM).

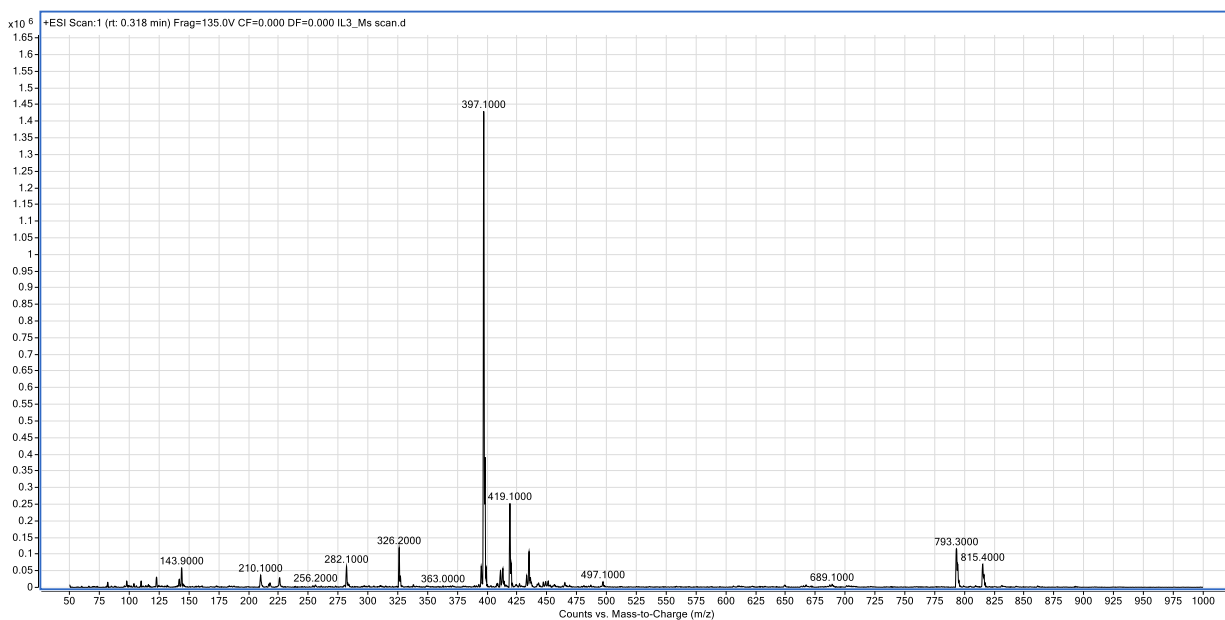


**Prilog 13.** Spektar spoja **3** dobiven  $^1\text{H}$  NMR-om.





**Prilog 14.** Spektar spoja **3** dobiven  $^{13}\text{C}$  NMR-om.



**Prilog 15.** Spektar spoja **3** dobiven MS (QQQ) metodom.

## Sinteza N-oleoiltriptamina (4)

Naziv spoja **4** prema IUPAC-u: (Z)-N-(2-(1H-indol-3-il)etil)oktadek-9-enamid.

Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i oleinske kiseline (84,7 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena *flash* kromatografijom. Dobiveni produkt je krutina svijetlo žute boje (101,1 mg, 79,4%)

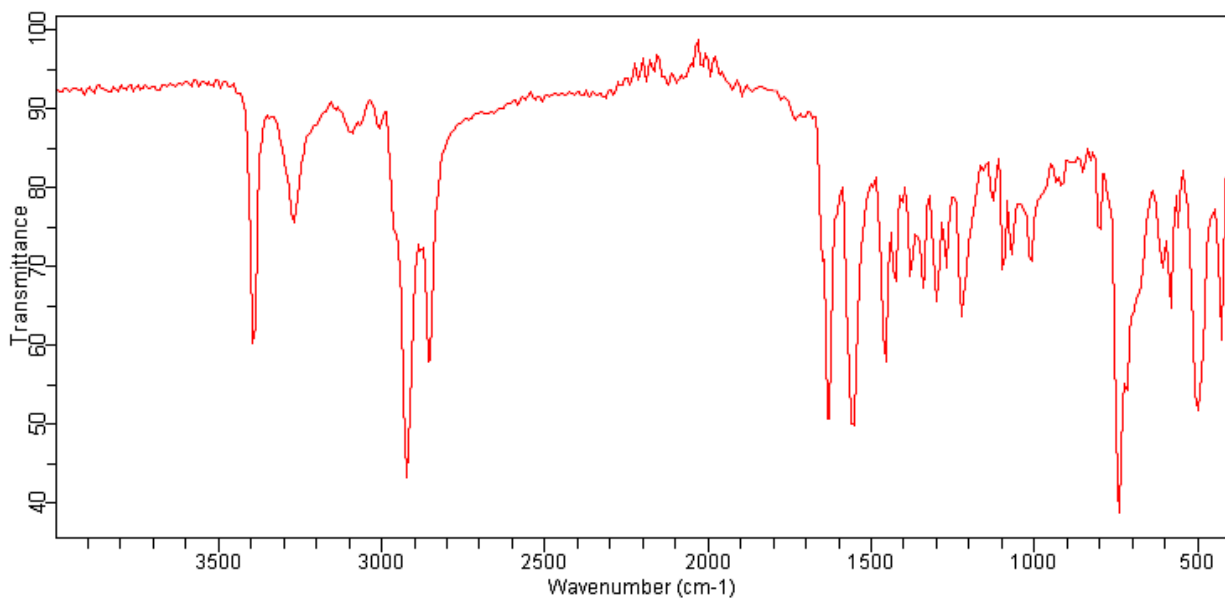
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,30 (m, 20H), 1,57 (m, 2H), 2,01 (m, 4H), 2,09 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,98 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,60 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 5,34 (m, 2H), 5,48 (br.s, 1H), 7,04 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,13 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14,06; 22,64; 25,37; 25,69; 27,15; 27,20; 29,10; 29,22; 29,24; 29,27; 29,29; 29,48; 29,66; 29,74; 31,87; 36,87; 39,62; 111,18; 113,20; 118,73; 119,51; 121,89; 122,22; 127,38; 129,74; 129,97; 136,40; 173,00

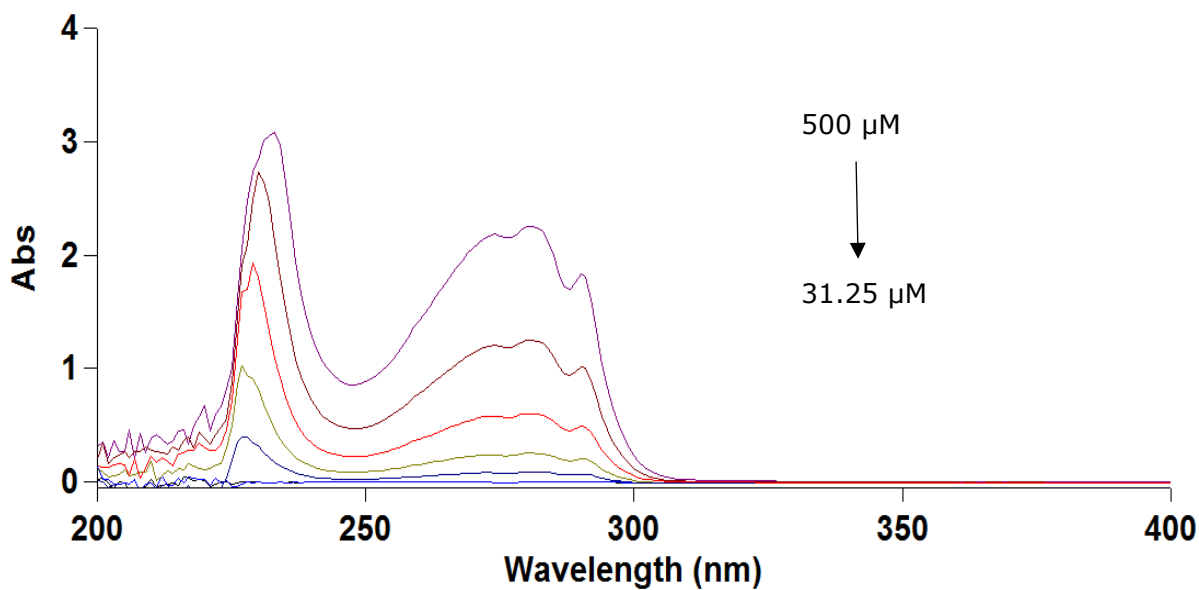
IR: 3397, 3270, 3091, 3010, 2928, 2861, 1632, 1558, 1461, 1431, 1387, 1349, 1305, 1275, 1230, 1134, 1104, 1074, 1014, 925, 858, 806, 746, 612, 508, 434 cm<sup>-1</sup>

ESI-MS: m/z = 447, 425 ([M+H]<sup>+</sup>), 399, 326, 282, 232, 144, 123

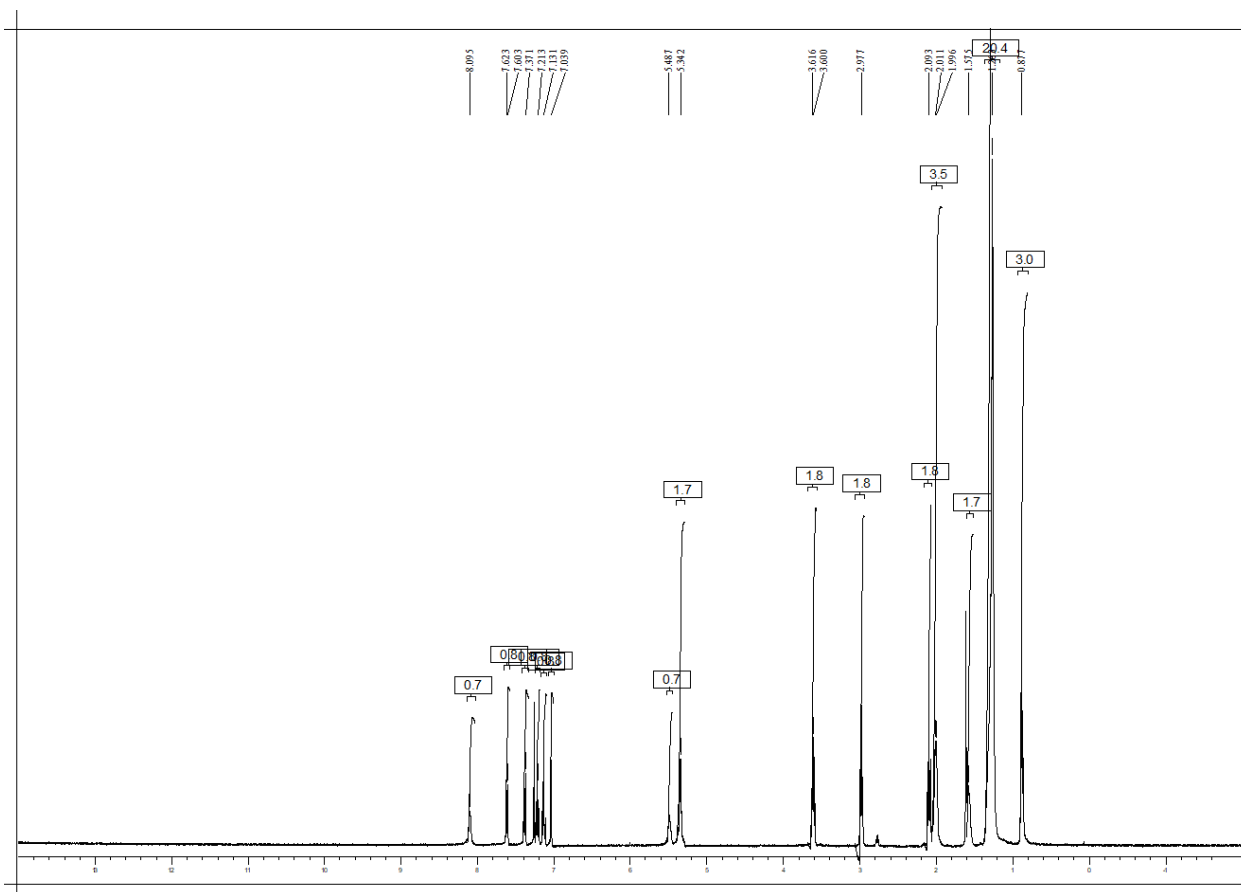
UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub>/nm (log ε) = 228 (4,17), 280 (3,66), 290 (3,59)



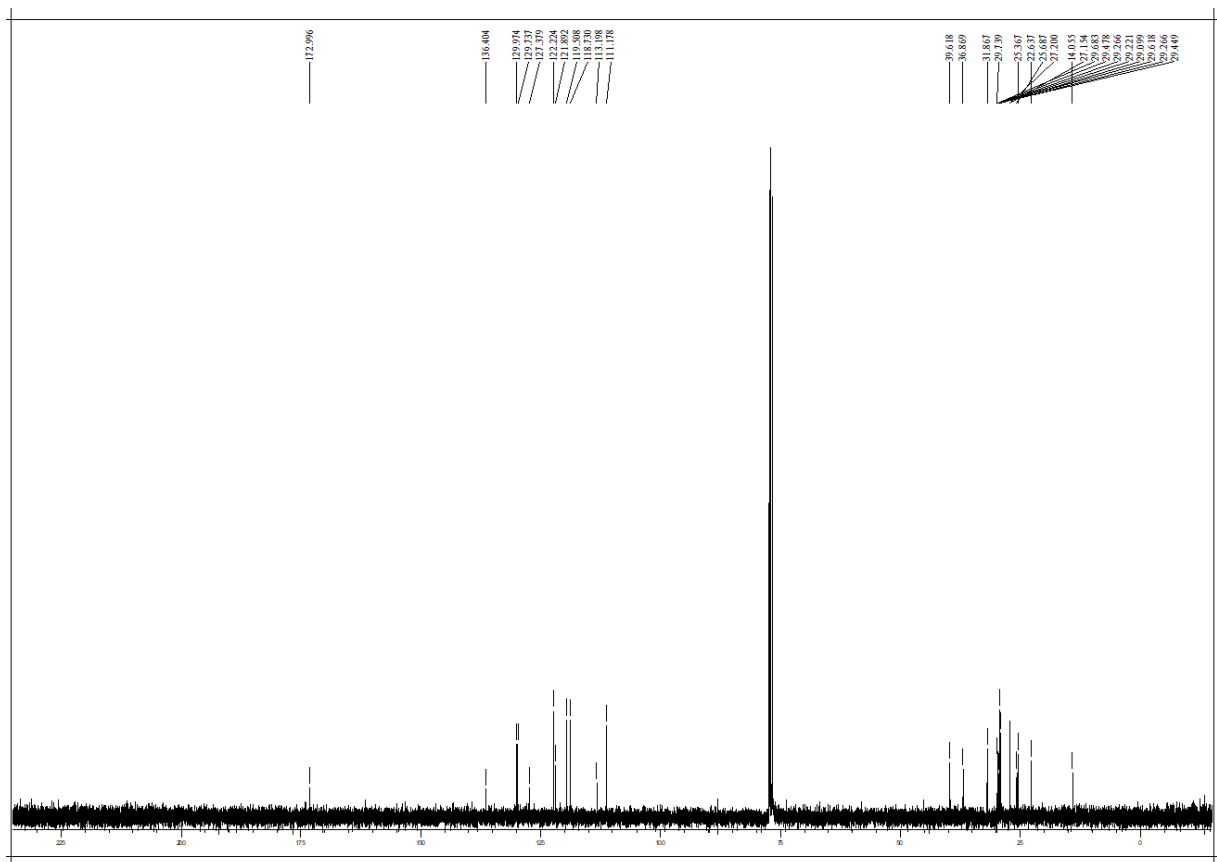
**Prilog 16.** Spektar spoja **4** dobiven IR spektroskopijom.



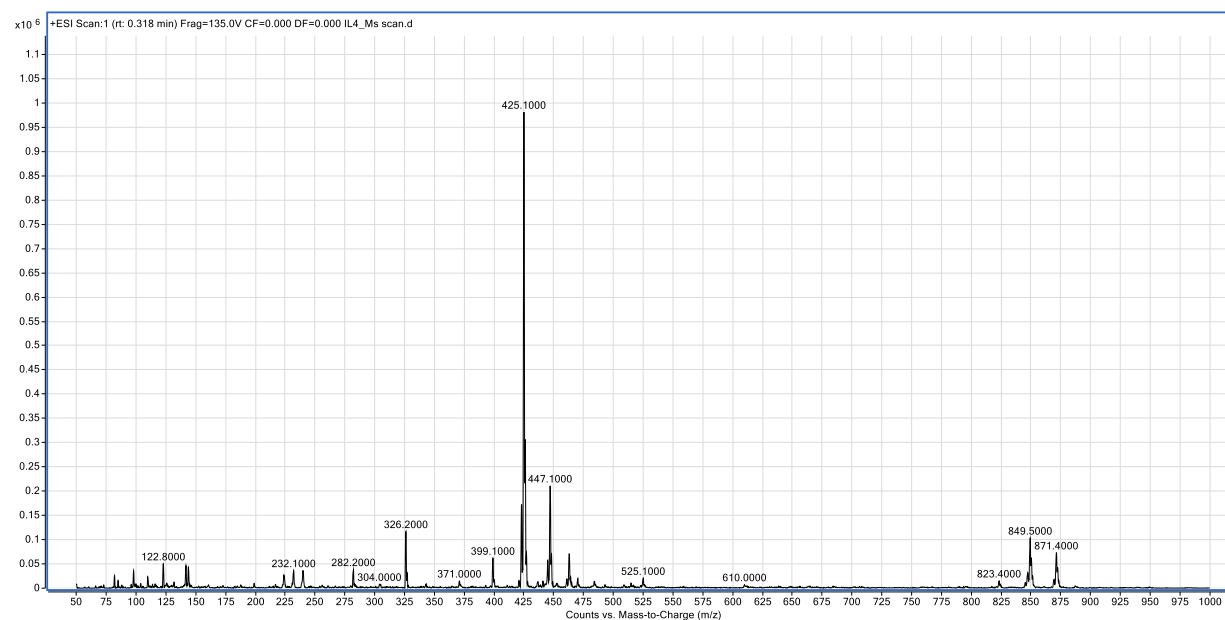
**Prilog 17.** Spektar spoja **4** dobiven UV-Vis spektrofotometrijom (koncentracijski raspon 31.25 – 500 μM).



**Prilog 18.** Spektar spoja **4** dobiven  $^1\text{H}$  NMR-om.



**Prilog 19.** Spektar spoja **4** dobiven  $^{13}\text{C}$  NMR-om.



**Prilog 20.** Spektar spoja **4** dobiven MS (QQQ) metodom.

## Sinteza N-alfa-linolenoiltriptamina (5)

Naziv prema IUPAC-u: (9Z,12Z,15Z)-N-(2-(1H-indol-3-il)etil)oktadeka-9,12,15-trienamid.

Trietilamin (45,5 mg, 0,45 mmol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (44,6 mg, 0,33 mmol) i EDC·HCL (86,3 mg, 0,45 mmol) su dodani otopini triptamina (52,8 mg, 0,33 mmol) i alfa-linolenske kiseline (83,5 mg, 0,30 mmol) u dimetilformamidu (0,3 mL) i diklormetanu (5 mL). Smjesa je miješana tokom noći prije uparavanja otapala. Zaostalom talogu je dodana voda (15 mL) te je ekstrahiran etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski slojevi su isprani sa vodenom otopinom limunske kiseline (5%, 3 x 20 mL), zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL) te BRINE otopinom (50 mL). Organska faza je sušena sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i isparena, nakon čega je pročišćena *flash* kromatografijom. Dobiveni produkt je krutina blijedo žute boje (100,0 mg, 79,2%).

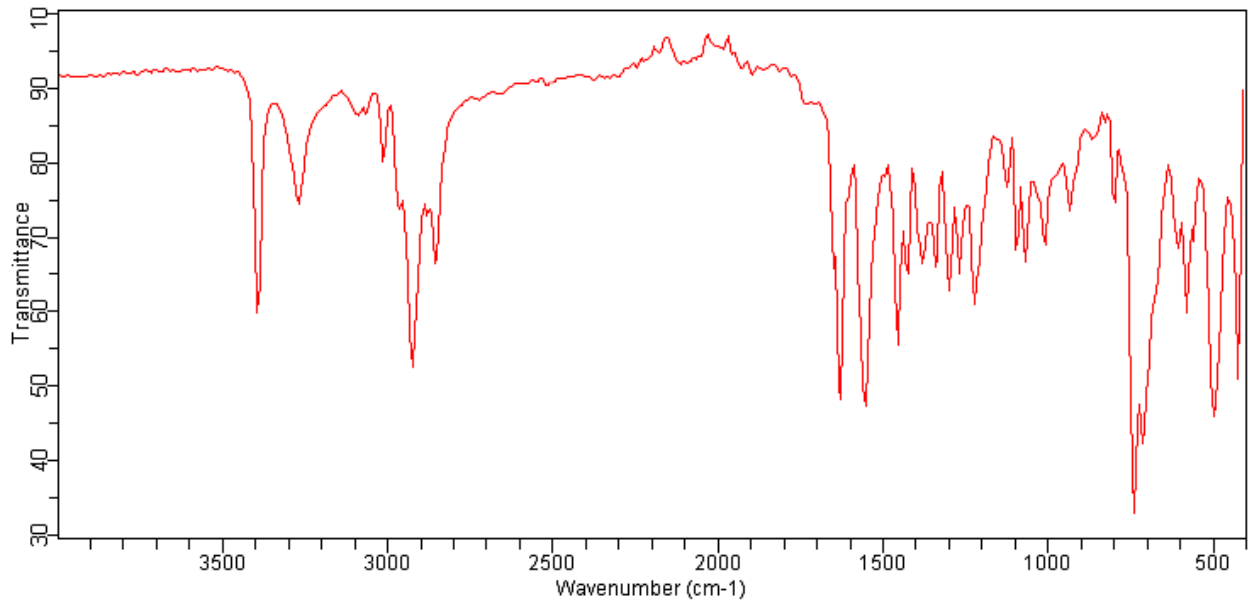
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,96 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,27 (m, 8H), 1,58 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,04 (m, 6H), 2,80 (t, *J* = 6,2 Hz, 4H), 2,98 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,60 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 5,33 (m, 6H), 5,50 (br. s, 1H), 7,01 (s, 1H), 7,13 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,13 (br. s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14,21; 20,52; 25,37; 25,51; 25,61; 25,68; 27,18; 29,09; 29,22; 29,56; 36,86; 39,63; 111,19; 113,17; 118,72; 119,49; 121,90; 122,21; 127,09; 127,38; 127,71; 128,23; 128,29; 130,26; 131,95; 136,41; 173,00

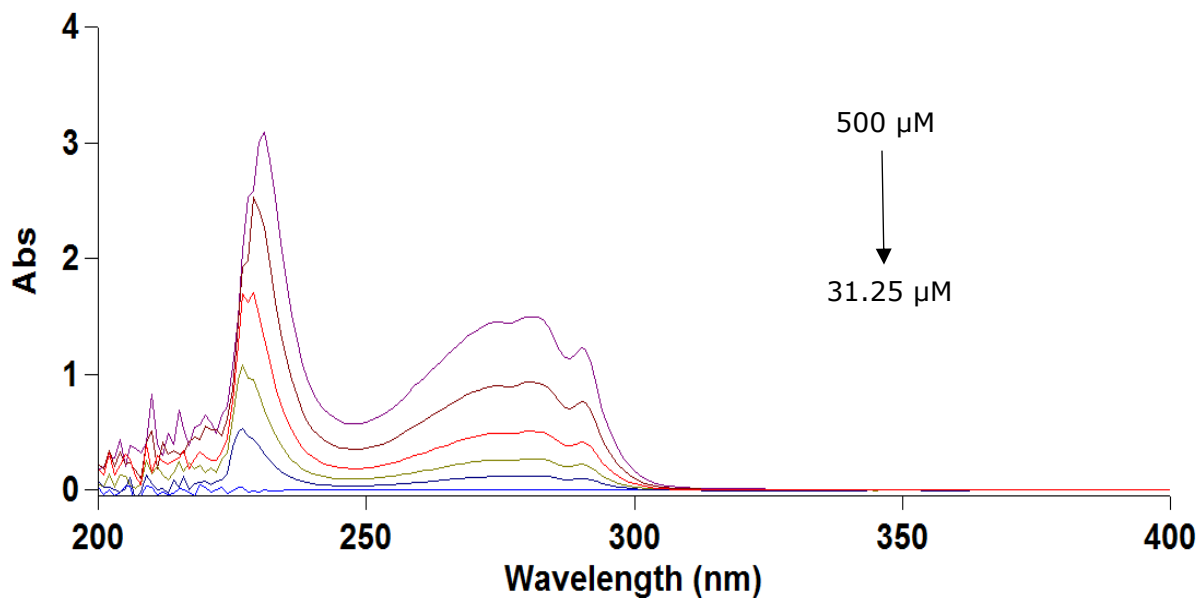
IR: 3397, 3270, 3091, 3017, 2928, 2861, 1632, 1558, 1461, 1431, 1387, 1349, 1305, 1275, 1230, 1134, 1104, 1074, 1014, 940, 873, 806, 746, 590, 508, 434 cm<sup>-1</sup>

ESI-MS: *m/z* = 443, 421 ([M+H]<sup>+</sup>), 326, 282, 238, 144, 116

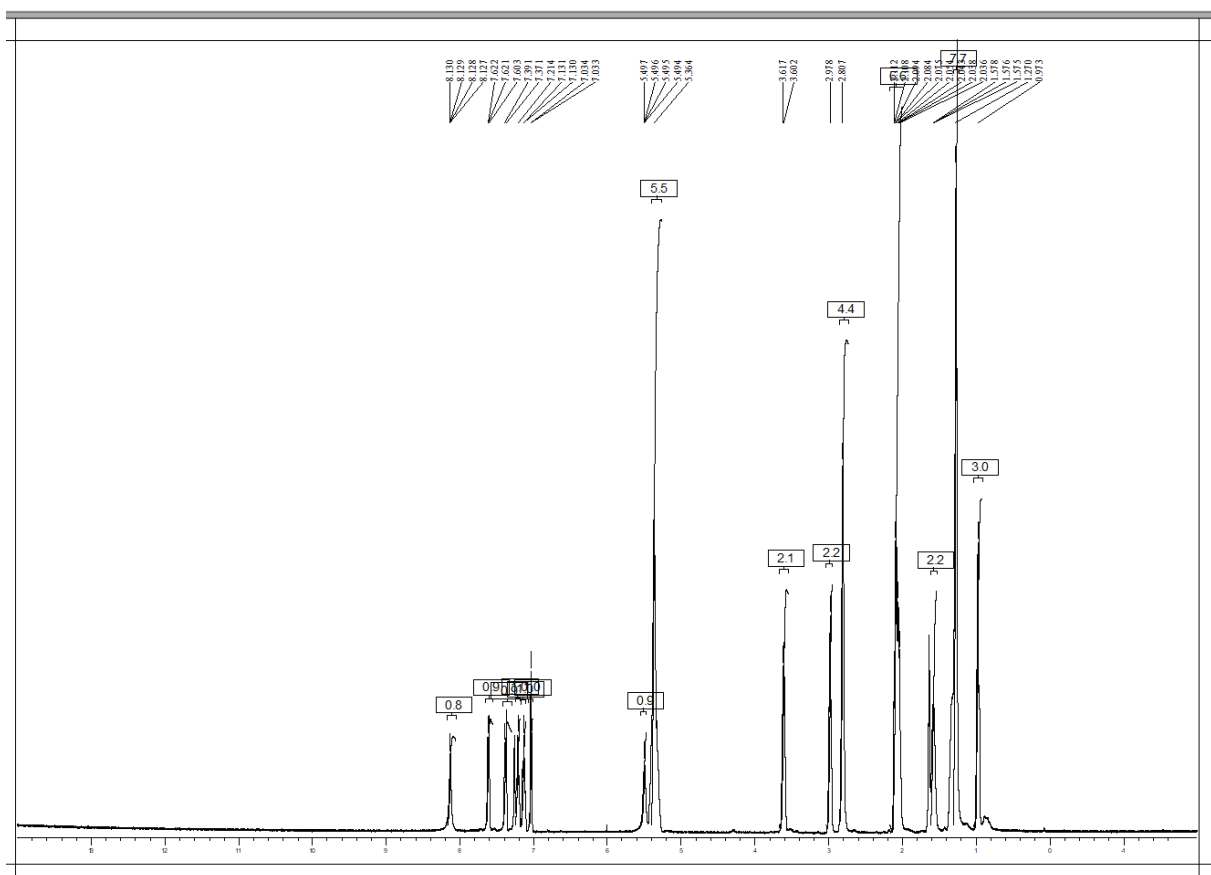
UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub>/nm (log ε) = 228 (4,12), 280 (3,60), 290 (3,50)



**Prilog 21.** Spektar spoja **5** dobiven IR spektroskopijom.

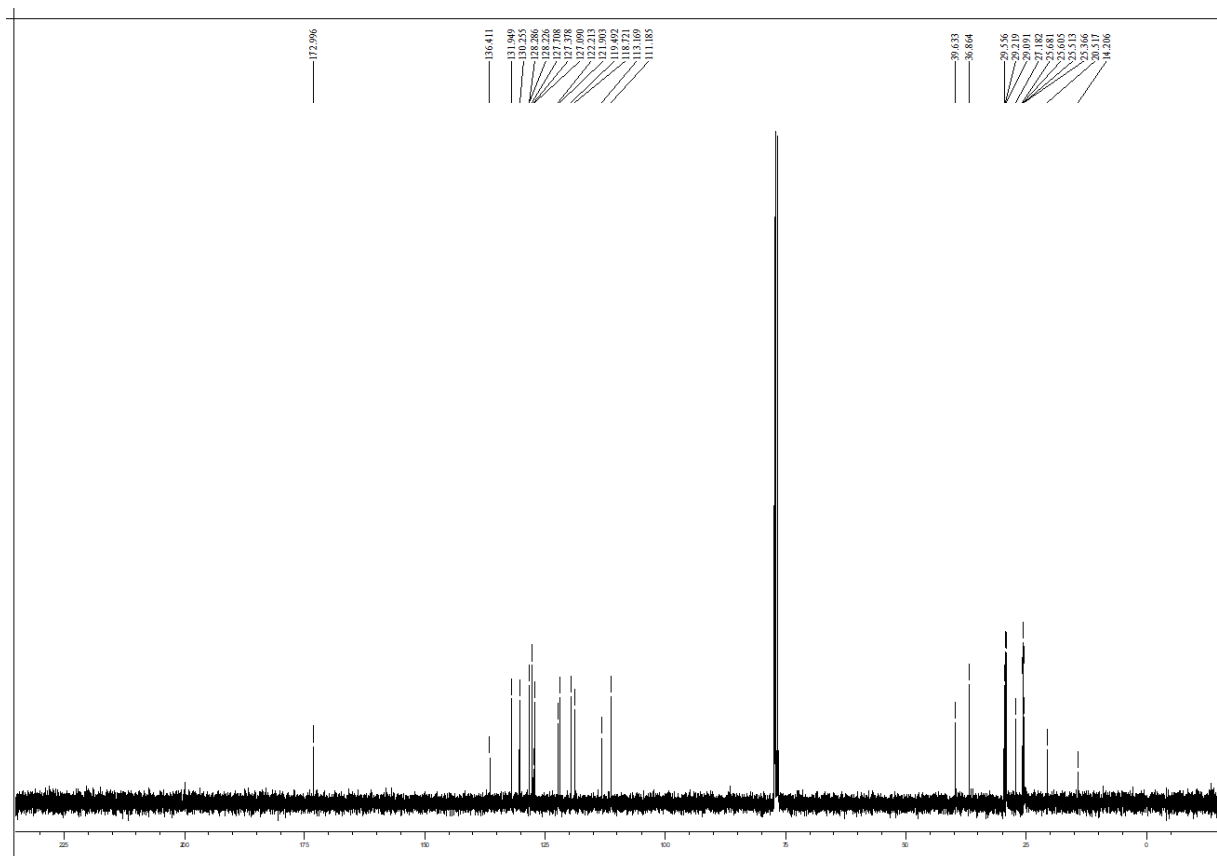


**Prilog 22.** Spektar spoja **5** dobiven UV-Vis spektrofotometrijom (koncentracijski raspon 31.25 – 500 μM).

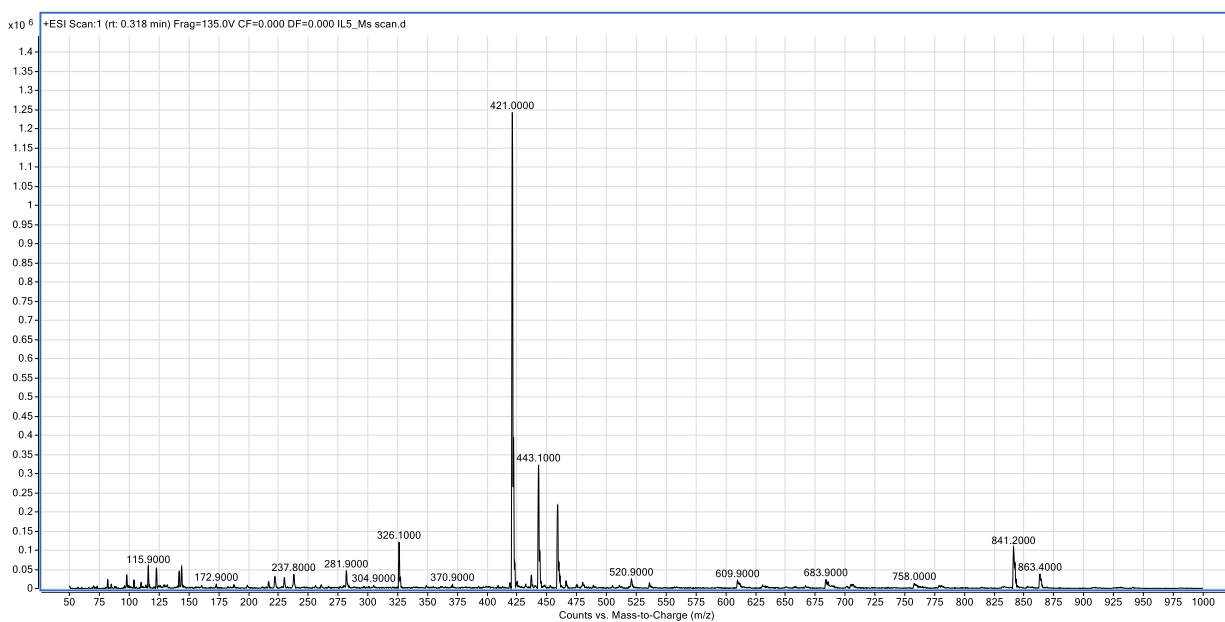


**Prilog 23.** Spektar spoja **5** dobiven  $^1\text{H}$  NMR-om.





**Prilog 24.** Spektar spoja **5** dobiven  $^{13}\text{C}$  NMR-om.



**Prilog 25.** Spektar spoja **5** dobiven MS (QQQ) metodom.

## 9. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE Iva Lovrović

 Praputnjak 157, 51226 Hreljin, Rijeka, Hrvatska

 051 / 766 - 468  091 619 5470

 [iva.lovrovic.il@gmail.com](mailto:iva.lovrovic.il@gmail.com)

Spol **Žensko** | Datum rođenja **23/10/1995** | Nacionalnost **Hrvatica**

### RADNO ISKUSTVO

---

02/2021. – 07/2021. **Rad u laboratoriju u sklopu diplomskog rada**  
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Zavod za medicinsku kemiju, Laboratorij za organsku kemiju i sintezu te kemiju čvrstog stanja, Rijeka (Hrvatska)

07/2018. **Stručna praksa u sklopu obrazovanja**  
Jadran galenski laboratorij d.d., Rijeka (Hrvatska)  
Kontrola kvalitete

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

2019.– danas. **Diplomski sveučilišni studij Biotehnologija u medicini.**  
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)  
Tema diplomskog rada: Antiproliferativni i antioksidativni učinci strukturnih analoga morskog prirodnog spoja granulatamida B  
Mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

2014. – 2019. **Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija i istraživanje lijekova**  
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)  
Stečena titula: univ. bacc. biotech. et pharma inv.

2010. – 2014. **Srednja škola**  
Gimnazija Andrije Mohorovičića, Rijeka (Hrvatska)  
Smjer: opća gimnazija

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski jezik

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

- Rad sa Windows operacijskim sustavima
- Korisnik programa Microsoft Office paketa (Excel, Word, PowerPoint, Teams)
- Poznavanje osnova rada u programima za računalnu kemiju: VMD, Avogadro, PyMOL, UCSF Chimera, Statistica, MedCalc

Druge vještine

- Komunikacijske i prezentacijske vještine stečene tijekom studiranja kroz razne seminare
- Samostalnost u obavljanju zadataka
- Komunikativnost u timskom radu

Vozačka dozvola - Položena B kategorija