

Ispitivanje citotoksičnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za farmaceutsku primjenu

Šarac, Sunčica

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:029137>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Sunčica Šarac

7500/BT

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA FARMACEUTSKU PRIMJENU**
ZAVRŠNI RAD

Projekt: HRZZ IP-2019-04-7712 Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Zagreb, 2021.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Manueli Panić na strpljivosti, srdačnosti, uloženom trudu i vremenu te pomoći pri izradi ovog rada. Veliko hvala i izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na prenesenom znanju te pomoći i vodstvu u eksperimentalnom radu.

Hvala mojoj obitelji i bližnjima na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Ispitivanje citotoksičnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za farmaceutsku primjenu

Sunčica Šarac, 7500/BT

Sažetak: Niskotemperaturna eutektička otapala su otapala sastavljena od dvije ili više komponenata od kojih jedna djeluje kao donor, a druga kao akceptor vodikove veze. Povezivanjem se dobije smjesa čija je temperatura tališta znatno niža od one pojedinih komponenata. Niskotemperaturna eutektička otapala smatraju se netoksičnima, ali je prije primjene u industriji potrebno ispitati njihov utjecaj na ljude i okoliš. U ovom radu ispitan je utjecaj triju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (timol:kumarin, timol:dekanska kiselina i timol:oktanska kiselina) i terapeutskog eutektičkog otapala (timol:oktanska kiselina:klotrimazol) na HaCaT i HeLa staničnu liniju MTS metodom. Otapala su pokazala nizak inhibitoran učinak na rast stanica te se mogu smatrati nisko citotoksičnim otapalima.

Glavne riječi: citotoksičnost, eutektička otapala, HaCaT stanična linija, klotrimazol

Rad sadrži: 26 stranica, 12 slika, 1 tablicu, 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Pomoć pri izradi: izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević

Datum obrane: 15. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Evaluation of cytotoxicity of deep eutectic solvents for pharmaceutical application

Sunčica Šarac, 7500/BT

Abstract: Deep eutectic solvents (DESs) are composed of two or more components, one of them being hydrogen bond donor and the other one acceptor. The melting point of the eutectic mixture is significantly lower than that of either of the components. DESs are considered to be non-toxic. However, prior to their large-scale use, it is necessary to determine their impact on human and the environment. In this bachelor thesis, the impact of three DESs (Ty:Cou, Ty:C₁₀, Ty:C₈) and one THEDES (Ty:C₈:CLO) on HaCaT and HeLa cell line was examined using MTS method. Solvents showed low inhibitory effect on cell growth and can be considered low-cytotoxic.

Keywords: cytotoxicity, clotrimazole, deep eutectic solvents, HaCaT cell line

Thesis contains: 26 pages, 12 figures, 1 table, 30 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Manuela Panić

Technical support and assistance: PhD Kristina Radošević, Associate Professor

Defence date: 15th July 2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	2
2.1.1. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala	4
2.1.2. Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala	5
2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala	6
2.2.1. Topljivost lijekova	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Otopine i puferi	10
3.1.3. HaCaT i HeLa stanice	11
3.1.4. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala	12
3.1.5. Uređaji i oprema	13
3.2. Metode	13
3.2.1. Uzgoj HaCaT i HeLa stanica i određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo	13
3.2.2. Nacjepljivanje HaCaT i HeLa stanica i tretman niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	15
3.2.3. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica	15
3.2.4. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na HaCaT i HeLa staničnu liniju	17
4.2. Morfologija HaCaT i HeLa stanica tretiranih niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	21
4.3. Učinak terapijskog eutektičkog otapala na HaCaT stanice	22
5. ZAKLJUČCI	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

Niskotemperaturna eutektička otapala definirana su kao mješavina dvaju ili više komponenata koje se povezuju vodikovim vezama, pri čemu dolazi do snižavanja točke tališta zbog čega se dobiva otapalo u tekućem stanju (Paiva i sur., 2014). Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su eutektička otapala sastavljena od primarnih metabolita, najčešće organskih kiselina, aminokiselina, šećera i alkohola (Choi i sur., 2011; Dai i sur., 2013). Ova otapala u potpunosti odgovaraju načelima zelene kemije (Panić, 2020). Niskotemperaturna eutektička otapala su u novije doba privukla pozornost na područjima prehrambene, kozmetičke, farmaceutske, biomedicinske industrije te ostalim područjima primjene pošto su pokazala veliki potencijal za zamjenu trenutno korištenih organskih otapala, koja su toksična za ljude i okoliš (Silva i sur., 2019).

U farmaceutskoj industriji se očekuje primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala jer su dobar medij za otapanje raznih molekula (Nguyen i sur., 2021). Jedan od glavnih problema farmaceutske industrije je loša topljivost lijekova, a veliki potencijal za poboljšanje njihove topljivosti pokazala su niskotemperaturna eutektička otapala (Pedro i sur., 2019). Također je moguća sinteza eutektičkog otapala koje kao jednu od komponenata sadrži lijek te se takve smjese nazivaju terapijska eutektička otapala (Aroso i sur., 2016).

Prije primjene u industriji i proizvodnje u velikom mjerilu, potrebno je istražiti citotoksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala. U ovom radu ispitano je djelovanje triju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (timol:kumarin, timol:dekanska kiselina i timol:oktanska kiselina) za poboljšanu topljivost klotrimazola na HaCaT i HeLa staničnoj liniji te terapijskog eutektičkog otapala timol:oktanska kiselina:klotrimazol na HaCaT staničnoj liniji MTS metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Deep eutectic solvents, DESs*) su često definirana kao mješavina dvaju ili više komponenata, u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju, koje se povezuju te dolazi do snižavanja točke tališta zbog čega se dobiva otapalo u tekućem stanju (Paiva i sur., 2014). Činjenica da se sintetiziraju iz jeftinih, biorazgradivih te netoksičnih komponenata, dovela je do zaključka da bi mogla biti alternativa ionskim kapljevina. Niskotemperaturna eutektička otapala ponekad se nazivaju četvrtom generacijom ionskih kapljevine. Ova definicija nije u potpunosti točna jer niskotemperaturna eutektička otapala u svojoj strukturi ne sadrže ione, nego su metaboliti koji tvore otapalo međusobno povezani vodikovim vezama (Radošević i sur., 2016).

Ionske kapljevine (eng. *Ionic liquids, ILs*) posljednjih 20 godina privukle su veliku pozornost te su smatrane *zelenim* otapalima. Međutim, iako posjeduju svojstva *zelenih* otapala, kao što su nehlapljivost, nezapaljivost te mogućnost ponovnog korištenja, nedostaci ILs su visoka cijena, stupanj toksičnosti sličan ili čak viši od onog organskih otapala te generalno slaba biorazgradivost. Zbog ovoga se posljednjih godina istražuju niskotemperaturna eutektička otapala, koja posjeduju fizikalno-kemijska svojstva (viskoznost, gustoća, električna vodljivost) slična ionskim kapljevina (Mitar i sur., 2019), a biorazgradiva su i nisko toksična (Radošević i sur., 2016).

Opća formula niskotemperaturnih eutektičkih otapala, prema radu Smith i sur. (2014), je Cat^+X^-zY , gdje je Cat^+ najčešće kation amonijevih, sulfatnih ili fosfatnih soli, dok je X^- halogenidni anion. Y predstavlja Lewis-ovu ili Brønsted-ovu kiselinu, a z je broj Y molekula koje stupaju u interakcije s odgovarajućim anionom. Niskotemperaturna eutektička otapala klasificirana su u četiri skupine:

Tip I (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe)

Tip II (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Cr, Co, Fe)

Tip III (kvaterna sol Cat^+X^- i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola)

Tip IV (halogenid metala poput Al, Zn i donor vodikove veze poput amida i alkohola)

Skupina III najistraženija je te su ta otapala najčešće bazirana na kolin-kloridu i različitim donorima vodikove veze (urea, alkoholi, kiseline) (Paiva i sur., 2014). Kolin-klorid je relativno jeftin, netoksičan i biorazgradiv te je zbog toga široko primjenjiv.

Kao što je već navedeno, niskotemperaturna eutektička otapala dobivaju se miješanjem dvaju ili više komponenata koje se međusobno povezuju vodikovim vezama. Najčešće se koriste dvije metode za dobivanje niskotemperaturnih eutektičkih otapala: metoda zagrijavanja te metoda usitnjavanja komponenti pri sobnoj temperaturi u tarioniku. Za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala koriste se razni akseptori (eng. *Hydrogen bond acceptors, HBAs*) te donori (eng. *Hydrogen bond donors, HBDs*) vodikove veze. Ova otapala nazivaju se i dizajniranim otapalima jer je moguće sintetizirati čak 10^6 različitih otapala (El Achkar i sur., 2021).

Kako su niskotemperaturna eutektička otapala dizajnirana otapala, jedna od važnih karakteristika su njihova fizikalno-kemijska svojstva, koja ovise o strukturi samog otapala. Svojstva koja su najvažnija za njihovu industrijsku primjenu su viskoznost, pH-vrijednost, gustoća, polarnost i dr. te se određuju odmah po pripremi DES-ova. Većina niskotemperaturnih eutektičkih otapala ima gustoću veću od vode te se kreće u rasponu od 1,0 i 1,3 g cm⁻³ pri 25 °C (Tang i Row, 2013). Polarnost DES-ova ovisi o sastavnim komponentama te njihovom omjeru. U zadnje vrijeme razvijaju se i hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala, što omogućava dizajniranje DES-ova širokog raspona polarnosti. pH vrijednost niskotemperaturnog eutektičkog otapala određuje odabir donora i akceptora vodikove veze. Na primjer DES-ovi koji kao donor vodikove veze sadrže organsku kiselinu imaju pH vrijednosti < 3. pH vrijednost izrazito kiselih otapala povećava se povećanjem udjela vode, dok kod lužnatih niskotemperaturnih eutektičkih otapala dodatak vode rezultira sniženjem pH vrijednosti (Panić i sur., 2020). Niskotemperaturna eutektička otapala su pri sobnoj temperaturi vrlo viskozne tekućine, a činjenica da je viskoznost glavni regulator ionske vodljivosti dovodi do zaključka da su DES-ovi slabi vodiči. Prisutnost vode značajno može utjecati na svojstva DES-ova. Iako može imati pozitivan utjecaj, prisutnost vode također može i poremetiti supramolekularnu mrežu eutektičke smjese. Mogućnost modifikacije fizikalno-kemijskih svojstava ovih otapala, kao i sinteza otapala sa željenim svojstvima, glavni su razlog rastućeg zanimanja znanstvenika za ova otapala. Uz činjenicu da su nezapaljiva, nehlapljiva, imaju niski tlak pare te su kemijski i toplinski stabilna, niskotemperaturna eutektička otapala, zbog širokog spektra sastavnih komponenata, mogu se sintetizirati za točno određene primjene (El Achkar i sur., 2021).

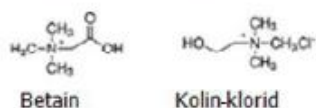
2.1.1. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala sastavljena od primarnih metabolita nazivaju se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural deep eutectic solvents, NADES*). Komponente koje najčešće grade prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su organske kiseline, aminokiseline, šećeri, alkoholi te često voda (Choi i sur., 2011; Dai i sur., 2013). Mnoga istraživanja pokazala su da su ove molekule prisutne unutar mikrobnih i biljnih stanica te stanica sisavaca te su smatrane međuproduktima metaboličkih puteva. Choi i sur. (2011) razvili su teoriju da su te molekule prisutne u značajnim koncentracijama jer grade treću vrstu stanične tekućine, uz vodu i lipide. Također je istaknuto da NADES-ovi vjerojatno imaju ulogu u različitim staničnim procesima te se ovim zaključkom mogu objasniti mehanizmi kao što je biosinteza molekula koje su netopljive u vodi.

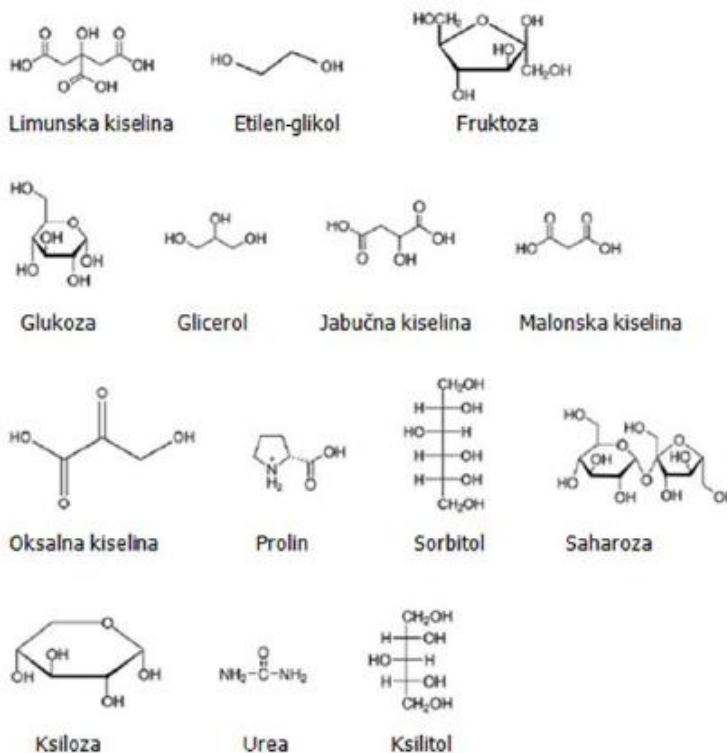
Svojstva prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala u potpunosti odgovaraju načelima *zelene* kemije: niska cijena, održiva proizvodnja, nehlapljivost i nezapaljivost, kemijska i toplinska stabilnost te biorazgradivost i niska toksičnost. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su vrlo viskozne te guste tekućine, što otežava rukovanje i prijenos mase u procesima u kojima se koriste. Što se tiče polarnosti, NADES-ovi na bazi organskih kiselina su najpolarnija, dok su NADES-ovi na bazi šećera i polialkohola najmanje polarna otapala. Sva navedena fizikalno-kemijska svojstva mogu se mijenjati dodatkom određene količine vode (Panić, 2020)

Za sintezu NADES-ova koriste se barem dvije jeftine, netoksične te lako dostupne komponente. Ove komponente, pri određenom molarnom odnosu, stupaju u interakciju te stvaraju novu eutektičku fazu koja ima točku tališta nižu od ishodnih komponenata. Za sintezu se mogu koristiti razne soli te donori vodikove veze koji su komponente prirodnih primarnih metabolita. Prilikom sinteze prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala potrebno je osušiti hidrofilne sirovine koje se koriste za sintezu, jer prisutstvo molekula vode može promijeniti molarni odnos.

Akceptori vodikove veze



Donori vodikove veze



Slika 1. Prikaz kemijskih struktura različitih akceptora vodikove veze i donora vodikove veze koji se koriste za sintezu prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Panić i sur., 2020)

2.1.2. Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Zaključak da su niskotemperaturna eutektička otapala netoksična proizlazi iz činjenice da su sastavne komponente otapala netoksične. Ova tvrdnja ne uzima u obzir mogućnost sinergističkog djelovanja komponenata, koje može imati značajan utjecaj na biološka svojstva dobivenog otapala. Zbog navedenog je potrebno opsežno istražiti toksičnost DES-ova prije primjene u industriji i proizvodnje u velikom mjerilu (Radošević i sur., 2015).

Razna istraživanja dokazala su primjetno veću toksičnost otapala, u odnosu na toksičnost sastavnih komponenata, što dokazuje utjecaj sinergističkog efekta. Ovu razliku autori su objasnili delokalizacijom naboja do koje dolazi zbog stvaranja vodikovih veza između organske soli i donora vodikove veze (Hayyan i sur., 2013a, 2013b; Paiva i sur., 2014).

U radovima Hayyan i sur. (2013a; 2013b) ispitana je toksičnost otapala na bazi kolin-klorida i fosfonijevog iona na larvama račića te dvije Gram pozitivne (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*) i dvije Gram negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). DES-ovi na bazi kolin-klorida nisu pokazali citotoksičnost, dok su oni na bazi fosfonijevog iona pokazali blagi antimikrobni učinak. Zaključeno je da toksičnost i citotoksičnost DES-ova ovisi o sastavu, viskoznosti i primjenjenoj koncentraciji.

U radu Radošević i sur. (2015) ispitana je citotoksičnost na ljudskoj i ribljoj staničnoj liniji, fitotoksičnost na pšenici te biorazgradivost triju niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida koja kao donor vodikove veze sadrže šećer (glukozu), alkohol (glicerol) te organsku kiselinu (oksalnu kiselinu). Utvrđeno je da kolin-klorid:glukoza te kolin-klorid:glicerol pokazuju nisku razinu citotoksičnosti, dok kolin-klorid:oksalna kiselina pokazuje umjerenu razinu citotoksičnosti. Ovaj rad ukazuje na važnost odabira donora vodikove veze prilikom sinteze niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Sva otapala su klasificirana kao biorazgradiva, a uočena je povezanost između toksičnosti i biorazgradivosti te je zaključeno da bi DES-ovi na bazi kolin-klorida mogli biti široko primjenjivi.

Rad Radošević i sur. (2016) dokazao je da i molarni odnosi komponenata DES-ova utječu na nivo toksičnosti. U radu je ispitana citotoksičnost petnaest IL-ova i DES-ova na bazi kolina na ribljim stanicama te je vidljiva blaga razlika u vijabilnosti stanica tretiranim otapalima kolin klorid:jabučna kiselina s različitim udjelom jabučne kiseline (nivo toksičnosti rastao je s porastom udjela kiseline). Iako pokazuju određenu razinu toksičnosti, ova otapala moguće je primjenjivati kada je inhibitorno djelovanje poželjno, na primjer kao antibakterijske ili antitumorske agense (Radošević i sur., 2016).

2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Od njihovog otkrića, niskotemperaturna eutektička otapala privukla su pozornost na područjima sinteze, procesima separacije, biokatalize, nanomaterijala, elektrokemije, prehrambene, kozmetičke, farmaceutske i biomedicinske industrije (Silva i sur., 2019).

Veliki potencijal i primjenu NADES-ovi su pokazali u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Naturex, 2015). Tako je tema mnogih znanstvenih radova priprema ekstrakata koji se između ostalog koriste i u kozmetičkoj industriji. Pripremaju se ekstrakti biološki aktivnih spojeva, kao što su flavonoidi, antocijani, terpenoidi te alkaloidi, pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala.

Činjenica da su DES-ovi jeftini, jednostavni za sintezu te generalno niske razine toksičnosti, dovodi do pretpostavke da bi se biološki aktivni spojevi, ekstrahirani niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, mogli koristiti u raznim granama industrije (farmaceutska, kozmetička, agrokemijska) (Panić, 2020). Ekstrakcijska učinkovitost DES-ova uvelike ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima svakog DES-a. Uz ekstrakcijsku učinkovitost na odabir otapala za ekstrakciju utječu i drugi parametri kao što su pH, viskoznost, cijena, molarni odnos sastavnih komponenata te utjecaj na okoliš. Jedan od najvećih problema kod korištenja DES-ova za ekstrakciju je činjenica da su to vrlo viskozne tekućine pri sobnoj temperaturi što predstavlja problem prijenosa mase između otapala i biomase iz koje se biološki aktivni spojevi ekstrahiraju. Dodatak vode smanjuje viskoznost te na taj način poboljšava prienos mase i efikasnost ekstrakcije (Ruesgas-Ramón i sur., 2020). U radu Dai i sur. (2016) dokazano je da je stabilnost antocijana viša u DES-u mliječna kiselina:glukoza nego u konvencionalnim otapalima (etanol i voda), što je još jedan važan faktor pri odabiru otapala za ekstrakciju. Stabilizacijska sposobnost DES-ova povezana je sa snažnim vodikovim vezama koje nastaju između otopljenih tvari i otapala.

Drugo područje primjene u kojem se DES-ovi intenzivno istražuju je farmaceutska industrija. Jedna od glavnih primjena DES-ova u farmaciji proizlazi iz činjenice da su dobar medij za otapanje, ne samo malih molekula, već i velikih makromolekula, kao što su proteini, nukleinske kiseline i polisaharidi. Zbog navedenog bi se mogli primjenjivati kao otapala za hidrofobne lijekove. U usporedbi s vodenim medijima, mogu pogodovati stvaranju određenih konformacija, a topljivost te stabilnost spojeva je povećana u usporedbi s konvencionalnim otapalima (Nguyen i sur., 2021).

2.2.1. Topljivost lijekova

U novije doba, jedan od glavnih ciljeva farmaceutske industrije je poboljšanje učinkovitosti postojećih lijekova. Ovakav pristup je puno jednostavniji od razvijanja novih lijekova, koji zahtijevaju klinička istraživanja. Većina postojećih lijekova je slabo topljiva u vodi, što rezultira lošom biodostupnošću i permeabilnošću. Iako su brojni pristupi opisani u raznim radovima, poboljšanje ovih nedostataka i dalje je jedan od najvećih izazova prilikom razvijanja lijekova. U cilju rješavanja ovog problema, veliki potencijal za poboljšanje topljivosti aktivne (djelatne) tvari (eng. *Active pharmaceutical ingredient, API*) pokazala su niskotemperaturna eutektička otapala.

Činjenica da se API najčešće nalazi u krutom stanju, ograničavala je napredak u poboljšanju učinkovitosti lijekova. Alternativa je prevođenje API-ja u tekuće stanje koje pokazuje bolju topljivost te time i bolje terapijsko djelovanje.

Ova konverzija mora biti provedena tako da sigurnost, efikasnost i stabilnost krajnjeg proizvoda budu osigurane (Pedro i sur., 2019).

Jedan od primjera razvoja API-ja u tekućem stanju je otapanje u ionskim kapljevina, sastavljenima od aktivnog sastojka u anionskom ili kationskom obliku. Rad Berton i sur. (2017) ispitaio je utjecaj otopljenog lidokaina u ionskoj kapljevinu (lidokain dokusat) na biodostupnost lidokaina. Ovaj pristup smatran je novom strategijom za poboljšanje terapijskog učinka lijekova, ali je problem predstavljala toksičnost IL, koja najviše ovisi o strukturi i uglavnom je nepoznata (Pedro i sur., 2019).

Kao alternativa ionskim kapljevina, primjenu su našli DES-ovi, u kojima se može otopiti API te proizvesti API u tekućem stanju. Jedan od prvih radova koji je potvrdio ovu tvrdnju, na primjeru nesteroidnih protuupalnih lijekova, je rad Morrison i sur. (2009). Prema radu Lu i sur. (2016) topljivost ibuprofena, aspirina, acetaminofena, ketoprofena i naproksena poboljšana je korištenjem DES-ova kao otapala. U istraživanju Li i Lee (2016) dokazana je poboljšana topljivost itrakonazola, piroksikama, lidokaina i posakonazola korištenjem DES-a na bazi kolin-klorida i glikolne kiseline, u usporedbi s topljivošću u vodi. NADES sastavljen od mentola i kamfora, pokazao se kao obećavajuće otapalo za ibuprofen, prema radu Phaechemud i sur. (2016).

Uz bolju topljivost, API u DES-ovima pokazuju i bolju kemijsku stabilnost. Navedeno pokazuje rad Lu i sur. (2016) u kojem je ispitana stabilnost aspirina te je hidroliza lijeka bila 8,2 puta sporija od one u vodenom mediju. Prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo betain:urea poboljšalo je stabilnost β -laktamskih antibiotika, prema radu Olivares i sur. (2018). Iz navedenog proizlazi da niskotemperaturna eutektička otapala mogu biti dizajnirana s ciljem poboljšanja topljivosti, ali i kemijske stabilnosti aktivne tvari lijekova.

Uz sve navedeno, moguća je i sinteza DES-ova u kojima je kao jedna od sastavnih komponenata API. Ovakve smjese nazivaju se terapijskim eutektičkim otapalima (eng. *Therapeutic deep eutectic system, THEDES*) (Aroso i sur., 2016). Većina djelatnih tvari može se ponašati kao HBA i HDB te je prilikom odabira drugih sastavnih komponenata THEDES-a potrebno odabrati one kojima će se dobiti eutektička smjesa koja, pri normalnoj tjelesnoj temperaturi, zadržava terapijska svojstva API-ja (Abbott i sur., 2017).

Rad Aroso i sur. (2016) istražio je primjenu THEDES-a kao sustava za topljivost biološki aktivnih molekula. Tako su ispitani THEDES-ovi na bazi kolin-klorida i mentola te tri aktivna sastojka (acetilsalicilna, benzojeva i fenilacetatna kiselina). Pokazana je bolja topljivost aktivnih sastojaka kada su u obliku THEDES-a, u usporedbi sa samim aktivnim sastojkom.

Svi THEDES-ovi su pokazali antimikrobnu aktivnost, što dokazuje da aktivni sastojci zadržavaju antimikrobno svojstvo kada su dio THEDES-a. U radu Duarte i sur. (2017) prikazana je efikasnost THEDES-ova na bazi mentola i tri API-ja (ibuprofen, benzojeva i fenilacetatna kiselina) kao formulacije za poboljšanje biodostupnosti djelatne tvari prevođenjem iz krutog u tekuće stanje. Dokazano je da se topljivost API-ja poboljšava do 12 puta, u odnosu na API u čistom obliku. U radu Silva i sur. (2019) pokazano je da je THEDES mentol:stearinska kiselina najperspektivnija formulacija THEDES-a od tri ispitane (mentol:stearinska kiselina, mentol:miristinska kiselina, mentol:laurinska kiselina) te može biti korištena kao potencijalni lijek za liječenje rana. Navedena formulacija također je pokazala antibakterijsko djelovanje na sojevima *Staphylococcus epidermis* i *Staphylococcus aureus*. Rad Wang i sur. (2017) dokazao je da sustav mentol:paeonol u obliku gela na bazi mikroemulzije poboljšava dopremu aktivne tvari putem kože te da bi eutektičke smjese API-mentol mogle biti korištene kao efikasniji sustav za transdermalnu primjenu lijeka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij], Promega, NY, SAD
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Niskotemperaturna eutektička otopala: timol:kumarin (Ty:Cou), timol:dekanska kiselina (Ty:C₁₀), timol:oktanska kiselina (Ty:C₈), timol:oktanska kiselina:klotrimazol (Ty:C₈:CLO), Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, RH

3.1.2. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

0,4% otopina tripan-plavo

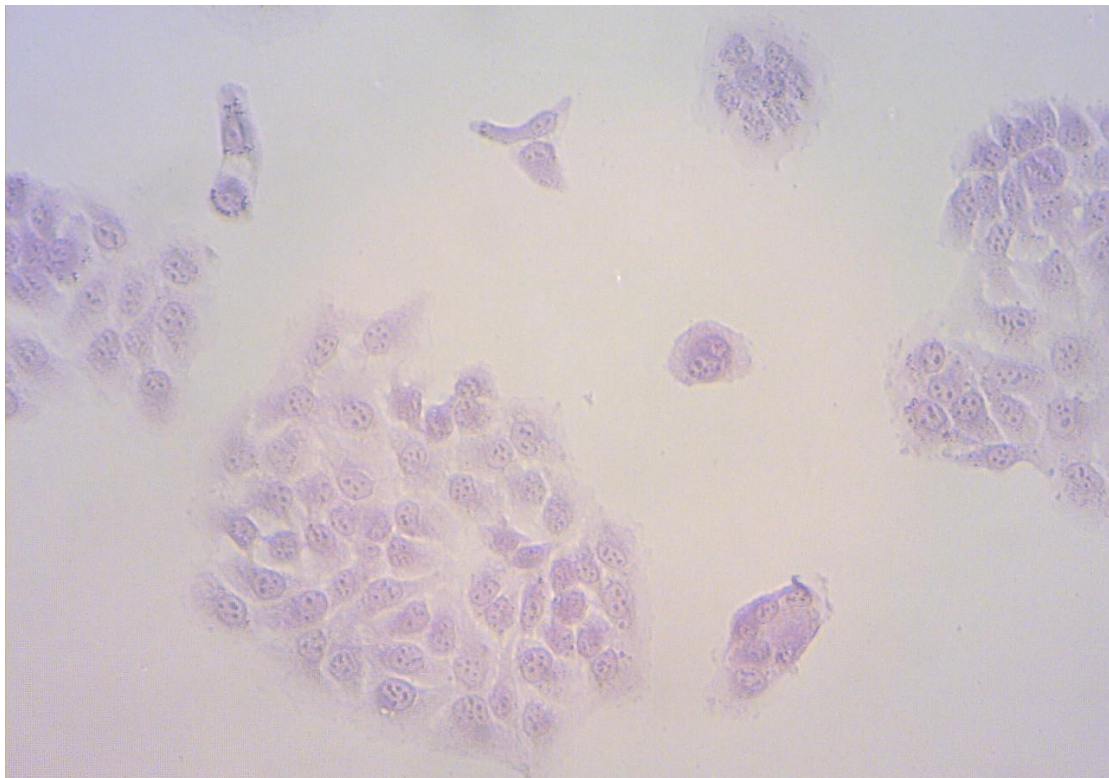
Boja tripan-plavo	0,04 g
PBS pufer	do 10 mL

0,2% otopina kristal-ljubičasto

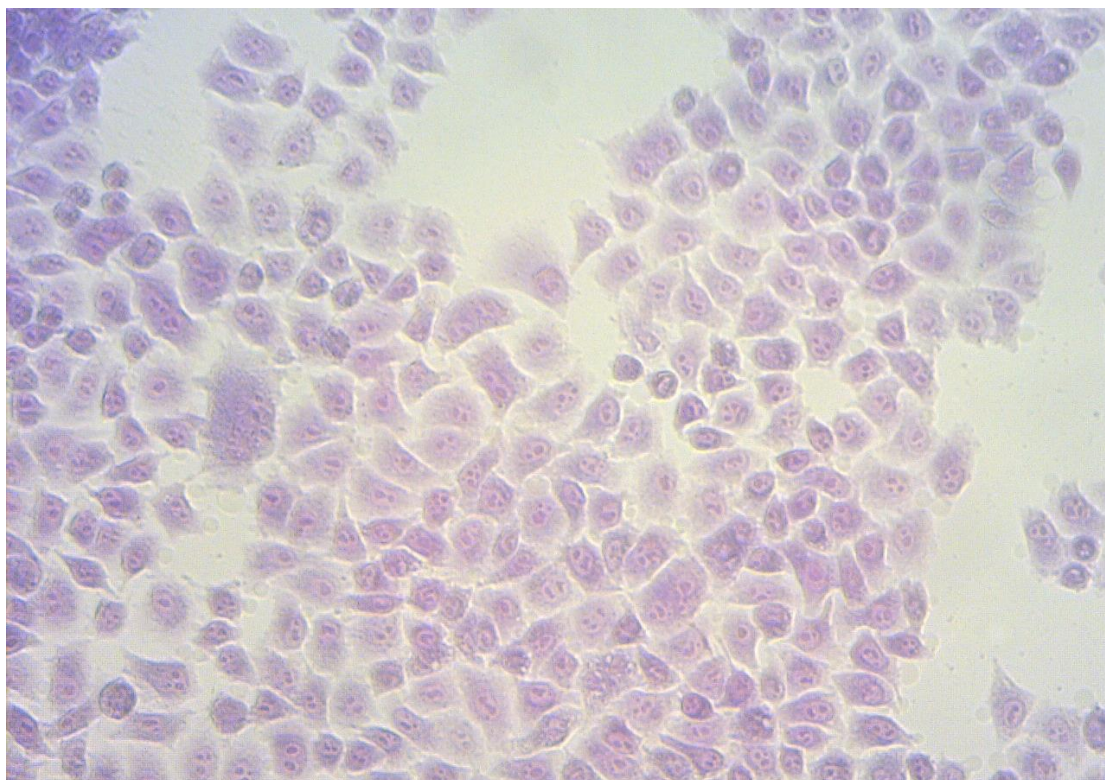
Boja kristal-ljubičasto	0,02 g
2% etanol	do 10 mL

3.1.3. HaCaT i HeLa stanice

U ovom radu korištena je HaCaT humana stanična linija iz *CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany)* radne banke stanica prikazana na slici 2. HaCaT je transformirana stanična linija besmrtnih keratinocita izoliranih iz histološki normalne kože. HaCaT stanice su morfološki keratinociti te pripadaju adherentnom tipu stanica. Za usporedbu je korištena i HeLa stanična linija izolirana iz tumora vrata maternice, koja se koristi kao biološki model u mnogim istraživanjima i izuzetno je dobar *in vitro* model. HeLa stanična linija iz *CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany)* radne banke stanica, prikazana je na slici 3. HeLa stanice također pripadaju adherentnom tipu stanica, a morfološki su epitelne stanice. Obje stanične linije uzgajaju se u kontroliranim uvjetima, u inkubatoru s atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂ te pri temperaturi od 37 °C. Medij za uzgoj stanica je DMEM uz dodatak 10% (v/v) FBS-a. Uzgoj stanica provodi se u petrijevim zdjelicama, ukoliko je cilj održavanje biomase stanica ili u ploči s jažicama prilikom postavljanja pojedinačnih eksperimenata ispitivanja citotoksičnosti eutektičkih otapala.



Slika 2. Mikroskopska slika HaCaT stanične linije obojane bojom kristal-ljubičasto (vlastiti izvor)



Slika 3. Mikroskopska slika HeLa stanične linije obojane bojom kristal-ljubičasto (vlastiti izvor)

3.1.4. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom radu sintetizirana su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu te su popisana u Tablici 1.

Tablica 1. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena u radu

Prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo	Molarni omjer	Kratica
timol:kumarin	3:2	Ty:Cou
timol:dekanska kiselina	1:1	Ty:C ₁₀
timol:oktanska kiselina	1:3	Ty:C ₈
timol:oktanska kiselina:klotrimazol	1:3:0,1	Ty:C ₈ :CLO

3.1.5. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannendorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Digitalna vaga, Boeco, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (mikropipete, nastavci za mikropipete, petrijeve zdjelice, laboratorijsko posuđe)

3.2. Metode

Rad sa staničnim linijama zahtijeva aseptične uvjete i korištenje sterilnog laboratorijskog pribora. Sve manipulacije HaCaT i HeLa stanicama provedene su u laminaru, a s ciljem sprečavanja kontaminacije, ruke i radna površina prije rada prebrisane su 70%-tnim etanolom.

3.2.1. Uzgoj HaCaT i HeLa stanica i određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo

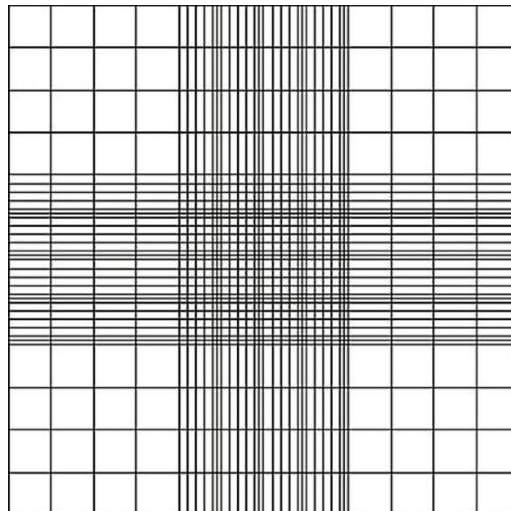
HaCaT i HeLa stanice čuvane su zamrznute na -70 °C u mediju za zamrzavanje. Ampule su odmrznute uranjanjem u vodenu kupelj na temperaturi od 37 °C, nakon čega je suspenzija centrifugirana, a medij za zamrzavanje uklonjen. Dobiveni talog resuspendiran je u svježem mediju za uzgoj u kojeg je dodano 10% seruma. Uzgoj stanica proveden je u petrijevim zdjelicama, u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C te u atmosferi koja sadrži 5% ugljikovog dioksida. Adherentne stanice, prilikom precjepljivanja, potrebno je tretirati tripsinom što rezultira odvajanjem stanica od podloge za rast. Iz petrijeve zdjelice uklonjen je medij za uzgoj, površina zdjelice isprana je PBS puferom te je dodan tripsin. Nakon dodatka tripsina, zdjelica sa stanicama vraćena je u inkubator dok se stanice ne odvoje od podloge. Napredak odvajanja stanica od podloge provjeravan je pod inverznim mikroskopom. Stanice prihvaćene za podlogu su romboidalnog i izduljenog oblika, dok su odvojene stanice kružnog, pravilnog oblika te plutaju u tripsinu.

Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom svježeg medija u kojem je stanice potrebno resuspendirati. Alikvot suspenzije (20 μ L) pomiješan je s jednakim volumenom boje tripan-plavo koja se koristi za određivanje broja stanica. Broj stanica određen je brojanjem u Neubauerovoj komorici (Slika 4). Komoricu za brojanje čini mreža sastavljena od velikog kvadrata podijeljenog na 9 manjih kvadrata. Broje se stanice koje se nalaze unutar četiri rubna kvadrata koji su podijeljeni na 16 (4x4) manjih kvadrata (Slika 5). Broj stanica u mililitru suspenzije određen je izračunavanjem zbroja stanica u 4 kvadrata te množenjem s 5000, tj. prema formuli (1):

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \cdot 5000 \quad (1)$$



Slika 4. Neubauerova komorica za brojanje stanica



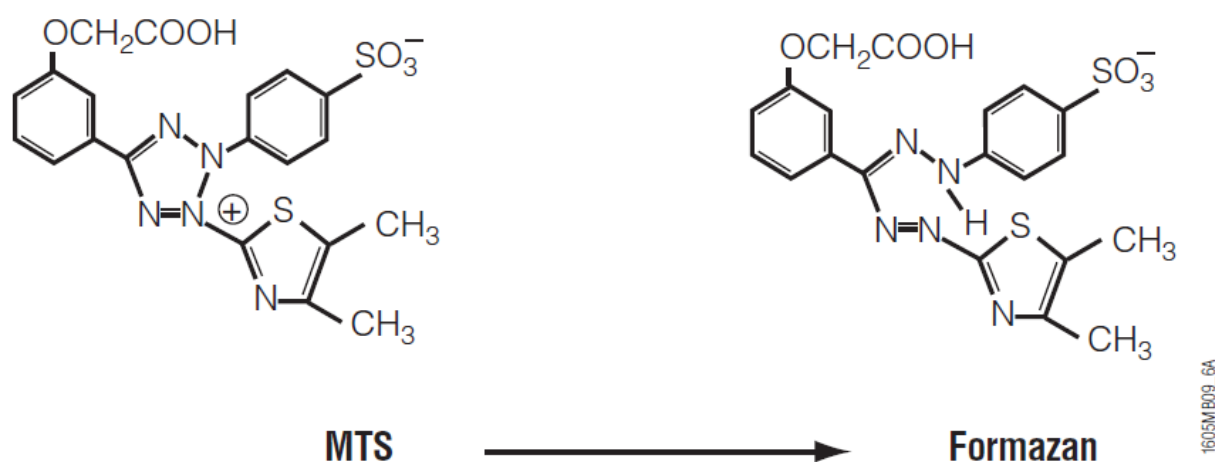
Slika 5. Izgled mreže Neubauerove komorice

3.2.2. Nacjepeljivanje HaCaT i HeLa stanica i tretman niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Nakon određivanja broja stanica u mL suspenzije, izračunat je volumen suspenzije potreban za nacjepeljivanje ploča sa 96 jažica, tako da koncentracija stanica bude $3 \cdot 10^4$ stanica mL^{-1} . U svaku jažicu nacijepljeno je 100 μL tako pripremljene suspenzije te su ploče stavljene u inkubator na 24 sata. Ovo je vrijeme potrebno da bi se stanice prihvatile za podlogu te počele dijeliti i rasti. Nakon inkubacije, obje stanične linije tretirane su različitim koncentracijama (5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 mg L^{-1}) pripremljenih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Ty: Cou, Ty: C₁₀ i Ty: C₈), a HaCaT stanična linija tretirana je i različitim koncentracijama (10, 25, 50, 100 mg L^{-1}) formulacije klotrimazola (Ty: C₈: CLO). Za svaku koncentraciju postavljene su tri paralele, a kontrolne stanice nisu tretirane. Po dodatku niskotemperaturnih eutektičkih otapala i formulacije klotrimazola, stanice su inkubirane na temperaturi od 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je određen učinak otapala na stanice MTS metodom.

3.2.3. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica

MTS metoda je kolorimetrijska metoda za određivanje broja vijablinih stanica prilikom istraživanja citotoksičnosti. The CellTiter 96® AQueous One Solution reagens sadržava tetrazolijevu sol MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij i PES (fenazin etosulfat) koji poboljšava stabilnost reagensa. MTS sol se u stanicama reducira do ljubičasto obojenog produkta, formazana koji je topljiv u staničnom mediju (Slika 6). Reakcija redukcije odvija se u prisutnosti NADH ili NADPH koji nastaju djelovanjem enzima dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica.



Slika 6. Prikaz strukture tetrazolijevе soli, MTS-a i reduciranog produkta, formazana

Nakon tretmana niskotemperaturnim eutektičim otapalima i terapijskim eutektičkim otapalom, medij je uklonjen te je u svaku jažicu dodan svježi medij s MTS reagensom (10% v/v). Ploče su vraćene na inkubaciju 1-4 sata na 37 °C. Intenzitet razvijene boje mjeri se spektrofotometrijski čitačem ploča te je izražen kao apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je količini nastalog formazana, koja je proporcionalna broju živih stanica. Postotak preživljenja stanica izračunava se množenjem omjera apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica sa 100, tj. prema formuli (2):

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \cdot 100 \quad (2)$$

3.2.4. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Obje stanične linije svakodnevno su promatrane pod inverznim mikroskopom, kako bi se uočile eventualne morfološke promjene. Stanice su, zbog bolje vidljivosti na fotografijama, obojane bojom kristal-ljubičasto. U ploču sa 24 jažice nacijepljeno je 0,5 mL suspenzije stanica početne koncentracije $3 \cdot 10^4$ stanica mL^{-1} te su stanice tretirane različitim koncentracijama eutektičkog otapala Ty:C₈. Ploča je zatim stavljena na inkubaciju 72 sata. Nakon inkubacije uklonjen je medij, stanice su isprane PBS puferom te je u svaku jažicu dodano 300 μL otopine boje kristal-ljubičasto. Ploča je, nakon dodatka boje, vraćena u inkubator na 10-15 minuta, boja je uklonjena te su stanice još jednom isprane PBS puferom. Ovako obojane stanice slikane su Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

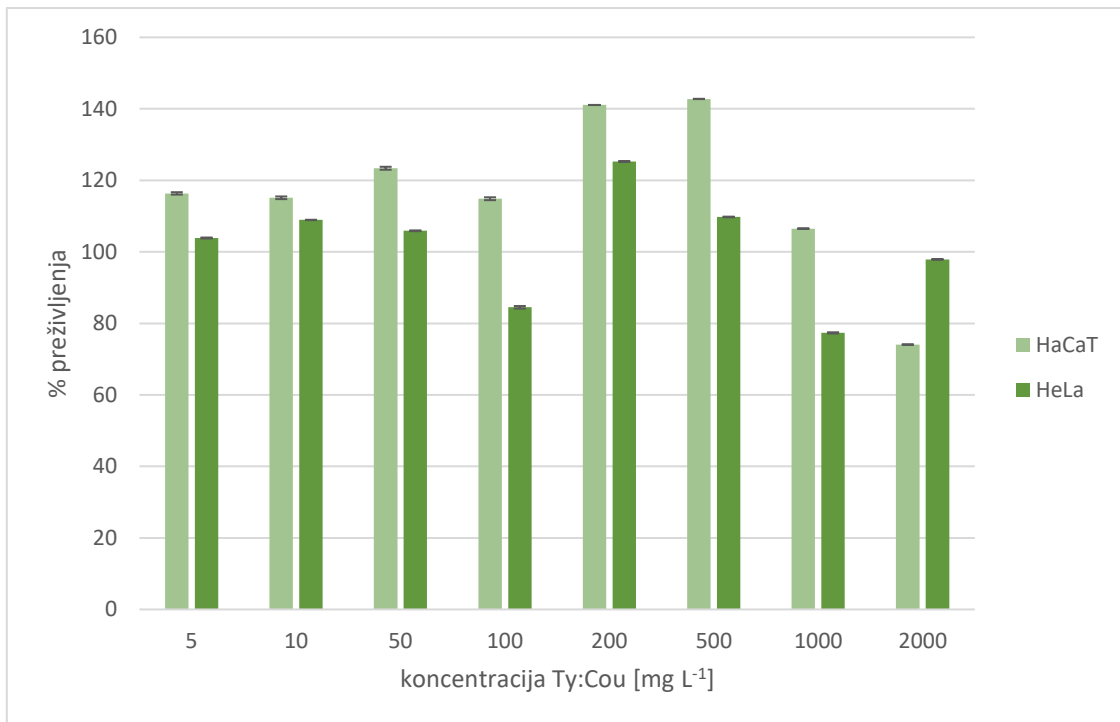
4. REZULTATI I RASPRAVA

Niskotemperaturna eutektička otapala, zbog svojih pozitivnih svojstava i mogućnosti dizajniranja za različite primjene, pokazala su potencijal za primjenu u raznim granama industrije. Jedno od područja primjene je farmaceutska industrija, gdje se očekuje moguća primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za otapanje djelatne tvari lijekova. Prije primjene u industriji i proizvodnje u velikom mjerilu, potrebno je ispitati djelovanje niskotemperaturnih eutektičkih otapala na ljude i okoliš te utvrditi je li njihova primjena sigurna.

Cilj ovog rada bio je ispitati citotoksično djelovanje triju niskotemperaturnih eutektičkih otapala sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, na HaCaT i HeLa staničnu liniju te terapijskog eutektičkog otapala na HaCaT staničnoj liniji. Ispitano je djelovanje niskotemperaturnih eutektičkih otapala timol:kumarin (Ty:Cou), timol:dekanska kiselina (Ty:C₁₀), timol:oktanska kiselina (Ty:C₈) te timol:oktanska kiselina:klotrimazol (Ty:C₈:CLO). HaCaT stanična linija često se koristi za određivanje citotoksičnosti u *in vitro* istraživanjima. Ova stanična linija ima visoku sposobnost diferencijacije i proliferacije te vrlo dobro izražava karakteristike humanih keratinocita. Za usporedbu, citotoksično djelovanje ispitano je i na HeLa staničnoj liniji izoliranoj iz tumora vrata maternice, koja se koristi u mnogim istraživanjima te je do sada objavljen niz radova u kojima je djelovanje DES-ova ispitano na HeLa stanicama. Stanice su uzgajane u DMEM mediju s dodatkom FBS seruma, tretman navedenim eutektičkim otapalima trajao je 72 sata, nakon čega je preživljenje stanica određeno MTS metodom.

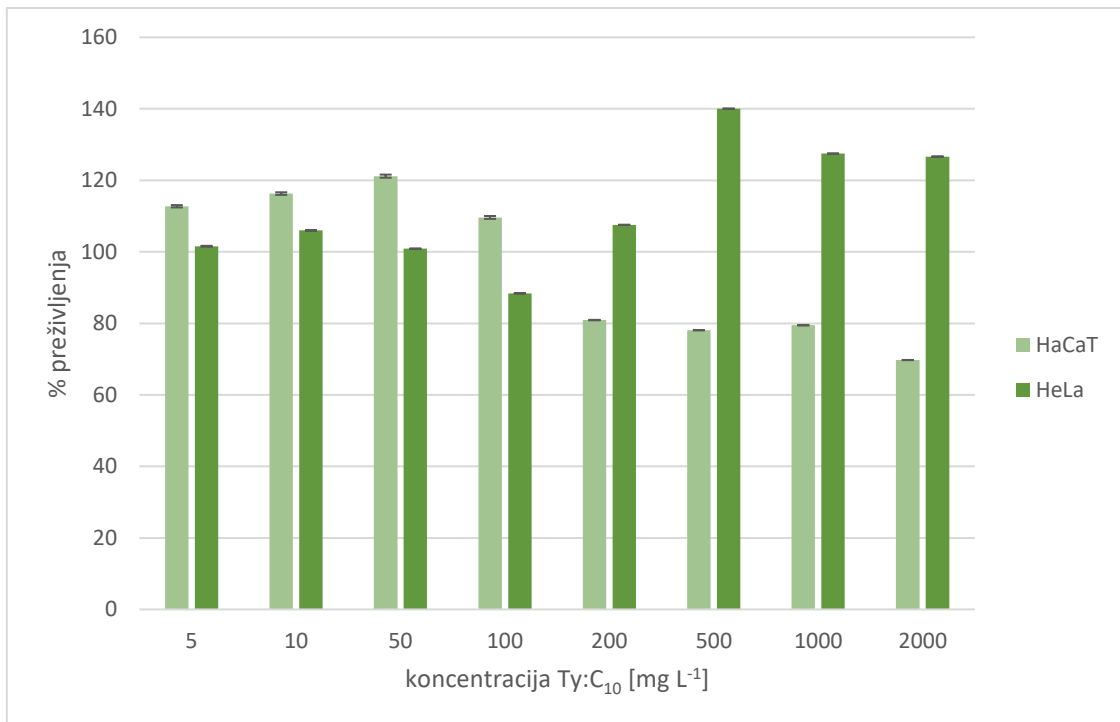
4.1. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na HaCaT i HeLa staničnu liniju

HaCaT i HeLa stanice naciepljene su na ploče s 96 jažica te nakon 24 sata tretirane niskotemperaturnim eutektičkim otapalima Ty:Cou, Ty:C₁₀ i Ty:C₈ u rasponu masenih koncentracija od 5 do 2000 mg L⁻¹. Nakon inkubacije koja je trajala 72 sata, MTS kolorimetrijskom metodom određeno je preživljenje stanica. Rezultat je izražen kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Utjecaj ispitanih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na HaCaT i HeLa stanične linije prikazan je na slikama 7, 8 i 9.



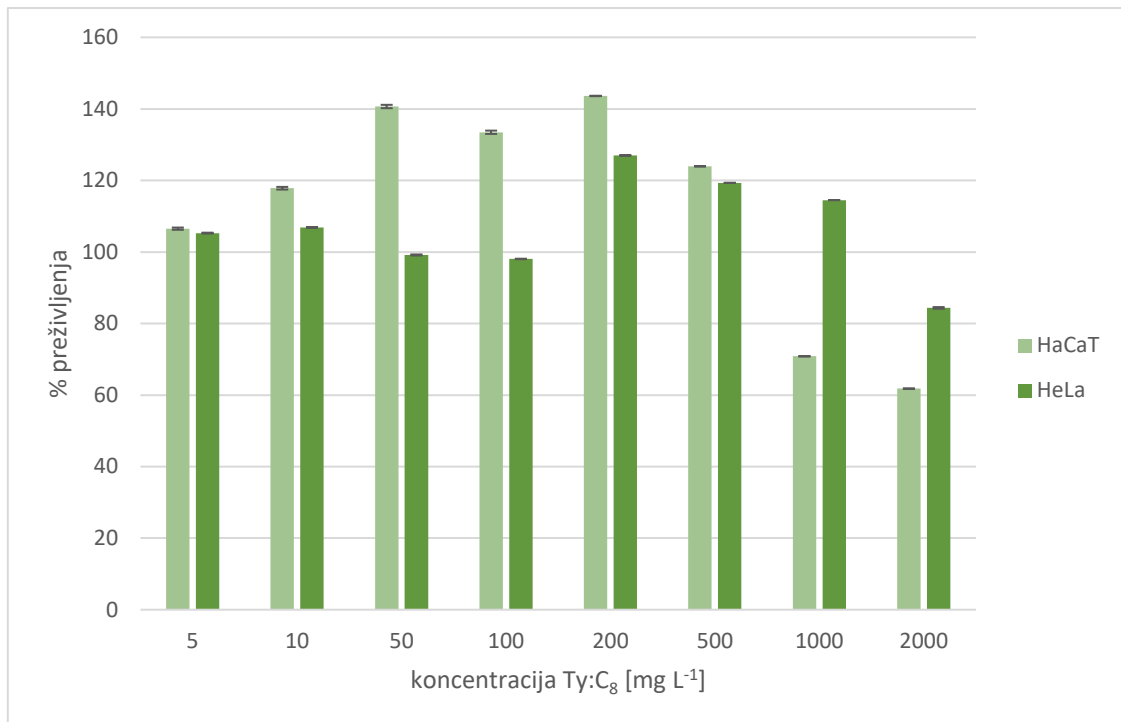
Slika 7. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ty:Cou na HaCaT i HeLa stanične linije

Najjače inhibitorno djelovanje niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ty:Cou, na rast HaCaT stanične linije, vidljivo je pri koncentraciji od 2000 mg L⁻¹. Preživljenje stanica pri toj koncentraciji otapala iznosi 74%, u odnosu na kontrolne stanice. Rast HeLa stanica najjače je inhibiran pri koncentraciji otapala od 1000 mg L⁻¹ te je preživljenje stanica, pri toj koncentraciji, 77%. Preživljenje stanica, ni pri najvišim koncentracijama, nije manje od 50% te se da zaključiti da je EC₅₀ vrijednost viša od 2000 mg L⁻¹ (Radošević i sur., 2016). Iz navedenog proizlazi da je Ty:Cou nisko citotoksično eutektičko otapalo.



Slika 8. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ty:C₁₀ na HaCaT i HeLa stanične linije

Djelovanje Ty:C₁₀ najjače je inhibiralo rast HaCaT stanica pri koncentraciji od 2000 mg L⁻¹ te preživljenje stanica iznosi 70%, u odnosu na kontrolne stanice. Najjače inhibitorno djelovanje prema HeLa stanicama, vidljivo je pri koncentraciji od 100 mg L⁻¹. Preživljenje stanica iznosi 88%. Ty:C₁₀ je također nisko citotoksično eutektičko otapalo.



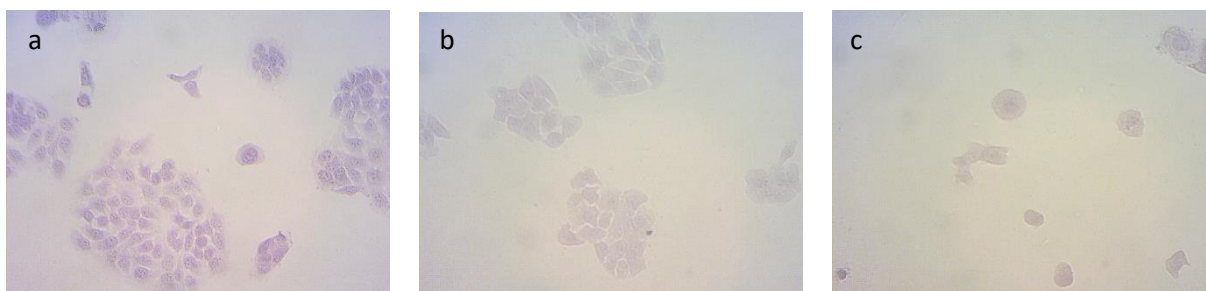
Slika 9. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ty:C₈ na HaCaT i HeLa stanične linije

Ty:C₈ najjače je inhibirao rast obje stanične linije pri najvišoj primjenjenoj koncentraciji, 2000 mg L⁻¹. Preživljenje HaCaT stanica iznosilo je 62%, a HeLa 84% u odnosu na kontrolne stanice. Iako je Ty:C₈ imao pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (2000 mg L⁻¹) najjači citotoksični učinak od sva tri ispitana niskotemperaturna eutektička otapala, niti to otapalo nije izazvalo inhibiciju rasta stanica veću od 50% stoga i ono ima nisku citotoksičnost i može se smatrati sigurnim za primjenu.

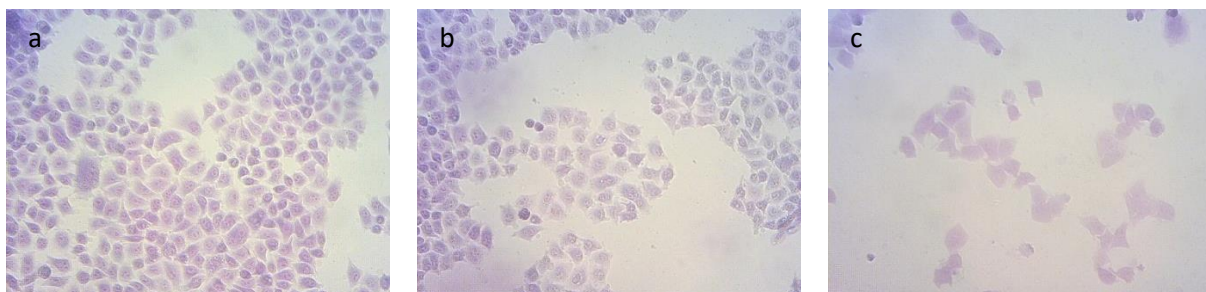
Citotoksičnost hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala još nije dovoljno istražena te se njihova niska toksičnost i *zeleni* karakter pretpostavljaju na temelju niske toksičnosti komponenata iz kojih se DES priprema. Do sada je objavljeno tek nekoliko znanstvenih radova, a konkretno ispitivana otapala u ovom radu još nisu okarakterizirana (Dwamena, 2019). Iz navedenih rezultata moguće je zaključiti da ispitana niskotemperaturna eutektička otapala posjeduju nisko citotoksično djelovanje na HaCaT stanice te su sigurna za primjenu. Ono što je vidljivo iz rezultata je da veće koncentracije uzrokuju jaču inhibiciju rasta stanica od nižih koncentracija. Ispitivana otapala, također su pokazala nisko citotoksično djelovanje i na HeLa staničnoj liniji.

4.2. Morfologija HaCaT i HeLa stanica tretiranih niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Uz ispitivanje djelovanja niskotemperaturnih eutektičkih otapala na rast i preživljenje HaCaT i HeLa stanica, svakodnevno je pod mikroskopom promatran izgled i brojnost tretiranih stanica. Stanice su fotografirane nakon 72-satnog tretmana i bojanja otopinom boje kristal-ljubičasto. Na slici 10 prikazane su HaCaT kontrolne stanice te stanice tretirane niskotemperaturnim eutektičkim otapalom Ty:C₈ koji je od tri ispitana DES-a imao najjači učinak na obje stanične linije. Na slici 11 prikazane su HeLa kontrolne stanice i stanice tretirane Ty:C₈.



Slika 10. HaCaT stanična linija obojana bojom kristal-ljubičasto i slikana pod inverznim svjetlosnim mikroskopom: a) kontrolne stanice b) stanice tretirane s 200 mg L⁻¹ Ty:C₈ c) stanice tretirane s 2000 mg L⁻¹ Ty:C₈

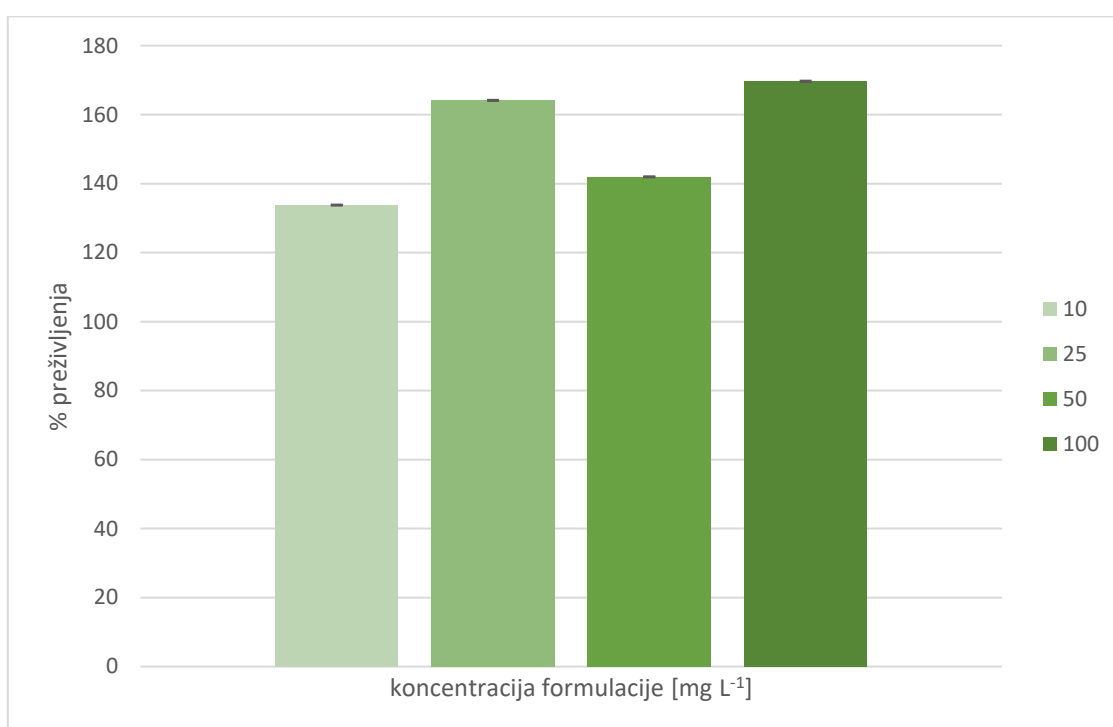


Slika 11. HeLa stanična linija obojana bojom kristal-ljubičasto i slikana pod inverznim svjetlosnim mikroskopom: a) kontrolne stanice b) stanice tretirane s 200 mg L⁻¹ Ty:C₈ c) stanice tretirane s 2000 mg L⁻¹ Ty:C₈

Na slikama 10 i 11 vidljivo je da niskotemperaturno eutektičko otapalo Ty:C₈ ima učinak na rast HaCaT i HeLa stanica te da je učinak ovisan o koncentraciji otapala. U odnosu na kontrolne stanice vidljive su određene morfološke promjene kod tretiranih HaCaT i HeLa stanica. Kontrolne stanice (Slika 10a i Slika 11a) imaju odgovarajuća morfološka obilježja HaCaT i HeLa stanica te lijepo porastao monosloj stanica. Osim manje gustoće monosloja, kod tretiranih stanica (Slika 10b,c i Slika 11b,c), vidljivo je i zaokruživanje stanica koje su se vjerojatno zbog blagog citotoksičnog djelovanja ispitane otapala odvojile od podloge za uzgoj.

4.3. Učinek terapijskog eutektičkog otopala na HaCaT stanice

Ty:C₈ je od tri ispitana NADES-a imao najizraženiji učinak na rast HaCaT i HeLa stanica, no općenito je niske citotoksičnosti spram HaCaT i HeLa stanica, stoga je u ovom radu ispitan učinak upravo tog niskotemperaturnog eutektičkog otopala kao sastavnog dijela nove formulacije klotrimazola, odnosno tzv. terapijskog eutektičkog otopala. Naime *in silico* modeliranjem i eksperimentalnom metodom (neobjavljeni rezultati), upravo je u tom otopalu postignuta najbolja topljivost djelatne aktivne tvari. S obzirom na to da je klotrimazol antimikotik koji se većinom koristi za topikalnu primjenu, djelovanje sintetiziranog THEDES-a, timol:oktanska kiselina:klotrimazol (1:3:0,1), ispitano je samo na stanicama keratinocita, odnosno na HaCaT staničnoj liniji te su dobiveni rezultati prikazani na slici 12.



Slika 12. Utjecaj terapijskog eutektičkog otopala Ty:C₈:CLO na HaCaT stanice

Terapijsko eutektičko otopalo Ty:C₈:CLO ni pri jednoj od primjenjenih koncentracija nije inhibiralo rast HaCaT stanica te se može zaključiti da navedena formulacija klotrimazola nema toksično djelovanje na stanice kože.

U dostupnoj literaturi je malo poznato o *in vitro* ispitivanjima učinka hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otopala na stanicama te njihovoj primjeni za razvoj novih formulacija lijekova, stoga su rezultati navedeni u radu vrijedna smjernica za nastavak istraživanja koja će se provoditi u narednom periodu u sklopu projekta: HRZZ IP-2019-04-7712 Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otopala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Niskotemperaturna eutektička otapala timol:kumarin, timol:oktanska kiselina i timol:dekanska kiselina, u ispitanim koncentracijama ($5 - 2000 \text{ mg L}^{-1}$) imaju nisko citotoksično djelovanje na HaCaT staničnu liniju te su sigurna za topikalnu primjenu
2. Niskotemperaturna eutektička otapala (Ty:Cou, Ty:C₈ i Ty:C₁₀), u ispitanim koncentracijama ($5-2000 \text{ mg L}^{-1}$) imaju nisko citotoksično djelovanje na HeLa staničnu liniju te se mogu smatrati sigurnima za daljnju primjenu.
3. Terapeutsko eutektičko otapalo timol:oktanska kiselina:klotrimazol ne djeluje negativno na stanice kože te je ova formulacija klotrimazola sigurna za topikalnu primjenu
4. Niskotemperaturno eutektičko otapalo Ty:C₈ uzrokuje određene morfološke promjene, kao što su manja gustoća monosloja i zaokruživanje stanica, na HaCaT i HeLa stanicama te je učinak otapala ovisan o koncentraciji otapala

6. LITERATURA

- Abbott A., Ahmed E., Prasad K., Qader I., Ryder K. (2017) Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation. *Fluid Phase Equilibria* **448**: 2-8.
- Aroso I. M., Silva J. C., Mano F., Ferreira A. S. D., Dionísio M., Sá-Nogueira I., Barreiros S., Reis R. L., Paiva A., Duarte A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **98**: 57–66.
- Berton P., Di Bona K. R., Yancey D., Rizvi S. A. A., Gray M., Gurau G., Shamshina J. L., Rasco J. F., Rogers R. D. (2017) Transdermal Bioavailability in Rats of Lidocaine in the Forms of Ionic Liquids, Salts, and Deep Eutectic. *ACS medicinal chemistry letters* **8**(5): 498–503.
- Choi Y., H.van Spronsen J., Dai Y., Verberne M., Hollmann F., Arends I. W. C. E., Witkamp G. J., Verpoorte R. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant physiology* **156**(4): 1701–1705.
- Dai Y., Rozema E., Verpoorte R., Choi Y. H. (2016) Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A* **1434**: 50–56.
- Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta* **766**: 61–68.
- Duarte A. R. C., Ferreira A. S. D., Barreiros S., Cabrita E., Reis R. L., Paiva A. (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **114**: 296–304.
- Dwamena A. (2019) Recent Advances in Hydrophobic Deep Eutectic Solvents for Extraction. *Separations* **6**: 9.
- El Achkar T., Greige-Gerges H., Fourmentin S. (2021) Understanding the Basics and Properties of Deep Eutectic Solvents. U: *Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances*, 1. izd., Fourmentin S., Costa Gomes M., Lichtfouse E., ur., Springer International Publishing, str. 1–40.
- Hayyan M., Hashim M. A., Al-Saadi M. A., Hayyan A., AlNashef I. M., Mirghani M. E. S.

- (2013) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**(2): 455–459.
- Hayyan M., Hashim M. A., Hayyan A., Al-Saadi M. A., AlNashef I. M., Mirghani M. E. S., Saheed O. K. (2013) Are deep eutectic solvents benign or toxic?. *Chemosphere* **90**(7): 2193–2195.
- Li Z., Lee P. I. (2016) Investigation on drug solubility enhancement using deep eutectic solvents and their derivatives. *International journal of pharmaceutics* **505**(1–2): 283–288.
- Lu C., Cao J., Wang N., Su E. (2016) Significantly improving the solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs in deep eutectic solvents for potential non-aqueous liquid administration. *MedChemComm* **7**(5): 955–959.
- Mitar A., Panić M., Kardum J., Halambek J., Sander A., Zagajski Kučan K., Radojčić Redovniković I., Radošević K. (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **33**: 1–18.
- Morrison H. G., Sun C. C., Neervannan S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *International journal of pharmaceutics* **378**(1–2): 136–139.
- Naturex (2015) *Naturex*. <<https://www.naturex.com/Media2/Press-releases/Naturex-launches-the-first-ever-NaDES-based-botanical-collection-and-expands-the-science-of-deep-eutectic-solvents>> Pristupljeno 3. srpnja 2021.
- Nguyen C. H., Augis L., Fourmentin S., Barratt G., Legrand F. X. (2021) Deep Eutectic Solvents for Innovative Pharmaceutical Formulations. U: *Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances*, 1. izd., Fourmentin S., Costa Gomes M., Lichtfouse E., ur., Springer International Publishing, str. 41–102.
- Olivares B., Martínez F., Rivas L., Calderón C. M., Munita J. R., Campodonico P. (2018) A Natural Deep Eutectic Solvent Formulated to Stabilize β -Lactam Antibiotics. *Scientific Reports* **8**(1): 14900.
- Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2**(5): 1063–1071.
- Panić M. (2020) Application of natural deep eutectic solvents in isolation of anthocyanins and

biocatalysis with lipase. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu

Panić M., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I. (2020) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **96**: 14-30

Pedro S. N., Freire M. G., Freire C. S. R., Silvestre A. J. D. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* **16**(5): 497–506.

Phaechamud T., Tuntarawongsa S., Charoensuksai P. (2016) Evaporation Behavior and Characterization of Eutectic Solvent and Ibuprofen Eutectic Solution. *AAPS PharmSciTech* **17**(5): 1213–1220.

Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Redovniković R. I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **112**: 46–53.

Radošević K., Železnjak J., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I., Slivac I., Gaurina Srček V. (2016) Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **131**: 30–36.

Ruesgas-Ramón M., Suárez-Quiroz M. L., González-Ríos O., Baréa B., Cazals G., Figueroa-Espinoza M. C., Durand E. (2020) Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. *Journal of the science of food and agriculture* **100**(1): 81–91.

Silva J. M., Pereira C. V., Mano F., Silva E., Castro V. I. B., Sá-Nogueira I., Reis R. L., Paiva A., Matias A. A., Duarte A. R. C. (2019) Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. *ACS Applied Bio Materials* **2**(10): 4346–4355.

Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114**(21): 11060–11082.

Tang B., Row K. H. (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **144**(10): 1427–1454.

Wang W., Cai Y., Liu Y., Zhao Y., Feng J., Liu C. (2017) Microemulsions based on paeonol-menthol eutectic mixture for enhanced transdermal delivery: formulation development and in vitro evaluation. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **45**(6): 1–6.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Đunića Šarac

ime i prezime studenta