

# **Učinci polifenola i ferocenskih konjugata polifenola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama ovarija**

---

**Jurišić, Anica**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:971551>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-27**



prehrambeno  
biotehnološki  
fakultet

*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

## DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Anica Jurišić

1387/MB

**UČINCI POLIFENOLA I  
FEROCENSKIH KONJUGATA  
POLIFENOLA NA RAZINU  
REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA  
U STANICAMA OVARIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ivane Kmetić te uz pomoć doc.dr.sc. Teute Murati i Marine Miletić, mag.ing.



Ovaj rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta **IP-2020-02-9162** „*Ferocenski analozi biomolekula: struktturna karakterizacija i biološka evaluacija*“

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Ivani Kmetić za mentorstvo te silno strpljenje i razumijevanje tijekom izrade ovog rada. Hvala Vam što ste prepoznali moju ljubav prema znanosti i što ste neprestano poticali znatiželju i želju za učenjem.

Veliko hvala doc.dr.sc. Teuti Murati na stručnim savjetima i pomoći pri izradi, a ogromno hvala mag.ing. Marini Miletić na neizmjernom strpljenju, svim savjetima, ohrabrvanju i podršci tijekom izrade ovog rada. Presretna sam što sam bila dio vašeg tima.

Hvala mojoj obitelji, posebno mami i tati što su mi omogućili da studiram ono što volim i podržavali me na svakom koraku do cilja, a zahvale dugujem i prijateljima i dečku koji su bili uz mene za svaki ispit.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### UČINCI POLIFENOLA I FEROCENSKIH KONJUGATA POLIFENOLA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U STANICAMA OVARIJA

Anica Jurišić 1397/MB

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati kakav učinak imaju različite koncentracije antioksidansa poput resveratrola i kurkumina te njihovih novosintetiziranih ferocenskih konjugata na razinu ROS-a i vijabilnost stanica u CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - K1 staničnoj liniji. U tu svrhu proveden je test za detekciju ROS-a te MTT test za procjenu vijabilnosti stanica. Pri tretmanu stanica ferocenskim konjugatom resveratrola (RF) razina ROS-a bila je najmanja u odnosu na preostala tri ispitana spoja te je stoga upravo taj bioorganometalni spoj odabran za određivanje mogućeg protektivnog učinka pri tretmanu stanica induktorima oksidacijskog stresa kao što su tert-butil hidroperoksid (TBHP) i kongener polikloriranih bifenila – PCB 77. RF je u svim ispitanim koncentracijama (1; 2,5 i 20 µM) značajno smanjio ROS induciran 50 µM TBHP-om. Također, određena je niža razina ROS-a u onim stanicama koje su bile predinkubirane RF-om, a zatim izložene 75 µM PCB-u 77 u odnosu na stanice izložene samo PCB-u 77, no u ovom slučaju učinak nije bio statistički signifikantan.

**Ključne riječi:** resveratrol, kurkumin, ferocen, ROS, vijabilnost stanica

**Rad sadrži:** 48 stranica, 24 slike, 3 tablice, 58 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetić

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Teuta Murati; Marina Miletić, mag.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc.dr.sc. Teuta Murati
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetić
3. izv.prof.dr.sc. Veronika Kovač
4. izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević (zamjena)

**Datum obrane:** 20. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### EFFECTS OF POLYPHENOLS AND FERROCENE-POLYPHENOL CONJUGATES ON REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVELS IN OVARIAN CELLS

Anica Jurišić 1397/MB

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of antioxidants such as resveratrol and curcumin and their novel synthesized ferrocene conjugates on the levels of ROS and viability of CHO (Chinese Hamster Ovary) - K1 cells. The ROS detection kit and MTT assay were used for this purpose. Treatment of CHO - K1 cells with ferrocene-resveratrol conjugate (RF) resulted in the lowest ROS levels compared to the other compounds tested. Therefore, RF was selected to determine its potential protective effect when CHO - K1 cells were treated with oxidative stress inducers such as tert-butyl hydroperoxide (TBHP) and polychlorinated biphenyl congener - PCB 77. RF significantly reduced 50 µM TBHP-induced ROS levels at all concentrations tested (1; 2,5 and 20 µM). In addition, lower ROS levels were determined in cells pre-incubated with RF and then exposed to 75 µM PCB 77 compared to cells exposed to PCB 77 alone, but the effect was not statistically significant.

**Keywords:** resveratrol, curcumin, ferrocene, ROS, cell viability

**Thesis contains:** 48 pages, 24 figures, 3 tables, 58 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor

**Technical support and assistance:** PhD. Teuta Murati, Assistant Professor; Marina Miletic, M. S., Scientific Assistant

**Reviewers:**

1. PhD. Teuta Murati, Assistant Professor
2. PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor
3. PhD. Veronika Kovač, Associate Professor
4. PhD. Kristina Radošević, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** 20<sup>th</sup> July 2021

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD .....</b>  | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>  | 2  |
| 2.1. OKSIDACIJSKI STRES I REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (ROS).....   | 2  |
| 2.2. INDUKTORI OKSIDACIJSKOG STRESA .....   | 4  |
| 2.2.1. Tert-butil hidroperoksid (TBHP) .....  | 4  |
| 2.2.2. Kongener PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil) .....   | 5  |
| 2.3. POLIFENOLI.....  | 6  |
| 2.3.1. Stilbeni .....   | 6  |
| 2.3.1.1. Resveratrol .....  | 6  |
| 2.3.1.2. Doza-ovisni učinci resveratrola.....   | 7  |
| 2.3.1.3. Mehanizam protektivnog djelovanja resveratrola .....   | 8  |
| 2.3.2. Kurkuminoidi .....   | 10 |
| 2.3.2.1. Kurkumin .....   | 10 |
| 2.3.2.2. Doza-ovisni učinci kurkumina .....   | 11 |
| 2.3.2.3. Mehanizam protektivnog djelovanja kurkumina.....   | 11 |
| 2.4. BIOORGANOMETALNI SPOJEVI .....   | 12 |
| 2.4.1. Ferocenski konjugati resveratrola .....  | 12 |
| 2.4.2. Ferocenski konjugati kurkumina .....   | 14 |
| 2.5. <i>IN VITRO</i> TESTOVI TOKSIČNOSTI.....   | 15 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>  | 17 |
| 3.1. MATERIJALI .....   | 17 |
| 3.1.1. Biološki materijal .....   | 17 |
| 3.1.2. Kemikalije .....   | 17 |
| 3.1.3. Otopine i puferi .....   | 17 |
| 3.1.4. Oprema i uređaji.....  | 21 |
| 3.2. METODE RADA .....  | 21 |
| 3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi .....  | 21 |
| 3.2.2. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i> .....   | 22 |
| 3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica metodom <i>MTT</i> .....  | 22 |
| 3.2.4. Određivanje količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) u CHO-K1 stanicama korištenjem DCFDA kit-a ..... | 23 |
| 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....  | 25 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | 26 |
| 4.1. UČINAK RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA.....                                      | 27 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2. UČINAK FEROCEŃSKOG KONJUGATA RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA .....  | 30        |
| 4.3. UČINAK KURKUMINA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA .....   | 32        |
| 4.4. UČINAK FEROCEŃSKOG KONJUGATA KURKUMINA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA .....   | 34        |
| 4.5. USPOREDBA DJELOVANJA POLIFENOLA I FEROCEŃSKIH KONJUGATA POLIFENOLA NA RAZINU ROS-a u STANICAMA.....                                 | 37        |
| 4.6. UČINAK PREDINKUBACIJE FEROCEŃSKIM KONJUGATOM RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIM PCB-em 77 ILI TBHP-om ..... | 38        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>   | <b>43</b> |

## 1. UVOD

Veliki broj zdravstvenih problema kod ljudi povezuje se s prekomjernim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species, ROS*) i oksidacijskim stresom kojem su stanice izložene uslijed nemogućnosti uklanjanja ROS-a. ROS imaju blagotvorno djelovanje pri niskim koncentracijama jer reguliraju unutarstaničnu signalizaciju i održavaju homeostazu, dok pri visokim koncentracijama imaju ulogu u patogenezi različitih ljudskih bolesti. Dokazano je kako nakupljanje ROS-a može dovesti do oštećenja proteina, lipida i DNA u stanicama (Prasad i sur., 2017; Rodríguez-García i sur., 2019).

U održavanju ravnoteže i uklanjanju prekomjernog ROS-a važnu ulogu imaju tvari koje imaju antioksidacijska svojstva kao što ih imaju polifenoli. Resveratrol i kurkumin su polifenoli koji djeluju kao promotori antioksidacijskog djelovanja enzima i imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala stoga su predmet istraživanja prevencije i terapije degenerativnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom. Unatoč impresivnim svojstvima, navedene polifenole karakterizira slaba topljivost u vodi što ograničava terapijsku primjenu kod ljudi te se zbog toga sve više istražuju konjugati koji bi moduliranjem strukture polifenola pripomogli apsorpciji i ostvarenju protektivnog djelovanja (Rossi i sur., 2013; Uberti i sur., 2017; Kim i sur., 2021). Dobrim kandidatom za poboljšanje antioksidacijskog djelovanja mnogih tvari smatra se ferocen (Meng i sur., 2018). Resveratrol i kurkumin pokazuju bifazno djelovanje ovisno o dozi jer pri niskim koncentracijama reveratrol i kurkumin djeluju kao antioksidansi koji mogu zaštititi od oštećenja DNA i oksidacijskog stresa, a pri visokim koncentracijama djeluju prooksidacijski, odnosno povećavaju razinu oksidacijskog stresa i potiču oštećenja DNA (Moghaddam i sur., 2019; Shaito i sur., 2020).

Cilj ovog rada je ispitati kakav učinak imaju različite koncentracije polifenola (resveratrol i ferocenski konjugat resveratrola te kurkumin i ferocenski konjugat kurkumina) na razinu ROS-a i vijabilnost u CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - K1 staničnoj liniji (uz ili bez izlaganja stanica induktoru ROS-a). U tu svrhu proveden je test za detekciju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-a) u kojem se koristi reagens 2',7' - diklorfluorescin diacetat (DCFDA) te MTT test za određivanje vijabilnosti stanica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OKSIDACIJSKI STRES I REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (ROS)

Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) prirodni su nusprodukti staničnog metabolizma i imaju važnu ulogu u modulaciji staničnog preživljjenja, stanične smrti, diferencijacije, stanične signalizacije i proizvodnje upalnih čimbenika (Abdal Dayem i sur., 2017).

Nastanak ROS-a povezuje se s brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima te ROS imaju ulogu u patogenezi različitih ljudskih bolesti. Pri niskim koncentracijama ROS pokazuju blagovorne učinke regulirajući unutarstaničnu signalizaciju i održavajući staničnu homeostazu, dok se pri visokim koncentracijama nakupljanje ROS-a povezuje s oštećenjem proteina, lipida i DNA u stanicama (Prasad i sur., 2017).

Biološki značajni ROS uključuju slobodne radikale, poput singlet kisika ( ${}^1\text{O}_2$ ), superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hidroksila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), hidroperoksila ( $\text{HO}_2^{\bullet-}$ ), karbonata ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ), peroksil radikala ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ), alkoksila ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) i radikala ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$ ) te neradikale, poput vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hipobromne kiseline ( $\text{HOBr}$ ), hipoklorne kiseline ( $\text{HOCl}$ ), ozona ( $\text{O}_3$ ), organskih peroksida ( $\text{ROOH}$ ), peroksinitrita ( $\text{ONOO}^-$ ), peroksinitrata ( $\text{O}_2\text{NOO}^-$ ), peroksinitrozne kiseline ( $\text{ONOOH}$ ), dušikovog oksida ( $\text{NO}$ ) i hipoklorita ( $\text{OCl}^-$ ) (Abdal Dayem i sur., 2017).

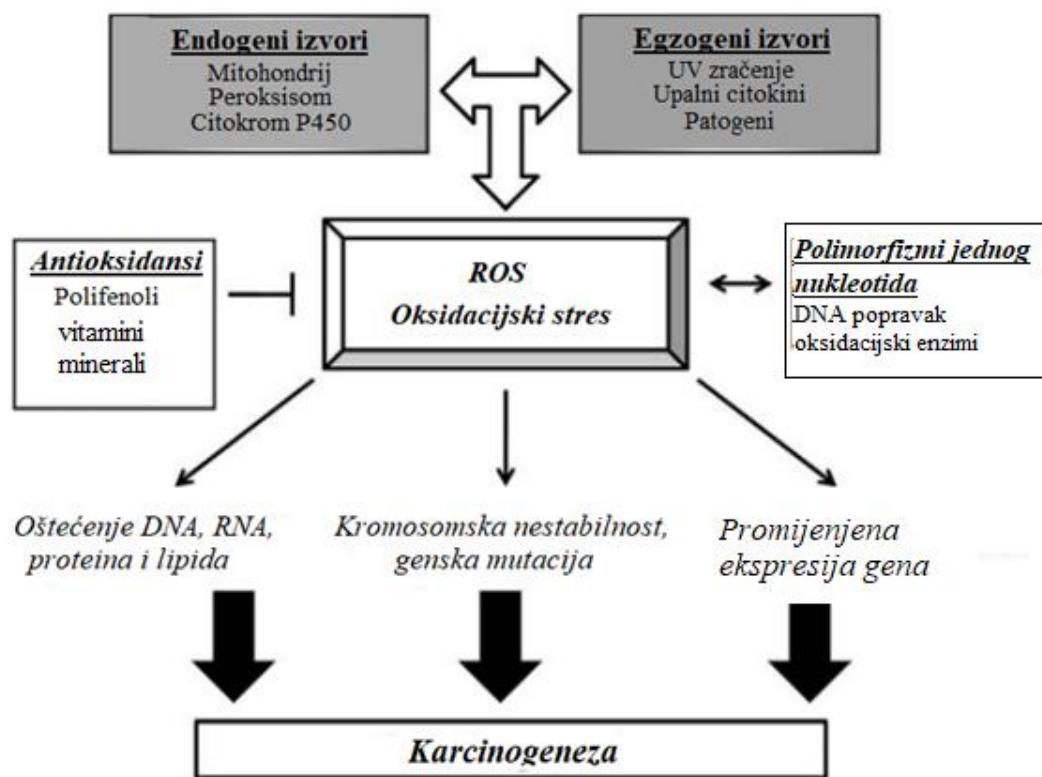
ROS se proizvode unutar stanica iz endogenih i egzogenih izvora, a učinci ROS-a u stanicama su brojni i ovise o njihovoј količini. Endogeni ROS proizvode se kao nusprodukti u organelima kao što su mitohondriji, peroksisomi, a mogu nastati i kao nusprodukt enzimatskog sustava citokrom P-450. Egzogeni izvori ROS-a su onečišćujuće tvari, duhan, dim, lijekovi, ksenobiotici, zračenje i drugi. Unutarstanični ROS proizvode se kroz više mehanizama, ovisno o tipu stanica i tkiva. Jedan od glavnih izvora unutarstaničnog ROS-a je NADPH oksidaza (NOX), enzimski sustav koji stvara ROS kao primarni produkt (Prasad i sur., 2017).

ROS imaju bitne biološke funkcije jer reguliraju mnoge signalne puteve izravnim djelovanjem i modificiranjem strukture proteina, transkripcijskih faktora i gena čime su njihove funkcije izmijenjene. ROS su uključeni u signaliziranje rasta i diferencijacije stanica, reguliranje aktivnosti enzima (poput ribonukleotid reduktaze), posredovanje upale stimulirajući proizvodnju citokina i uklanjajući patogene i strane čestice.

Slobodni radikali kisika reagiraju s biološkim molekulama, uključujući DNA, proteine i lipide što može prouzročiti oksidacijsku modifikaciju navedenih biomolekula i promijeniti njihove funkcije (Trachootam i sur., 2009).

Blagi porast razine ROS-a može biti rezultat privremenih promjena u stanicama, dok ozbiljan porast ROS-a u stanicama može uzrokovati nepovratna oksidacijska oštećenja i dovesti do stanične smrti (Trachootam i sur., 2009).

Kada količina prooksidansa nadmaši količinu antioksidansa, dolazi do nakupljanja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva u velikim količinama i u stanicama dolazi do oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres karakterizira velika količina ROS-a i usko je povezan s razvojem bolesti poput karcinoma uzrokovanih oksidacijskim lezijama u DNA. Postoje i mehanizmi koji štite od oksidacije, a s obzirom na brojne bolesti povezane s oksidacijskim stresom, raste interes za pronalaženje spojeva s antioksidacijskim djelovanjem kakvo imaju polifenoli poput kurkumina i resveratrola (Rodríguez-García i sur., 2019). Na slici 1 shematski je prikazana uloga ROS-a u stanicama i potencijalni ishodi ovisno o mogućnosti uklanjanja ROS-a u stanicama.



**Slika 1.** Uloga ROS-a u stanicama (prema Klaunig i sur., 2009)

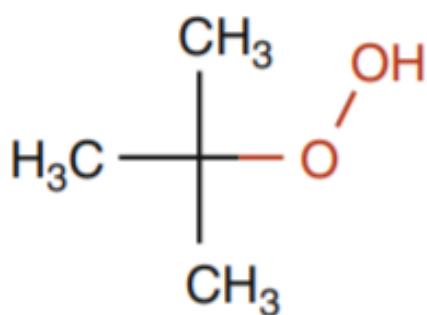
## 2.2. INDUKTORI OKSIDACIJSKOG STRESA

Proizvodnja slobodnih radikala i indukcija oksidacijskog stresa može nastati kao rezultat izloženosti zagađivačima okoliša, teškim metalima, određenim lijekovima i slično. Nakon ulaska egzogenih spojeva u organizam, oni se razgrađuju ili metaboliziraju, a slobodni radikali nastaju kao nusproizvodi (Pizzino i sur., 2017). Poliklorirani bifenili (engl. *polychlorinated byphenils*, PCBs) pripadaju skupini perzistentnih organskih zagađivača (engl. *persistent organic pollutants*, POPs) koje karakterizira vrlo dugo zadržavanje u okolišu i negativni učinci za ljudsko zdravlje (Jayaraj i sur., 2016), a u njih se ubraja kongener PCB 77 koji djeluje kao induktor oksigenaza i potiče oksidacijski stres (Murati, 2015). U poznate promotore oksidacijskog stresa i razvoja tumora ubrajaju se organski peroksidi i hidroperoksidi kojima je predstavnik spoj tert-butil hidroperoksid (TBHP) te se kao takav u istraživanjima često koristi za praćenje učinaka antioksidacijskih tvari (Zhang i sur., 2017).

### 2.2.1. Tert-butil hidroperoksid (TBHP)

Tert-butil hidroperoksid (TBHP) je organski hidroperoksid koji se često koristi u studijama za induciranje oksidacijskog stresa u stanicama i istraživanje uloge međuprodukata (radikala) u promociji tumora (Zhang i sur., 2017). Struktura TBHP-a prikazana je na slici 2.

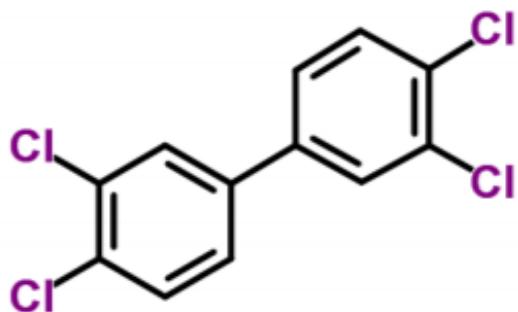
Toksičnost TBHP-a pripisuje se stvaranju radikala te indukciji DNA oštećenja u ljudskim stanicama, a osim toga TBHP stimulira aktivnost superoksid dismutaze i glutation peroksidaza (NCBI, 2021).



**Slika 2.** Struktura TBHP-a (Gad, 2014)

## 2.2.2. Kongener PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil)

Kongener PCB 77 (slika 3) se trenutno smatra jednim od najtoksičnijih PCB-a. Planarna struktura PCB-a 77 omogućava indukciju enzima monooksigenaza iz skupine mikrosomskih enzima citokrom P450. Zbog dokazanog teratogenog, mutagenog, kancerogenog, hepatotoksičnog i neurotoksičnog djelovanja, sve su brojnije *in vivo* i *in vitro* studije koje proučavaju biološki učinak PCB-a 77 (Murati, 2015).



**Slika 3.** Struktura PCB 77 (Murati, 2015)

Izloženost PCB-u 77 povezuje se sa širokim spektrom bioloških učinaka, poput poremećaja endokrinih funkcija i sinteze spolnih hormona. Pri tretmanu CHO-K1 stanica PCB-em 77 u koncentraciji 10 - 100 µM zabilježeno je smanjenje vijabilnosti stanica i citotoksičnost ovisna o primijenjenoj dozi. Dokazano je kako PCB 77 potencijalno djeluje na lizosome/endosome, interferira u sintezi proteina te aktivira proteine apoptoze (kaspaza 3). To ukazuje na negativan utjecaj PCB-a 77 na stanice ovarija (Murati i sur., 2015).

Mehanizmi djelovanja PCB-a, uključuju aktivaciju specifičnih receptora, poput Ah receptora i konstitutivnog androstanskog receptora (engl. *constitutive androstane receptor*, CAR), čime dolazi do induciranja sustava citokrom P-450. U brojnim studijama, zabilježeno je kako PCB izazivaju oksidacijski stres i povećavaju lipidnu peroksidaciju (Glauert i sur., 2008).

## 2.3. POLIFENOLI

Polifenoli su jedni od najzastupljenijih spojeva u prirodi, a nastaju kao sekundarni metaboliti u biljkama koje ih koriste kao obrambene agense (zaštita od štetnog UV zračenja, uklanjanje slobodnih radikala, pomoć pri opravšivanju i drugo). Najčešće je zastupljena podjela polifenola u dvije velike skupine – flavonoide i ne-flavonoide od kojih svaka ima mnoštvo podskupina i široki spektar polifenolnih spojeva koji im pripadaju (Rasouli i sur., 2017).

### 2.3.1. Stilbeni

Stilbeni su podskupina ne-flavonoidnih polifenola te su predmet brojnih istraživanja zbog njihovih protektivnih svojstava. Prema strukturi stilbeni su derivati 1,2-difeniletena (Durazzo i sur., 2019).

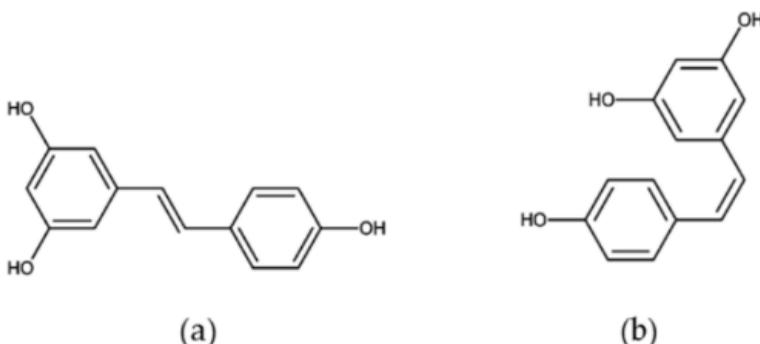
Resveratrol i njegovi derivati poput pterostilbena, oksi-resveratrola ili viniferina, najviše su istraživani predstavnici stilbena zbog različitih bioloških aktivnosti (Dubrovina i Kiselev, 2017). Različitu biološku aktivnost duguju strukturnoj raznolikosti unutar same podskupine zbog brojnih supstitucijskih skupina i različitih načina polimerizacije. Mehanizmi kojima stilbeni štite stanice od oksidacijskog stresa uključuju aktivaciju transkripcije protektivnih gena putem interakcije u Nrf2/ARE (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response elements*) putu i sustavu glasnika cAMP (engl. *cyclic adenosine monophosphate*). Stilbeni potiču lokalizaciju transkripcijskog faktora Nrf2 u jezgru i aktivaciju Nrf2 ciljnih gena povezanih s antioksidacijskom obranom i autofagijom (Durazzo i sur., 2019).

#### 2.3.1.1. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidoksistilben) je prvi put izoliran 1939. godine iz biljke *Veratrum grandiflorum*, a zdravstvene blagodati resveratrola prvi puta su istaknute početkom 1990-ih proučavanjem „francuskog paradoksa“ i od tada traje opsežno istraživanje aktivnosti navedenog spoja (Shaito i sur., 2020).

Resveratrol se nalazi u preko 70 biljnih vrsta, a sintezu ove molekule u biljkama katalizira resveratrol sintaza u fenilpropanoidnom putu. Resveratrol ima dva fenolna prstena koji su povezani dvostrukom stirenskom vezom zbog čega postoji u *cis* i *trans* izomernom obliku (slika 4) pri čemu je *trans* izomerni oblik učestaliji i stabilniji prirodni oblik.

Resveratrol ima tri hidroksilne skupine koje sudjeluju u uklanjanju slobodnih radikala i kelaciji metala. Prisutnost hidroksilnih skupina olakšava interakciju s makromolekulama i stvaranje kompleksa (Galiniak i sur., 2019).



**Slika 4.** Strukture *trans*-resveratrola (a) i *cis*-resveratrola (b) (Meng i sur., 2021)

Resveratrolom su bogate mnoge biljke, voće i voćni derivati, poput grožđa, vina, jabuka, malina, borovnica, pistacije, šljiva, kikirikija i mnoštva drugih ljekovitih i jestivih biljnih vrsta. Eksperimentalne i pretkliničke studije pripisale su resveratrolu nekoliko učinaka na poboljšanje zdravlja, uključujući kardioprotективне учинке, preventivnu aktivnost kod različitih karcinoma i sposobnost produženja životnog vijeka organizama (Weiskirchen i Weiskirchen, 2016).

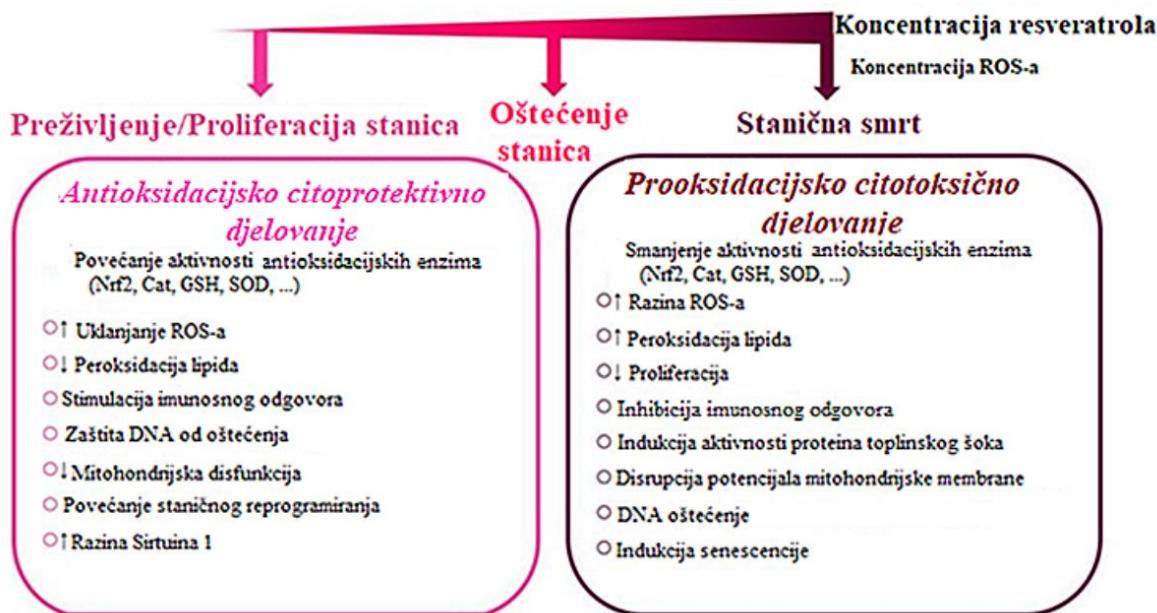
Resveratrolu se pripisuju antioksidacijska, protuupalna, antikancerogena, antidijabetička, kardioprotективna i neuroprotektivna svojstva (Shaito i sur., 2020).

### 2.3.1.2. Doza-ovisni učinci resveratrola

Resveratrol ima ulogu u prevenciji i usporavanju napredovanja kroničnih bolesti koje nastaju zbog upalnih procesa - poput dijabetesa, pretilosti, kardiovaskularnih bolesti, neurodegeneracije i karcinoma. Interferirajući s nekoliko molekularnih „meta“ i utjecajem na djelovanje imunoloških stanica i ekspresiju gena, resveratrol regulira urođeni i steceni imunitet. Rezultati novijih istraživanja pokazuju kako su učinci resveratrola kontrastni s obzirom na primjenjenu dozu, tj. resveratrol pokazuje dvojako djelovanje koje ovisi o primjenjenoj dozi (slika 5) (Malaguarnera, 2019; Shaito i sur., 2020). Zabilježeno je da resveratrol modulira imunološku funkciju ovisno o dozi, odnosno pri niskim dozama resveratrol stimulira imunološki sustav, dok kod visokih doza izaziva imunosupresiju (Malaguarnera, 2019).

U niskim koncentracijama resveratrol djeluje kao antioksidans koji može zaštititi od oštećenja DNA i oksidacijskog stresa. S druge strane, u visokim koncentracijama, resveratrol djeluje prooksidacijski i potiče oštećenja DNA, istodobno povećavajući oksidacijski stres. Niske i visoke koncentracije nude blagotvorne učinke u prevenciji napredovanja raka. Primjenom niskih doza resveratrola utječe se na zaustavljanje rane faze raka (inicijacija i promocija).

Primjenom visokih koncentracija resveratrola inducira se stanična smrt zbog proksidacijskog djelovanja (resveratrol može dovesti do apoptoze i zaustavljanja staničnog ciklusa malignih stanica). Dokazano je da resveratrol inducira enzim kaspazu koja regulira smrt u stanicama raka jajnika putem mehanizma ovisnog o ROS-u (Shaito i sur., 2020).



**Slika 5.** Doza ovisni učinci resveratrola (prema Shaito i sur., 2020)

### 2.3.1.3. Mehanizam protektivnog djelovanja resveratrola

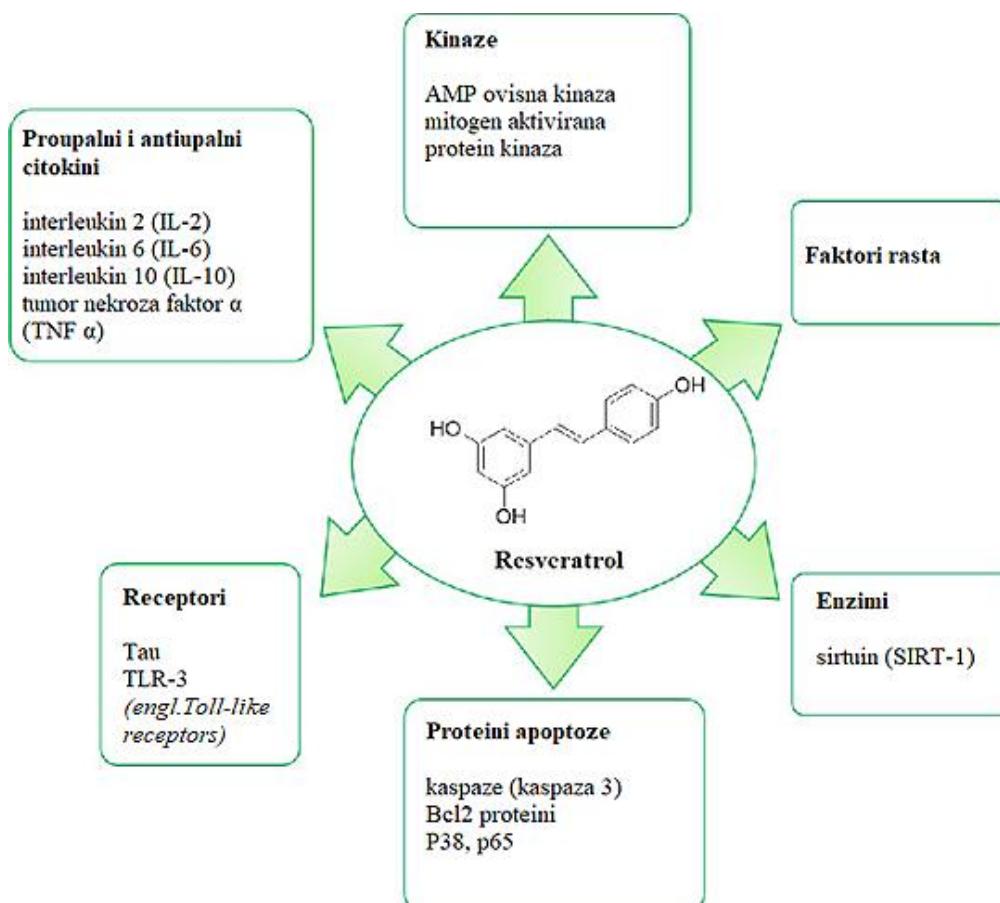
Zdravstvene blagodati resveratrola dobro su dokumentirane dok su mehanizam i izravni molekularne „mete“ njegovog djelovanja dugo vremena bili nepoznati (Tennen i sur., 2012). Novija istraživanja i razvoj novih metoda detekcije pokazali su kako resveratrol djeluje na niz molekularnih „meta“ i biokemijskih puteva (slika 6), ostvarujući protektivno djelovanje putem aktivacije antioksidacijskih enzima i „hvatanjem“ štetnih radikalova (Pannu i Bhatnagar, 2019).

Glavni mehanizmi protektivnog učinka resveratrola temelje se na prevenciji apoptoze i smanjenju razine ROS-a regulacijom ekspresije anti- ili proapoptočnih proteina koji su uključeni u antioksidacijske sustave te na poboljšanju funkcije mitohondrija (Galiniak i sur., 2019).

Protektivno djelovanje resveratrola uključuje različite mehanizme poput aktivacije proteina koji reguliraju ekspresiju gena. U te regulatore ubrajaju se npr.: sirtuin 1 (SIRT1, pripada obitelji proteina sirtuina koji imaju ulogu deacetilaza te reguliraju ekspresiju različitih gena), transkripcijski faktori Nrf-2 i NF-κB (engl. *nuclear factor kappa B*).

Osim toga, resveratrol modulira aktivnost antioksidacijskih enzima poput cikloksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX) te inducibilne sintaze dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) (Pannu i Bhatnagar, 2019; Saad i sur., 2020).

Aktivacija sirtuina dovodi do deacetilacije određenih histona, što vodi do promjena u ekspresiji različitih regulatora povezanih sa starenjem stanica. Nekoliko studija potvrdilo je da resveratrol ima više ciljnih proteina koji djeluju na smanjenje oksidacijskog stresa. Resveratrol uklanja slobodne radikale inhibiranjem enzima peroksiredoksin-2. Resveratrol stimulira antioksidacijski enzim mangan-superoksid dismutazu (Mn-SOD) što sprječava staničnu smrt stanica srčanog mišića izazvanu oksidacijskim stresom. Resveratrol povećava razine antioksidansa reduciranjem glutationa putem AMP ovisne kinaze (ima ulogu u očuvanju energetskog statusa stanice) što na kraju smanjuje hipertrofiju stanica srčanog mišića te smanjuje količinu peroksidiranih lipida (Pannu i Bhatnagar, 2019).



Slika 6. Molekularne „mete“ za resveratrol (prema Saad i sur., 2020)

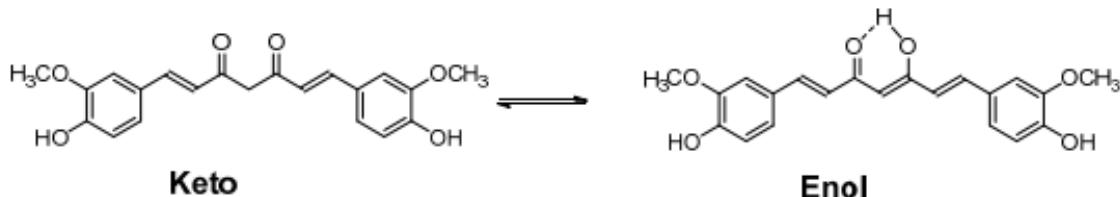
### 2.3.2. Kurkuminoidi

Kurkuminoidi, u koje se ubrajaju kurkumin, demetoksikurkumin i bisdemetoksikurkumin, pripadaju skupini biološki aktivnih ne-flavonoidnih polifenolnih spojeva izrazito žute boje. Identificirani su u korijenu biljke kurkume (*Curcuma longa*), a zahvaljujući terapeutskim svojstvima (antiupalna, antioksidacijska i antikancerogena svojstva) predmet su brojnih *in vivo* i *in vitro* istraživanja (Kotha i Luthria, 2019).

Među kurkuminoidima je najviše proučavan kurkumin kojemu su dobro opisana struktura i pridružena svojstva, a pripisuju mu se brojne blagodati za ljudsko zdravlje koje ostvaruje kroz različite mehanizme djelovanja.

#### 2.3.2.1. Kurkumin

Kurkumin je pigment žute boje te je prvi puta izoliran 1815. godine iz korijena biljke kurkume (*C. Longa*), a prvi puta je pročišćen 1842. godine. Kurkumin postoji u najmanje dva tautomerna oblika (slika 7) (keto u kiselim i neutralnim otopinama te enol u alkalnom mediju). Praktički je netopljiv u vodi pri kiselim i neutralnom pH, ali je topljiv u lužini. Stabilan je pri visokim temperaturama i u kiselinama, ali nestabilan u lužnatim uvjetima i u prisutnosti svjetlosti (Giuliani i sur., 2016; Kotha i Luthria, 2019).



**Slika 7.** Keto-enolni tautomeri kurkumina (Kotha i Luthria, 2019)

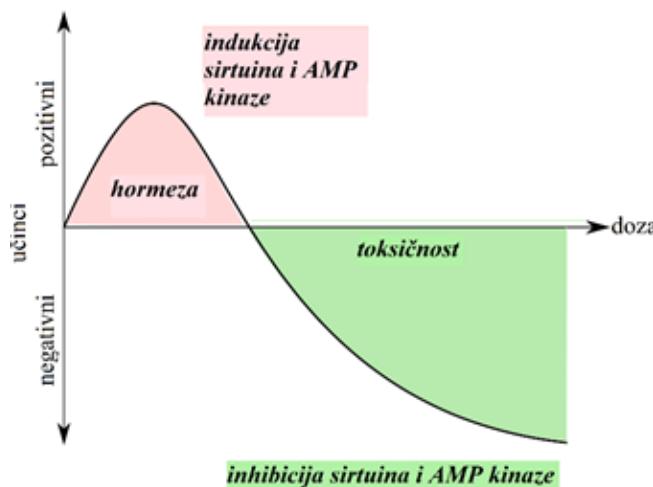
Pri pH u rasponu od 3 do 7, kurkumin djeluje kao izuzetno moćan donor vodikovih atoma i djeluje kao snažan antioksidans, dok iznad pH 8 kurkumin djeluje uglavnom kao donor elektrona. Zbog prisutnosti dvije fenolne skupine i aktivne metilenske skupine, kurkumin može vezati metale, najčešće željezo i bakar (Giuliani i sur., 2016).

Kurkumin je u istraživanjima pokazao protuupalno, protukancerogeno i antioksidacijsko djelovanje te veliku učinkovitost u zacjeljivanju rana (Moghaddam i sur., 2019). Navedena svojstva kurkumina moguća su zbog prisustva metoksi, hidroksilne, te  $\alpha$  i  $\beta$ -nezasićene karbonilne skupine ili diketonских skupina (Aggarwal i sur., 2015).

### 2.3.2.2. Doza-ovisni učinci kurkumina

Kurkumin pokazuje tzv. hormetički učinak (bifazno djelovanje ovisno o dozi) zato jer djeluje stimulativno na staničnu proliferaciju i vijabilnost u niskim dozama, a inhibitorno u visokim dozama. Također, pri niskim dozama, zabilježeno je da kurkumin ima antioksidacijsko djelovanje, a pri visokim dozama kurkumin inducira autofagiju i staničnu smrt.

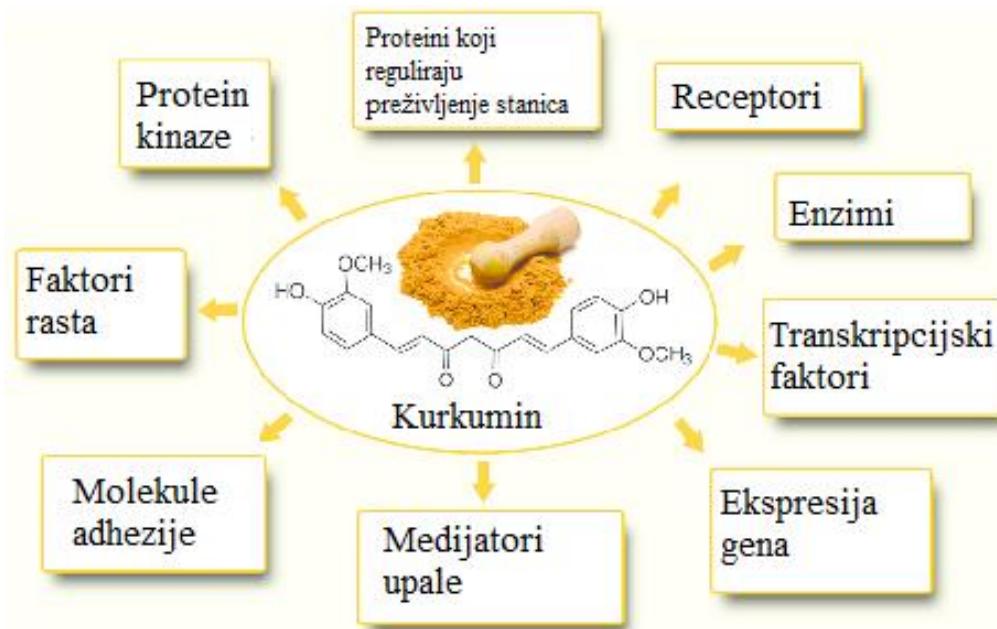
Niske doze kurkumina imaju izraženije protektivne učinke od visokih doza. Pri niskim koncentracijama kurkumin aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze i ima antioksidacijsko djelovanje (Moghaddam i sur., 2019). Niske doze kurkumina pokazuju pozitivne učinke na staničnoj razini tako što sudjeluju u aktivaciji sirtuina i AMP-ovisne kinaze (AMPK). Pri višim koncentracijama, kurkumin može djelovati citotoksično ili citostatično tako što djeluje na inhibiciju sirtuina i AMPK (slika 8) (Bielak-Zmijewska i sur., 2019).



**Slika 8.** Hormetički učinak kurkumina (prema Bielak-Zmijewska i sur., 2019)

### 2.3.2.3. Mehanizam protektivnog djelovanja kurkumina

Kurkumin ima širok raspon molekularnih „meta“ (slika 9) i utječe na veliki broj signalnih puteva, što povećava njegov potencijal protektivnog djelovanja. Može interferirati s velikim brojem različitih proteina, a to poboljšava njegovu selektivnu modulaciju signalnih puteva povezanih s različitim kroničnim bolestima. Uobičajene molekularne „mete“ kurkumina uključuju transkripcijske faktore, medijatore upale, protein kinaze i enzime poput proteinskih reduktaza i histon acetiltransferaze, a smatra se kako je vjerojatni mehanizam, kroz koji kurkumin ostvaruje svoje mnogostrukе učinke, epigenetska regulacija različitih gena (Kunnumakkara i sur., 2016).



Slika 9. Molekularne „mete“ kurkumina (prema Lopresti i sur., 2012)

## 2.4. BIOORGANOMETALNI SPOJEVI

Organometalni spojevi sadrže barem jednu ugljik-metal vezu gdje ugljik ima parcijalno negativan naboj, koji omogućava nukleofilni napad, što predvodi brojnim organskim reakcijama (Bhatt, 2016). Konjugati organometalnih spojeva i biomolekula nazivaju se bioorganometalni spojevi, a u istraživanjima su privukli značajnu pozornost od pojave Salvarsana, organometalnog spoja za liječenje sifilisa na bazi ferocena (Meng i sur., 2018).

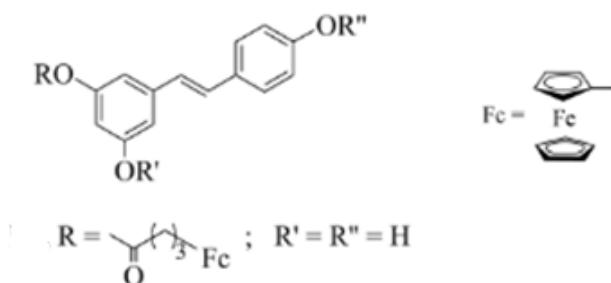
Ferocen je organometalni spoj (metalocen strukture  $(C_5H_5)_2Fe$ ), a sastoji se od dva ciklopentadienilna prstena između kojih je smješten atom željeza (Bhatt, 2016). Ferocen se koristi za dizajn novih lijekova zbog svojih redoks svojstava, visoke lipofilnosti i posjedovanja trodimenzionalne metalocenske jedinice, što može dovesti do promjena u selektivnosti prema biološkim ciljevima. S obzirom na navedeno, ferocen se smatra dobriim kandidatom za poboljšanje antioksidacijskog djelovanja mnogih tvari jer je ferocenilna skupina snažna antioksidacijska skupina i može se koristiti za modificiranje prirodnih antioksidansa (Meng i sur., 2018).

### 2.4.1. Ferocenski konjugati resveratrola

Istraživanja su pokazala kako nekolicina bioorganometalnih spojeva koji nose ferocenilnu skupinu pokazuju bolja biološka svojstva u odnosu na ishodnu molekulu. Chalal i suradnici (2014) su, u cilju poboljšanja antitumorskih aktivnosti polifenola, sintetizirali spoj strukture stilbena u kojoj je benzenski prsten zamijenjen ferocenilnom skupinom, a položaj 4 preostalog benzenskog prstena zamijenjen je slobodnom fenolnom funkcijском skupinom.

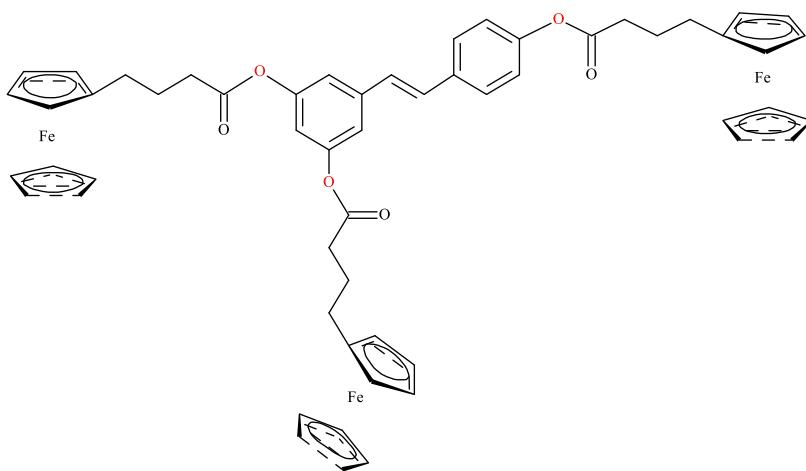
Ferocenski stilbenski analog pokazao je povećanu aktivnost u odnosu na ishodnu molekulu *trans*-resveratrola u inhibiciji proliferacije staničnih linija raka (Chalal i sur., 2014). Ferocenski konjugat resveratrola sintetizirali su Kovač i suradnici (2016) potaknuti istraživanjima u kojima je dokazano kako resveratrol kojemu su modificirani broj i položaj fenolnih skupina pokazuje poboljšanu aktivnost. Poboljšana biološka aktivnost tako dobivenih derivata resveratrola u usporedbi s onima iz ishodne molekule vjerojatno je posljedica povećanja lipofilnosti i olakšanog transporta kroz staničnu membranu.

Ferocenski konjugat resveratrola koji sadrži trimetilen alkilni lanac između ferocena i resveratrola spojenih esterskom vezom prikazan je na slici 10. Dodatak trimetilenskog alkilnog lanca poboljšava lipofilnost derivata resveratrola, presudno svojstvo za biološku aktivnost. Za sada je potvrđeno kako je novosintetizirani ferocenski konjugat resveratrola koji ima trimetilen alkilni lanac manje aktivan od drugih derivata resveratrola, ali je zabilježen snažniji učinak na proliferaciju stanica i citotoksičnost od samog resveratrola. Niža citotoksičnost opažena je kod normalnih stanica jajnika (CHO-K1) u usporedbi sa stanicama hepatoblastoma. Vrijednost IC<sub>50</sub> za ferocenski konjugat resveratrola bila je 20% niža od vrijednosti IC<sub>50</sub> za resveratrol (Kovač i sur., 2016; Čakić Semenčić i Barišić, 2017).



**Slika 10.** Struktura ferocenskog konjugata resveratrola (Kovač i sur., 2016)

U Laboratoriju za organsku kemiju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, gdje je sintetiziran ferocenski konjugat prikazan na slici 10, sintetiziran je i novi ferocenski triesterski konjugat resveratrola (slika 11) čiji će učinak na razinu ROS-a i vijabilnost CHO-K1 stanica biti ispitani u ovom radu.



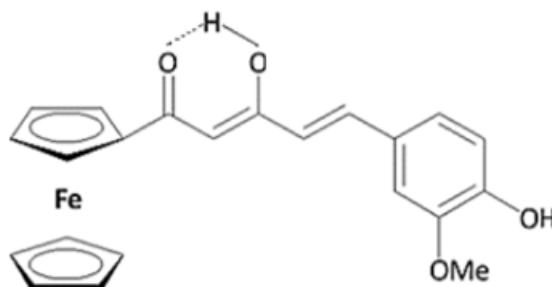
**Slika 11.** Struktura ferocenskog triesterskog konjugata resveratrola

#### 2.4.2. Ferocenski konjugati kurkumina

S obzirom na protektivni potencijal kurkumina, povećava se interes znanstvenika za sintezu i istraživanje konjugata kurkumina koji bi pokazali povećanu bioaktivnost i biodostupnost. Ferocenil supstituirani derivati kurkumina, uključujući 1,7-bis(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-4-feroceniliden-hepta-1,6-dien-3,5-dion (FCU), 1-(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-3-hidroksi-7 ferocenil-hepta-1,4,6-trien-5-on (FFT) i 1-(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-5-ferocenil-penta-1,4-dien-3-on (FDZ) pokazali su zaštitno djelovanje pri primjeni na stanicama gdje je inducirana oksidacija DNA različitim spojevima. FCU, FFT i FDZ pokazali su antioksidacijsko djelovanje i potencijal u hvatanju slobodnih radikala. U tom učinku podjednaku ulogu imaju hidroksilne skupine kurkumina i atom željeza iz ferocena (Li i Liu, 2011).

Arezki i suradnici (2011) sintetizirali su osam novih ferocenskih konjugata kurkumina i dokazali su kako prisutnost ferocenilne jedinice poboljšava biološku aktivnost većine novih derivata kurkuminoida (Arzeki i sur., 2011). Meng i suradnici (2018) sintetizirali su i istražili svojstva četiri nova ferocenska konjugata kurkumina te su dokazali kako uvođenje ferocenilne skupine rezultira većim antioksidacijskim djelovanjem od klasičnih analoga kurkumina. Dodatna skupina koja ima sposobnost prihvaćanja elektrona, a može se vezati za fenilnu skupinu, mogla bi dodatno povećati antioksidacijsku aktivnost ferocenskih konjugata kurkumina. Konjugati kurkumina koji sadrže ferocen pokazuju veću aktivnost u hvatanju radikala i zaštiti DNA od oksidacije izazvane radikalima (Meng i sur., 2018).

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu sintetiziran je novi ferocenski  $\beta$ -diketonski konjugat kurkumina (slika 12) u cilju poboljšanja biološkog djelovanja i biodostupnosti (Lukačević, 2019). U ovom radu bit će ispitana učinak tog spoja na razinu ROS-a i vijabilnost u CHO-K1 stanicama.



**Slika 12.** Struktura ferocenskog  $\beta$ -diketonskog analoga kurkumina (Lukačević, 2019)

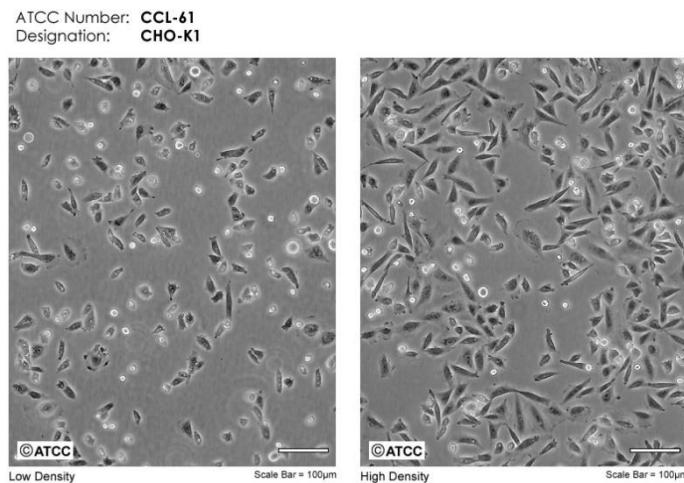
## 2.5. IN VITRO TESTOVI TOKSIČNOSTI

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih i sintetiziranih spojeva provodi se izvođenjem testova na organizmima (*in vivo*) ili kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) kako bi se procijenio njihov učinak na ljude. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). Kulture stanica izolirane izravno iz tkiva nazivaju se primarnim staničnim kulturama, a subkultivacijom primarne stanične kulture dobiva se stanična linija (Freshney, 2005).

Prvu staničnu liniju, „L“ staničnu liniju, uspostavio je Earle 1948. godine tako što je izolirao stanice iz potkožnog mišjeg tkiva i subkultivirao ih. U 50-im i 60-im godinama razvijene su još mnoge diploidne stanične linije kao npr. HeLa (uspostavio Gay), MRC-5 (uspostavio Jacobs), WI-38 (uspostavili Hayflick i Moorhead) te Vero stanična linija dobivena iz tkiva majmuna (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Prvu CHO staničnu liniju (engl. *chinese hamster ovary*) (slika 13) razvio je T. Puck 1957. godine za proučavanje genetike stanica, a nakon toga CHO stanice su dobivale sve veću pažnju kao domaćini proizvodnje heterolognih proteina u ranim 1980-ima. Izvorna CHO stanična linija subklonirana je više puta.

Može rasti adherentno i u suspenziji, a rast im je ovisan o serumu (Lindskog i sur., 2018). Eksponencijalno rastuće CHO stanice imaju vrijeme udvostručenja od 12 do 14 sati (Araújo i sur., 1999).



**Slika 13.** CHO-K1 stanice (ATCC, 2021)

Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje citotoksičnost koja se definira kao učinak koji nastaje međudjelovanjem ispitivane tvari i procesa nužnih za preživljavanje i proliferaciju ili funkcije koje su zajedničke svim stanicama u organizmu. Testovi toksičnosti koriste se za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizma djelovanja određene tvari. Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti tvari primjenom kultura stanica je *MTT* test – test redukcije tetrazolijeve soli. *MTT* test je kolorimetrijska metoda, a bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija. Enzimi mitohondrija provode redukciju topljive žute MTT tetrazolijeve soli u ljubičasti netopljivi formazan. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se vijabilnost stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica. U primjeni su i drugi testovi poput: *Kenacid Blue* metode, *Trypan Blue* metode, *Neutral Red* metode, bojanja bojom kristal-ljubičasto, metode otpuštanja laktat dehidrogenaze i smanjenje razine ATP-a (Radojić Redovniković i sur., 2016).

Za mjerjenje količine slobodnih radikala u stanicama postoje mnoge metode. Izravne tehnike koriste fluorescentne i kemiluminescentne sonde koje lako ulaze u stanice, a 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFDA) jedna je od najčešće korištenih tehnika za izravno mjerjenje redoks stanja stanice. Prednosti primjene DCFDA uključuju jednostavnost upotrebe, veliku osjetljivost na promjene u redoks stanju stanice te relativno povoljna cijena (Eruslanov i Kusmartsev, 2009).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biološki materijal

Za izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištena je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1. Stanična linija raste adherentno (ATCC, 2021).

##### 3.1.2. Kemikalije

Za provedbu eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- medij za uzgoj stanica Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (minimalni esencijalni medij s 15 mM HEPES-om, NaHCO<sub>3</sub> i piridoksinom), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- serum fetusa goveda (Fetal Bovine Serum, FBS), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- 0,25 % Trypsin-EDTA 1X (tripsin – EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- boja tripan plavo (Trypan Blue), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
- apsolutni etanol, Alkaloid, Skopje
- destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil) Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Resveratrol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ferocenski esterski derivat resveratrola, Laboratorij za organsku kemiju, PBF, Zagreb
- Kurkumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ferocenski β-diketonski analog kurkumina, Laboratorij za organsku kemiju, PBF, Zagreb
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo

##### 3.1.3. Otopine i puferi

Korišten je Dulbecco (DMEM/F-12) medij za uzgoj stanica, a sastav Dulbecco medija prikazan je u Tablici 1 i Tablici 2.

**Tablica 1.**Anorganske soli i aminokiseline u DMEM/F-12 mediju

|                 | sastojci  | Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| anorganske soli | CaCl <sub>2</sub>                                     | 116,6                               |
|                 | CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O                 | 0,0013                              |
|                 | Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O | 0,05                                |
|                 | FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                 | 0,417                               |
|                 | KCl   | 311,80                              |
|                 | MgCl <sub>2</sub> anhidrid                            | 28,64                               |
|                 | MgSO <sub>4</sub> anhidrid                            | 48,84                               |
|                 | NaCl  | 6995,50                             |
|                 | NaHCO <sub>3</sub>                                    | 1200,00                             |
|                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 71,02                               |
| aminokiseline   | ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                 | 0,432                               |
|                 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | 62,5                                |
|                 | L-alanin  | 4,45                                |
|                 | L-arginin hidroklorid                                 | 147,50                              |
|                 | L-asparagin x H <sub>2</sub> O                        | 7,50                                |
|                 | L-aspartat  | 6,65                                |
|                 | L-cistein x HCl x H <sub>2</sub> O                    | 17,56                               |
|                 | L-cistein x 2HCl                                      | 31,29                               |
|                 | L-glutaminska kiselina                                | 7,35                                |
|                 | L-glutamin  | 365,00                              |
|                 | L-glicin  | 18,75                               |
|                 | L-histidin x HCl x H <sub>2</sub> O                   | 31,48                               |
|                 | L-izoleucin   | 54,47                               |
|                 | L-leucin  | 59,05                               |
|                 | L-lizin hidroklorid                                   | 91,25                               |
|                 | L-metionin  | 17,24                               |
|                 | L-fenilalanin   | 35,48                               |
|                 | L-prolin  | 17,25                               |
|                 | L-serin   | 26,25                               |
|                 | L-treonin   | 53,45                               |
|                 | L-triptofan   | 9,02                                |
|                 | L-tirozin x 2Na x 2H <sub>2</sub> O                   | 55,79                               |
|                 | L-valin   | 52,85                               |

**Tablica 2.** Vitamini i ostali sastojci u DMEM/F-12 mediju

|                 | sastojci                  | Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|
| vitamini        | biotin                    | 0,0035                              |
|                 | D-Ca pantotenska kiselina | 2,24                                |
|                 | folna kiselina            | 2,65                                |
|                 | i-inozitol                | 12,60                               |
|                 | kolin-klorid              | 8,98                                |
|                 | nikotinamid               | 2,02                                |
|                 | piridoksin hidroklorid    | 2,00                                |
|                 | riboflavin                | 0,219                               |
|                 | tiamin hidroklorid        | 2,17                                |
| ostali sastojci | vitamin B <sub>12</sub>   | 0,68                                |
|                 | D-glukoza                 | 3151,00                             |
|                 | fenol crvenilo            | 8,10                                |
|                 | HEPES                     | 3574,5                              |
|                 | hipoksantin x Na          | 2,39                                |
|                 | linolna kiselina          | 0,042                               |
|                 | lipoična kiselina         | 0,105                               |
|                 | Na piruvat                | 55,00                               |
|                 | putrescin x 2HCl          | 0,081                               |
|                 | timidin                   | 0,365                               |

Preostale otopine i puferi korišteni u izradi eksperimenta prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Otopine i puferi korišteni u izradi eksperimenta

|  | sastojci                         | količina   | napomena  |
|--|----------------------------------|------------|---|
| <b>Ishodna otopina PCB 77</b>                                  | PCB 77                           | 10 mg      | Koncentracija PCB 77 u mediju za uzgoj iznosila je 75 µM.                     |
|  | DMSO                             | 2,77 mL    |   |
| <b>0,4 %-tna otopina Trypan Blue</b>                           | <i>Trypan Blue</i>               | 0,08 g     | Profiltrirati.  |
|  | PBS pufer                        | 20 mL      |   |
| <b>Ishodna otopina MTT (stock otopina)</b>                     | MTT                              | 25 g       | Sterilno profiltrirati.   |
|  | PBS                              | 5 mL       |   |
| <b>Ishodna otopina resveratrola (RSV)</b>                      | Resveratrol                      | 13,6944 mg | Koncentracije RSV-a u mediju za uzgoj iznosile su 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100 µM. |
|  | DMSO                             | 3 mL       |   |
| <b>Ishodna otopina ferocenskog konjugata resveratrola (RF)</b> | Ferocenski konjugat              | 59,4348 mg | Koncentracije RF u mediju za uzgoj iznosile su 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100 µM.    |
|  | resveratrola                     |            |   |
|  | DMSO                             | 3 mL       |   |
| <b>Ishodna otopina kurkumina (K)</b>                           | Kurkumin                         | 22,1028 mg | Koncentracije K u mediju za uzgoj iznosile su 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100 µM.     |
|  | DMSO                             | 3 mL       |   |
| <b>Ishodna otopina ferocenskog konjugata kurkumina (FKP)</b>   | Ferocenski konjugat              | 24,2544 mg | Koncentracije FKP-a u mediju za uzgoj iznosile su 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100 µM. |
|  | kurkumina                        |            |   |
|  | DMSO                             | 3 mL       |   |
| <b>Ishodna otopina 10X pufera</b>                              | 1X pufer                         | 10 mL      |   |
|  | dH <sub>2</sub> O                | 100 mL     |   |
| <b>PBS (engl. Phosphate- Buffered Saline) pufer pH=7,4</b>     | NaCl                             | 8 g        |   |
|  | KCl                              | 0,2 g      |   |
|  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44 g     |   |
|  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24 g     |   |
|  | dH <sub>2</sub> O                | do 1000 mL |   |

### 3.1.4. Oprema i uređaji

Za izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korištena je sljedeća laboratorijska oprema:

- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- spektrofotometar, Helios-γ, Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- spektrofluorimetar VARIAN, Cary Eclipse, USA
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi

CHO-K1 stanice čuvaju se na -80 °C u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80% medija za uzgoj (DMEM/F12), 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Za uzgoj i održavanje stanica potrebno je naglo odmrznuti stanice, pri temperaturi od 37 °C u inkubatoru i atmosferi koja se sastoji od 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub>. Nakon odmrzavanja, stanice se centrifugiraju pet minuta na 1000 okretaja/min, a potom se ukloni supernatant. Slijedi resuspenzija taloga stanica u mediju za uzgoj koji se sastoji od 90% medija za uzgoj (DMEM/F12) i 10% - 20% FBS-a te prijenos u T-bocu na daljnju kultivaciju. Za osiguranje optimalnih uvjeta za rast i razvoj stanica, stanice se užgajaju u kontroliranoj atmosferi (95% zraka i 5% CO<sub>2</sub>) u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C. Kako bi stanice imale sve potrebne hranjive tvari za rast i razvoj potrebno je redovito mijenjati medij za uzgoj.

CHO-K1 stanice rastu adherentno i u monosloju stoga ih je potrebno odvojiti od površine T-boce. Iskorišteni medij za uzgoj se ukloni, a stanice se isperu i odvoje od površine boce dodatkom 1 mL tripsina koji ima proteaznu aktivnost. Nakon kratke inkubacije s tripsinom, stanice se dobro resuspendiraju u svježem mediju za uzgoj. Iz stanične suspenzije uzima se mali uzorak za brojanje stanica pod svjetlosnim mikroskopom metodom *Trypan Blue*.

Nakon određivanja broja stanica u uzorku, izračuna se koliki je volumen resuspendiranih uzgojenih stanica potrebno ostaviti u T-boci za daljnji uzgoj pri čemu početna koncentracija stanica iznosi  $1 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj.

### 3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Iz prethodno tripsinizirane stanične suspenzije uzme se uzorak od  $20 \mu\text{L}$  i stavi u jažicu na ploči za uzorke, zatim se doda  $20 \mu\text{L}$  *Trypan Blue* boje i dobro se resuspendira. Iz resuspendiranog uzorka uzme se  $20 \mu\text{L}$  i nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica. Pod svjetlosnim mikroskopom se izbroje žive (neobojane) i mrtve (plavo obojane) stanice. Mrtve se stanice oboje budući da boja lako prolazi kroz oštećenu staničnu membranu.

Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je na 16 kvadrata, a broje se stanice unutar 4 središnja kvadrata te se računa srednja vrijednost izbrojanih stanica. Za izbjegavanje višestrukog brojanja stanica, u svakom se kvadratu broje stanice unutar i na donjem i desnom rubu kvadrata. Dubina komorice iznosi  $0,2 \text{ mm}$ , a površina iznosi  $0,0625 \text{ mm}^2$ . Ukupan broj živih stanica u uzorku odredi se prema formuli gdje je broj živih stanica jednak srednjoj vrijednosti broja izbrojanih stanica  $\times 2 \times 5 \times 10^3$  [ $\text{st } \text{mL}^{-1}$ ].

### 3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica metodom *MTT*

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je tetrazolijeva sol žutog obojenja koja se u živim stanicama djelovanjem mitochondrialnih dehidrogenaza prevodi u kristale formazana ljubičastog obojenja. Postupak određivanja vijabilnosti stanica započinje nacijepljivanjem stanica u jažice na 96-well ploči. U svaku jažicu nacijepljeno je po  $100 \mu\text{L}$  stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji  $2 \times 10^4$   $\text{st } \text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Nakon 24-satne inkubacije, medij za uzgoj se uklanja iz jažica te se stanice tretiraju sa  $100 \mu\text{L}$  svježeg medija za uzgoj s dodatkom određenog antioksidansa tako da se u mediju postignu koncentracije antioksidansa od 1; 2,5; 5; 20; 50 i  $100 \mu\text{M}$  spoja. Slijedi 2,5-satna inkubacija na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon 2,5 sata u svaku se jažicu doda  $10 \mu\text{L}$  ishodne otopine MTT-a te slijedi inkubacija od 3 sata pri  $37^\circ\text{C}$ . Nakon toga, medij se uklanja iz jažica pazeci da se ne uklone i nastali ljubičasti kristalići formazana te se u svaku jažicu doda  $100 \mu\text{L}$  DMSO-a koji otapa nastale kristale. Pomoću spektrofotometra odredi se intenzitet razvijene boje pri valnoj duljini od  $570 \text{ nm}$  u odnosu na slijepu probu. Dobivene vrijednosti apsorbancija dovode se u odnos sa staničnom vijabilnosti.

S obzirom da jače obojenje znači veću količinu formazana, a time i jaču aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaza, koje su aktivne u živim stanicama, veća vrijednost apsorbancije povezuje se s većim brojem živih stanica.

### 3.2.4. Određivanje količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) u CHO-K1 stanicama korištenjem DCFDA kit-a

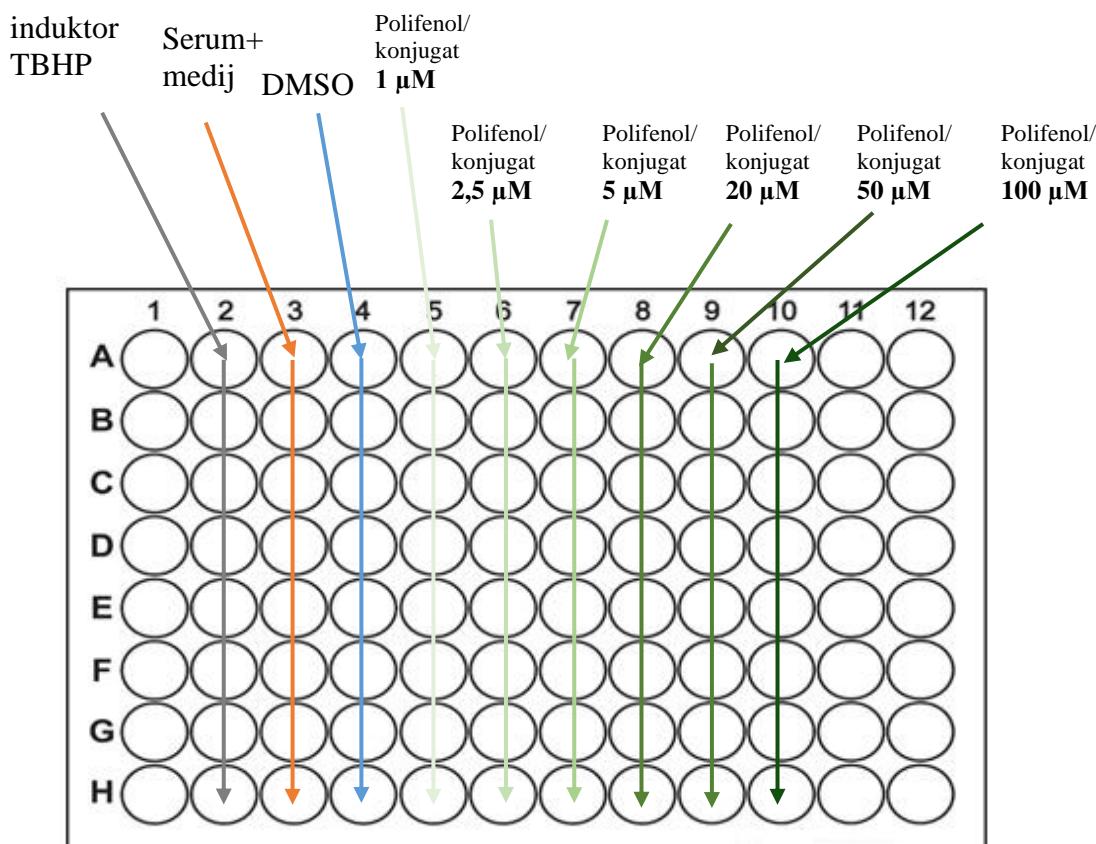
DCFDA kit za detekciju ROS-a omogućava kvantitativno mjerjenje ROS-a u suspenziji stanica. U navedenom testu za detekciju staničnog ROS-a koristi se reagens 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCFDA). DCFDA je fluorogeni spoj koji prodire u stanicu i omogućava mjerjenje aktivnosti hidroksil i peroksil radikala te drugih ROS-a u stanci.

Nakon ulaska u stanicu DCFDA se deacetilira pomoću staničnih esteraza u nefluorescentni spoj koji kasnije bude oksidiran od strane reaktivnih kisikovih vrsta u 2',7'-diklorofluorescein (DCF). DCF je veoma fluorescentan spoj čija se fluorescencija može izmjeriti pomoću fluorescentne spektroskopije pri valnim duljinama ekscitacije ( $E_x$ ) i emisije ( $E_m$ ) od 495 nm i 529 nm. DCF se može mjeriti pri rasponu  $E_x$  od 485 do 495 nm i  $E_m$  u rasponu od 529 do 535 nm.

Prvi dan pokusa 96-well ploče tamnoga dna nacjepljuju se s po 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 uz dodatak 20% FBS-a u koncentraciji od  $2,5 \times 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Slijedi inkubacija stanica u trajanju od 24 sata na 37 °C.

Drugi dan pokusa potrebno je pripremiti 10x pufer razrjeđivanjem s destiliranim vodom (u kit-u se nalazi 1x pufer), 25  $\mu\text{M}$  DCFDA razrjeđivanjem s 10x puferom (u kit-u se nalazi 20 mM DCFDA) te otopinu 50  $\mu\text{M}$  TBHP (tert-butil hidroperoksid) razrjeđivanjem s 10x puferom (u kitu se nalazi 55 mM). TBHP dokazano inducira nastanak ROS-a u stanicama.

Iz 96-well ploča uklanja se medij iz svih jažica, jažice se ispiru sa 100  $\mu\text{L}$  10x pufera te se potom u svaku jažicu odpipetira 100  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{M}$  otopine DCFDA. Poslije 45-minutne inkubacije pri 37 °C, potrebno je ukloniti DCFDA iz svih jažica te svaku jažicu isprati 10x puferom. Nakon ispiranja, stanice u jažicama se tretiraju s po 100  $\mu\text{L}$  otopine polifenola ili konjugata polifenola u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100  $\mu\text{M}$  prema shemi (primjer sheme na slici 14). Nakon 2,5 h fluorescencija je očitana na spektrofluorimetru pri valnim duljinama ekscitacije ( $E_x$ ) i emisije ( $E_m$ ) od 495 nm i 529 nm.



**Slika 14.** Primjer sheme tretmana CHO-K1 stanica polifenolom/konjugatom polifenola u cilju mjerjenja ROS-a

Kako bi se odredio potencijalni protektivni učinak odabranog antioksidansa, odnosno odredila količina ROS-a uslijed izloženosti i induktoru i antioksidansu potrebno je prilagoditi protokol provedbe pokusa. Tada je prvi dan pokusa potrebno nacijepiti 96-well ploče CHO-K1 stanicama u koncentraciji od  $2,5 \times 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  uz serum i medij koji sadrže odabrane koncentracije antioksidansa te ih inkubirati 24 sata.

Drugi dan pokusa se iz 96-well ploča uklanja medij iz svih jažica, jažice se ispiru sa 100  $\mu\text{L}$  10x pufera te se potom u svaku jažicu odpipetira 100  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{M}$  otopine DCFDA. Poslije 45-minutne inkubacije pri 37 °C, potrebno je ukloniti DCFDA iz svih jažica te svaku jažicu isprati 10x puferom. Nakon ispiranja, stanice u jažicama se tretiraju 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 ili 50  $\mu\text{M}$  TBHP-om. Nakon 2,5 h fluorescencija je očitana na spektrofluorimetru pri valnim duljinama ekscitacije (Ex) i emisije (Em) od 495 nm i 529 nm.

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $\bar{x}$ ) uzorka u skupini:

$$(\bar{x}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

S pripadajućim standardnim pogreškama  $S_{\bar{x}}$ :

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N - 1)}}$$

$N$  = ukupan broj uzoraka u skupini

$x_i$  = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t-testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak različitih koncentracija odabranih polifenola (kurkumin i resveratrol) te njihovih ferocenskih konjugata (ferocenski  $\beta$ -diketonski analog kurkumina i ferocenski triesterski derivat resveratrola) na razinu stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i vijabilnost u CHO-K1 staničnoj liniji.

Ispitan je učinak polifenola i ferocenskih konjugata polifenola nakon 2,5 sata inkubacije pri koncentracijama 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100  $\mu\text{M}$  kako bi se utvrdilo djeluju li navedeni spojevi protektivno i pri kojim koncentracijama ostvaruju takav učinak na razinu stvaranja ROS-a. Osim toga, polifenolni spojevi mogu biti i induktori ROS-a te se u ovom radu željelo ispitati dolazi li i pri kojim koncentracijama do povišene razine ROS-a i indukcije oksidacijskog stresa.

Naposlijetu je ispitana potencijalna protektivna učinak odabranog antioksidansa na induciranoj razini ROS-a koja je očekivana u prisutnosti organoklornog spoja PCB-a 77 u koncentraciji od 75  $\mu\text{M}$  ili poznatog induktora oksidacijskog stresa TBHP-a u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$ . U tu svrhu korišten je DCFDA kit za mjerjenje razine ROS-a u stanicama koji se bazira na ulasku nefluorescentnog spoja DCFDA u stanicu koji djelovanjem staničnih esteraza prelazi u spoj koji će oksidacijom pomoći reaktivnih kisikovih vrsta dati fluorescentni DCF spoj čija se fluorescencija može izmjeriti i dovesti u odnos s količinom ROS-a u stanici.

Usporedno s određivanjem razine ROS-a, provedeno je određivanje stanične vijabilnosti metodom *MTT*, a rezultati su statistički obrađeni i uspoređeni s dostupnim literaturnim podacima.

#### 4.1. UČINAK RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA

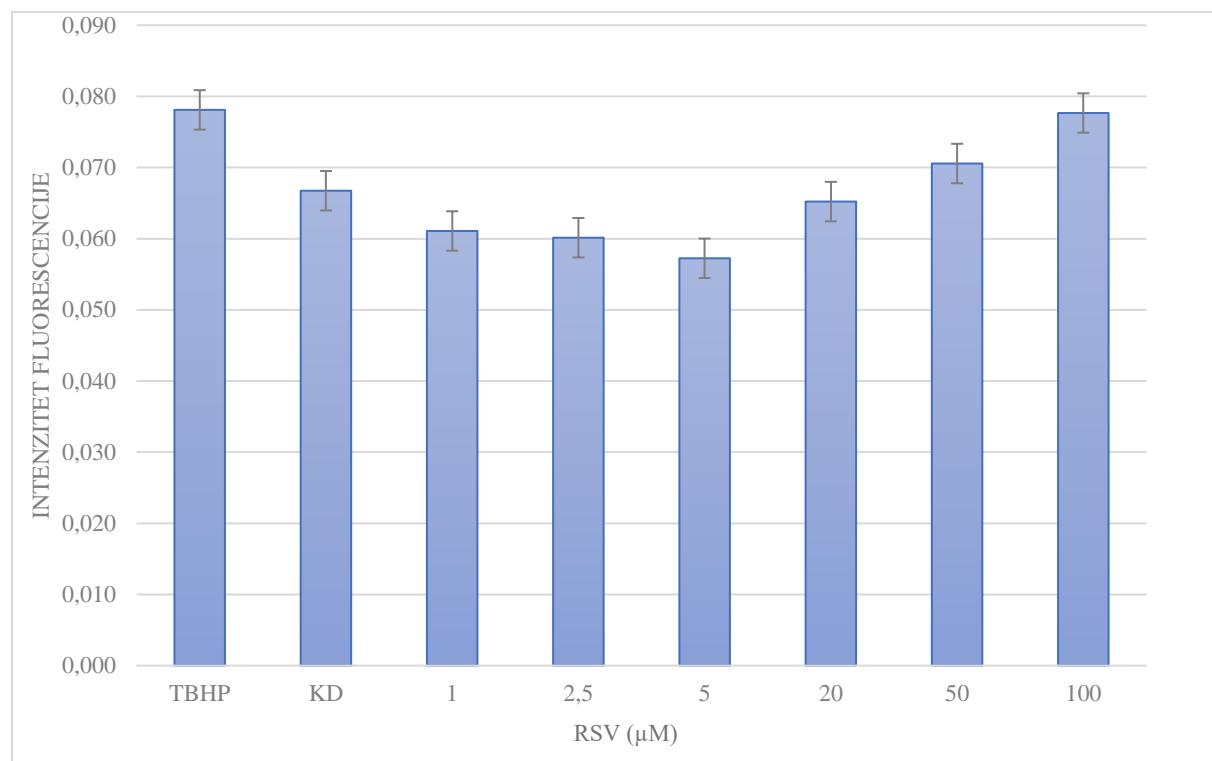
Resveratrol (RSV) je redoks-aktivni polifenol koji se nalazi u mnoštvu biljaka te je zabilježen njegov širok spektar bioloških učinaka, uključujući antikancerogeno, protuupalno, kardioprotektivno i neuroprotektivno djelovanje. Njegov potencijalni benefit za zdravlje uglavnom se pripisuje antioksidacijskim svojstvima i utjecaju na aktivnost sirtuina.

Ciljnim mjestima djelovanja resveratrola u stanici smatraju se mitohondriji. Resveratrol ima utjecaj na proizvodnju mitohondrijskog ROS-a kroz njegovu spomenutu interakciju sa sirtuinima. Osim toga, resveratrol utječe na stanični metabolizam aktivacijom sirtuina i utjecajem na transkripciju gena za enzime koji sudjeluju u metabolizmu. Resveratrol utječe na aktivnost kompleksa enzima respiratornog lanca (niskim koncentracijama aktivira enzime, a pri visokim koncentracijama inhibira aktivnost enzima) (Gueguen i sur., 2015).

Prema literaturi, resveratrol u niskim koncentracijama djeluje kao antioksidans koji može zaštiti od oksidacijskog stresa i nakupljanja ROS-a, dok s druge strane, u visokim koncentracijama, resveratrol djeluje prooksidacijski i potiče oštećenje DNA na način da povećava oksidacijski stres (Malaguarnera, 2019; Shaito i sur., 2020).

Toronjo-Urquiza i suradnici (2019) utvrdili su da je resveratrol toksičan za CHO stanice pri koncentraciji od  $100 \mu\text{M}$ , dok pri nižim koncentracijama uzrokuje inhibiciju rasta stanica u mjeri ovisnoj o koncentraciji u kojoj je dodan stanicama (Toronjo-Urquiza i sur., 2019).

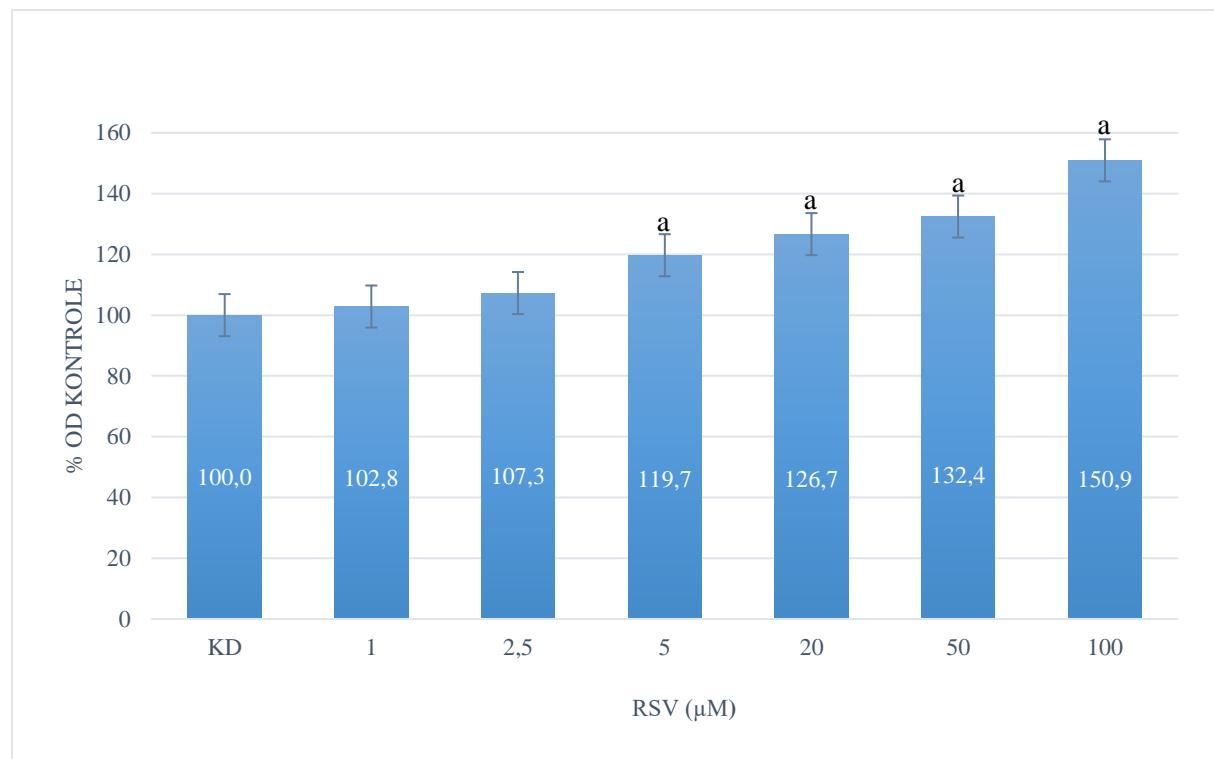
U ovom radu, ispitano je djelovanje resveratrola u koncentracijama od 1; 2,5; 5; 20; 50 i  $100 \mu\text{M}$  na razinu ROS-a i vijabilnost stanica nakon 2,5 sata. Stanice su nacijepljene na 96-well ploču u koncentraciji od  $2,5 \times 10^5 \text{ st mL}^{-1}$ , a nakon 24-satne inkubacije tretirane su različitim koncentracijama resveratrola. Slijedio se protokol proizvođača kit-a za detekciju ROS-a te je nakon 2,5 sata mjerena fluorescencija. Izmjerena fluorescencija proporcionalna je količini ROS-a u stanicama. Na slici 15 dan je grafički prikaz učinka resveratrola na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama.



**Slika 15.** Učinak resveratrola (1-100  $\mu\text{M}$ ) na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana. Kontrolni uzorci stanica tretirani su tert-butil hidroperoksidom (TBHP) u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  te otapalom dimetil sulfoksidom (DMSO) u koncentraciji 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (KD). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Iz grafa (slika 15) je vidljivo kako resveratrol ovisno o koncentraciji različito utječe na razinu ROS-a u stanicama. Razina ROS-a u stanicama tretiranim resveratrolom u koncentracijama višim od 20  $\mu\text{M}$ , veća je u odnosu na razinu ROS-a u u kontrolnim uzorcima (KD, stanice tretirane 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  DMSO-a). Razina ROS-a u stanicama tretiranim resveratrolom u koncentracijama od 1; 2,5 i 5  $\mu\text{M}$  manja je u odnosu na razinu ROS-a u KD te u tim dozama resveratrol ima potencijalan antioksidacijski učinak. Resveratrol pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  na razinu ROS-a u stanicama djeluje gotovo kao induktor TBHP.

Usporedno s mjeranjem razine ROS-a izmjerena je vijabilnost stanica nakon 2,5 satne izloženosti resveratrolu pomoću metode *MTT*, a rezultati mjerjenja grafički su prikazani na slici 16.



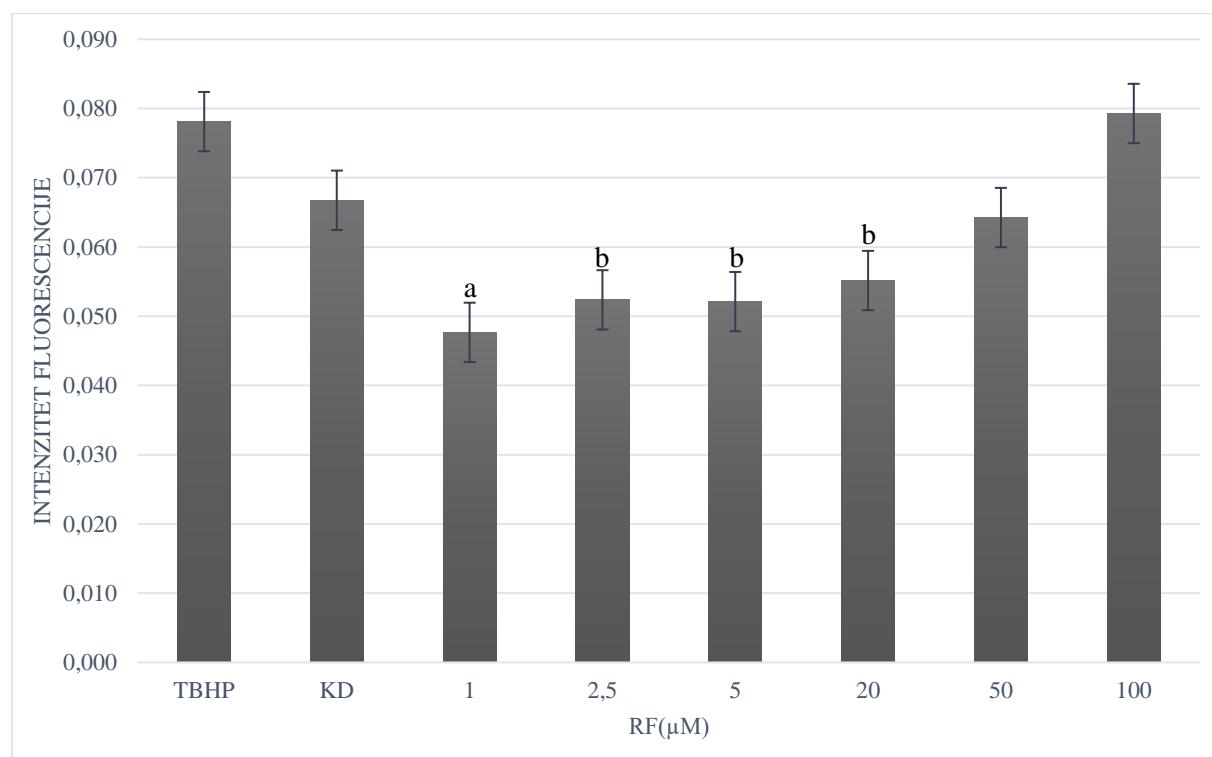
**Slika 16.** Učinak resveratrola (1-100  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 2,5 sata nakon tretmana u odnosu na kontrolni uzorak KD (stanice tretirane s 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  DMSO-a) određen MTT metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student  $t$ -test):  $^a p < 0,001$

Iz grafa (slika 16) je vidljivo da je vijabilnost stanica koje su tretirane resveratrolom u koncentraciji 5  $\mu\text{M}$  statistički značajno viša u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,001$ ). Određen je porast u vijabilnosti od 19,7%. Također, resveratrol i u višim dozama inducira staničnu vijabilnost i proliferaciju, pri čemu je učinak resveratrola ovisan o dozi i statistički značajan ( $p < 0,001$ ). Pri koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$  određen je porast u vijabilnosti od 26,7% ( $p < 0,001$ ). Pri koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  određen je porast u vijabilnosti od 32,4% ( $p < 0,001$ ). Pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  određen je porast u vijabilnosti od 50,9% ( $p < 0,001$ ).

Ovakav učinak resveratrola određen je nakon kratkog perioda inkubacije stanica, dok su prijašnja istraživanja provedena u Laboratoriju za toksikologiju pokazala da duži period inkubacije stanica resveratrolom (pri koncentraciji resveratrola većoj od 5  $\mu\text{M}$ ) rezultira redukcijom u broju i vijabilnosti stanica (Mardetko, 2015).

#### 4.2. UČINAK FEROCENSKOG KONJUGATA RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA

U Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta sintetiziran je novi ferocenski triesterski konjugat resveratrola. U ovom radu, ispitano je djelovanje tog novosintetiziranog ferocenskog konjugata resveratrola (RF) u koncentracijama 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100  $\mu\text{M}$  na razinu ROS-a i vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 2,5 sata, a grafički prikaz rezultata prikazan je na slikama 17 i 18.



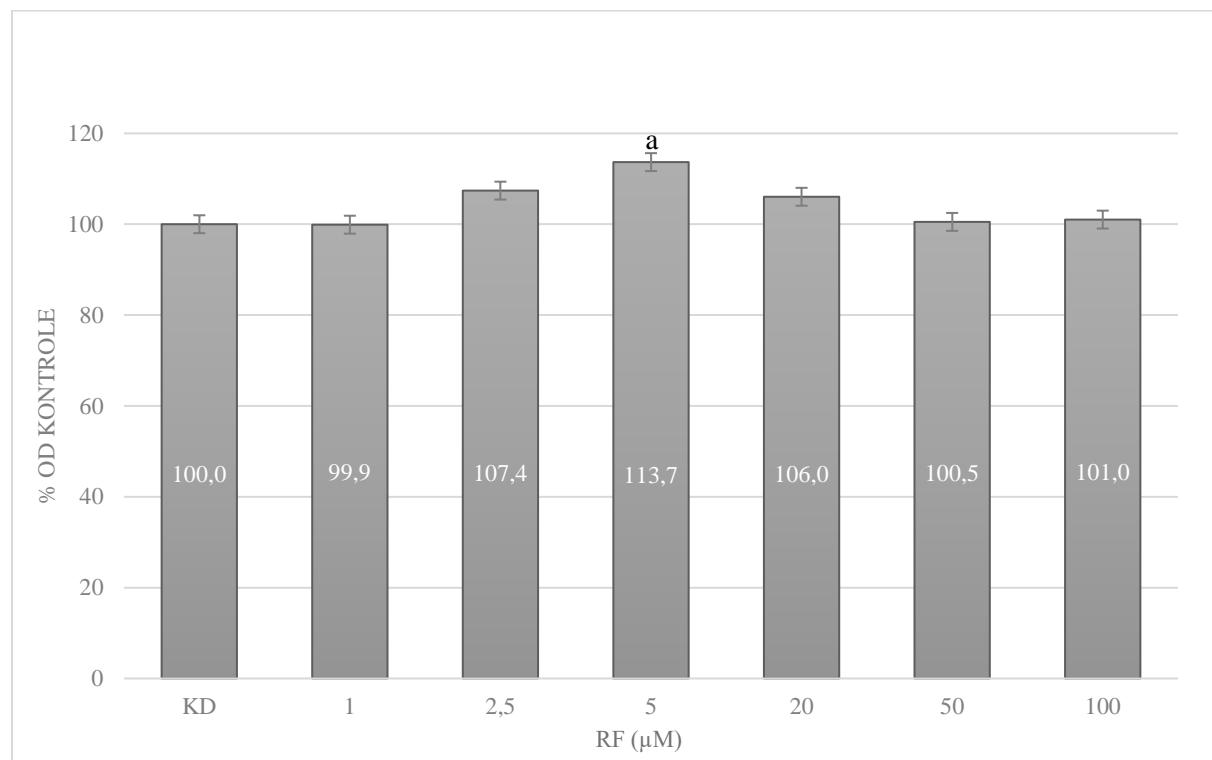
**Slika 17.** Učinak ferocenskog konjugata resveratrola (1-100  $\mu\text{M}$ ) na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana. Kontrolni uzorci stanica tretirani su tert-butil hidroperoksidom (TBHP) u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  te otapalom dimetil sulfoksidom (DMSO) u koncentraciji 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (KD). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p<0,005$ , <sup>b</sup> $p<0,025$ .

Iz grafa na slici 17 vidljivo je da je razina ROS-a u stanicama tretiranim ferocenskim konjugatima resveratrola u najvišoj koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ , veća u odnosu na razinu ROS-a u kontrolnom uzorku (KD).

Nadalje, određeno je da je razina ROS-a u stanicama koje su tretirane RF-om u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  statistički značajno niža ( $p<0,005$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (KD) i najniža je u odnosu na razinu ROS-a u stanicama tretiranim RF-om u koncentracijama 2,5 – 100  $\mu\text{M}$ .

Statistički značajno smanjenje razine ROS-a u odnosu na kontrolni uzorak (KD) zabilježeno je i kod koncentracija ferocenskog konjugata resveratrola od  $2,5 \mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ),  $5 \mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i  $20 \mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ).

Usporedno s mjeranjem razine ROS-a određena je vijabilnost stanica nakon 2,5 satne izloženosti ferocenskom konjugatu resveratrola pomoću metode *MTT*, a rezultati su prikazani na slici 18.



**Slika 18.** Učinak ferocenskog konjugata resveratrola ( $1-100 \mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 2,5 sata nakon tretmana u odnosu na kontrolni uzorak KD (stanice tretirane s  $5 \mu\text{L mL}^{-1}$  DMSO-a) određen *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p<0,05$ .

Iz grafa na slici 18 je vidljivo kako ferocenski konjugat resveratrola pri koncentraciji od 1; 50 i  $100 \mu\text{M}$  nema velikog utjecaja na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (KD), dok se pri koncentracijama od  $2,5$ ;  $5$  i  $20 \mu\text{M}$  bilježi blagi porast u staničnoj vijabilnosti.

Statistički značajno djelovanje na vijabilnost stanica, ferocenski konjugat resveratrola pokazuje pri koncentraciji od  $5 \mu\text{M}$  ( $p<0,05$ ) gdje je vijabilnost stanica veća za 13,7% u odnosu na kontrolni uzorak.

U odnosu na RSV, RF gotovo pri svim ispitanim koncentracijama pokazuje jači citotoksični učinak na CHO-K1 stanice.

#### 4.3. UČINAK KURKUMINA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA

Polifenol kurkumin, glavni aktivni sastojak korijena biljke kurkume, ima široki spektar učinaka te je zabilježeno njegovo antioksidacijsko, antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Araújo i sur., 1999).

Posjedovanje antioksidacijskih i prooksidacijskih učinaka otežava terapijsku upotrebu kurkumina. Nedavna klinička ispitivanja kurkumina protiv različitih bolesti bila su neuspješna velikim dijelom zbog problema s bioraspoloživosti i stabilnosti kurkumina. Međutim, kurkumin ili njegovi metaboliti imaju neosporne učinke na fiziologiju stanica (Swatson i sur., 2017).

Pojedina istraživanja djelovanja kurkumina sugeriraju da je kurkumin antioksidans, dok druga istraživanja sugeriraju da kurkumin ima prooksidacijske učinke, povećavajući ROS i time inducirajući oksidacijski stres u stanicama. U pojedinim istraživanjima je potvrđena antioksidacijska aktivnost u normalnim stanicama i prooksidacijska aktivnost u stanicama karcinoma, ali još uvijek nema jasnog biokemijskog objašnjenja ovih doza-ovisnih učinaka kurkumina. Kurkumin je zbog toga potencijalni adjuvant u kemoterapijskim i radioterapijskim protokolima za povećanje citotoksičnih učinaka na stanice raka i smanjenje toksičnosti za normalna tkiva (Rainey i sur., 2020).

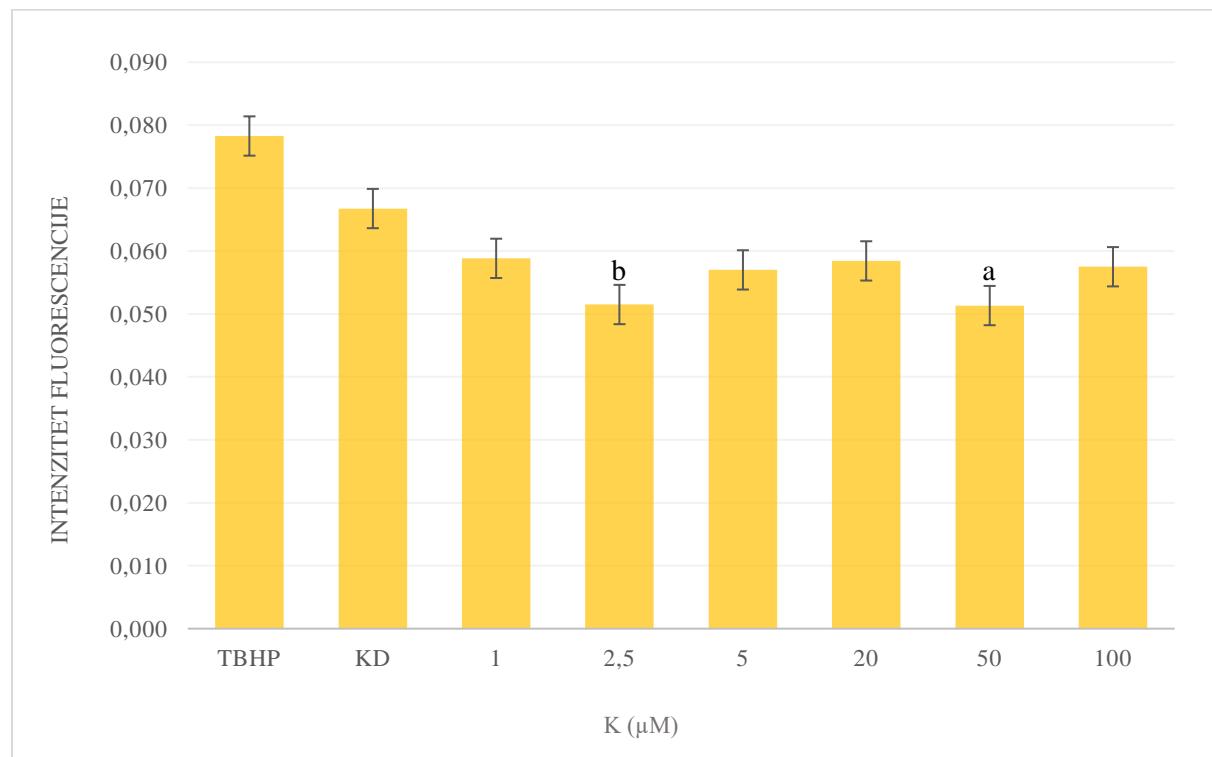
Kurkumin ovisno o koncentraciji različito djeluje na razinu ROS-a u stanicama, a zabilježen je značajan porast ROS-a u stanicama sisavaca pri koncentracijama većim od  $10 \mu\text{M}$  vrlo brzo nakon tretmana kurkuminom (1 do 2 sata). Povećana razina ROS-a u korelaciji je sa smanjenjem vijabilnosti stanica uslijed izloženosti različitim koncentracijama kurkumina (Han i sur., 2012). Yu i suradnici (2018) dokazali su da i niske ( $5 \mu\text{M}$ ) i visoke ( $>20 \mu\text{M}$ ) koncentracije kurkumina povećavaju razinu ROS-a u stanicama mioblastoma te da je regulacija staničnog redoks stanja pomoću kurkumina ovisna o primjenjenoj dozi. Prilikom tretmana stanica niskom koncentracijom kurkumina razina ROS-a bila je relativno niska i dosegla je vrhunac 2 sata nakon tretmana. Budući da kurkumin povećava ekspresiju antioksidacijskih enzima, proizvodnja ROS-a u stanicama tretiranim niskom koncentracijom kurkumina uravnotežena je antioksidacijskim sustavom obrane. S druge strane, visoke koncentracije kurkumina duljim periodom inkubacije nastavljaju povećavati razinu ROS-a u stanicama te se narušava stanična redoks-ravnoteža i stanice prelaze u stanje oksidacijskog stresa (Yu i sur., 2018).

U ovom radu, ispitano je djelovanje kurkumina u koncentracijama od 1; 2,5; 5; 20; 50 i  $100 \mu\text{M}$  na razinu ROS-a i vijabilnost stanica nakon 2,5 sata.

Stanice su nacijepljene na 96-well ploču u koncentraciji od  $2,5 \times 10^5 \text{ st mL}^{-1}$ , a nakon 24-satne inkubacije tretirane su različitim koncentracijama kurkumina. Slijedio se protokol

proizvođača kit-a za detekciju ROS-a te je nakon 2,5 sata mjerena fluorescencija. Izmjerena fluorescencija proporcionalna je količini ROS-a u stanicama.

Na slici 19 dan je grafički prikaz učinka kurkumina na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana.

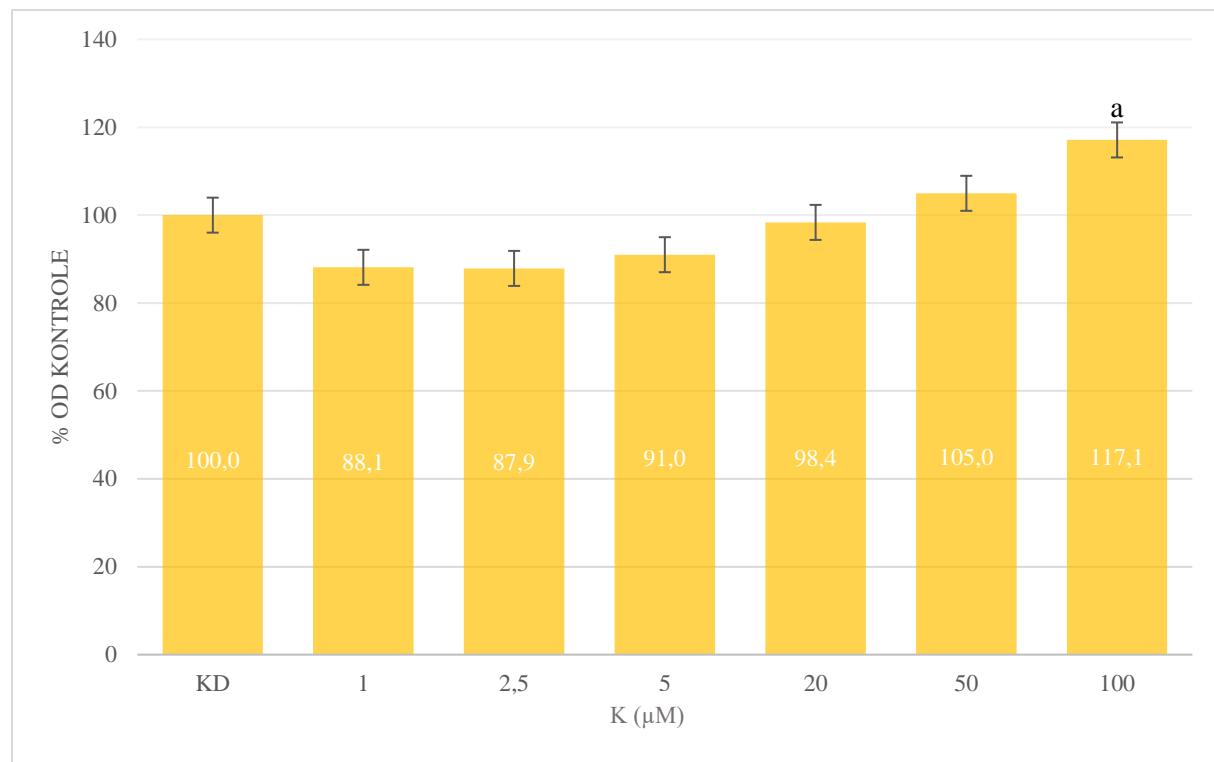


**Slika 19.** Učinak kurkumina (1-100  $\mu\text{M}$ ) na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana. Kontrolni uzorci stanica tretirani su tert-butil hidroperoksidom (TBHP) u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  te otapalom dimetil sulfoksidom (DMSO) u koncentraciji 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (KD). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student  $t$ -test): <sup>a</sup>p<0,005, <sup>b</sup>p<0,025.

Iz grafa na slici 19 vidljivo je da kurkumin u svim primijenjenim dozama (1-100  $\mu\text{M}$ ) smanjuje razinu ROS-a u usporedbi s razinom ROS-a u kontrolnom uzorku (KD). Statistički značajan pad u razini ROS-a određen je pri koncentracijama kurkumina 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p<0,005$ ).

U usporedbi s literaturnim podacima prema kojima je utvrđeno da kurkumin pri većim dozama pokazuje prooksidacijsko djelovanje (Han i sur., 2012; Yu i sur., 2018), može se uočiti da rezultati dobiveni u ovoj studiji to ne potvrđuju.

Usporedno s mjeranjem razine ROS-a u stanicama, izmjerena je i vijabilnost stanica nakon tretmana kurkuminom pomoću MTT metode, a rezultati mjeranja prikazani su na slici 20.



**Slika 20.** Učinak kurkumina (1-100  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 2,5 sata nakon tretmana u odnosu na kontrolni uzorak KD (stanice tretirane s 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  DMSO-a) određen MTT metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test); <sup>a</sup>  $p<0,001$ .

Iz grafa na slici 20 je vidljivo kako je vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (KD) manja pri koncentracijama od 1; 2,5; 5 i 20  $\mu\text{M}$ , dok se pri koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{M}$  bilježi porast vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu. Statistički značajan utjecaj na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu kurkumin ima pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ) gdje se bilježi porast u staničnoj vijabilnosti za 17,1% nakon kratkog vremena inkubacije od 2,5 sata.

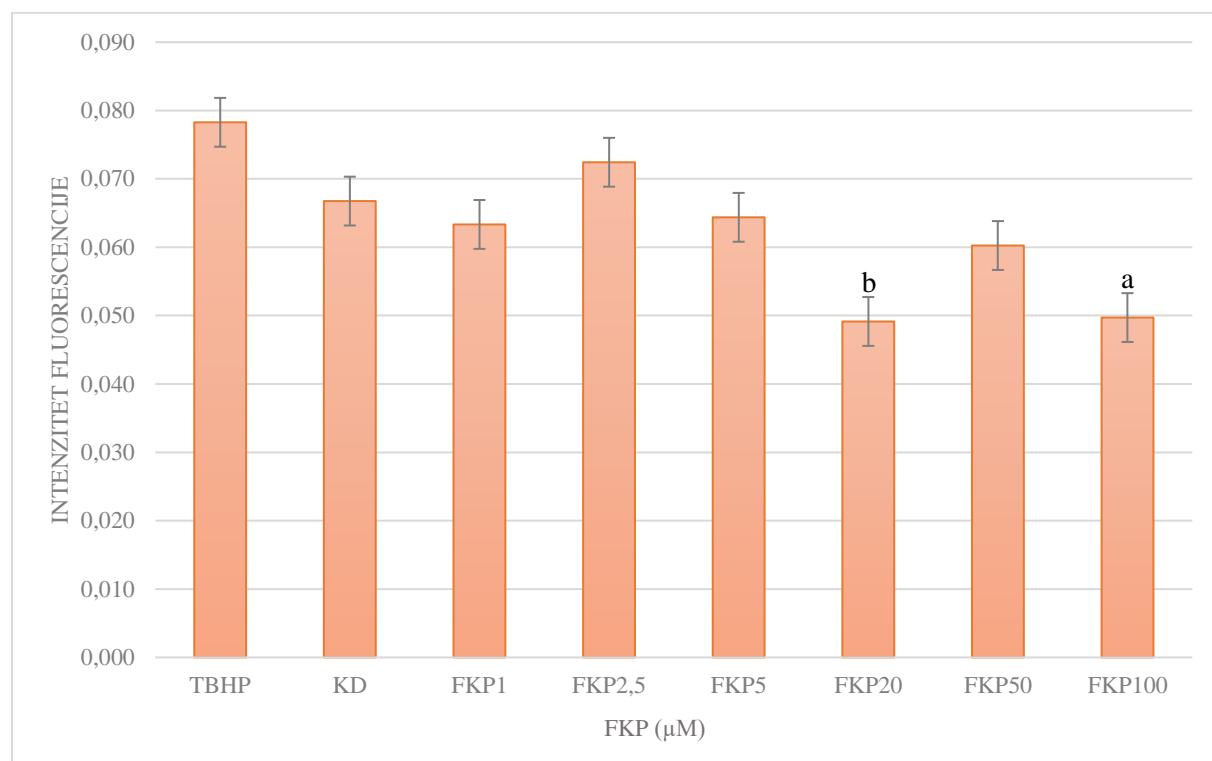
U prijašnjim istraživanjima, kurkumin je pokazao citotoksično djelovanje na stanice pri koncentracijama većima od 10  $\mu\text{M}$  (Palić, 2020), no period inkubacije stanica s kurkuminom u tim je istraživanjima bio dulji (48 h).

#### 4.4. UČINAK FEROCEŃSKOG KONJUGATA KURKUMINA NA RAZINU ROS-a I VIJABILNOST CHO-K1 STANICA

S obzirom na dokazani protektivni potencijal kurkumina, raste broj istraživanja kojima je u fokusu sinteza i proučavanje djelovanja konjugata kurkumina koji mogu imati povećanu bioaktivnost i biodostupnost u odnosu na čisti kurkumin. Prisutnost ferocenske jedinice poboljšava biološku aktivnost većine novosintetiziranih derivata kurkuminoida. Konjugati kurkumina koji sadrže ferocen pokazuju veću sposobnost „hvatanja“ radikala (Arezki i sur.,

2011; Meng i sur., 2018). Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Laboratoriju za organsku kemiju sintetiziran je novi ferocenski  $\beta$ -diketonski analog kurkumina. U ovom radu, ispitano je djelovanje tog novosintetiziranog ferocenskog konjugata kurkumina (FKP) u koncentracijama od 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100  $\mu\text{M}$  na razinu ROS-a i vijabilnost CHO-K1 stanica nakon 2,5 sata. Stanice su nacijepljene na 96-well ploču u koncentraciji od  $2,5 \times 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ , a nakon 24-satne inkubacije tretirane su različitim koncentracijama ferocenskog konjugata kurkumina. Slijedio se protokol proizvođača kit-a za detekciju ROS-a te je nakon 2,5 sata mjerena fluorescencija. Izmjerena fluorescencija proporcionalna je količini ROS-a u stanicama.

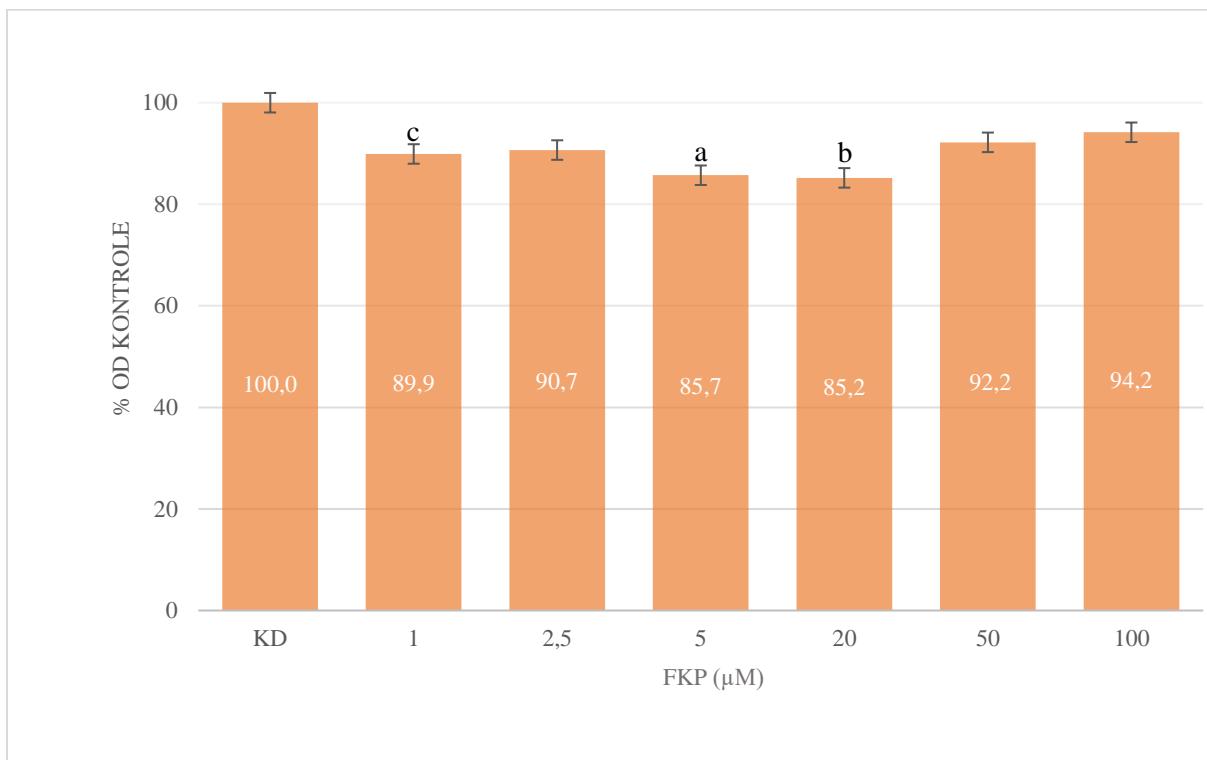
Na slici 21 dan je grafički prikaz učinaka ferocenskog konjugata kurkumina (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana.



**Slika 21.** Učinak ferocenskog konjugata kurkumina (1-100  $\mu\text{M}$ ) na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana. Kontrolni uzorci stanica tretirani su tert-butil hidroperoksidom (TBHP) u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  te otapalom dimetil sulfoksidom (DMSO) u koncentraciji 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (KD). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student  $t$ -test): <sup>a</sup> $p<0,01$ , <sup>b</sup> $p<0,025$ .

Iz grafa na slici 21 vidljivo je kako statistički značajan utjecaj na sniženje razine ROS-a u odnosu na kontrolu (KD), FKP ima pri koncentracijama 20  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,01$ ). Pri tim koncentracijama razina ROS-a je manja u odnosu na kontrolni uzorak i razinu ROS-a u stanicama tretiranim drugim koncentracijama FKP-a. Manja razina ROS-a u odnosu na kontrolni uzorak zabilježena je i kod koncentracije 1  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ , ali učinak nije bio statistički značajan.

Usporedno s mjeranjem razine ROS-a u stanicama, izmjerena je i vijabilnost stanica uslijed tretmana ferocenskim konjugatom kurkumina pomoću *MTT* metode, a rezultati su prikazani na slici 22.



**Slika 22.** Učinak ferocenskog konjugata kurkumina (1–100  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 2,5 sata nakon tretmana u odnosu na kontrolni uzorak KD (stanice tretirane s 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  DMSO-a) određen *MTT* metodom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p<0,001$ , <sup>b</sup> $p<0,01$ , <sup>c</sup> $p<0,025$ .

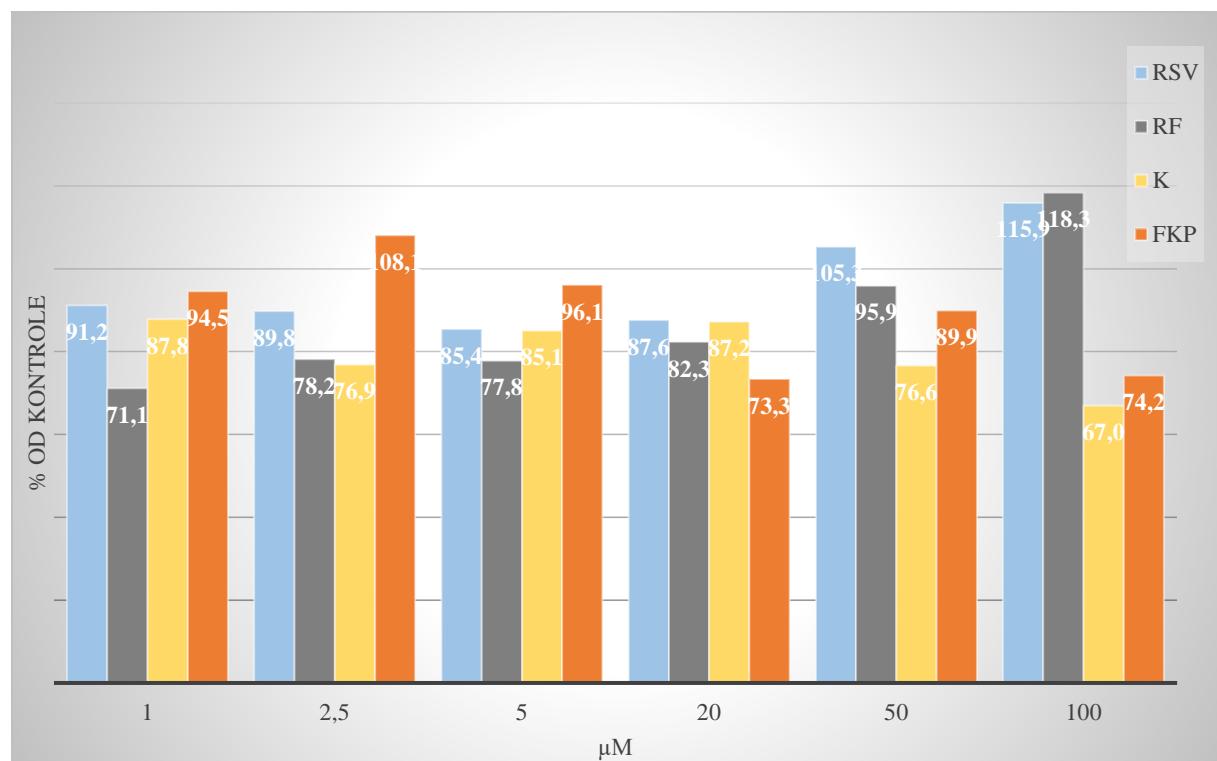
Iz grafa na slici 22 je vidljivo kako ferocenski konjugat kurkumina pri svim ispitanim koncentracijama (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) blago smanjuje vijabilnost stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Statistički značajan utjecaj na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (KD), FKP je pokazao pri koncentracijama 5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p<0,01$ ) gdje se vijabilnost stanica smanjila za gotovo 15%. Nadalje, pri koncentraciji 1  $\mu\text{M}$  FKP djeluje na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu te je zabilježen statistički značajan ( $p<0,025$ ) pad u vijabilnosti stanica za 10,1%.

U odnosu na kurkumin, ferocenski konjugat kurkumina pri koncentracijama višim od 2,5  $\mu\text{M}$  pokazuje jači citotoksični učinak na CHO-K1 stanice. Manje stanica je vijabilno u

odnosu na kontrolni uzorak nakon tretmana ferocenskim konjugatom kurkumina, nego je to bio slučaj nakon tretmana kurkuminom pri istim koncentracijama (5; 20; 50 i 100  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.5. USPOREDBA DJELOVANJA POLIFENOLA I FEROSENSKIH KONJUGATA POLIFENOLA NA RAZINU ROS-a u CHO-K1 STANICAMA

Na slici 23 grafički je prikazana usporedba učinaka resveratrola i kurkumina te njihovih ferocenskih konjugata na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama nakon 2,5 sata u odnosu na kontrolni uzorak.



**Slika 23.** Usporedba djelovanja resveratrola (RSV) i kurkumina (K) te njihovih ferocenskih konjugata (RF i FKP) pri koncentracijama 1-100  $\mu\text{M}$  na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama nakon 2,5 sata.

Iz grafa na slici 23 vidljivo je kako ferocenski konjugat resveratrola gotovo pri svim koncentracijama djeluje više protektivno na stvaranje ROS-a u stanicama od resveratrola. Najmanja razina ROS-a zabilježena je pri tretmanu stanica ferocenskim konjugatom resveratrola u koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ , a pri toj je koncentraciji i razlika u djelovanju RF-a i RSV-a najveća (za 20,1% manja razina ROS-a u stanicama tretiranim RF-om od razine ROS-a u stanicama tretiranim resveratrolom pri istoj koncentraciji).

Pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  oba spoja djeluju prooksidacijski.

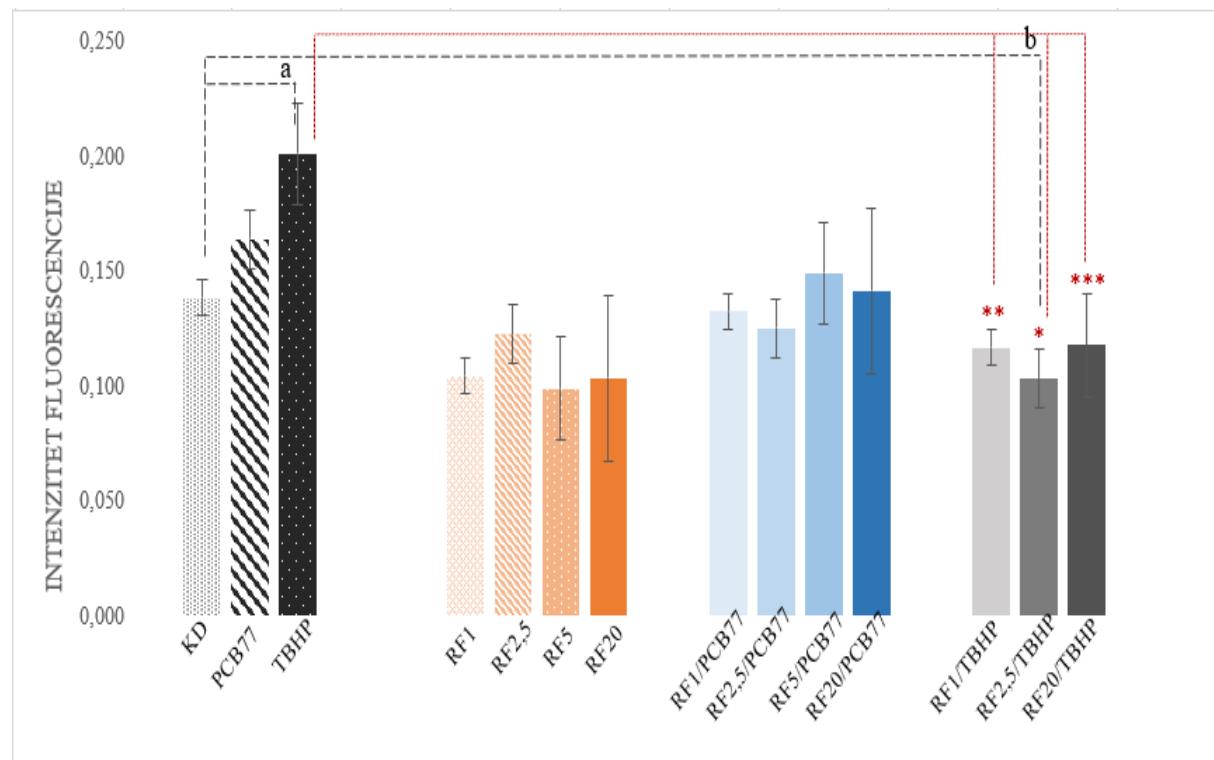
Kurkumin pri gotovo svim koncentracijama djeluje više protektivno na stvaranje ROS-a u stanicama od ferocenskog konjugata kurkumina. Najmanja razina ROS-a zabilježena je pri koncentraciji kurkumina  $100 \mu\text{M}$ .

Pri koncentraciji  $2,5 \mu\text{M}$  razlika u djelovanju je najveća (za 31,2% manja razina ROS-a u stanicama tretiranim kurkuminom od razine ROS-a u stanicama tretiranim FKP-om pri istoj koncentraciji). Pri koncentraciji  $20 \mu\text{M}$  kurkumin pokazuje slabiji protektivni učinak na stvaranje ROS-a u stanicama u odnosu na ferocenski konjugat kurkumina. U odnosu na razinu ROS-a u stanicama koje su tretirane kurkuminom, razina ROS-a u stanicama koje su tretirane ferocenskim konjugatom kurkumina pri istim koncentracijama  $1; 2,5; 5, 50$  i  $100 \mu\text{M}$  je viša. Pri tim koncentracijama je ferocenski konjugat kurkumina pokazao slabije protektivno djelovanje od kurkumina na stvaranje ROS-a.

Najjači protektivni učinak od sva četiri ispitana antioksidansa zabilježen je kod ferocenskog konjugata resveratrola pri koncentracijama  $1; 2,5$  i  $5 \mu\text{M}$ .

#### 4.6. UČINAK PREDINKUBACIJE FEROCEŃSKIM KONJUGATOM RESVERATROLA NA RAZINU ROS-a U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIM PCB-em 77 ILI TBHP-om

U ovom radu provedeno je istraživanje učinaka resveratrola i kurkumina te njihovih novosintetiziranih ferocenskih konjugata na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama. Rezultati mjerjenja pokazali su kako je pri tretmanu stanica ferocenskim konjugatom resveratrola (RF) razina ROS-a bila najmanja u odnosu na preostala tri ispitana spoja. Zbog toga je upravo taj bioorganometalni spoj odabran za određivanje mogućeg protektivnog učinka pri tretmanu stanica induktorima oksidacijskog stresa kao što su kongener polikloriranih bifenila PCB 77 ili tert-butil hidroperoksid TBHP. Na slici 24 dan je grafički prikaz učinka predinkubacije ferocenskim konjugatom resveratrola u koncentraciji  $1$  do  $20 \mu\text{M}$  na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama  $2,5$  sata nakon tretmana  $75 \mu\text{M}$  PCB-em 77 ili  $50 \mu\text{M}$  TBHP-om.



**Slika 24.** Razina ROS-a u CHO-K1 stanicama 2,5 sata nakon tretmana 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 ili 50  $\mu\text{M}$  TBHP-om uz 24-satnu predinkubaciju ferocenskim konjugatom resveratrola (1-20  $\mu\text{M}$ ). (KD – tretman stanica DMSO-om, TBHP – tretman stanica TBHP-om u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ , PCB 77 – tretman stanica 75  $\mu\text{M}$  PCB-em, RF1-RF20 – stanice predinkubirane RF-om u koncentracijama 1 – 20  $\mu\text{M}$ , RF1/TBHP - RF20/TBHP – stanice predinkubirane RF-om u koncentracijama 1 – 20 te tretirane TBHP-om u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ , RF1/PCB 77 – RF20/PCB 77 – stanice predinkubirane RF-om u koncentracijama 1 – 20  $\mu\text{M}$  te tretirane PCB-em 77 u koncentraciji 75  $\mu\text{M}$ ). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolni uzorak tretiran DMSO-om (KD): <sup>a</sup> $p<0,025$ , <sup>b</sup> $p<0,05$ ; u odnosu na uzorak tretiran TBHP-om: <sup>\*</sup> $p<0,001$ , <sup>\*\*</sup> $p<0,01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p<0,025$ .

Iz grafa na slici 24 vidljivo je kako je razina ROS-a u stanicama nakon tretmana sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 viša u odnosu na kontrolni uzorak tretiran DMSO-om (KD). Statistički značajno ( $p<0,025$ ) viša razina ROS-a u odnosu na KD zabilježena je u CHO-K1 stanicama nakon tretmana 50  $\mu\text{M}$  TBHP-om . U stanicama koje su bile predinkubirane s ferocenskim konjugatom resveratrola u koncentracijama 1; 2,5; 5 i 20  $\mu\text{M}$  zabilježena je niža razina ROS-a u odnosu na kontrolni uzorak tretiran DMSO-om. U stanicama koje su bile predinkubirane ferocenskim konjugatom resveratrola (1 – 20  $\mu\text{M}$ ), a zatim izložene 75  $\mu\text{M}$  PCB-u 77 u trajanju od 2,5 sata, razina ROS-a je niža u odnosu na razinu ROS-a gdje su stanice tretirane samo PCB-em 77.

Iako PCB 77 u ovom eksperimentu nije statistički značajno induciraо rast razine ROS-a u stanicama u odnosu na kontrolu, bilježi se niža razina ROS-a u onim stanicama koje su prvo bile izložene ferocenskom konjugatu resveratrola, a zatim PCB-u 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77.

U stanicama koje su bile predinkubirane s ferocenskim konjugatom resveratrola (1 – 20  $\mu\text{M}$ ), a zatim izložene 50  $\mu\text{M}$  TBHP-u u trajanju od 2,5 sata, razina ROS-a je niža u odnosu na razinu ROS-a gdje su stanice tretirane samo TBHP-om. Statistički značajan učinak ( $p<0,001$  –  $p<0,025$ ) na smanjenje ROS-a pri tretmanu CHO-K1 stanica TBHP-om ferocenski konjugat resveratrola pokazao je pri svim ispitanim koncentracijama (1  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$ ). Pri koncentraciji ferocenskog konjugata resveratrola od 2,5  $\mu\text{M}$  i tretmanu stanica TBHP-om razina ROS-a je najmanja u odnosu na ostale ispitane koncentracije.

Razina ROS-a je u stanicama koje su bile predinkubirane s 2,5  $\mu\text{M}$  ferocenskim konjugatom resveratrola, a zatim izložene TBHP-u u trajanju od 2,5 sata statistički značajno niža ( $p<0,05$ ) i od kontrolnog uzorka.

Nakon ispitivanja učinka različitih koncentracija kurkumina i resveratrola te njihovih ferocenskih konjugata na razinu stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i vijabilnost u CHO-K1 staničnoj liniji uočeno je kako odabrani ispitani antioksidansi ispoljavaju različit učinak ovisno o primijenjenoj koncentraciji. Nadalje, zabilježena je modificirana biološka aktivnost ferocenskih konjugata u odnosu na polazni polifenolni spoj. Saznanja dobivena ovim istraživanjem mogu doprinijeti razvoju sinteze novih ferocenskih konjugata polifenola unaprijeđene aktivnosti te mogu pridonijeti odabiru spojeva koji bi imali protektivno djelovanje pri izloženosti induktorima oksidacijskog stresa.

## 5. ZAKLJUČCI

- Razina ROS-a u stanicama tretiranim resveratrolom u koncentracijama  $\geq 20 \mu\text{M}$ , veća je u odnosu na razinu ROS-a u u kontrolnim uzorcima (KD), a u koncentracijama od 1 - 5  $\mu\text{M}$  manja je u odnosu na razinu ROS-a u KD te u tim dozama resveratrol ima potencijalan antioksidacijski učinak.
- Vijabilnost stanica koje su bile izložene resveratrolu 2,5 h u koncentracijama  $\geq 5 \mu\text{M}$  statistički je značajno ( $p<0,001$ ) viša u odnosu na kontrolu.
- Statistički značajno smanjenje razine ROS-a u odnosu na kontrolni uzorak (KD) zabilježeno je kod koncentracija ferocenskog konjugata resveratrola od 1  $\mu\text{M}$  ( $p<0,005$ ), 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ).
- Ferocenski konjugat resveratrola pri koncentracijama od 1; 50 i 100  $\mu\text{M}$  nema utjecaja na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu (KD), dok se pri koncentracijama od 2,5; 5 i 20  $\mu\text{M}$  bilježi blagi porast u staničnoj vijabilnosti. Statistički značajno ( $p<0,05$ ) djelovanje na vijabilnost stanica RF pokazuje pri koncentraciji 5  $\mu\text{M}$  gdje se uočava porast u staničnoj vijabilnosti za 13,7%.
- Kurkumin u dozama 1-100  $\mu\text{M}$  smanjuje razinu ROS-a u usporedbi s razinom ROS-a u kontrolnim uzorcima. Statistički značajan pad u razini ROS-a određen je pri koncentracijama kurkumina 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p<0,005$ ).
- Statistički značajan utjecaj na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu kurkumin ima pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ) gdje se bilježi porast u staničnoj vijabilnosti za 17,1% nakon kratkog vremena inkubacije od 2,5 sata.
- Ferocenski konjugat kurkumina (FKP) pokazao je utjecaj na sniženje razine ROS-a u odnosu na kontrolni uzorak pri koncentracijama 1, 20 ( $p<0,025$ ), 50 i 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,01$ ).
- Statistički značajan utjecaj na vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu, FKP je pokazao pri koncentracijama 5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p<0,01$ ) gdje se vijabilnost stanica smanjila za gotovo 15% te pri koncentraciji 1  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) gdje je zabilježen pad u vijabilnosti stanica za 10,1%. I pri drugim ispitanim dozama ( $<100 \mu\text{M}$ ) uočen je inhibicijski učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica.
- Najjači antioksidacijski učinak od sva četiri ispitana spoja (resveratrol, ferocenski konjugat resveratrola, kurkumin, ferocenski konjugat kurkumina) pokazao je RF pri koncentracijama 1; 2,5 i 5  $\mu\text{M}$ .

- Određena je niža razina ROS-a u stanicama koje su bile predinkubirane RF-om (1-20  $\mu\text{M}$ ), a zatim izložene PCB-u 77 (75  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na stanice izložene samo PCB-u, no učinak nije bio statistički značajan.
- Statistički značajan učinak na smanjenje ROS-a pri tretmanu stanica TBHP-om (50  $\mu\text{M}$ ) RF je pokazao pri svim ispitanim koncentracijama (1-20  $\mu\text{M}$ ).

## 6. LITERATURA

- Aggarwal, B. B., Deb, L., Prasad, S. (2015) Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules*. **20**, 185-205. doi: 10.3390/molecules20010185.
- Abdal Dayem, A., Hossain, M., Lee, S., Kim, K., Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H. Y., Cho, S.-G. (2017) The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int. Jou. Mol. Sci.* **18** (1), 120. doi: 10.3390/ijms18010120.
- Araújo, M.C.P., Luz, D., Kronka, S., Takahashi, S. (1999) Effects of turmeric and its active principle, curcumin, on bleomycin-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. *Genet. Mol. Bio.* **22**, 407-414. doi: 10.1590/S1415-47571999000300021.
- Arezki, A., Chabot, G. G., Quentin, L., Scherman, D., Jaouen, G., Brulé, E. (2011) Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *Med. Chem. Comm.* **2**(3), 190-195. doi: 10.1039/C0MD00231C.
- ATCC (2021) Cell biology, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CCL-61.as>>. Pristupljeno 13.svibnja 2021.
- Bhatt, V. (2016) Basic Organometallic Chemistry. U: *Essentials of Coordination Chemistry*. Elsevier Academic Press, London/San Diego/Waltham/Kindlington, str. 173–190.
- Bielak-Zmijewska, A. Grabowska, W., Ciolko, A., Bojko, A., Mosieniak, G., Bijoch, Ł., Sikora, E. (2019) The role of curcumin in the modulation of ageing. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1239. doi: 10.3390/ijms20051239.
- Chalal, M., Delmas, D., Meunier, P., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D. (2014) Inhibition of cancer derived cell lines proliferation by synthesized hydroxylated stilbenes and new ferrocenyl-stilbene analogs. Comparison with resveratrol. *Molecules*. **19**(6), 7850-7868. doi: 10.3390/molecules19067850.
- Čakić Semenčić, M., Barišić, L. (2017) Ferrocene bioconjugates. *Croat. Chem. Acta*, **90** (4), 537-569. doi: 10.5562/cca3246.
- Dubrovina, A. S., Kiselev, K. V. (2017) Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, **246** (4), 597-623. doi:10.1007/s00425-017-2730-8.

- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., Santini, A. (2019) Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother. Res.* **33**, 2221-2243 doi:10.1002/ptr.6419.
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2009) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. U: *Advanced Protocols in Oxidative Stress*, (Armstrong, D., ured.), Humana Press, Buffalo, str. 57-72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1\_4.
- Freshney, R. I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gad, S. E. (2014) Hydroperoxide, tert-Butyl. U: *Encyclopedia of Toxicology*, (Wexler, P., ured.), Elsevier Academic Press, Cary, str. 977–978. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00854-x
- Galiniak, S., Aebisher, D., Bartusik-Aebisher, D. (2019) Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol.* **28**, 13-21. doi: 10.18388/abp.2018\_2749.
- Giuliani, A., Cerretani, L., Cichelli, A. (2016) Colors: properties and determination of natural pigments. U: *Encyclopedia of Food and Health*, (Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., ured.), Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston/Heidelberg/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapore/Sydney/Tokyo, str. 273-283.
- Glauert, H. P., Tharappel, J. C., Lu, Z., Stemm, D., Banerjee, S., Chan, L. S., Spear, B. T. (2008) Role of oxidative stress in the promoting activities of PCBs. *Environ. Toxi. Pharm.*, **25**, 247-250. doi: 10.1016/j.etap.2007.10.025.
- Gueguen, N., Desquiert-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessières, E., Ayer, A., Henrion, D. D., Lenaers, G., Reynier, P., Procaccio, V. (2015) Resveratrol directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLOS ONE*, **10** (12), e0144290. doi:10.1371/journal.pone.0144290.
- Han, X., Xu, B., Beevers, C. S., Odaka, Y., Chen, L., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Huang, S. (2012) Curcumin inhibits protein phosphatases 2A and 5, leading to activation of mitogen-activated protein kinases and death in tumor cells. *Carcinogenesis*. **33** (4), 868-875. doi: 10.1093/carcin/bgs029.
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. (2016) Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* **9** (3- 4), 90-100. doi: 10.1515/intox-2016-0012.

- Jedrzejczak-Silicka, M. (2017) History of cell culture. U: *New Insights into Cell Culture Technology*, (Gowder, S. J. T., ured.), InTechOpen, doi:10.5772/66905.
- Kim, S., Kim, M., Kang, M. C., Lee, H. H. L., Cho, C. H., Choi, I., Park, Y., Lee, S. H. (2021) Antioxidant effects of turmeric leaf extract against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* in Vero cells and *in vivo* in Zebrafish. *Antioxidants*. **10** (1):112. doi: 10.3390/antiox10010112.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., Hocevar, B. A. (2009) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **38**, 96-109. doi:10.1177/0192623309356453.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. hig. rada. toksikol.* **56** (2), 195-204.
- Kotha, R. R., Luthria, D. L. (2019) Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*. **24** (16), 2930. doi:10.3390/molecules24162930.
- Kovač, V., Kmetič, I., Murati, T., Miletic, M., Barišić, L. (2016) Facile synthesis and cytotoxic activity of the first ferrocene-resveratrol conjugate. *Croat. Chem. Acta*. **89** (3), 339-343. doi: 10.5562/cca2992.
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., Aggarwal, B. B. (2016) Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Brit. J. Pharmacol.* **174** (11), 1325-1348. doi:10.1111/bph.13621.
- Li, P.-Z., Liu, Z.-Q. (2011) Ferrocenyl-substituted curcumin: can it influence antioxidant ability to protect DNA? *Eur. J. Med. Chem.* **46** (5), 1821-1826. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.041.
- Lindskog, E. K., Fischer, S., Wenger, T., Schulz, P. (2018) Host cells. U: *Biopharmaceutical Processing*, (Jagschies, G., Lindskog, E., Łącki, K., Galliher, P., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 111-130. doi:10.1016/b978-0-08-100623-8.00006-2.
- Lopresti, A., Hood, S., Drummond, P. (2012) Multiple antidepressant potential modes of action of curcumin: a review of its anti-inflammatory, monoaminergic, antioxidant, immune-modulating and neuroprotective effects. *J. Psychopharmacol.* **26** (12), 1512-24. doi: 10.1177/0269881112458732.
- Lukačević, T. (2019) Ferocensi asimetrični kurkuminoid-pirazoli: sinteza i struktorna karakterizacija. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.

- Malaguarnera, L. (2019) Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients.* **11**(5):946. doi: 10.3390/nu11050946.
- Marđetko, S. (2015) Učinak resveratrola na vijabilnost CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-K1 stanica uz ili bez tretmana polikloriranim bifenilima. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
- Meng, X., Li, S., Ma, W., Wang, J., Hu, Z., Cao, D. (2018) Synthesis and antioxidant activities of ferrocenyl-containing curcumin analogues. *Lett. Drug. Des. Discov.* **15**, 1252 -1258, 10.2174/1570180815666180219161110.
- Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., He, J. (2021) Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules.* **26**, 229. 10.3390/molecules26010229.
- Moghaddam, N. S. A., Oskouie, M. N., Butler, A. E., Petit, P. X., Barreto, G. E., Sahebkar, A. (2019) Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? *J. Cell. Physiol.* **234** (7):10060-10071.
- Murati, T. (2015) Studija citotoksičnih učinaka polikloriranih bifenila. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
- Murati, T., Šimić, B., Brozović, A., Kniewald, J., Miletic Gospic, A., Bilandžić, N., Kmetić, I. (2015) PCB 77 action in ovary cells – toxic effects, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Toxicol. Mech. Methods,* **25** (4), 302-311. doi: 10.3109/15376516.2015.1028605.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (2021) Tert-butyl hydroperoxide. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6410#section=Toxicity-Summary>>. Pristupljeno 5. srpnja, 2021.
- Palić, D. (2020) Učinci kurkumina na citotoksičnost induciranoj polikloriranim bifenilima. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
- Pannu, N., Bhatnagar, A. (2019) Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 2237-2251. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.075.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla D., Bitto, A. (2017) *Oxidative stress: harms and benefits for human health.* *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1–13. doi:10.1155/2017/8416763

- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K. (2017) Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* **387**, 95-105. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.042.
- Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr.* **11** (3-4), 169-175.
- Rainey, N. E., Moustapha, A., Petit, P. X. (2020) Curcumin, a multifaceted hormetic agent, mediates an intricate crosstalk between mitochondrial turnover, autophagy, and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020, 1–23. doi:10.1155/2020/3656419
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: a review. *Int. J. Food Prop.* **20**, 1700-1741. doi: 10.1080/10942912.2017.1354017.
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Gaforio, J. J. (2019) Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. *Antioxidants.* **8** (5), 137. doi: 10.3390/antiox8050137.
- Rossi, M., Caruso, F., Antonicelli, R., Viglianti, A., Traversi, G., Leone, S., Basso, E., Cozzi, R. (2013) Scavenging of hydroxyl radical by resveratrol and related natural stilbenes after hydrogen peroxide attack on DNA. *Chem-Biol. Interact.* **206** (2), 175-185. doi: 10.1016/j.cbi.2013.09.013.
- Saad, N., Sekar, M., Gan, S., Lum, P., Va, J., Ravi, S. (2020) Resveratrol: latest scientific evidences of its chemical, biological activities and therapeutic potentials. *Pharmacogn. J.* **12**, 1779-1791. doi: 10.5530/pj.2020.12.240.
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., Pintus, G. (2020) Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (6), 2084. doi: 10.3390/ijms21062084.
- Swanson, W. S., Katoh-Kurasawa, M., Shaulsky, G., Alexander, S. (2017) Curcumin affects gene expression and reactive oxygen species via a PKA dependent mechanism in *Dictyostelium discoideum*. *PLOS ONE.* **12** (11), e0187562. doi:10.1371/journal.pone.0187562.
- Tennen, R. I., Michishita-Kioi, E., Chua, K. F. (2012) Finding a target for resveratrol. *Cell.* **148**, 387-389. doi:10.1016/j.cell.2012.01.032.
- Toronjo-Urquiza, L., Acosta-Martin, A. E., James, D. C., Nagy, T., Falconer, R. J. (2019) Resveratrol addition to CHO cell culture media: the effect on cell growth,

- monoclonal antibody synthesis and its chemical modification. *Biotechnol. Progr.* **36** (3), e2940. doi: 10.1002/btpr.2940.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8** (7), 579-591. doi: 10.1038/nrd2803.
  - Uberti, F., Morsanuto, V., Aprile, S., Ghirlanda, S., Stoppa, I., Cochis, A., Gerosa, G., Rimondini, L., Molinari, C. (2017) Biological effects of combined resveratrol and vitamin D3 on ovarian tissue. *J. Ovarian Res.* **10** (1), 61. doi: 10.1186/s13048-017-0357-9.
  - Weiskirchen, S., Weiskirchen, R. (2016) Resveratrol: how much wine do you have to drink to stay healthy? *Adv. Nutr.* **7**, 706-718. doi: 10.3945/an.115.011627.
  - Yu, T., Dohl, J., Elenberg, F., Chen, Y., Deuster, P. (2018). Curcumin induces concentration-dependent alterations in mitochondrial function through ROS in C2C12 mouse myoblasts. *J. Cell. Physiol.* **234**, 6371-6381
  - Zhang, Y., Han, S.-J., Park, I., Kim, I., Chay, K.-O., Kim, S. M., Jang, D.I., Lee, T.-H., Lee, S.-R. (2017) Redox regulation of the tumor suppressor pten by hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 982. <https://doi.org/10.3390/ijms18050982>

### IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Anica Jurišić  
Anica Jurišić