

Priprava prirodnih eutekličnih otapala i njihova primjena u krioprotekciji stanične linije

Ivanjko, Natalia

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:232952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Natalia Ivanjko,
613/MB

**PRIPRAVA PRIRODNIH
EUTEKTIČNIH OTAPALA I
NJIHOVA PRIMJENA U
KRIOPROTEKCIJI STANIČNE
LINIJE
HEK 293T**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr.sc. Igora Slivca u sklopu HRZZ projekta br. 9550 „Zelena otapala za zelene tehnologije“.

Zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Igoru Slivcu, te izv.prof.dr.sc. Ivani Radojčić Radovniković na uloženom vremenu i trudu i nesebičnoj pomoći, te na svemu što su me naučili pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pruženoj pomoći i savjetima pri odradi eksperimentalnog dijela rada.

Također, želim zahvaliti svojoj obitelji i Vanji na iskazanoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjersvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Priprava prirodnih eutektičnih otapala i njihova primjena u krioprotekciji stanične linije

HEK 293T

Natalia Ivanjko, 613/MB

Sažetak: Prirodna eutektična otapala (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) su nova generacija ekološki prihvatljivih otapala sa mogućim primjenama u različitim industrijskim područjima. Definišu se kao smjesa dviju ili više komponenata koje se međusobno mogu povezati vodikovim vezama te koje u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese. S obzirom na njihovu široku primjenu, u ovom radu ispitana je mogućnost njihove primjene kao krioprotektanata na staničnoj liniji HEK 293T. U ovom radu pripravljena su dva različita NADES-a u različitim molarnim odnosima (kolin klorid:glukoza, prolin:glukoza) te s različitim udjelima vode. Učinkovitost ovih NADES-a kao krioprotektanata uspoređena je sa standardnim krioprotektantima, glicerolom i dimetil sulfoksidom. Istraživanje je pokazalo da testirani spojevi nisu dostojna zamjena standardnim krioprotektantima.

Ključne riječi: prirodna eutektična otapala, fizikalno–kemijska svojstva, krioprotektanti, citotoksičnost

Rad sadrži: 38 stranica, 7 slika, 3 tablice, 49 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Igor Slivac*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
2. doc. dr. sc. Igor Slivac
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić-Redovniković
4. izv. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: 28.09.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Preparation of natural deep eutectic solvents and their application as cryoprotectants for cell line HEK 293T

Natalia Ivanjko, 613/MB

Abstract: Natural deep eutectic solvents (NADES) are new generation of environmentally friendly solvents with potential application in various industrial fields. They are defined as a mixture of two or more components connected to each other by hydrogen bonds. At a certain ratio of their building components, NADES can have lower melting points than the individual components of the mixture. Considering their widespread application, NADES are tested as cryoprotectants on cell line HEK 293T. Two different NADES are made for this experiment; they are consisted of proline/glucose and choline chloride/glucose in different molar ratio and with different percentage of water content. Efficiency of those NADES are compared with standard cryoprotectants, glycerol and dimethyl sulfoxide. The results showed that NADES cannot serve as an appropriate alternative to the standard cryoprotectants.

Keywords: natural deep eutectic solvents, physico-chemical properties, cryoprotectants, cytotoxicity

Thesis contains: 38 pages, 7 figures, 3 table, 49 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Igor Slivac, assistant professor*

Reviewers:

1. Ph.D. Ivana Kmetič, associate professor
2. Ph.D. Igor Slivac, assistant professor
3. Ph.D. Ivana Radojčić Redovniković, associate professor
4. Ph.D. Ksenija Durgo, associate professor (substitute)

Thesis defended: 28.09.2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Eutektična otapala.....	3
2.1.1. Prirodna eutektična otapala	5
2.1.2. Priprema NADES-a.....	5
2.1.3. Kemijska struktura NADES-a	6
2.1.4. Fizikalno – kemijska svojstva NADES-a.....	7
2.1.5. Funkcija NADES-a u živim organizmima	9
2.2. Krioprezervacija	11
2.2.1. Metoda sporog hlađenja	12
2.2.2. Vitifikacija.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Kemikalije	18
3.1.2. Uređaji i oprema.....	18
3.1.2. Humana stanična linija.....	19
3.2. Metode rada	19
3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala	19
3.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HEK 293T staničnim linijama i njihove primjene kao krioprotektanata.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala	24
4.2. Mjerenje pH vrijednosti.....	26
4.3. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala i standardnih krioprotektanata na HEK 293T staničnoj liniji.....	27
4.4. Uporaba NADES-a kao sredstva za krioprotekciju stanične linije HEK 293T.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA.....	34

1. UVOD

Napredak znanosti i tehnologije ima značajan utjecaj na okoliš; nastanak ozonskih rupa te masovno nakupljanje nerazgradivih sastojaka koji onečišćuju sve dijelove ekosustava jedni su od vodećih ekoloških problema. Naime, većina postojećih procesa u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, te biotehnologiji koristi hlapljiva organska otapala barem u jednom proizvodnom stupnju pri čemu nastaju velike količine otpadnih, za okoliš štetnih tvari. Osim toga, posljednjih nekoliko godina globalna ekonomska kriza, rastuće cijene hrane, energije i drugih roba, ali i povećana svijest o utjecaju čovjeka na okoliš su potaknuli koncept zelene ekonomije u središte političkih, gospodarskih i znanstvenih rasprava. Novi zakoni i odredbe Europske unije usmjereni su k zaštiti okoliša i ljudi od štetnih utjecaja kemikalija, pa je stoga akademska zajednica mobilizirana da razvije nova otapala koja su manje štetna za ljudsko zdravlje i okoliš.

Eutektična otapala (DES – eng. Deep Eutectic Solvents) su sastavljena od primarnih metabolita poput šećera, aminokiselina ili organskih kiselina te u potpunosti zadovoljavaju koncept zelene kemije (Paiva i sur., 2014). Kao „zelenija verzija“ ionskih kapljevin, eutektična otapala su zbog prilagodljivosti njihovih svojstava odabirom početnih sirovina, privukla pozornost u sintetskoj kemiji i (bio)katalizi, elektrokemiji, nanomaterijalima, biokemiji, separacijskim postupcima, te su istraživane u cilju ekstrakcije bioloških aktivnih spojeva različite polarnosti (Dai i sur., 2013c).

Osim navedenih područja primjene eutektičnih otapala, ona pokazuju obećavajuću primjenu i u kriobiologiji, biološkoj grani znanosti koja istražuje preživljavanje i postojanost stanica, tkiva, organa i organizama pri uvjetima niskih temperatura te proučava ponašanja živih tvari izloženih intenzivnom hlađenju. Cilj krioprotektivnih metoda je izložiti žive stanice niskim temperaturama, s namjerom da se očuva morfološka struktura i funkcionalnost stanica kroz duži vremenski period. Mnogi prirodni spojevi koji mogu stvarati prirodna eutektična otapala su i stanični metaboliti koji su u korelaciji sa sušom, hladnoćom ili tolerancijom na salinitet. Standardni krioprotektanti poput dimetil sulfoksida, usprkos svojim visokim performansama očuvanja stanica i tkiva tijekom zamrzavanja, pokazuje i određenu razinu toksičnosti. Prirodna eutektična otapala zbog svojih karakterističnih svojstava poput visoke viskoznosti imaju predispoziciju za krioprotekciju, a uz to su nehlapiva i netoksična (Ishiguro i Rubinsky, 1994).

U ovom radu istražit će se mogućnost primjene prirodnih eutektičnih otapala kao krioprotektivnih agenasa s ciljem zamjene standardnih spojeva koje se primjenjuju u ovu svrhu. Cilj ovog rada temelji se na primjeni dvije vrste NADES-a (glukoza:prolin, kolin klorid:glukoza) kao krioprotektanata tijekom smrzavanja humanih stanica HEK 293T te usporedbi djelotvornosti sa standardnim krioprotektantima, glicerolom i dimetil sulfoksidom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Eutektična otapala

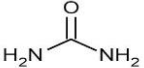
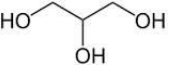
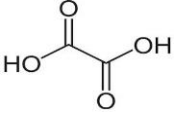
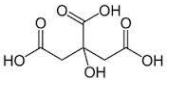
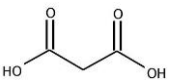
Nova ekološki prihvatljiva otapala koja bi mogla poslužiti kao zamjena za uobičajena organska otapala jedan su od najznačajnijih predmeta istraživanja u sklopu zelenih tehnologija. Konvencionalna organska otapala su u uporabi u gotovo svim procesima te velike količine takvih organskih otapala mogu predstavljati ekološki problem. Jedan od načina očuvanja okoliša je zamjena organskih otapala novim „zelenim“ otapalima, a u tu kategoriju spadaju ionske kapljevine i eutektična otapala. Stoga se ionske kapljevine i eutektična otapala, nova generacija nehlapljivih i stabilnih otapala, posljednjih godina intenzivno proučavaju kao zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala u različitim područjima industrije.

U cilju razvoja ekološki prihvatljivih otapala, ionske kapljevine su privukle veliku pozornost zbog njihovog zanemarivog tlaka para pri sobnoj temperaturi, ali i zbog njihovih karakteristika poput polarnosti i selektivnosti koje mogu biti alterirane ovisno o karakteru primjene. Ionske kapljevine su organske soli u tekućem stanju odnosno soli čija je točka taljenja niža od 100 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Sastavljene od organskih kationa i anorganskih ili organskih aniona, a moguća je sinteza i do 10^{18} različitih ionskih kapljevine. Posljedica mnoštva različitih kombinacija kationa i aniona koji ih čine jesu različita fizikalno - kemijska svojstva pojedinih ionskih tekućina. Iako ionske kapljevine predstavljaju dobru alternativu za konvencionalna organska otapala, njihova primjena je limitirana u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji s obzirom na njihovu visoku cijenu, visoku toksičnost pojedinih komponenti otapala, ali i zbog iritacijskih svojstava.

Drugi tip otapala sa sličnim karakteristikama kao i ionske kapljevine su eutektična otapala (eng. Deep Eutectic Solvents – DES) i prema tomu ona su kategorizirana kao četvrta generacija ionskih kapljevine. DES-ovi se definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koje u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Paiva i sur., 2014). DES-ovi su smjese Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina i baza, te mogu sadržavati različite anione i katione. Za razliku od njih, ILS se formiraju prvenstveno od jedne izolirane vrste kationa i aniona (Smith i sur., 2014). Dakle, eutektična otapala nastaju mješanjem čvrstih spojeva koji tvore eutektičnu mješavinu sa

točkom topljenja mnogo nižom nego što je slučaj kod zasebnih komponenti. Kao primjer možemo navesti mješavinu kolin klorida (2-hidroksietil-trimetilamonij klorid) i uree u omjeru 1:2. Naime, kolin klorid ima točku taljenja na 302 °C, a urea na 133 °C, dok će eutektična smjesa ostati u tekućem stanju do temperature od 12 °C. Više takvih primjera prikazano je u tablici 1 (Zhang i sur., 2012). Snižavanje temperature tališta ovisi o simetriji prisutnog kationa i o kemijskoj prirodi funkcionalnog bočnog lanca (Abbott i sur., 2001). U slučaju kolin klorida, izbor HBD (Hidrogen Bond Donor) kao i njihov molarni omjer je kritična točka formiranja NADES sa nižom točkom tališta. Također, prisutan anion u derivatu kolinskih soli može utjecati na točku tališta, pa tako u kombinaciji s ureom točka tališta NADES opada prema redosljedu $F^- > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$ (Zhang i sur., 2012).

Tablica 1. Temperature leđišta eutektičnih otapala i temperature tališta njihovih pojedinih komponenti (Zhang i sur., 2012).

Komponenta 1: Kolin klorid (ChCl) Temperatura tališta: 302 °C	Komponenta 2: Donor vodikove veze (HBD)		Temperatura tališta komponente 2 (HBD) [°C]	Molarni omjer (ChCl:HBD)	Temperatura leđišta [°C]
	Naziv	Struktura			
	Urea		134	1:2	12
	Glicerol		17,8	1:2	-40
	Oksalna kiselina		190	1:1	34
	Limunska kiselina		149	1:1	69
	Jabučna kiselina		135	1:1	10

Spomenuta otapala obično su sastavljena od organskih komponenti poput kvaternarnih amonijevih soli, amida, organskih kiselina i polialkohola te kao takva pokazuju prednosti

naspram ionskih kapljevina: jednostavna metoda pripreme, niske cijene troškova, visoka čistoća te niska toksičnost.

2.1.1. Prirodna eutektična otapala

U cilju povećanja broja kandidata za ionske kapljevine i eutektična otapala te svladavanja njihovih negativnih karakteristika, prirodni spojevi su istraživani kao izvor komponenti za ovakva otapala. Istraživanja su se uglavnom temeljila na primarnim metabolitima kao što su aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina. Takva otapala u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije (Choi i sur., 2011).

Prirodni spojevi su izdašan i idealan izvor za sintezu eutektičnih otapala zbog njihove kemijske različitosti, biorazgradivih svojstava, održivosti i prihvatljive toksičnosti. Eutektična otapala sastavljena od prirodnih spojeva nazivaju se zajedničkim imenom prirodna eutektična otapala (eng. NADES – Natural Deep Eutectic Solvents). Osim što predstavljaju zanimljivu alternativu za konvencionalna organska otapala i ionske kapljevine, njihova funkcija u živim organizmima ima još interesantniji aspekt; njihova egzistencija unutar mnogih organizama mogla bi vrlo dobro objasniti mnoge biološke procese poput biosinteze, topljivosti, skladištenja i transporta u vodi netopivih metabolita i makromolekula. Također, prisutnost prirodnih eutektičnih otapala u živim organizmima može objasniti preživljavanje istih u uvjetima ekstremne suše ili niskih temperatura. Mnoge prednosti prirodnih eutektičnih otapala sugeriraju veliki potencijal za njihovu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, ali i kozmetičkoj industriji, rezultirajući ekonomskim i ekološkim beneficijama.

2.1.2. Priprema NADES-a

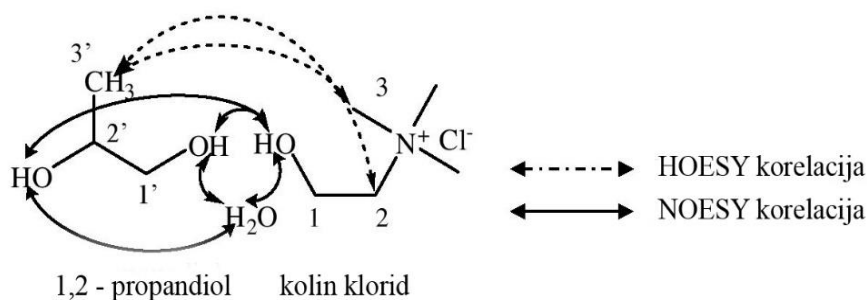
Sama priprema NADES je jednostavna i ekonomična u odnosu na pripravu drugih generacija ionskih kapljevina. Postoji više načina pripreme; iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014).

Najčešći postupak pripreme je blago zagrijavanje točno određene mase komponenata sa ili bez dodatka vode uz miješanje na temperaturi do 100 °C, 30 do 90 minuta dok se ne formira bistra tekućina. Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi komponenata eutektičnog otapala. Otapala istog kemijskog profila mogu se dobiti vakuum upravljanjem gdje se sastojci NADES prvo otapaju u vodi, a potom uparavaju na 50 °C pomoću rotacijskog uparivača do postizanja konstantne mase (Abbott i sur., 2004; Dai i sur., 2013a). Osim spomenutog postupka pripreme, NADES se može dobiti i primjenom postupka liofilizacije; vodene otopine pojedinačnih komponenata u određenom omjeru se pomiješaju i zamrznu te se postupkom sušenja (sublimacije) dobiva tekući NADES (Gutiérrez i sur., 2009).

2.1.3. Kemijska struktura NADES-a

Svaka komponenta koja čini eutektičnu mješavinu je istovremeno donor i akceptor vodikovih veza, što je u stvari temelj nastanka supermolekularne strukture prirodnih eutektičnih otapala. Osim toga, na stabilnost utječe i sama struktura komponenata koje čine prirodna eutektična otapala. Broj donorskih ili akceptorskih grupa vodikovih veza, prostorna struktura tih grupa i pozicija nastalih vodikovih veza ima veliki utjecaj na formiranje i stabilnost prirodnih eutektičnih otapala (Dai i sur., 2013a). Primjerice, limunska i malonska kiselina formiraju eutektičnu otopinu sa kolin kloridom u molarnom omjeru 1:2, no zbog različitog prostornog rasporeda reaktivnih skupina, eutektična otopina sa limunskom kiselinom (donor tri protona) gubi na stabilnosti i s vremenom postaje gusti gel, dok eutektična otopina sa malonskom kiselinom (donor dva protona) zadržava svoja svojstva duže vrijeme (Popescu i Constantin, 2014).

HOESY spektar (heteronuklearna spektroskopija) 1,2 propandiola, kolin klorida i vode otkriva odgovarajući signal da proton na metilnoj grupi 1,2 propandiola ulazi u interakcije s metilnim i metilnskim (vezan na dušik) C-atomima kolin klorida. Protoni hidroksilnih grupa 1,2 propandiola tvore vodikove veze s kolin kloridom (Dai i sur., 2013a). NOESY spektar ($^1\text{H} - ^1\text{H}$ nuklearna spektroskopija) ukazuje na jaku interakciju između protona i hidroksilnih grupa kolin klorida, 1,2 propandiola i vode putem formiranja vodikovih veza. Ovaj primjer sugerira da voda ima važnu ulogu u formiranju supermolekularne strukture NADES-a (Slika 1).



Slika 1. Nastanak vodikovih veza između 1,2 – propandiola, kolin klorida i vode (Dai i sur., 2015)

Različiti omjeri komponenata koje čine prirodna eutektična otapala mogu utjecati na stabilnost mješavine u smislu ostajanja u tekućoj fazi kroz duži vremenski period. U cilju testiranja stabilnosti prirodnih eutektičnih otapala, pripremljene su mješavine s različitim molarnim omjerima komponenata. Primjerice, eutektična smjesa glukoze i kolin klorida u molarnom omjeru 2:5 je stabilna, dok one u omjerima 2:1, 1:1 ili 1:4 tvore prozirnu tekućinu, međutim kroz određeni vremenski period dolazi do kristalizacije. Razlog tomu je što jedan kloridni ion iz kolin klorida može tvoriti dvije vodikove veze sa dvije hidroksilne grupe glukoze (Dai i sur., 2013a).

Dodatak male količine vode u eutektičnu mješavinu rezultira smanjenjem vremena pripreme i temperature, ali i smanjuje njihovu viskoznost. Ekstenzivna razrjeđenja vodom rezultiraju gubitkom postojećih vodikovih veza i posljedično nestankom posebne strukture prirodnih eutektičnih otapala.

2.1.4. Fizikalno – kemijska svojstva NADES-a

Slično kao i kod ionskih tekućina, eutektična otapala se mogu „dizajnirati“ kombinirajući različite kvaternarne amonijeve soli sa različitim donorima vodikovih veza. Stoga se mogu dobiti eutektična otapala s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima (točka tališta, viskoznost, konduktivnost, pH vrijednost) (Dai i sur., 2013a). Istraživana su različita svojstva eutektičnih otapala kao što su gustoća, viskoznost i pH vrijednost. Fizikalno kemijska svojstva pokazuju da se gustoća NADES-a kreće u opsegu od $1.08 - 1,36 \text{ g cm}^{-3}$, a njihova viskoznost između $37 \text{ i } 720 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, što je mnogo više od vode ($1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Viskoznost se dramatično povećava pri niskim temperaturama, ali i ako NADES sadržava mali udio vode. Nekoliko studija ukazuje da su fizikalno – kemijska svojstva stanične citoplazme u stanju anhidrobioze odnosno sušnih uvjeta vrlo slična NADES-ima. U uvjetima anhidrobioze, dolazi do formiranja takozvanog “staklenog” stanja citoplazme. “Stakleno” stanje citoplazme u stanicama pri uvjetima suše posljedica je kompleksa šećera, aminokiselina i soli (Buitink i Leprince, 2004). Viskoznost citoplazme se drastično povećava tijekom uvjeta suše i s vremenom prelazi u takozvano “stakleno” stanje.

2.1.5.1. Gustoća

Gustoća je jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava za otapalo, a definira kao omjer mase i volumena neke tvari. Općenito, gustoća NADES je veća nego gustoća vode, te je usporediva sa ILs čija gustoća varira između $1.08 - 1.36 \text{ g cm}^{-3}$. Na gustoću NADES-a može se utjecati promjenom temperature; povećanje temperature dovodi do veće molekularne aktivnosti i pokretljivosti, a posljedica toga je povećanje molarnog volumena otopine te linearno smanjivanje gustoće (Hayyan i sur., 2012; Hayyan i sur., 2013; Kareem i sur., 2010). Također, na promjenu gustoće NADES utječe i molarni omjer organske soli i donora vodikove veze, kao i njihova kemijska priroda.

2.1.5.2. Viskoznost

Viskoznost je važna karakteristika, ali istovremeno jedna od najvećih prepreka njihove primjene. Prirodna eutektična otapala odlikuju se vrlo visokom viskoznosti ($200-500 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ na $40 \text{ }^\circ\text{C}$) što dovodi do nekih praktičnih problema kao što je dugotrajan prijenos mase u postupcima ekstrakcije (Dai i sur., 2013b). Visoke vrijednosti viskoznosti povezuju se sa jakim intermolekularnim interakcijama (mreža vodikovih veza i Van der Waalove interakcije) između pojedinih komponenata NADES koje neizbježno smanjuju pokretljivost slobodnih molekula unutar NADES (Ruß i König, 2012; Zhang i sur., 2012).

Dodatak vode utječe na viskoznost NADES-a; voda utječe na prisutne vodikove veze koje postupno oslabljuju tj. progresivno pucaju čime se viskoznost eutektičnog otapala smanjuje. No, kada udio vode pređe 50 %, gubi se struktura NADES (povećava se broj slobodnih molekula), te se takvo otapalo više ne može smatrati NADES (Dai i sur., 2015). Primjerice, dodatkom 5% vode u eutektičnu smjesu dobivenu miješanjem kolin klorida i

glukoze viskoznost se smanjuje za 1/3, dok se povišenjem temperature s 20 °C na 40 °C viskoznost spomenute eutektične smjese smanjila za 2/3 od početne vrijednosti.

2.1.5.3. pH vrijednost

pH je mjera kiselosti odnosno bazičnosti vodenih otopina i mijenja se linearno sa promjenom temperature. Osim temperature, na pH može imati jak utjecaj i kemijska priroda donora vodikovih veza (HBD - Hidrogen Bond Donor), pa tako eutektična otapala koja sadrže kolin klorid i šećerne alkohole kao HBD uvijek pokazuju neutralni pH (Maugeri, 2012).

Na sobnoj temperaturi pH NADES koji sadrže šećere (fruktoza, glukoza) kreće se u rasponu od 6,1 do 7,1, no postupno povećanje temperature uzrokuje smanjivanje pH (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013c). Budući da se organske kiseline koriste kao HBD u prirodnim eutektičnim otapalima, dokazano je da takvi NADES imaju osobito niske vrijednosti pH (manje od 3), te kao rezultat toga je njihov negativan učinak na aktivnost stanica zbog toga što uzrokuju denaturaciju proteina (Radošević i sur., 2015), ali zbog svojih kiselih svojstva takvi NADES su poželjniji u ekstrakcijskim procesima (Dai i sur., 2013b).

2.1.5. Funkcija NADES-a u živim organizmima

Eutektična otapala imaju još jedan interesantniji aspekt. Naime, pretpostavlja se da su eutektična otapala treći mediji za odvijanje bioloških reakcija, uz već postojeći vodeni i lipidni medij u organizmima živih bića (Dai i sur., 2013a). Naime, ako su vodeni i lipidni mediji jedini mediji u stanicama bilo bi teško objasniti velik broj bioloških procesa koji se pojavljuju u svim organizmima kao što su primjerice biosinteze metabolita teško topljivih u vodi ili preživljavanje organizama u ekstremnim uvjetima kao što su suše. Sastojci koji tvore prirodna eutektična otapala, a prisutni su u organizmima živih bića, vode do hipoteze da spomenuta otapala igraju važnu fiziološku ulogu kao treći medij u živim stanicama i organizmima.

Tolerancija na sušu, hladnoću ili povišenu koncentraciju soli je u visokoj korelaciji sa prisustvom staničnih metabolita poput šećera (sukroza, trehaloza, rafinoza), aminokiselina (askorbinska kiselina), šećernih alkohola (sorbitol, manitol), glicina, betaina i kolina (Bartels i Sunkar, 2005). Svi navedeni spojevi mogu stvarati prirodna eutektična

otapala, pa se toga sumnja u mogućnost formiranja istih u živim organizmima. U uvjetima suše, biljke poput *Sporobolus staofianus* nakupljaju velike količine glukoze i aminokiselina (Whittaker i sur., 2007). Suprotno tomu, u uvjetima hladnoće, biljke poput *Arabidopsis italiana* nakupljaju veće količine šećera (fruktoza, glukoza, rafinoza), prolin i galaktinol. Posljedica toga je veća sposobnost preživljenja spomenutih biljaka u ekstremnim klimatskim uvjetima.

2.1.6.1. Prirodna eutektična otapala kao krioprotektivna sredstva

Često korišteni krioprotektanti za biljke su šećeri, šećerni alkoholi i prolin. Prolin je bitan za aklimatizaciju biljaka i drugih organizama na hladne klimatske uvijete (Kovács i sur., 2011). Mnogi prirodni spojevi koji mogu stvarati prirodna eutektična otapala su i stanični metaboliti koji su u korelaciji sa sušom, hladnoćom ili tolerancijom na salinitet. To su netoksične molekule koje ne interferiraju s normalnim metabolizmom i uglavnom se akumuliraju u citoplazmi u visokim koncentracijama tijekom stresnih uvijeta kao i za vrijeme osmotskog stresa (Bartels i Sunkar, 2005). Šećeri s drugim komponentama mogu tvoriti „stakleni“ matriks i na taj način sprječavaju makromolekularnu denaturaciju i gubitak integriteta membrane u uvjetima suše.

U slučaju uvjeta ekstremne hladnoće, visoke koncentracije prolina uzrokuju da preostala nesmrznuta voda prijeđe u stanje nalik staklu (tekući kristali) i na taj način sprječava stvaranje kristalića vode koji oštećuju stanicu (Kovács i sur., 2011). Spomenuti metaboliti mogu tvoriti prirodna eutektična otapala u različitim staničnim odjeljcima. Snažno vezanje metabolita putem vodikovih veza temelj je objašnjenja formacije tekućih kristala i zadržavanje određene količine vode kao dio sastava prirodnih eutektičnih otapala. Komponente eutektičnih otapala mogu tvoriti tekuće kristale u vodenom okruženju i na taj način smanjuju sadržaj šećera u vodi što posljedično utječe na osmotski tlak. Takvi tekući kristali mogu otopiti i stabilizirati makromolekule i stanične membrane.

Prirodna eutektična otapala imaju stabilizirajući učinak na staničnu membranu. Jedan od mogućih mehanizama na koji NADES-i stabiliziraju staničnu membranu jest smanjenje lateralne difuzije lipida unutar fosfolipidnog dvosloja u prisutnosti NADES-a. Smatra se da NADES-i stvaraju sloj oko liposoma, što dovodi do povećanja njegove veličine (Dai, 2015).

U slučaju primjene eutektičnog otapala sastavljenog iz sukroze, prolina, glukoze i vode (SPGH) te onog sastavljenog od sukroze, prolina i vode (SPH), dok je u slučaju eutektičnog otapala sastavljenog od sukroze, malične kiseline i vode (SMH), veličina liposoma se smanjila (Dai, 2015).

Zeta potencijal se često koristi za kvantifikaciju električnog naboja fosfolipidnog dvosloja. U slučaju SPGH, SPH zeta potencijal se smanjio, a povećao kod SMH, u usporedbi s fosfatnim puferom. Različiti zeta potencijali potvrđuju interakcije NADES-a s liposomima, ali i ukazuju da su te interakcije drugačije ovisno o tome koji je NADES primjenjen. U slučaju SPGH, šećerne komponente ovog eutektičnog otapala stvaraju vodikove veze sa glavnom skupinom lipida stvarajući film oko liposoma i na taj način povećavaju njegovu veličinu (Crowe i Crowe, 2012). Eutektično otapalo koje sadržava maličnu kiselinu dovodi do smanjenja veličine liposoma, a razlog tomu je negativno nabijena grupa malične kiseline koja stupa u interakcije s pozitivno nabijenim grupama lipida i ovakve interakcije mogu smanjiti veličinu liposoma kao posljedica efekta privlačenja pozitivnih i negativnih kemijskih grupa (Dai, 2015).

Dakle, određeni NADES-i formiraju „zaštitni sloj“ oko liposoma pa se smatra da isti mogu formirati takav sloj i oko staničnih membrana stanica i stabilizirati ih na taj način. Nagada se da takav zaštitni sloj posljedično može imati i pozitivan učinak na samu krioprezervaciju budući da je stanična membrana stanica koje se smrzavaju vrlo važna komponenta u procesu krioprezervacije.

2.2. Krioprezervacija

Krioprezervacija razvila se 50-tih godina prošlog stoljeća, a glavni događaj koji je prethodio njenom razvitku jest otkriće krioprotektanata; glicerol se pokazao efikasan u očuvanju vijabilnosti spermatozoida u uvjetima smrzavanja (Polge i sur., 1949). Ovo područje kriobiologije definira se kao proces prezervacije ili čuvanja biološkog materijala, stanica i tkiva hlađenjem na niskim temperaturama (obično oko - 80°C) te održavanja vijabilnosti nakon naknadnog zagrijavanja na temperaturi iznad 0°C. Tijekom procesa krioprezervacije metabolizam je usporen, a posljedica toga je usporeno propadanje smrznutih stanica ili tkiva.

Smrzavanje je konverzija tekuće vode u kristaliće leda, što rezultira u povećanoj koncentraciji otopljenih tvari u preostaloj tekućoj fazi i precipitaciji onih otopljenih tvari koje su prekoračile njihovu granicu topljivosti. Smrzavanje počinje nakon određenog perioda hlađenja. Tijekom smrzavanja odnosno formiranja ledene kristalne strukture, kristalizacija počinje oko takozvane ledene jezgre, a taj se proces se naziva ledena nukleacija (Denniston i sur., 2000). Ledena nukleacija se može pojaviti u dva oblika; homologna i heterologna nukleacija.

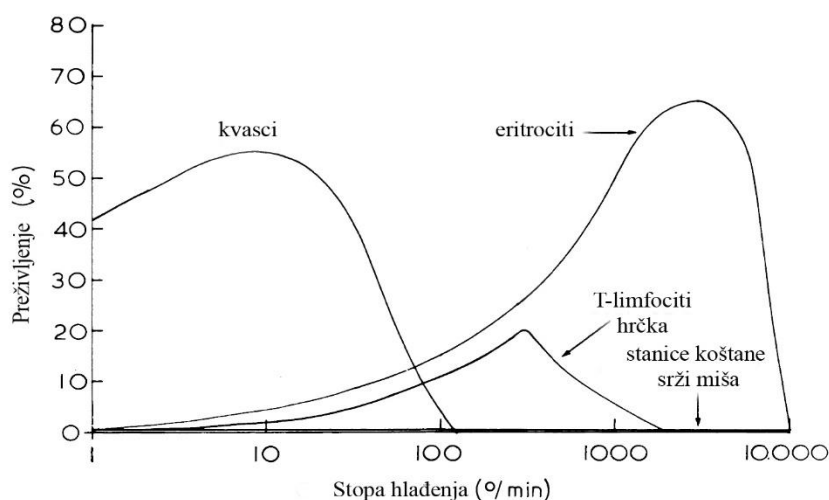
Mehanizmi oštećenja do kojih dolazi tijekom intracelularnog smrzavanja još su uvijek stvar nagađanja. Postoje dvije teorije nastanka oštećenja smrzavanjem; smatra se da oštećenja tijekom smrzavanja mogu nastati kao posljedica formiranja kristala leda koji direktno mehanički oštećuju i narušavaju stanične strukture, ili da su oštećenja posljedica sekundarnih efekata odnosno promjene sastava tekuće faze. Oba mehanizma su važna; njihov relativni doprinos ovisi o tipu stanice, stopi hlađenja i zagrijavanja. Konsenzusom spomenutih mehanizma oštećenja zaključilo se da je intracelularno smrzavanje letalno, dok je ekstracelularno relativno bezopasno (Pegg, 1987). Najčešće korištene krioprezervativne metode su metoda sporog smrzavanja i vitrifikacija.

2.2.1. Metoda sporog hlađenja

Metoda sporog hlađenja poznata je još kao i ravnotežno smrzavanje uslijed izmjene tekućina između ekstracelularnog i intracelularnog prostora i ona rezultira sigurnim smrzavanjem bez ozbiljnih osmotskih i deformacijskih efekata na stanice (Mazur, 1990). Ova tehnika je prihvaćena kao sigurna zbog primjene relativno niske koncentracije krioprotektanta pa posljedično ne uzrokuje ozbiljna toksična i osmotska oštećenja. Međutim, niske koncentracije krioprotektanata mogu biti nedovoljne za izbjegavanje nastajanja kristala leda unutar stanica, a i sama metoda je vremenski zahtjevna s obzirom da se stanice moraju sporo zamrzavati, odnosno stopa hlađenja je visoka. Osim toga, metoda sporog hlađenja zahtjeva i primjenu skupih programiranih uređaja za smrzavanje.

Stope smrzavanja i zagrijavanja imaju vrlo važnu ulogu u preživljenju stanica tijekom smrzavanja. Stopa promjene temperature je važna jer je odgovorna za regulaciju transporta vode kroz staničnu membranu, a indirektno i za mogućnost nastanka

intracelularnih kristala leda što je uglavnom letalno za stanicu (Mazur, 1963). Stopa hlađenja je odgovorna za regulaciju osmolalnosti tekućine koja okružuje stanicu pa je stoga posljedično odgovorna za transport vode iz stanice tijekom hlađenja i transport vode u stanicu tijekom zagrijavanja (Pegg, 1972). Pri optimalnoj stopi hlađenja, stanice brzo mogu povratiti termodinamičku ravnotežu kroz staničnu membranu pri čemu se citoplazma neće ohladiti ispod temperature točke smrzavanja, i svi nastali kristali leda bit će izvan stanice. Međutim, ako je stopa hlađenja prebrza za specifičnu staničnu membranu, premala količina vode bit će transportirana iz stanice, a posljedica toga je da će se citoplazma ohladiti ispod temperature točke smrzavanja što u konačnici dovodi do nastanka intracelularnih kristala leda koji oštećuju stanične strukture što je uglavnom letalno za samu stanicu (Mazur, 1963). U slučaju preniske stope hlađenja, odnosno ako se hlađenje odvija presporo, dolazi do formacije ekstracelularnog leda; gubitak vode je posljedica transmembranskog osmotskog gradijenta koji u konačnici dovodi hipertoničnog stanja stanica. Ako stanice prijeđu određenu razinu hipertoničnosti, nastupaju osmotska oštećenja (Meryman, 1970). Svaka vrsta stanica ima optimalnu stopu hlađenja (slika 2), iako je apsolutno preživljavanje stanica nakon smrzavanja uglavnom vrlo malo, osim ako nije prisutan krioprotektant koji smanjuje oštećenja prisutna kod niskih stopa hlađenja (Pegg, 1972).



Slika 2. Utjecaj stope hlađenja na preživljavanje četiri tipa stanica nakon smrzavanja (Pegg, 1972)

2.2.1.1. Krioprotektanti

Krioprotektanti su supstance koje se dodaju stanicama prije smrzavanja u cilju smanjena oštećenja koja nastaju kao posljedica smrzavanja (Karow, 1969). Izazov uspješne krioprezervacije je mogućnost hlađenja i oporavka stanica od vrlo niskih temperatura (ispod 100°C), a da pritom ne dolazi do promjene metabolizma i strukture stanice nakon izvjesnog vremenskog perioda. Funkcija krioprotektanta u procesu krioprezervacije je smanjenje oštećenja koja nastaju kao posljedica smrzavanja. Visoka koncentracija krioprotektanta uzrokuje osmotsku dehidraciju u izloženih stanica. Ako se primjenjuje penetrirajući krioprotektivni spoj, on prolazi kroz stanicu što rezultira povećanjem volumena same stanice. Krajnja ravnoteža volumena stanice ovisi o koncentraciji nepermeabilnih otopljenih tvari u stanici i izvan nje. Krajnji ravnotežni volumen je jednak normalnom volumenu stanice samo ako je koncentracija otopljenih tvari unutar i izvan stanice jednaka, odnosno ako se stanica nalazi u izotoničnoj otopini (Yang, 2009). Krioprotektant okupira prostor unutar stanice, a posljedica toga je smanjen volumen vode unutar stanice; s obzirom da je udio vode unutar stanice mnogo manji, posljedično nastaje i puno manje intracelularnih kristala leda koji su uglavnom letalni za stanicu.

Krioprotektanti su kategorizirani u dvije velike skupine na temelju njihove mogućnosti prolaska kroz staničnu membranu; razlikujemo penetrirajuće i nepenetrirajuće krioprotektante (UK Essays, 2013). Penetrirajući krioprotektanti mogu difundirati kroz staničnu membranu i stvoriti okolinu za smanjenje sadržaja vode u stanici u cilju smanjenja oštećenja. S obzirom da je sadržaj vode u stanici manji, manja je i mogućnost nastanka intracelularnih kristala leda koji uzrokuju oštećenja staničnih struktura. Osim toga, ovakvi krioprotektanti uzrokuju preraspodjelu membranskih lipida i proteina, što rezultira povećanom membranskom fluidnošću, većom dehidracijom stanice pri nižim temperaturama, a posljedično tomu i veće preživljenje stanica nakon krioprezervacijskog procesa (Holt, 2000). Penetrirajući krioprotektanti su otapala koja otapaju šećere i soli u krioprezervacijskom mediju. Postoji mnogo spojeva koji se definiraju kao penetrirajući krioprotektanti, a najčešće se primjenjuju glicerol, dimetilsulfoksid, propilen glikol i etilen glikol (Karow, 1969). Glicerol je prvi otkriveni i najčešće korišteni krioprotektant koji se široko počeo primjenjivati u kriobiologiji i to uglavnom za krioprezervaciju eritrocita i sperme (Purdy, 2006). Glicerol je mala, polihidroksilirana molekula koja je vrlo topiva u vodi, te pokazuje nisku razinu toksičnosti prema živim stanicama. Međutim, negativna

strana glicerola je sporo difundiranje kroz staničnu membranu, pa se velik broj stanica ili tkiva čini nepropusnim za ovaj krioprotektant (UK Essays, 2013). Dimetil sulfoksid za razliku od glicerola, vrlo brzo difundira kroz većinu staničnih membrana.

Visoke koncentracije krioprotektanata poput dimetil sulfoksida, etilen glikola i dimetilformamida mogu biti toksične za stanice (Meryman, 1970). Mehanizmi toksičnosti krioprotektanata još nisu u potpunosti shvaćeni (Fahy, 1990), ali na temelju empirije može se donjeti nekoliko generaliziranih zaključaka. Lipofilnost je u strogoj korelaciji sa toksičnošću krioprotektanata; molekule s visokim afinitetom za lipide mogu se ugraditi u staničnu membranu i na taj način ih destabilizirati. Osim toga, postoji i korelacija toksičnosti i visoke hidrofilnosti krioprotektanata; smatra se da takvi krioprotektanti odvedu molekule vode s površine makromolekula (npr. proteina), što posljedično utječe na njihovu strukturu, ali i funkciju (Fahy, 1990).

Nepenetrirajući krioprotektanti ne mogu difundirati kroz staničnu membranu, nego oni osmotski istiskuju vodu iz stanica tijekom inicijalnih faza smrzavanja kada su takvi krioprotektanti koncentrirani u ekstracelularnom području (McGann, 1978). Pri vrlo niskim temperaturama, nepenetrirajući krioprotektanti dehidriraju stanicu i omogućuju brzo umjesto sporog hlađenja. Nepenetrirajući krioprotektanti su uglavnom polimeri koji mogu stvarati mnogo vodikovih veza s molekulama vode pri čemu su najčeće primjenjivani polietilen glikol i polivinilpirolidon. Ovakvi krioprotektanti su obično manje toksični od onih penetrirajućih pri istoj koncentraciji.

Osim spomenutih kategorija krioprotektanata, postoje i oni prirodni koje nalazimo kod različitih organizama koji žive u ekstremnim klimatskim uvjetima. Određene otopljene tvari koje mogu djelovati kao prirodni krioprotektanti su metaboliti sintetizirani i akumulirani kao odgovor na stres.



Slika 3. *Nemoura arctica* (Anonymus 1, 2016).

Primjerice, *Nemoura arctica* (slika 3) koja spada u red insekata, akumulira različite potencijalne krioprotektivne spojeve i smatra se da se na taj način adaptira na ekstremne klimatske uvjete. Točnije, u ovakvom insektu pronađene su veće količine niskomolekulskih otopljenih tvari, poput prolina i trehaloze, za koje je prethodno dokazano da direktno stupaju u interakcije s membranskim fosfolipidima te na taj način stabiliziraju lipidni dvosloj tijekom smrzavanja (Walters i sur., 2009).

2.2.2. Vitifikacija

1894. godine kriobiolog Gregory Fahy je prvi predložio vitifikaciju kao alternativni pristup krioprezervaciji. Vitifikacija je metoda koja omogućuje da žive stanice budu ohlađene na kriogene temperature bez nastanka kristala leda unutar i izvan njih. Da bi vitifikacija bila uspješna, otopina koja se smrzava, mora biti vrlo koncentrirana u cilju sprječavanja brzog izlučivanja vode koje je posljedica osmotskog gradijenta izvanstaničnog medija. Koncentracija otopine se povećava dodatkom krioprotektivnih sredstava (Lin i sur., 2009). Druga vrlo bitna stavka u procesu vitifikacije jest brzo hlađenje; s obzirom da ne dolazi do stvaranja kristala leda, hlađenje ne mora biti sporo. Ova metoda pojednostavljuje i često poboljšava krioprezervaciju zbog toga što eliminira mehanička oštećenja koja su posljedica kristala leda, eliminira potrebu za pronalaskom optimalnih stopa hlađenja i zagrijavanja te omogućuje da hlađenje bude dovoljno brzo kako bi se izbjegla oštećenja.

Krioprotektanti koji se koriste u postupku vitifikacije moraju posjedovati specifična svojstva; koriste se penetrirajući krioprotektanti koji prodiru u stanicu te osiguravaju dehidrataciju stanice prije nego što dođe do formiranja intracelularnih kristala leda. U procesu vitifikacije, koristi se visoka koncentracija krioprotektanta zbog čega je otopina vrlo viskozna što dovodi do smanjenja točke smrzavanja. Smanjenje točke smrzavanja onemogućuje da molekule vode poprime kristalnu strukturu, već one poprimaju amorfnu strukturu odnosno dolazi do takozvanog „staklenog“ stanja.

Kao i u slučaju primjene sporo-smrzavajuće metode, metoda vitifikacije također može oštetiti stanice ili tkiva. Primjenom vitifikacijskih metoda, stanice ili tkiva se nalaze u mediju koji ima visoku koncentraciju krioprotektivnih agenasa. Ako je koncentracija dovoljno visoka, vitificirana otopina će poprimiti takozvanu staklenu strukturu i to bez rizika od stvaranja ekstracelularnog i intracelularnog leda tijekom hlađenja ili zagrijavanja,

ovisno o stopama hlađenja ili zagrijavanja. Međutim, vrlo visoke koncentracije krioprotektanata potrebnih za vitrifikaciju mogu uzrokovati oštećenja uslijed naglih osmotskih promjena, ekstremno niskog potencijala vode ili kemijske toksičnosti (Rall, 1987).

Koncentracija krioprotektanata u vitrificiranoj otopini ponekad prelazi i preko 50% pa se stoga krioprotektant se ne može dodati u jednom koraku jer u protivnom nastaju uvjeti u kojima stanica prelazi u ekstremno hipotonično stanje koje može biti letalno za stanicu. Stanice koje se smrzavaju metodom vitrifikacije tretiraju se krioprotektivnim agensom u više koraka pri čemu koncentracija krioprotektanta u svakom koraku eksponencijalno raste. Dodatak krioprotektanta dodaje se pri temperaturi od 0°C kako bi se smanjila toksičnost.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1 Kemikalije

- Destilirana voda, PBF
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Glukoza, Kemika, Zagreb, RH
- Glicerol, Kemika, Zagreb, RH
- Kolin-klorid ($\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Prolin, Kemika, Zagreb, RH

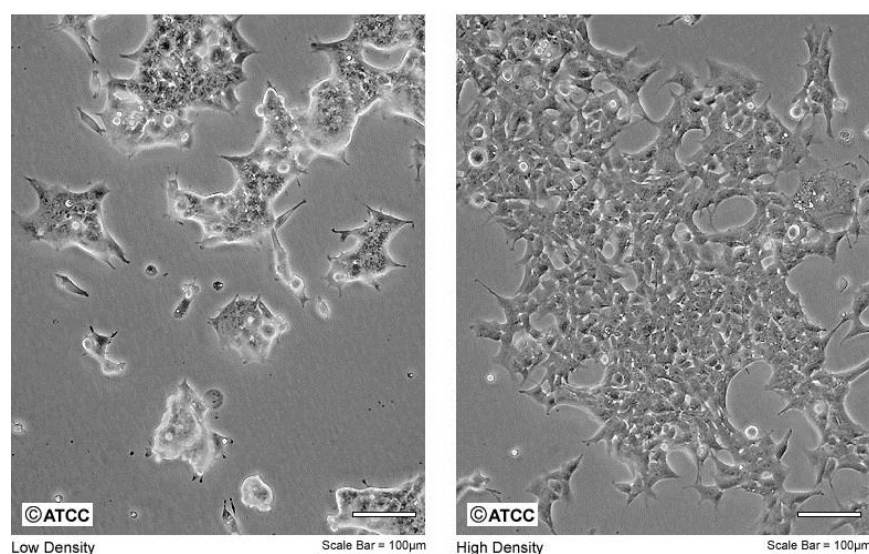
3.1.2. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, ljevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)
- Lakmus papir (pH raspon 0-14), Johnson Test Papers
- Magnetske miješalice s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Neubauerova komorica za brojanje stanica
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.1.2. Humana stanična linija

U ovom radu korištena je humana stanična linija HEK 293T, dobivena iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC).

HEK 293T (slika 4) stanice su izvedene transformacijom humanih embrionalnih stanica bubrega s DNA adenovirusom 5. Ranih 1970-ih godina u Nizozemskoj, Alex Van der Eb kultivirao je staničnu liniju, dok je transformaciju izveo Frank Graham po čijoj metodi dobivaju ime; HEK je skraćeni engleski naziv ove stanične linije (eng. Human Embryonic Kidney), dok 293 predstavlja redni broj eksperimenta koji je bio uspješan odnosno kojim je nastala ova stanična linija. Popularne su zbog brze i jednostavne reprodukcije i održavanja, te mogućnosti transfekcije različitim metodama. Zbog visoke učinkovitosti transfekcije često se koriste u biološkim istraživanjima. Koriste se za proizvodnju egzogenih proteina ili virusa, za farmaceutsku i biomedicinsku namjenu te u raznim istraživanjima.



Slika 4. HEK 293T stanična linija (Anonymous 2, 2016).

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Sve kemikalije za pripravu NADES korištene su bez prethodnog pročišćavanja, a njihova odvaga se provodila na analitičkoj vagi. Za potrebe istraživanja pripravljena su dva prirodna eutektična otapala s različitim udjelima vode: kolin klorid:glukoza (ChCl:Glu) s

molarnim omjerom komponenata 2:1 s udjelom vode od 10% te prolin:glukoza (Pro:Glu) u omjeru 5:3 s udjelom vode od 20%.

Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom u kojoj se pomiješaju čvrste-čvrste ili čvrste-tekuće komponente prirodnog eutektičnog otapala u molarnim omjerima kako je navedeno gore uz različiti udio vode (10% odnosno 20 %). Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj mješalici do 3 sata na temperaturi od 40 do 60 °C uz neprestano miješanje. Reakcija je gotova kada se dobije bistro, tekuće eutektično otapalo.

3.2.2. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HEK 293T staničnim linijama i njihove primjene kao krioprotektanata

Uzgoj staničnih kultura

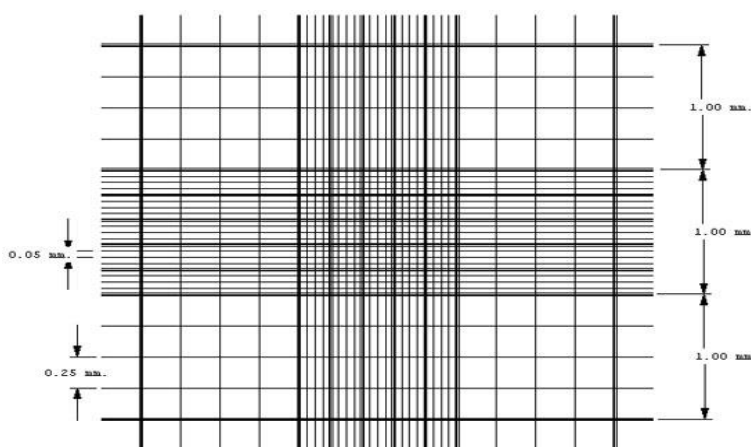
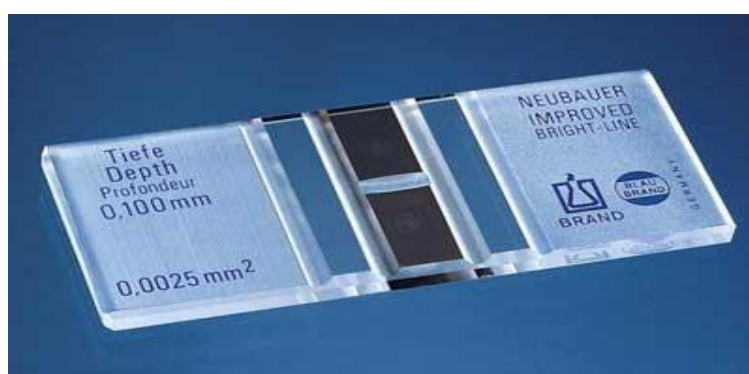
Uzgoj stanica u kulturi ovisi o tipu stanične linije. HEK 293T su adherentne stanice koje ovise o površini za rast tj. stanice će porasti tek kada se prihvate za površinu. Za uzgoj staničnih kultura koristi se kompleksni tekući medij koji mora zadovoljavati potrebe stanica jednako kao u odgovarajućem *in vivo* sustavu. Medij je neophodan za rast i razvoj stanica, a najvažnije komponente medija su glukoza, aminokiseline, anorganske soli i vitamini. Hranjivom mediju najčešće se dodaje i serum sisavaca koji predstavlja izvor hormona, te različitih faktora kao što su faktori rasta, faktori prihvatanja i širenja stanica i druge specifične tvari potrebne za rast stanica u kulturi. Osim hranjivog medija za uzgoj, stanicama je potrebno osigurati i optimalne fizikalno-kemijske uvjete kao što su pH, temperatura, osmolalnost te odgovarajuća atmosfera. Za vrijeme rada u laboratoriju potrebno je održavati aseptične uvjete i koristiti sterilne tehnike rada kako ne bi došlo do kontaminacije kulture stanica.

HEK 293T stanice održavane su u Petrijevim zdjelicama za potrebe umnožavanja biomase i postavljanja pojedinačnih pokusa u mediju DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) uz dodatak 5 % (v/v) serumom FBS (*fetal bovine serum*) te su uzgajane u inkubatoru na 37 °C sa 5 % CO₂ i vlažnoj atmosferi. Stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim mikroskopom pri čemu je praćeno njihovo prihvatanje za podlogu i opće stanje. Stanice su pasažirane svaka 3-4 dana kako bi se održavale u eksponencijalnoj fazi rasta i kako bi se spriječila kontaktna inhibicija.

Određivanje broja stanica metodom tripan- plavo

Boja tripan- plavo omogućuje razlikovanje mrtvih, plavih stanica od živih koje ostaju neobojene. Prvo se ukloni hranjivi medij te se doda ugrijani tripsin koji djeluje tako da odvoji stanice od površine. Reakcija traje oko 4 minute u inkubatoru, a zatim se pod inverznim mikroskopom provjeri da li su se stanice odvojene od podloge. Stanice pričvršćene za površinu su nepravilnog, romboidnog i izduljenog oblika, dok odvojene stanice su pravilnog kružnog oblika. Slijedi dodavanje hranjivog medija sa serumom da se spriječi daljnje djelovanje tripsina i time su stanice resuspendirane te se uzima 20 μL alikvota suspenzije stanica i pomiješa se sa 10 μL boje tripan plavo. 10 μL takve suspenzije nanese se na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Komorica je podjeljena na 4 velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu nalazi se 16 malih kvadratića u kojima se broje stanica (Slika 5). Broj stanica u mL suspenzije izračuna se prema formuli:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{broj stanica izbrojenih u 4 kvadrata} \times 5000$$



Slika 5. Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymous 3, 2016).

Test citotoksičnosti

S obzirom da su HEK 293T stanice adherentnog tipa, prije postavljanja pokusa su tretirane tripsinom kako bi se odvojile od podloge, izbrojan je ukupan broj stanica u Neubaerovoj komorici za brojanje stanica, te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za nacijepeljivanje ploče s 24 jažice. U svaku jažicu nacijepljeno je po 1,8 mL suspenzije stanica u početnoj koncentraciji $4,5 \times 10^6$ stanica mL^{-1} .



Slika 6. Ploča za uzgoj stanica s 24 jažice (Anonymus 4, 2016).

Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i porasle, tj. nakon 24 sata uzgoja, tretirane su s 200 μL (po jažici) ishodnih otopina različitih koncentracija NADES, te su stavljene na inkubaciju na 1h odnosno 48h. Ishodne otopine NADES pripremljene su u deioniziranoj vodi, sterilizirane su filtracijom kroz 0,22 μm filter, te su razrijeđene u mediju za uzgoj stanica kako bi volumni udio NADES-a bio 10%, 5%, 2%, i 0,5%. Eksperimenti su provedeni na HEK 293T staničnoj liniji s dvije paralele za svaku koncentraciju i podaci su izraženi kao prosjek \pm S.D. Postotak preživljenja stanica izražen je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Smrzavanje i odmrzavanje stanica

Prije smrzavanja stanica potrebno je stanice tripsinizirati kako bi se stanice odvojile od podloge, a zatim im je dodan medij u cilju inhibicije tripsina. Suspenzija stanica podjeljena je u četiri falkonice koje se cetrifugiraju na 1000 RPM u vremenu od 3-5 min. Supernatant se baca, a talogu stanica dodaju pripremljeni krioprotektanti i NADES-i; krioprotektanti i NADES-i su pripremljeni na način da su razrijeđeni u mediju za uzgoj

stanica kako bi njihov udio u konačnici bio 10% odnosno 2%. Stanice se resuspendiraju u mediju s dodanim krioprotektantima te se zatim rasporede u ampulice za smrzavanje u volumenu od 0,5 mL. Stanice se nakon toga smrzavaju na temperaturu od -80 °C i tako se mogu čuvati kroz izvjesni vremenski period.

Vijabilnost stanica se provjerava u vremenskom periodu od trideset odnosno devedeset dana. Pri odmrzavanju stanica, stanice se stavljaju u vodenu kupelj na temperaturu od 37°C. Nakon odmrzavanja broje se žive i mrtve stanice u Neubaerovoj komorici za brojanje stanica. Eksperimenti su provedeni na HEK 293T staničnoj liniji s dvije paralele za svaki krioprotektant i NADES u različitim koncentracijama, a podaci su izraženi kao prosjek \pm S.D.

pH vrijednost

pH vrijednosti krioprotektanata i NADES-a koji su korišteni u eksperimentu izmjereni su pomoću lakmus papira koji mjeri pH vrijednost u rasponu od 0 do 14.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripravljena su dva prirodna eutektična otapala (glukoza:prolin, kolin klorid:glukoza) s različitim molarnim omjerima i udjelima vode s ciljem ispitivanja njihove primjene kao krioprotektivnih agenasa. Pripravljena prirodna eutektična otapala korištena su kao krioprotektanti tijekom smrzavanja humanih stanica HEK 293T te je njihova djelotvornost uspoređena sa standardnim krioprotektantima, glicerolom i dimetil sulfoksidom. Vijabilnost stanica se provjerava u vremenskom periodu od trideset odnosno devedeset dana.

Također je proveden i test citotoksičnosti standardnih krioprotektanata i primjenjenih NADES-a u različitim koncentracijama na staničnoj liniji HEK 293T u vremenskom periodu nakon 1h i 48h.

Izmjerene su i pH vrijednosti standardnih krioprotektanata, glicerola i dimetil sulfoksida, te korištenih NADES-a pomoću lakmus papira.

4.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Priprava ispitivanih prirodna eutektična otapala, molarni odnosi komponenata, te različiti udjeli vode prikazani su u tablici 2. Iako dodavanjem male količine vode u NADES doprinosi smanjenju vremena i temperature pripreme, udio vode u pripremljenim NADES ne prelazi 50 %, zbog toga što dodatak vode utječe na prisutne vodikove veze koje s prevelikim dodatkom vode pucaju, što utječe na njihova fizikalno-kemijska svojstva, ali i strukturu NADES koja se gubi jer se povećava broj slobodnih molekula, te se takvo otapalo više ne može smatrati NADES (Dai i sur., 2015).

Priprava većine otapala provodila se na temperaturi od 60 °C. U slučaju ispitivanih otapala, NADES sastavljen od prolina i glukoze s udjelom vode od 20% poprimio je svijetlo smeđu boju zbog oksidacije tj. karmelizacije šećera te se zbog toga njihova priprava provodila na temperaturi od 40 °C, što se slaže sa zapažanjima Hayyan i sur. (2012).

Za pripremu NADES-a sastavljenog od kolin klorida i glukoze primjetno je puno kraće vrijeme pripreme (30 do 45 minuta) u odnosu na ono sastavljeno od prolina i glukoze u čijem je slučaju bilo potrebno oko 3h.

Tablica 2. Pripravljena eutektična otapala korištena u radu

NADES	Molarni omjer	Kratica	Udio vode
Kolin klorid:Glukoza	2:1	ChCl:Glc_10	10%
Prolin:Glukoza	5:3	Pro:Glc_20	20%

Za ovaj eksperiment odabrana su ova dva prirodna eutektična otapala s obzirom na to da mnogi radovi ukazuju da šećeri poput trehaloze i glukoze, ali i prolin imaju ulogu u preživljavanju različitih organizama, od biljaka do životinja, tijekom ekstremnih klimatskih uvijeta (Kovács i sur., 2011).

NADES-i su se ishodišno pripremali s udjelima vode od 10, 30 i 50%, međutim za ovaj eksperiment odabrana su ona s najmanjim udjelom vode. Iako veća količina vode dodana NADES-ima olakšava njihovu pripremu, u primjeni NADES-a kao krioprotektanta može biti kontraproduktivna; ekscesivna količina vode, osim što može narušiti strukturu samih NADES-a (Dai i sur., 2015), može dovesti i do stvaranja kristala leda tijekom smrzavanja što može biti letalno za stanice koje se smrzavaju (Mazur, 1963).

Korišteni NADES-i iznimno su visoke viskoznosti, a razlog tomu je minimalna pridodana količina vode. Povećana viskoznost otopine odnosno samog krioprotektanta tijekom hlađenja inhibira nastajanje kristala leda, uzrokujući malo odstupanje od termodinamičke ravnoteže (Morris i sur., 2006). U slučaju NADES-a sastavljenog od prolina i glukoze, njegova priprema je ishodišno započeta s udjelom vode od 10%, međutim takav NADES je bio ekstremno viskoz i kašast, a u konačnici je došlo i do kristalizacije. Stoga je on pripremljen s udjelom vode od 20%, pri čemu se viskoznost smanjila, te nakon dužeg vremenskog perioda nije došlo do kristalizacije.

4.2. Mjerenje pH vrijednosti

Izmjerene su pH vrijednosti ispitivanih NADES-a i standardnih krioprotektanata. NADES-i i standardni krioprotektanti, glicerol i dimetil sulfoksid, razrijeđeni su s medijem za uzgoj stanične linije HEK 293T kako bi njihov volumni udio bio 10%, 5%, 2% i 0,5%. pH vrijednosti pripremljenih otopina ispitane su pomoću lakmus papira, a rezultati su prikazani u tablici 3. Na sobnoj temperaturi pH NADES-a koji sadrže šećere (glukoza) kreće se u rasponu od 6,1 do 7,1, no postupno povećanje temperature uzrokuje smanjivanje pH (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013c). Niska pH vrijednost NADES-a ima negativan učinak na aktivnost stanica zbog toga što uzrokuju denaturaciju proteina, posebice ako su NADES-i sastavljeni od organskih kiselina (pH vrijednosti manje od 3) (Radošević i sur., 2015).

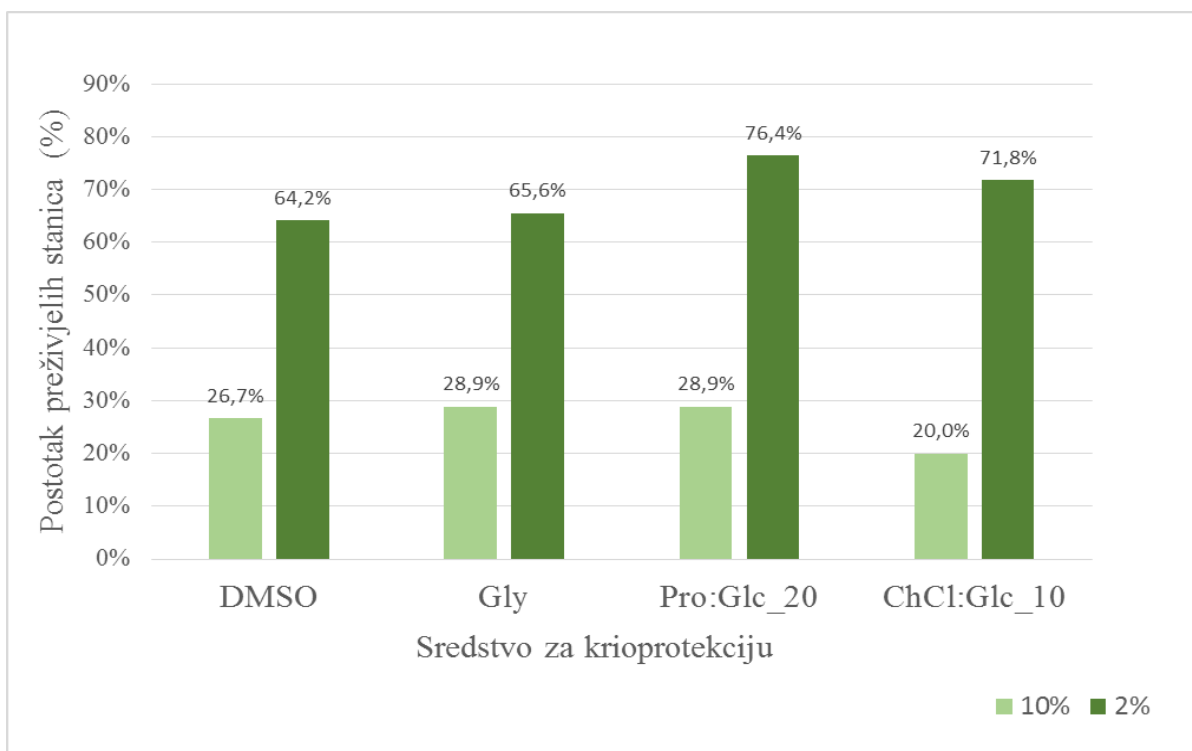
Tablica 3: pH vrijednosti standardnih krioprotektanata i ispitivanih NADES-a

PH VRIJEDNOST				
Udio sredstva za krioprotekciju u mediju za uzgoj	DMSO	Glicerol	Pro:Glc_20	ChCl:Glu_10
10%	7,6	7,7	7,5	7,7
5%	7,6	7,6	7,5	7,6
2%	7,5	7,6	7,4	7,6
0,5%	7,5	7,5	7,4	7,6

pH vrijednosti pripremljenih otopina ispitana na lakmus papiru se nalaze u neutralnom području. pH vrijednosti su neutralne i stoga ne mogu imati negativni učinak na aktivnost stanica odnosno ne dolazi do denaturacije staničnih proteina.

4.3. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala i standardnih krioprotektanata na HEK 293T staničnoj liniji

Prije naciepljivanja ploče s 24 jažice, stanična linija je tripsinizirana, izbrojan je ukupan broj stanica u Neubaerovoj komorici za brojanje stanica, te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za naciepljivanje. U svaku jažicu naciepljeno je po 1,8 mL suspenzije stanica u početnoj koncentraciji $4,5 \times 10^6$ stanica mL^{-1} . Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i porasle, tj. nakon 24 sata uzgoja, tretirane su s 200 μL (po jažici) ishodnih otopina različitih koncentracija NADES, te su stavljene na inkubaciju na 1h odnosno 48h. Eksperimenti su provedeni na HEK 293T staničnoj liniji s dvije paralele za svaku koncentraciju i podaci su izraženi kao prosjek \pm S.D. Preživljavanje stanica izraženo je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, a rezultati su prikazani na slikama 5 i 6.

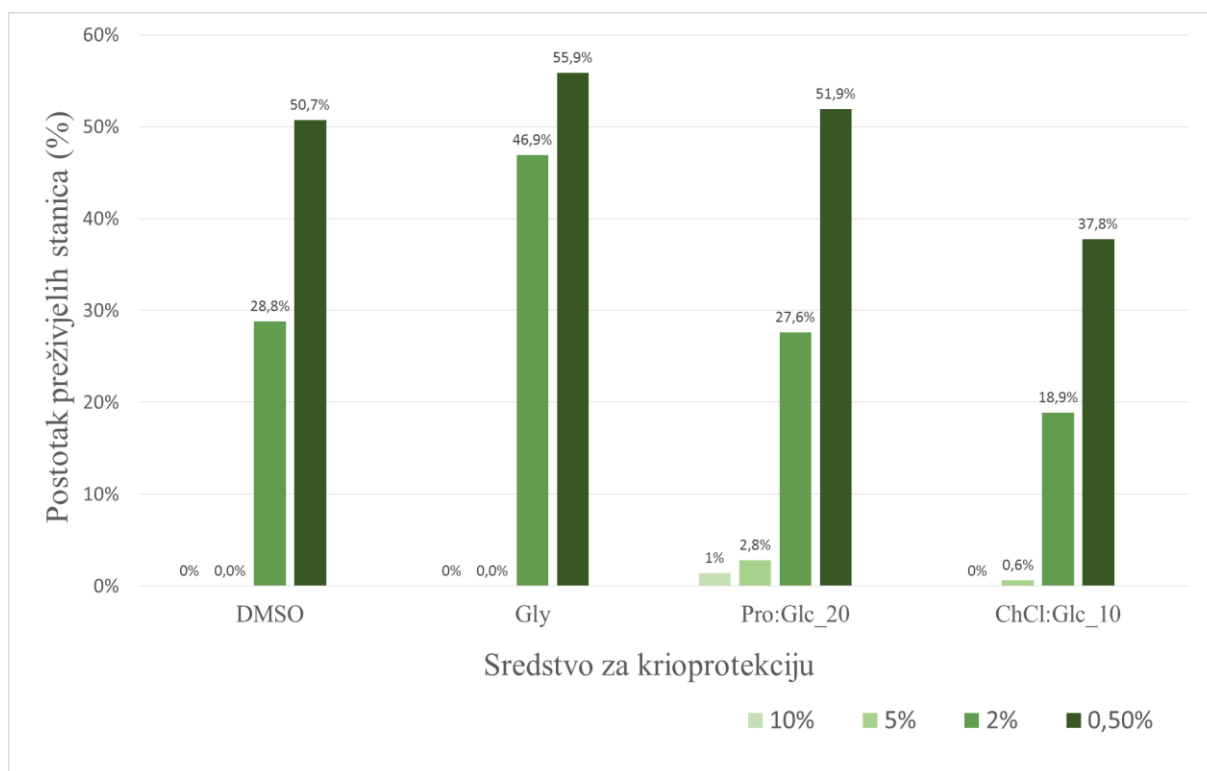


Slika 5: Djelovanje standardnih krioprotektanata, dimetil sulfoksida (DMSO) i glicerola (Gly), te ispitivanih NADES-a, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10 nakon 1h u koncentracijama od 10% i 2% na staničnoj liniji HEK 293T. Postotak preživljenja izražen je u odnosu na netretiranu staničnu kulturu.

1h nakon tretiranja stanične linije HEK 293T standardnim krioprotektantima, glicerolom i dimetil sulfoksidom, te ispitivanim NADES-ima, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10, u udjelima od 10% i 2%, praćeno je preživljavanje stanica te izraženo kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (slika 5).

Pri udjelima od 10% ispitivanih standardnih krioprotektanata i NADES-a, najmanji postotak preživjelih stanica bio je prilikom tretiranja HEK 293T NADES-om sastavljenog od kolin klorida i glukoze s udjelom vode od 10%. Postotak preživjelih stanica tretiranih sa standardnim krioprotektantima s udjelima od 10%, dimetil sulfoksidom (DMSO) i glicerolom, je gotovo jednak i iznosi 26,7% odnosno 28,9%. Postotak preživjelih stanica tretiranih 10% NADES-om sastavljenog od prolina i glukoze, s udjelom vode od 20%, jednak je postotku preživljenja stanica tretiranih standardnim krioprotektantom glicerolom. Pri udjelima od 2% najveći postotak preživjelih stanica je onaj gdje je stanična linija HEK 293T tretirana NADES-om sastavljenim od prolina i glukoze s udjelom vode od 20% i iznosi 76,4%. Postotak preživljenja stanica prilikom tretiranja stanične linije HEK 293T ostalim standardnim krioprotektantima s udjelima od 2% u suspenziji stanica, dimetil sulfoksidom i glicerolom gotovo je jednak i iznosi 64,2% odnosno 65,6%. Postotak preživljenja stanica tretiranih NADES-om sastavljenim od kolin klorida i glukoze s udjelom vode od 10% nešto veći u odnosu na standardne krioprotektante, glicerol i dimetil sulfoksid te iznosi 71,8%.

Ovim eksperimentom pokazano je da ispitivani NADES-i u koncentraciji od 2% u staničnoj suspenziji imaju nešto manji negativni učinak na preživljenje stanica HEK 293T u odnosu na standardne krioprotektante, glicerol i dimetil sulfoksid, dok pri koncentraciji od 10% imaju gotovo jednak toksićni učinak na stanice.



Slika 6: Djelovanje standardnih krioprotektanata, dimetil sulfoksida (DMSO) i glicerola (Gly), te ispitivanih NADES-a, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10 u koncentracijama od 10, 5, 2 i 0,5 % nakon 48h na staničnoj liniji HEK 293T. Postotak preživljenja izražen je u odnosu na netretiranu staničnu kulturu.

48h nakon tretiranja stanične linije HEK 293T standardnim krioprotektantima, glicerolom i dimetil sulfoksidom, te ispitivanim NADES-ima, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10, u udjelima od 10%, 5%, 2% i 0,5%, praćeno je preživljavanje stanica te izraženo kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (slika 6). Pri udjelima od 10% ispitivanih standardnih krioprotektanata i NADES-a, u vremenskom periodu od 48h jedino preživljenje stanica vidljivo je prilikom tretiranja stanične linije HEK 293T NADES-om sastavljenog od prolina i glukoze s udjelom vode od 20%. Također, pri udjelima od 5%, NADES Pro:Glc_20 se pokazao najmanje toksičnim na staničnoj liniji HEK 293T gdje je postotak preživljenja iznosio 2,8%. Drugi ispitivani NADES sastavljen iz kolin klorida i glukoze s udjelom vode od 10%, pokazao je postotak preživljenja stanica od 0,6%. Postotak preživljenja stanica tretiranih standardnim krioprotektantima, DMSO-om i glicerolom, bio je jednak nuli.

Pri udjelima od 2% kroz vremenski period od 48h najmanju citotoksičnost je pokazao glicerol, u odnosu na dimetil sulfoksid i ispitivane NADES-e pri čemu postotak

preživljenja iznosi 46,9%. Odmah iza glicerola slijedi DMSO pri čemu je postotak preživljenja 28,8%. Postotak preživljenja stanica tretiranih NADES-om sastavljenim od prolina i glukoze iznosi 27,6%. Pri udjelu od 2% najveću toksičnost imao je NADES ChCl:Glc_10. Pri udjelima od 0,5%, kao najmanje toksičan ponovo se pokazao glicerol, iza kojeg slijedi NADES Pro:Glc_20.

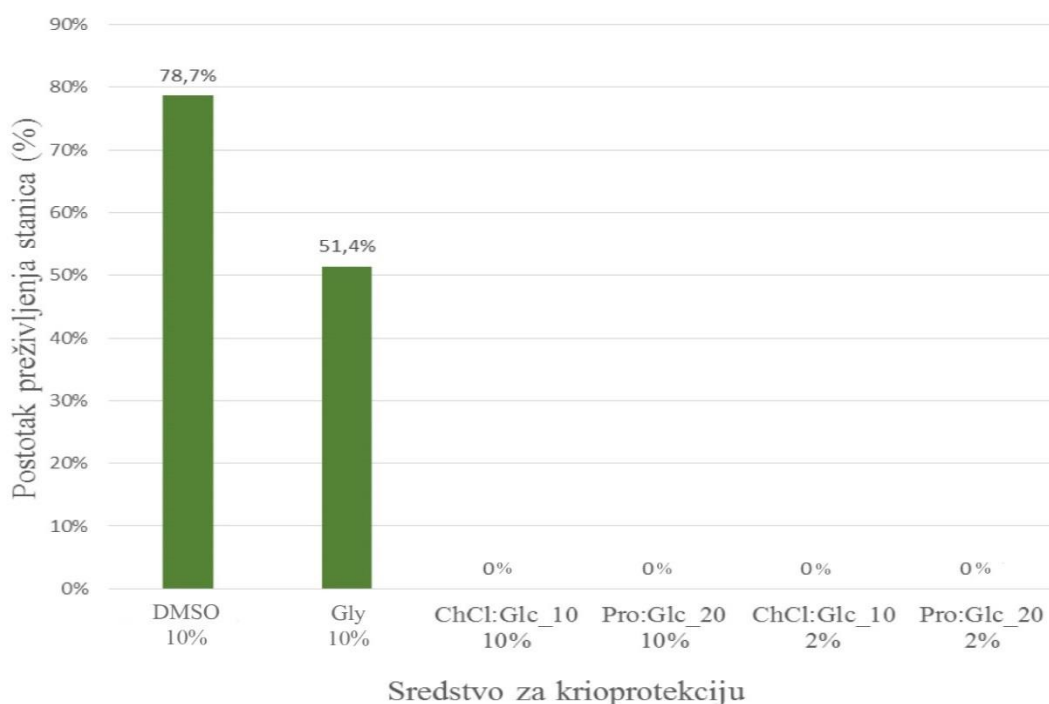
Uspoređujući standardne krioprotektante, glicerol i dimetil sulfoksid, te prirodna eutektična otapala, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10, u različitim koncentracijama (2% i 0,5%), glicerol se pokazao kao najmanje toksičan kroz vremenski period od 48h. Glicerol kao penetrirajući krioprotektant, odmah poslije etilen glikola, pokazuje najmanju toksičnost u odnosu na druge penetrirajuće krioprotektante kao što je to primjerice dimetil sulfoksid. Toksičnost krioprotektanta ovisi o različitim eksperimentalnim uvjetima poput temperature okoline, njihovoj koncentraciji, ali i vremenskim periodu u kojem su stanice izložene krioprotektantima (Liebermann, 2015).

NADES Pro:Gln_20 pokazuje najmanju toksičnost poslije glicerola, dok se NADES sastavljen od kolin klorida i glukoze pokazao najtoksičnijim. Većina komponenta koje tvore eutektična otapala su prirodnog podrijetla, i stoga je pretpostavka da su oni netoksični. Međutim, zbog sinergističkog učinka između komponenta koje tvore eutektična otapala, toksični učinak na stanice može bit veći u odnosu na zasebne komponente (Hayyan i sur., 2013a, 2013b). Mehanizam djelovanja eutektičnih otapala najvjerojatnije je povezan s interakcijama stanične membrane, iako se pretpostavlja da toksičnost eutektičnih otapala baziranih na solima kolina uvelike ovisi i o tipu samih stanica. Najvjerojatniji razlog zašto se NADES ChCl:Glc_10 pokazao kao najtoksičniji na staničnoj liniji HEK 293 je posljedica negativnog sinergističkog učinka komponenti koje tvore ovo prirodno eutektično otapalo.

4.4. Uporaba NADES-a kao sredstva za krioprotekciju stanične linije HEK 293T

Eksperiment zamrzavanja stanične linije HEK 293T zamišljen je na način da se vijabilnost stanica provjerava u vremenskom periodu od jednog odnosno tri mjeseca. Suspenziji stanica prije zamrzavanja dodali su se klasični krioprotektanti, glicerol i dimetil sulfoksid, te ispitivani NADES-i, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10, u koncentracijama od 10% i 2%. Stanice se resuspendiraju u mediju s dodanim krioprotektantima te se zatim rasporede u ampulice za smrzavanje u volumenu od 0,5 mL. Stanice se nakon toga smrzavaju na temperaturu od -80 °C i čuvaju se kroz trideset odnosno devedeset dana.

Pri odmrzavanju stanica, stanice se stavljaju u vodenu kupelj na temperaturu od 37°C. Nakon odmrzavanja broje se žive i mrtve stanice u Neubaerovoj komorici za brojanje stanica. Trideset dana nakon smrzavanja, vijabilnost odmrznute stanične linije HEK 293T prikazana je na slici 7.



Slika 7: Vijabilnost odmrznutih stanica 30 dana nakon, uz primjenjene standardne krioprotektante, glicerol i dimetil sulfoksid, u koncentracijama od 10%, te NADES-e, Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10, u koncentracijama od 10 i 2%.

Trideset dana nakon smrzavanja, stanična linija je odmrznuta te je ispitana vijabilnost stanica. Iz slike 7 je vidljivo da se dimetil sulfoksid (DMSO) pokazao kao najučinkovitiji, a odmah iza njega slijedi glicerol i to u koncentracijama od 10% koja je uobičajena za ove krioprotektante u procesu krioprezervacije. NADES-i Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10 (u koncentracijama od 10 i 2%) koji su testirani kao alternativa klasičnim krioprotektantima, nažalost nisu se pokazali učinkovitima, pa se eksperiment odmrzavanja stanica nakon tri mjeseca nije provodio. Iako su ispitivani NADES-i sastavljeni od komponenti koje se inače koriste u krioprotekciji, u obliku eutektičnih otapala nisu se pokazali efikasnim. Naime, prethodno je dokazano da niskomolekulski spojevi poput prolina i drugih šećera direktno stupaju u interakcije s membranskim fosfolipidima i da na taj način stabiliziraju lipidni dvosloj tijekom smrzavanja (Walters, 2009).

Mogući razlog nedjelovanja ispitivanih NADES-a kao krioprotektanata je nemogućnost odnosno vrlo sporo difundiranje NADES-a kroz staničnu membranu HEK 293T stanica. Ukoliko NADES-i ne mogu difundirati kroz staničnu membranu i stvoriti okolinu za smanjenje sadržaja vode, dolazi do oštećenja stanica kao posljedica formiranja intracelularnih kristala leda. Drugi mogući razlog nedjelovanja ispitivanih NADES-a je neformiranje zaštitnog sloja oko fosfolipidnog dvosloja stanične membrane; Dai i suradnici (2015) smatraju da NADES-i stvaraju sloj oko stanične membrane što djeluje stabilizirajuće na staničnu membranu.

S druge strane, dimetil sulfoksid se pokazao kao najučinkovitiji, a jedan od razloga je brzo difundiranje u stanicu te „istiskivanje“ intracelularne vode pa stoga ne može doći do nastanka intracelularnih kristala leda koji su uglavnom letalni za stanicu. Drugi standardni krioprotektant, glicerol, također se pokazao učinkovitim tijekom smrzavanja HEK 293T stanične linije. Iako je glicerol mala, polihidroksilirana molekula koja je vrlo topiva u vodi, te pokazuje nisku razinu toksičnosti prema živim stanicama njena krioprotektivna efektivnost je manja u odnosu na dimetil sulfoksid. Glicerol je molekulskom masom veći od dimetil sulfoksida pa sporije difundira kroz staničnu membranu te se velik broj stanica ili tkiva čini nepropusnim za ovaj krioprotektant (UK Essays, 2013). To za posljedicu ima stvaranje unutarstaničnih kristala, pa je stoga i njegova učinkovitost u krioprezervaciji manja u odnosu na dimetil sulfoksid.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Primarni metaboliti kao što su glukoza, prolin i kolin klorid u odgovarajućim omjerima i s različitim udjelima vode (10% i 20 %) uspješno tvore stabilne NADES.
2. Ovisno o strukturi NADES-a, njihova fizikalno-kemijska svojstva međusobno se znatno razlikuju. Povećanje udjela vode u NADES uzrokuje smanjivanje vrijednosti gustoće i viskoznosti.
3. pH vrijednost ispitivanih NADES nalazi se u neutralnom području s obzirom na to da u svom sastavu ne sadrže organske kiseline koje obično snižavaju pH vrijednost.
4. Ispitivani NADES-i u vremenskom periodu od 1h u koncentraciji od 2% u staničnoj suspenziji imaju manji negativni učinak na preživljenje stanica HEK 293T u odnosu na standardne krioprotektante, glicerol i dimetil sulfoksid, dok pri koncentraciji od 10% imaju gotovo jednak toksični učinak na stanice.
5. Ispitivani NADES Pro:Glc_20 u vremenskom periodu od 48h u gotovo svim istraživanim koncentracijama (10, 5 i 0.5 %) pokazuje najmanju toksičnost poslije glicerola, dok se NADES sastavljen od kolin klorida i glukoze pokazao najtoksičnijim.
6. Dimetil sulfoksid (DMSO) pokazao se kao najučinkovitiji krioprotektant, a odmah iza njega slijedi glicerol. NADES-i Pro:Glc_20 i ChCl:Glc_10 u koncentracijama od 10% i 2% koji su testirani kao surogat standardnim krioprotektantima nisu se pokazali učinkovitima u krioprotekciji stanica.

6. LITERATURA

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142–9147.

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2001) Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem. Commun.* **19**, 2010-2011.

Anonymous 1 (2016) <<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Nemoura> > Pristupljeno 08. srpnja 2016.

Anonymous 2 (2016) <<http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/E/1/4/7/1820.ashx> > Pristupljeno 16.kolovoza 2016.

Anonymous 3 (2016) < <http://kinesis.co.uk/brand-general-consumables-counting-chamber-blaubrand-neubauer-improved-ivd-w-o-spring-clips-double-rul-bright-line-717810.html> > Pristupljeno 16. kolovoza 2016.

Anonymous 4 (2016) < <http://www.morganvillesci.com/Celltreat-24-Well-Cell-Culture-Plate-Nontreated-100-case-NCP0300.html/> > Pristupljeno 16. kolovoza 2016.

Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. in Plant Sci.* **24**, 1-36.

Buitnik, J., Leprince, O. (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology.* **48**, 215-228.

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* **156**, 1701-1705.

Crowe L.M., Crowe, J.H. (1992) Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv. Space Res.* **12**, 239-247.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe.* **99**, 1–12.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013c), Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural product research: Mixtures of solids as extraction solvents. *J. Nat. Prod.*, **76**, 2162-2173.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **187**, 14-19.

Denniston, R.S., Michelet, S., Godke R.A. (2000) Principles of Cryopreservation. U: Cryopreservation in aquatic species (Tiersch T.R., Mazik P.M., ured.) The World Aquaculture Society, Morgantown, str. 59-74.

Fahy, G. M. (1990) Cryoprotectant Toxicity and Cryoprotectant Toxicity Reduction: In Search of Molecular Mechanisms, *Cryobiology* **27**, 247 – 268.

Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., del Monte F. (2009) Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. *Langmuir* **25**, 5509-5515.

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta* **541**, 70-75.

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., Hashim, M. A. (2013) Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J.Mol. Liq.* **178**, 137-141.

- Holt, W.V. (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. **53**, 47-58.
- Ishiguro, H., Rubinsky B. (1994) Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology* **5**, 483-500.
- Kareem, M. A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2010) Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties. *J. Chem. Eng. Data* **55**, 4632-4637.
- Karow Jr., A.M. (1969) Cryoprotectants – a new class of drugs. *J. Pharm Pharmacol.* **21**, 209–223.
- Kovács, Z., Simon-Sarkadi, L., Sovány, C., Kirsch, K., Galiba, G., & Kocsy, G. (2011) Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat. *Plant Sci* **180**, 61-68.
- Liebermann, J. (2015) Vitrification: A Simple and Successful Method for Cryostorage of Human Blastocysts, *Methods Mol Biol.* **1257**, 305 – 319.
- Lin, C., Zhang, T., Rawson, D. M. (2009) Cryopreservation of Zebrafish (*Danio rerio*) Blastomeres by Controlled Slow Cooling. *Cryoletters*, **30**, 132-141.
- Maugeri, Z., de María, P. D. (2012) Novel choline-chloride-based deep-eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Adv.* **2**, 421–425.
- Mazur, P. (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* **47**, 347–369.
- Mazur, P. (1990) Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* **17**, 53–92.
- McGann, L.E. (1978) Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, **15**, 382–90.

Meryman HT (1970) The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. U: The frozen cell (Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M., ured.) J & A Churchill, London, 51–64.

Morris, G.J., Goodrich, M., Acton, E., Fonseca, F. (2006) The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology* **52**, 323–334.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

Pegg, D. E. (1972) Cryobiology-A Review. U: Advances in Cryogenic Engineering (Timmerhaus, K. D., ured.), Plenum Publishing Corporation, New York, str. 116–136.

Pegg, D.E. (1987) Mechanisms of freezing damage. U:Temperature and animal cells. (Bowler, K., Fuller, B.J., ured.) The Company of Biologists Ltd., Cambridge, str. 363–378.

Polge, C., Smith, A.U, Parks, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature, *Nature* **164**, 666.

Popescu, A. M., Constantin, V.(2014) Synthesis, Characterization and Thermophysical Properties of Three Neoteric Solvents-Ionic Liquids Based on Choline Chloride. *Chem. Res. Chin. Univ.* **30**, 119—124.

Purdy, P.H. (2006) A review on goat sperm cryopreservation, *Small Rum Res* **6**, 215-225.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.

Rall, W.F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **5**, 387-402.

Ruß, C., König, B. (2012) Low melting mixtures in organic synthesis—an alternative to ionic liquids? *Green Chem.* **14**, 2969-2982.

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

UK Essays. November 2013. Penetrating Cryoprotectants Across Cell Membranes Biology Essay. [online]. Available from: <https://www.ukessays.com/essays/biology/penetrating-cryoprotectants-across-cell-membranes-biology-essay.php?cref=1> [Accessed 9 August 2016].

Walters Jr., K.R., Sformo, T., Barnes, B.M., Duman, J.G. (2009) Freeze tolerance in an arctic Alaska stonefly. *J Exp Biol.* **212**, 305-312.

Whittaker, A., Martinelli, T., Farrant, J. M., Bochicchio, A., Vazzana, C. (2007) Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C4 resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. *J. Exp. Bot.* **58**, 3775–3787.

Yang, G., Zhang, A., Xu, L.X. (2009) Experimental study of intracellular ice growth in human umbilical vein endothelial cells. *Cryobiology* **58**, 96–102.

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.

