

Učinci kurkumina na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima

Palić, Dorotea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:531371>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Dorotea Palić, 1188/N

**UČINCI KURKUMINA NA
CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU
POLIKLORIRANIM BIFENILIMA**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za toksikologiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Kmetič te uz pomoć doc. dr. sc. Teute Murati i Marine Miletić, mag. ing.

Ovaj rad izrađen je u okviru potpore istraživanju „Učinci polifenola na citotoksičnost induciranu perzistentnim organskim zagađivačima“ financiranog sredstvima Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivani Kmetič na prihvaćenom mentorstvu, omogućenoj izradi diplomskog rada u Laboratoriju za toksikologiju i prenesenom znanju.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Teuti Murati, a posebice Marini Miletić, mag. ing. na uloženom trudu, vremenu, suradnji, podršci, pomoći pri izradi diplomskog rada i prije svega prenesenom znanju.

Veliko hvala mojim prijateljicama Ivani, Eni i Valentini na bezuvjetnoj podršci i ljubavi. Hvala vam što ste uvijek našle način kako me oraspoložiti i utješiti kada je bilo najgore.

Hvala mojim dragim prijateljicama i kolegicama Tei, Sandri i Anji na svakoj zajedničkoj suzi, osmijehu, padu i prolazu ispita tijekom ovih 6 godina zajedničkog studiranja. Hvala vam što ste ovo iskustvo učinile zabavnijim i što ste znale reći prave riječi u pravome trenutku.

I za kraj, posebna i najveća zahvala ide mojim roditeljima, bratu i mojoj obitelji na podršci, ljubavi i vjeri u mene u trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije. Zbog vas sam ono što jesam.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

UČINCI KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU
POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

Dorotea Palić, 1188/N

Sažetak: U ovom radu ispitan je protektivni učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) pri citotoksičnom djelovanju 75 μM PCB-a 77 ili 75 μM PCB-a 153 na CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanicama metodama *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *Kenacid Blue*. Utvrđeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolne uzorke pri tretmanu CHO-K1 stanica s PCB-em 77 te PCB-em 153 metodama *Trypan Blue* i *Kenacid Blue*. Niti jedna od primijenjenih koncentracija kurkumina (1 - 20 μM) kojima su predinkubirane stanice nije potvrdila početnu hipotezu u o njegovom protektivnom učinku na citotoksičnost induciranu PCB 77. Toksični učinci dioksinu sličnog PCB kongenera u ovoj studiji nisu umanjeni tretmanom različitim koncentracijama kurkumina, čak štoviše, visoke koncentracije kurkumina (10 i 20 μM) dovele su do izraženijeg-sinergističkog učinka na smanjenje vijabilnosti stanica. Pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 153, kurkumin je u pojedinim slučajevima (niže doze) pokazao blagi protektivni učinak na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.

Glavne riječi: kurkumin, PCB 77, PCB 153, citotoksičnost, CHO-K1 stanična linija

Rad sadrži: 60 stranica, 21 slika, 70 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 Kmetič

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Teuta Murati

Marina Miletić, mag. ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Teuta Murati
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 15. srpnja 2020.

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: Nutrition

EFFECTS OF CURCUMIN ON CYTOTOXICITY CAUSED BY POLYCHLORINATED BIPHENYLS

Dorotea Palić, 1188/N

Abstract: In this study, the protective effect of different curcumin concentrations (1 – 20 μM) on cytotoxic activity of 75 μM PCB 77 or 75 μM PCB 153 on CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 cells was determined by *Trypan Blue*, *Neutral Red* and *Kenacid Blue* methods. Statistically significant reduction in cell viability was observed after treatment of CHO-K1 cells with PCB 77 or PCB 153 in comparison to the control samples determined with *Trypan Blue* and *Kenacid Blue* methods. The initial hypothesis based on curcumin protective effect on cytotoxicity induced by PCB 77 has not been confirmed. Toxic effects of dioxin like PCB congener in this study were not reduced by the action of the curcumin, on the contrary – high curcumin concentrations (10 and 20 μM) resulted in more pronounced effects on the reduction of cell viability. Low doses of curcumin showed a mild protective effects on PCB 153 induced reduction in proliferation and viability of CHO-K1 cells.

Keywords: curcumin, PCB 77, PCB 153, cytotoxicity, CHO-K1 cell line

Thesis contains: 60 pages, 21 figures, 70 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) versions 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 Miletić, M.S., Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. *Teuta Murati*, Assistant Professor
2. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate Professor
3. PhD. *Kristina Radošević*, Associate Professor
4. PhD. *Igor Slivac*, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 15th July 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)	3
2.1.1. Izloženost PCB-ima	5
2.1.2. Metabolizam PCB-a	7
2.1.3. Toksičnost PCB-a	8
2.1.4. PCB 77 (3, 3', 4, 4'-tetraklorobifenil).....	10
2.1.5. PCB 153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-heksaklorobifenil).....	12
2.2. KURKUMIN	14
2.2.1. Svojstva i bioraspoloživot kurkumina	15
2.2.2. Kurkumin i poliklorirani bifenili	16
2.3. TESTOVI TOKSIČNOSTI	17
2.3.1. <i>In vivo</i> testovi.....	17
2.3.2. <i>In vitro</i> testovi.....	18
2.4. STANIČNE KULTURE I LINIJE	18
2.4.1. Primarne stanične kulture	19
2.4.2. Stanične kulture u suspenziji i monosloju	19
2.4.3. Stanične linije.....	20
2.4.4. CHO (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) - K1 stanična linija.....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. MATERIJAL	23
3.1.1. Biološki materijal.....	23
3.1.2. Kemikalije	23
3.1.3. Otopine i puferi.....	24
3.1.4. Oprema i uređaji	29
3.2. METODE RADA.....	29
3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi	29
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom Trypan Blue.....	30
3.2.3. Određivanje učinka kurkumina na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.....	31
3.2.4. Određivanje učinka kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica	31
3.2.5. <i>Neutral Red</i> i <i>Kenacid Blue</i> metoda.....	32

3.3. STATISTIČKA OBRADA	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. UČINAK KURKUMINA NA PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA	35
4.2. UČINAK KURKUMINA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-A 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA <i>TRYPAN BLUE</i>, <i>NEUTRAL RED</i> TE <i>KENACID BLUE</i>	38
4.3. UČINAK KURKUMINA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-A 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA <i>TRYPAN BLUE</i>, <i>NEUTRAL RED</i> TE <i>KENACID BLUE</i>	45
5. ZAKLJUČCI.....	51
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Poliklorirani bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*, PCB) pripadaju skupini kemijskih tvari klasificiranih kao perzistentni organski zagađivači (engl. *persistent organic pollutants*, POPs) koji su široko rasprostranjeni u okolišu, a do 1970-ih su se uobičajeno koristili u različitim industrijskim procesima (Dickerson i sur., 2019). Zbog svoje kemijske strukture vrlo su stabilni i otporni na različite procese i metaboličku razgradnju u okolišu (Pessah i sur., 2019).

Postoji 209 različitih PCB kongenera koji se dijele u 12 dioksinu sličnih kongenera (engl. *dioxin like*, DL) i 197 dioksinu ne-sličnih kongenera (engl. *non-dioxin like*, NDL) kojih količinski u okolišu ima mnogo više nego dioksinu sličnih kongenera (Dickerson i sur., 2019). Unatoč zabrani upotrebe 1980-ih godina, velike količine PCB-a zaostale u kontaminiranim materijalima i dalje se mogu naći u okolišu te se PCB još uvijek koriste kao dio boja, brtvila i plastičnih masa pa se i na taj način mogu otpustiti u okoliš (Williams i sur., 2020).

PCB se mogu naći u tlu, vodenim površinama te atmosferi u koju dospjevaju isparavanjem tla i vodenih površina, a najvećim se dijelom prenose zrakom. Ljudi su PCB-ima izloženi primarno putem kontaminirane hrane i zraka, a određene koncentracije pojedinih PCB-a uočene su u krvi, majčinom mlijeku te ostalim tkivima, dok se najviše PCB-a akumulira u masnom tkivu zbog izražene lipofilnosti. Glavni prehrambeni izvori PCB-a su masna riba, meso te mliječni proizvodi (ATSDR, 2000).

U organizmu čovjeka, PCB se mogu apsorbirati dermalnim putem, gastrointestinalnim putem te putem respiratornog sustava (EFSA, 2005). Uneseni i apsorbirani u organizam, PCB podliježu reakcijama biotransformacija koje se odvijaju primarno u jetri. Ovdje dolazi do hidroksilacije i konjugacije PCB-a s glukuronskom kiselinom i sulfatima (Tehrani i Van Aken, 2014). Glavni putevi eliminacije PCB-a i njihovih metabolita su putem fecesa, urina i majčinog mlijeka (Reddy i sur., 2019).

Prema IARC-u (engl. *International Agency of Research on Cancer*) klasificirani su kao karcinogeni za ljude (IARC, 2016). Toksičnost svakog od 209 kongenera ovisi o broju i položaju klorovih atoma u osnovnoj strukturi PCB-a (Ghavami i Sajadi, 2010). Brojne studije potvrđuju toksičnost različitih PCB kongenera. PCB djeluju toksično na živčani, imunološki i reproduktivni sustav, imaju imunosupresivno djelovanje, povećavaju rizik od razvoja raka te mogu oponašati

djelovanje endogenih hormona i na taj način remetiti njihove uobičajene funkcije (Kmetič i sur., 2012).

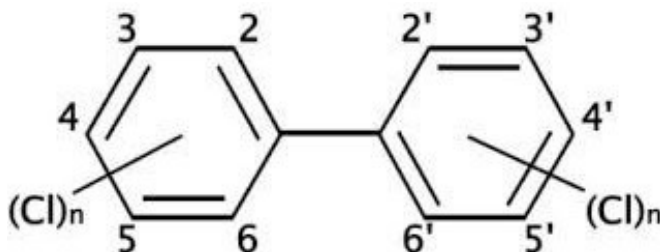
U ovom radu odrediti će se potencijalno protektivni učinak kurkumina na citotoksičnost uzrokovanu dvama PCB kongenerima: planarnim PCB-em 77 te neplanarnim PCB-em 153 na CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanice. Citotoksični učinci pokušat će se umanjiti inkubacijom stanica s odabranim koncentracijama kurkumina (1 – 20 μM) 24 sata prije tretmana 75 μM PCB-em 77, odnosno PCB-em 153. Kurkumin ima snažno protuupalno djelovanje (Akram i sur., 2010), a zbog svoje polifenolne strukture djeluje kao vrlo dobar antioksidans (Trujillo i sur., 2013). Zbog tih svojstava, moguće je da ima protektivno djelovanje na stanice i procese u njima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)

Poliklorirani bifenili (PCB) zajedno s organoklornim pesticidima te ostalim kloriranim ili bromiranim aromatima čine grupu spojeva poznatih kao perzistentni organski zagađivači (POPs) (Herceg Romanić, 2002).

PCB su skupina sintetičkih organskih kemijskih spojeva u kojima su na strukturu od dva povezana benzenska prstena (bifenila) vezani jedan do deset atoma klora (Ghavami i Sajadi, 2010). Strukturna formula PCB-a prikazana je na Slici 1. Opća kemijska formula PCB-a glasi $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, gdje n predstavlja broj atoma klora. Supstituirani atomi klora mogu se nalaziti u *ortho* (2, 2', 6, 6'), *meta* (3, 3', 5, 5') i *para* položaju (4, 4') (Kmetič i sur., 2012). Moguće je sintetizirati 209 različitih kongenera podijeljenih u 10 homolognih skupina, a stupanj klorinacije iznosi od 19 do 69 % (Ghavami i Sajadi, 2010). Svih 209 kongenera dijele istu osnovnu strukturu, a razlikuju se u broju klorovih atoma te njihovom položaju na benzenskim prstenima (Williams i sur., 2020). Benzenski prsteni mogu rotirati oko veze koja ih spaja tvoreći jednu od dviju mogućih krajnjih konfiguracija – planarnu, gdje se prsteni nalaze u istoj ravnini i neplanarnu konfiguraciju u kojoj se prsteni nalaze pod kutem od 90° . Stupanj planarnosti uvelike ovisi o broju vodikovih atoma u *ortho* položaju, čijom supstitucijom s većim atomima klora, dolazi do rotacije benzenskog prstena i gubitka planarne konfiguracije (ATSDR, 2000).



Slika 1. Kemijska struktura PCB-a (ATSDR, 2000)

S obzirom na konfiguraciju, dijele se na dioksinu slične kongenere (DL) koji imaju planarnu konfiguraciju i na one neplanarne koji nisu slični dioksinu (NDL). Postoji dvanaest dioksinu sličnih PCB kongenera koji pokazuju toksičnost sličnu jednom od najtoksičnijih dioksina - TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-diokin) (Reddy i sur., 2019).

Dioksinu slični PCB, koji se smatraju najtoksičnijim i endokrino modulirajućim kongenerima, vežu se za Ah (engl. *aryl hydrocarbon*) receptor i aktiviraju enzim citokrom P-450 monooksigenazu. Također, i PCB kongeneri koji nisu slični dioksinu, pokazuju brojne toksične učinke, neovisno o Ah receptoru. Takvi kongeneri koji imaju dva ili tri vezana klorova atoma, pokazuju najveću neurotoksičnost. Oni sa četiri klorova atoma i smjese manje kloriranih kongenera uzrokuju veći poremećaj homeostaze štitne žlijezde u odnosu na visoko klorirane kongenere (Williams i sur., 2020).

PCB su hidrofobni i teško hlapljivi, otporni su na kiseline, baze i degradacijske procese u okolišu te kao takvi imaju veliku tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu kao i u hranidbenom lancu (Ghavami i Sajadi, 2010; Kmetič i sur., 2012). Relativno su netopljivi u vodi, a topljivost se smanjuje većim stupnjem klorinacije (ATSDR, 2000). Dobri su električni izolatori s visokom toplinskom vodljivošću i niskom zapaljivošću pa su otporni i na termičku razgradnju. Koriste se kao organski razrjeđivači, plastifikatori, dodaci pesticidima, bojama, lubrikantima i slično (Ghavami i Sajadi, 2010).

PCB u tijelu podliježu reakcijama biotransformacija gdje nastaju različiti metaboliti, neki štetniji i od izvornog oblika unesenog PCB-a. Izlučuju se putem fecesa ili urina ili se zadržavaju u masnom tkivu (ATSDR, 2000).

Unatoč zabrani upotrebe 1980-ih, ogromne se količine PCB-a i dalje mogu naći u kontaminiranim materijalima na odlagalištima otpada ili u skladištima materijala koji sadrže PCB. Tako još uvijek dopijevaju u morsko okružje te se koriste u pojedinim proizvodima poput boja i brtvila pri čemu zaostaju u okolišu. Prisutni su diljem svijeta na kopnenim i morskim područjima te se pojavljuju u prehrambenom lancu kao kompleksna smjesa spojeva (Williams i sur., 2020).

2.1.1. Izloženost PCB-ima

Prisutnost PCB-a u okolišu nije prepoznata sve do 1966. godine kada ih je Jensen identificirao u tkivima čovjeka i divljih životinja (WHO, 2000). Masovna proizvodnja PCB-a započela je kasnih 1920-ih sve dok njihova komercijalna proizvodnja nije zabranjena u Sjedinjenim Američkim Državama 1979. godine zbog sve većeg broja zabilježenih slučajeva trovanja te brige za utjecaj na zdravlje ljudi. Komercijalna proizvodnja PCB-a uključivala je klorinaciju bifenila plinovitim klorom uz prisutnost katalizatora, pri čemu je nastala kompleksna smjesa niza PCB-a umjesto samo jednog kongenera, a takve su se smjese prodavale pod raznim imenima poput *Aroclor* u SAD-u, *Kanechlor* u Japanu te *Chlophen* u Njemačkoj (Grimm i sur., 2015). Glavni izvori otpuštanja PCB-a u okoliš bili su otvoreni sustavi te slučajna ili namjerna otpuštanja iz zatvorenih sustava. Danas je upotreba u zatvorenim prostorima zabranjena (Kmetič i sur., 2012).

Izloženost PCB-u u zatvorenim prostorima od posebne je važnosti u školama i drugim objektima izgrađenima 1950-ih i 1960-ih godina. Tijekom tog perioda, brtvila i ostali građevinski materijali sadržavali su visoke koncentracije PCB-a i kao takvi predstavljaju značajan izvor kronične respiratorne izloženosti. Jedna od studija pokazala je značajnu korelaciju između izloženosti PCB-ima i povećane koncentracije PCB-a u krvi profesora koji su radili u kontaminiranim zgradama (Grimm i sur., 2015). Ljudi koji žive u blizini odlagališta opasnog otpada gdje su otkriveni PCB primarno su izloženi udisanjem zraka koji sadrži PCB-e ili konzumacijom kontaminirane ribe iz voda u blizini odlagališta. Djeca koja se igraju ili odrasli koji rade u blizini takvih mjesta mogu biti izloženi dodatnim PCB-ima dermalnim kontaktom s kontaminiranom zemljom i unosom iste prljavim rukama (ATSDR, 2000). U Republici Hrvatskoj rizik od PCB-a i dalje je prisutan zbog vojnih razaranja tijekom Domovinskog rata (1991.-1995.) u kojima su oštećeni ili uništeni mnogi industrijski i elektroenergetski objekti iz kojih je došlo do istjecanja PCB-a (Kmetič i sur., 2012).

Široka komercijalna i industrijska primjena PCB-a zajedno s neprimjerenim odlaganjem istih, dovela je do ozbiljnog zagađenja okoliša. PCB iz električnih dijelova industrijskih pogona, poput transformatora, uz ostale PCB-e s odlagališta otpada, otpuštaju se u atmosferu budući da odlagališta nemaju rješenje za upravljanje takvim štetnim otpadom. Otprilike je trećina proizvedenog PCB-a u Sjedinjenim Američkim Državama otpuštena u okoliš, a zagađenje se

povećava sve većim brojem starih električnih uređaja na odlagalištima. U okoliš mogu dospjeti isparavanjem boja i premaza te iz plastike, istjecanjem u kanalizacije i potoke te bacanjem u oceane. Bez obzira na zakonsku regulativu, PCB se i dalje ilegalno odlažu na mjestima koja nisu za to predviđena. U vodama oko industrijskih područja, koncentracija PCB-a veća je i do 100 puta u odnosu na kopnene površine. Koncentracija PCB-a u atmosferi korelira s veličinom populacije, odnosno u naseljenim su područjima uočene veće koncentracije PCB-a u odnosu na ruralna područja (Reddy i sur., 2019).

PCB se mogu pronaći u atmosferi, vodenim površinama te tlu, a najvećim se dijelom prenose zrakom. U atmosferu dopijevaju isparavanjem tla i vodenih površina. Bifenili s jednim do dva supstituirana atoma klora zadržavaju se u atmosferi, oni s jednim do četiri migriraju do polarnih područja ciklusima isparavanja i taloženja, dok oni s osam do devet atoma klora zaostaju vrlo blizu izvora zagađenja. U vodi se PCB prenose procesom difuzije te djelovanjem struja, dok oni u tlu nemaju tendenciju migriranja u podzemne vode, budući da su čvrsto vezani za čestice tla (ATSDR, 2000).

Glavni transformacijski proces PCB-a u atmosferi je reakcija s hidroksilnim radikalima, dok se fotoliza kao abiotička razgradnja odvija u vodi, a u tlu i sedimentnim područjima prevladavaju biodegradacijski procesi u aerobnim i anaerobnim uvjetima (ATSDR, 2000). Razgradnja PCB-a najčešće se javlja uslijed djelovanja sunčeve svjetlosti i mikroorganizama, a u atmosferi, PCB reagiraju s vodom i ozonom u prisutnosti sunčeve svjetlosti (Reddy i sur., 2019). Teoretsko vrijeme poluraspada PCB-a u atmosferi kao posljedica fotolize iznosi od 3 do 120 dana, odnosno u vremenskom okviru od nekoliko tjedana dok se u vodi i tlu zadržavaju puno dulje, čak i do nekoliko godina (Sinkkonen i Paasivirta, 2000). Stupanj razgradnje ovisi o položaju i broju klorovih atoma, koncentraciji PCB-a, prirodi mikroorganizama, dostupnim nutrijentima te temperaturi (Reddy i sur., 2019).

Ljudi su PCB-ima izloženi primarno putem kontaminirane hrane i zraka, a određene koncentracije PCB-a uočene su u krvi, masnom tkivu, majčinom mlijeku i ostalim tkivima (ATSDR, 2000). Hrana se može kontaminirati jednim od triju glavnih puteva kontaminacije (i) prijenosom PCB-a iz okoliša na usjeve, stoku, ribu i perad, (ii) kontaminacijom stočne hrane, (iii) direktnom kontaminacijom (IARC, 2016). Glavni prehrambeni izvori PCB-a su riba, meso te mliječni proizvodi (ATSDR, 2000). Europska komisija je 2002. godine donijela niz mjera kako bi

se smanjila prisutnost dioksina i PCB-a u hrani i hrani za životinje. EFSA (engl. *European Food Safety Authority*) je provela procjenu kontaminacije hrane PCB-ima, pri čemu je analizirano 12 563 uzoraka hrane i hrane za životinje u 18 zemalja članica Europske unije, Norveškoj i Islandu u razdoblju od 1995. – 2008. godine. Analizirano je šest kongenera PCB-a: 28, 52, 101, 180 te kongeneri 138 i 153 koji su se pokazali najzastupljenijima. Najviši stupanj kontaminacije uočen je u ribi i proizvodima od ribe, a zatim su slijedila jaja, mlijeko i mliječni proizvodi te meso i mesne prerađevine, dok je najmanja kontaminacija uočena u namirnicama biljnog podrijetla (EFSA, 2010). Glavni doprinos ukupnoj izloženosti PCB-a u Europi jesu mlijeko i mliječni proizvodi za većinu novorođenčadi i male djece te riba i morski plodovi za adolescente, odrasle i stariju populaciju. Više od 90 % izloženosti PCB-ima u Europi je putem hrane, posebice ribe, a prosječni dnevni unos smjese šest kongenera PCB-a iznosi 10 – 45 ng kg⁻¹ tjelesne mase za odraslu populaciju, dok su te koncentracije za djecu do 2,5 puta veće (IARC, 2016).

Skupine najizloženije PCB-u su pojedinci koji konzumiraju velike količine kontaminirane hrane poput ribe, novorođenčad koja se hrani pretežito majčinim mlijekom, osobe koje rade s PCB-ima ili materijalima koji ga sadrže te osobe koje žive ili rade u zgradama kontaminiranim PCB-ima (WHO, 2000).

2.1.2. Metabolizam PCB-a

PCB se u organizam mogu apsorbirati oralno (putem gastrointestinalnog trakta), dermalno te putem dišnog sustava, odnosno udisanjem (EFSA, 2005).

Raspodjela PCB-a ovisi o strukturi i fizikalno-kemijskim svojstvima kongenera te o dozi u kojoj je prisutan u organizmu (Kmetič i sur, 2012). U ljudi, PCB su u najvišim koncentracijama pronađeni u masnom tkivu. Zbog visokog udjela masti, majčino mlijeko može akumulirati velike količine PCB-a koje se mogu prenijeti na dijete tijekom dojenja, a mogu se prenijeti i tijekom trudnoće, budući da prolaze placentalnu barijeru (ATSDR, 2000).

PCB koji se nakupljaju u okolišu podložni su različitim procesima, uključujući i razgradnju posredovanu enzimima. Mehanizam i kinetika biotransformacija PCB-a ovisi o brojnim faktorima poput metaboličkog kapaciteta organizama te strukture samih kongenera, a rezultat biotransformacijskih reakcija su dva moguća metabolita: hidroksilirani ili metil sulfonirani PCB.

U nekim vrstama i tkivima koncentracija ovih metabolita može biti vrlo slična ili viša u odnosu na koncentraciju izvornog PCB-a (Maervoet i sur., 2004).

Primarno mjesto biotransformacije PCB-a je jetra gdje dolazi do hidroksilacije i konjugacije s glukuronskom kiselinom i sulfatima (Tehrani i Van Aken, 2014). Prvi korak je oksidacija posredovana citokrom P-450 enzimskim sustavom pri čemu dolazi do direktnog umetanja -OH skupine ili tvorbe aren oksida, reaktivnih intermedijera koji se dalje mogu metabolizirati u fenole, dihidrodiole te konjugate glutaciona ili u potencijalno toksične spojeve (WHO, 2000). Nakon prve faze, nastali hidroksilirani PCB mogu dalje konjugirati s glukuronskom kiselinom i sulfatima, a nastali su konjugati topljiviji i podložniji bržem izlučivanju iz organizma (Tehrani i Van Aken, 2014).

Hidroksilirani produkti su glavni metaboliti koji nastaju hidroksilacijom primarno na *para* i *meta* položaju gdje nema atoma klora. Mogu inhibirati sulfotransferaze i na taj način povećati količinu slobodnih estrogena u organizmu (La Rocca i Mantovani, 2006). Hidroksilirani i metil sulfonirani PCB potencijalno se akumuliraju u tkivima poput pluća te u fetusu (WHO, 2000). Glavni putevi eliminacije iz organizma jesu putem fecesa, urina i majčinog mlijeka (Reddy i sur., 2019).

2.1.3. Toksičnost PCB-a

PCB su prema IARC-u klasificirani kao karcinogeni za ljude (kategorija 1) (IARC, 2016). Zbog velikog broja kongenera, PCB su podijeljeni u nekoliko skupina za procjenu toksikološkog rizika: skupina 1 (estrogenog učinka: PCB-44, 49, 52, 101, 174, 177, 187, 201), skupina 2 (dioksinu slični PCB, PCB-126, anti-estrogenog učinka, imunotoksični te CYP1A enzim-inducirajući PCB) i skupina 3 (vrlo perzistentni u organizmu, CYP1A1 i CYP2B enzim-inducirajući PCB, PCB-99, 153, 180, 183, 196, 203) (La Rocca i Mantovani, 2006).

Štetni učinci na zdravlje zabilježeni su u štakora, majmuna, miševa i ostalih sisavaca nakon akutne, subkronične i kronične izloženosti PCB-ima. Uočeni su učinci na jetru, imunološki sustav, kožu te reproduktivni sustav, a uočen je i utjecaj na indukciju edema i tumora (WHO, 2000).

Toksičnost PCB-a ovisi o stupnju klorinacije i položaju atoma klora u strukturi. PCB bez klorovih atoma u *ortho* položaju, a popunjenim *para* položajima (4 i 4') i najmanje jednim klorom

na *meta* položaju mogu postići relativno planaran položaj te inducirati dioksinu-sličnu toksičnost (Ghavami i Sajadi, 2010).

Allen i Norback su 1976. godine proveli istraživanje utjecaja smjese PCB-a (*Aroclor* 1248) na organizam majmuna tijekom dva mjeseca u dnevnim dozama od 1,3 mg kg⁻¹ i otkrili razvoj gastritisa uz hipertrofiju i hiperplaziju želučane sluznice.

Istraživanje koje su proveli Treon i suradnici 1956. godine pokazalo je razvoj lezija na jetri štakora, miševa, zečeva te zamoraca tijekom 150 dana nakon ekspozicije *Aroclor*-u 1254 u dozama od 1,5 mg m⁻³, 7 sati dnevno. Što se tiče utjecaja PCB-a na čovjeka, nema jasnih poveznica o štetnosti na jetru.

Studije na glodavcima i primatima, ovisno o dozi i trajanju, pokazuju značajan učinak na hormone štitnjače poput histoloških promjena i promjena lučenja hormona, smanjenje razine T₄ i T₃ hormona u serumu, smanjenje aktivnosti jodotironin sulfotransferaze i ostalih endokrinih funkcija (ATSDR, 2000). *In vitro* studije pokazuju vezanje PCB-a na transtiretin, transportni protein tiroksina te utjecaj na metabolizirajuće enzime hormona štitnjače pronađenih u mozgu i jetri (Crinnion, 2011).

Mnogi PCB mogu imitirati djelovanje spolnih hormona pa mogu djelovati kao potencijalni endokrini modulatori koji povećavaju rizik od karcinogeneze i reproduktivnih poremećaja. Vežu se na estrogene i androgene receptore i utječu na fiziologiju spolnih hormona. *In vivo* i *in vitro* studije pokazale su kako pojedini PCB, njihovi metaboliti i smjese mogu oponašati biološko djelovanje endogenih hormona poput estrogena te izazvati promjene poput prijevremenog puberteta i poremećenog rada maternice (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2001).

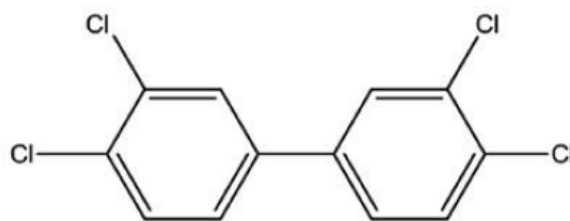
In vitro studije sugeriraju da PCB potencijalno induciraju apoptozu monocita i timocita što rezultira manjim brojem bijelih krvnih zrnaca, smanjuju dostupnost superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) i uzrokuju pro-oksidativno stanje s manjim brojem neutrofilnih krvnih zrnaca što utječe na smanjenu staničnu imunost (Crinnion, 2011). Imunološke promjene uzrokovane PCB-ima uključuju infekcije dišnog sustava u odraslih i djece te smanjenu razinu antitijela IgA i IgM, a najosjetljivija je novorođenčad izložena *in utero* i/ili dojenjem. U životinja je uočena atrofija slezene i timusa, smanjena proizvodnja antitijela te veća podložnost infekcijama (ATSDR, 2000).

Zbog svog lipofilnog karaktera, PCB se u značajnoj količini mogu naći u majčinom mlijeku te mogu proći placentalnu barijeru i tako uzrokovati dugoročna neurološka oštećenja fetusa/djeteta (ATSDR, 2000). Istraživanje provedeno na djeci pogođenoj Yu-Cheng tragedijom pokazalo je nižu inteligenciju, veći broj poremećaja u ponašanju te smanjenu psihomotornu funkciju (WHO, 2003).

Izloženost visokim dozama PCB-a može imati štetne učinke na reproduktivni sustav čovjeka, uključujući povećani rizik od raka testisa i smanjenu plodnost u muškaraca te poremećaje menstrualnog ciklusa, spontane pobačaje i nemogućnost začeća u žena (Toft, 2014). Gerhard i suradnici (1998) uočili su porast koncentracije PCB-a u krvi u odnosu na referentnu vrijednost u 22 % slučajeva u studiji na 89 žena koje su imale učestale pobačaje (Gerhard i sur., 1998). Aulerich i Ringer su 1977. godine proveli istraživanje utjecaja *Aroclor*-a 1254 na vidrama tijekom 39 tjedana. Dnevne doze od $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ rezultirale su skotnošću 2 od 7 parenih ženki te rođenjem 2 mladunca, od kojih je jedno rođeno mrtvo (Aulerich i Ringer, 1977).

2.1.4. PCB 77 (3, 3', 4, 4'-tetraklorobifenil)

PCB 77 (3, 3', 4, 4'-tetraklorobifenil) ima planarnu konfiguraciju sličnu 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksinu (TCDD) koja mu omogućava vezanje na Ah receptor. Samim time ima i vrlo sličnu toksičnost pa se PCB 77 smatra jednim od najtoksičnijih PCB kongenera. Oba *para* i dva *meta* položaja supstituirani su atomima klora. Strukturna formula PCB 77 ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_4$) prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Strukturna formula PCB 77 (Jung i sur., 2017)

PCB 77 ima estrogena i antiestrogena svojstva te se pokazalo kako utječe na mozak i ponašanje štakora u razvoju. Visoke doze (2 i 4 mg kg⁻¹ dnevno) tijekom gestacijskog razdoblja između 6. i 18. dana, povećale su smrtnost mladunčadi i rezultirale nižom porođajnom masom legla tijekom prvih 6 dana života (Simmons i sur., 2005).

Zbog svoje strukture i mogućnosti vezanja na Ah receptor, PCB 77 može uzrokovati brojne karcinogene učinke uslijed inhibicije apoptoze, supresije međustanične komunikacije, utjecaja na proliferaciju stanica i općenito uključenosti u kontrolu staničnih ciklusa (Jung i sur., 2017).

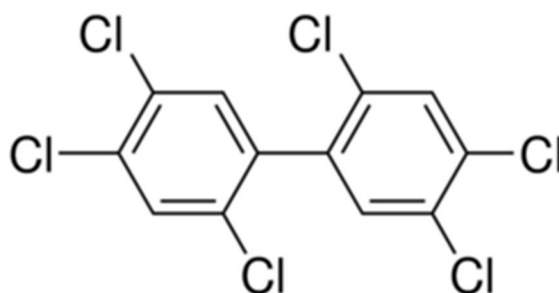
PCB 77 se nakuplja u masnom tkivu uslijed svoje lipofilnosti te se njegova koncentracija može povećavati porastom tjelesne mase. Arsenescu i suradnici su ispitivali *in vitro* i *in vivo* utjecaj PCB 77 na morfologiju i diferencijaciju adipocita, tjelesnu masu, serumske lipide, aterosklerozu i proupalne adipokine. Rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su kako niže koncentracije PCB 77 potiču diferencijaciju 3T3-L1 adipocita dok ju visoke koncentracije inhibiraju. *In vivo* istraživanja na miševima pokazala su kako PCB 77 utječe na razvoj pretilosti i povišeni kolesterol te shodno tome i na rizik od ateroskleroze (Arsenescu i sur., 2008).

Studije na životinjama daju čvrste dokaze o proaterogenim svojstvima flavinske monooksigenaze (engl. *flavin containing monooxygenase*, FMO) i njenog produkta trimetilamin-N-oksida (TMAO). Petriello i suradnici (2016) proveli su studiju o utjecaju planarnih PCB-a na ekspresiju FMO3 (FMO izoforma) i kardiovaskularnog zdravlja. Miševima su dane dnevne doze od 49,6 mg kg⁻¹ tijekom 48 sati. Rezultati pokazuju povećanu ekspresiju FMO3 enzima i nastanak trimetilamin-N-oksida te povećan rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti.

Sargent i suradnici su 1989. godine otkrili da PCB 77 uzrokuje kromosomske aberacije u limfocitima čovjeka i to u netoksičnim dozama (10⁻¹-10⁻⁴ μg mL⁻¹).

2.1.5. PCB 153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-heksaklorobifenil)

PCB 153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-heksaklorobifenil) je neplanarni, *ortho*-supstituirani PCB. Nema afinitet za vezanje na Ah receptor i pripada skupini PCB-a koji nisu slični dioksinu (NDL). Neplanarne PCB-e, uključujući i PCB 153, u većim količinama nalazimo u masnom tkivu, serumu, majčinom mlijeku, ali i u tkivu mozga u djece s poremećajem razvoja mozga. Strukturna formula PCB 153 (C₁₂H₄Cl₆) prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Strukturna formula PCB 153 (Đinović-Stojanović i sur., 2013)

Masno tkivo je primarno mjesto skladištenja lipofilnih tvari pa tako i PCB-a koji utječu na njegovu diferencijaciju, metabolizam i ostale funkcije povezane s pretilosti i/ili metaboličkim sindromom. Mullerova i suradnici su 2017. godine proveli istraživanje utjecaja PCB 153 na diferencijaciju adipocita čovjeka. Pokazalo se kako koncentracija PCB 153 od 0,1 μM utječe na ekspresiju gena uključenih u diferencijaciju adipocita i proteina važnih za pohranu masti metabolizam glukoze i inzulina što može dovesti do pretilosti i promjena u osjetljivosti stanica na inzulin (Mullerova i sur., 2017).

PCB 153 ima utjecaj na imunološki sustav te neke studije navode imunosupresijski, a neke imunostimulirajući učinak. Kuiper i suradnici uočili su da visoka doza u muških miševa smanjuje ukupan broj stanica slezene i B stanica, smanjuje lučenje citokina, inhibira odgovor T- stanica i povećava razine makrofaga. Zanimljivo je kako niske i visoke doze ovog kongenera smanjuju incidenciju dijabetesa tip 1 u pokusnih miševa. Takvi rezultati sugeriraju na potencijalni zaštitni učinak što je kontradiktorno rezultatima svih ostalih istraživanja (Kuiper i sur., 2016).

Postnatalna izloženost djece PCB 153 povezuje se sa zaostajanjem u rastu, a izloženost majki tijekom trudnoće može rezultirati nižom porođajnom masom novorođenčadi (Tang i sur., 2018).

Leong i suradnici (2019) proučavali su povezanost između izloženosti PCB 153 i razine testosterona u serumu. U istraživanju je sudjelovalo 557 muškaraca, prosječne dobi 45,7 godina, s prosječnom razinom testosterona od 479 ng dL⁻¹ te prosječnom razinom PCB 153 od 0,2 ng g⁻¹. Uočena je smanjena razina testosterona u serumu u pojedinaca s višom razinom PCB-a u krvi.

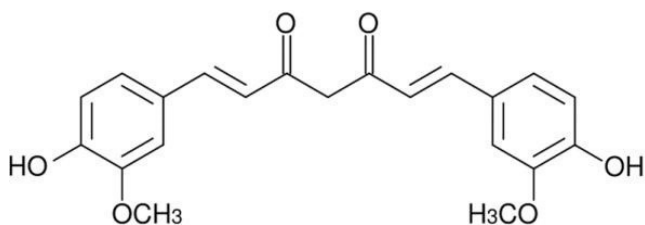
Povećana razina koncentracije triju PCB kongenera (118, 137 i 153) u spermi povezuje se sa smanjenom pokretljivošću sperme u neplodnih muškaraca (ATSDR, 2000).

Nekoliko *in vitro* studija pokazuju kako PCB povećavaju unutarstanične razine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u neuronima. Izložene smjesi *Aroclor* 1254 ili pojedinačnom kongeneru (PCB 153), kulture stanica neurona podložnije su produkciji ROS-a i staničnoj smrti (Klocke i Lein, 2020).

2.2. KURKUMIN

Curcuma longa ili kurkuma je biljka koja pripada porodici đumbira i jedna je od najčešće korištenih indijskih začina. Osim u kuhinji kao začin, koristi se kao konzervans i prirodno bojilo u hrani (Zhou i sur., 2011). Kurkuma sadrži 60-70 % ugljikohidrata, 8,6 % proteina, 5-10 % masti, 2-7 % vlakana te 3-5 % kurkuminoida (kurkumin, demetoksikurkumin, *bis*-demetoksikurkumin). Glavni kurkuminoid kojeg ima oko 70 % je kurkumin (Trujillo i sur., 2013).

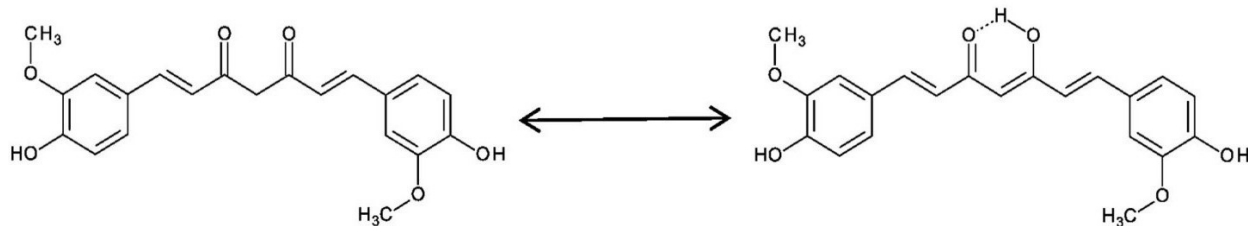
Kurkumin (1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion) ili diferuloilmetan je nepolarni polifenol niske molekulske mase i žuto-narančasti pigment netopljiv u vodi (Sharma i sur., 2005; Trujillo i sur., 2013). Prvi je puta izoliran 1815. godine, a kemijsku strukturu i sintezu potvrdio je Lampe sa suradnicima 1910., odnosno 1913. godine (Zhou i sur., 2011). Strukturna formula kurkumina prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Strukturna formula kurkumina (Zhou i sur., 2011)

Kurkumin postoji u dva tautomerna oblika: enolni, koji je dominantan u lužnatom mediju i keto oblik, kojeg nalazimo u kiselom i neutralnom mediju (Trujillo i sur., 2013). Tautomerni oblici kurkumina prikazani su na Slici 5. Pri pH 3-7, kurkumin djeluje kao iznimno jak donor vodikovih atoma, a pri pH iznad 8 kada je dominantna enolna forma, djeluje kao elektron donor što je tipično za antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva (Sharma i sur., 2005).

Unesen oralno, kurkumin se metabolizira na kurkumin glukuronid i kurkumin sulfonat, a sustavnim ili intraperitonealnim unosom se metabolizira u tetrahidrokurkumin, heksahidrokurkumin te heksahidrokurkuminol (Aggarwal i sur., 2007). Metaboliti se u najvećoj mjeri izlučuju fecesom, a veća količina pronađena je i u žuči pokusnih miševa i štakora (Sharma i sur., 2005).



Slika 5. Tautomerni oblici kurkumina (Jankun i sur., 2016)

2.2.1. Svojstva i bioraspoloživost kurkumina

Kurkumin ima antioksidacijska, protuupalna, antivirusna i antifungalna svojstva, nije toksičan za čovjeka te mu je FDA (engl. *Food and Drug Administration*) dodijelila GRAS status (engl. *generally recognized as safe*). Inhibira rast *Helicobacter pylori* koja uzrokuje čir na želucu, veže teške metale poput kadmija i olova i sprječava njihov toksični učinak (Akram i sur., 2010; Alizadeh i Kheirouri, 2019). Istraživanja su pokazala njegov hepato- i nefroprotektivan učinak, supresiju tromboze i reume te zaštitno djelovanje na infarkt miokarda (Anand i sur., 2007).

Brojne studije pokazuju inhibitorno djelovanje kurkumina na oksidacijski stres u različitim kroničnih bolesti, ovisno o dozi i trajanju suplementacije (Alizadeh i Kheirouri, 2019). Kurkumin djeluje kao bifunkcionalni antioksidans budući da može direktno djelovati s reaktivnim vrstama ili može povećati ekspresiju superoksid dismutaze (SOD), glutation reduktaze, katalaze i ostalih enzima važnih za zaštitu stanica od oksidacije. Može ući u reakcije s različitim radikalima poput superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilnih radikala ($\cdot OH$) i peroksilnih radikala ($ROO\cdot$) te s ROS i reaktivnim dušikovim vrstama (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), a vezanjem istih na fenolne skupine može spriječiti oksidacijska oštećenja stanica (Trujillo i sur., 2013).

Jedan od važnijih učinaka kurkumina je i antikancerogeno djelovanje budući da izaziva apoptozu stanica raka kao i inhibiciju DNA topoizomeraze II. Cheng i suradnici su uočili histološka poboljšanja u pacijenata s različitim vrstama raka nakon 3 mjeseca suplementacije dnevnim dozama od 1-8 g kurkumina. Također, uočen je njegov preventivni učinak na rak probavnog sustava, jetre, pluća i kože u pokusnih glodavaca (Sharma i sur., 2005).

Unatoč dokazanim pozitivnim učincima na zdravlje i sigurnosti za ljudsku upotrebu, kurkumin još uvijek nije odobren kao sredstvo za liječenje, a glavni razlog tomu je njegova

relativna bioraspoloživost. Ograničena bioraspoloživost kurkumina rezultat je vrlo slabe apsorpcije i brzog metabolizma nakon unosa u organizam. Ravindranath i Chandrasekhara (1980) su uočili slabu apsorpciju u krvi štakora nakon oralnog unosa 400 mg kurkumina, dok su Shoba i suradnici (1998) u studiji na ljudima uočili minimalnu ili nikakvu koncentraciju kurkumina u serumu jedan sat nakon oralnog unosa (Ravindranath i Chandrasekhara, 1980; Shoba i sur., 1998). Nakon apsorpcije, kurkumin konjugira sa sulfatima ili glukuronskom kiselinom te se metaboliti vrlo brzo izlučuju iz organizma. Nanočestice, liposomi, micle i fosfolipidni kompleksi su obećavajuće nove formulacije kurkumina kojima se postiže povećanje bioraspoloživosti kurkumina, jer se čini da omogućuju dužu cirkulaciju i otpornost kurkumina na metaboličke procese (Anand i sur., 2007).

2.2.2. Kurkumin i poliklorirani bifenili

Pokazalo se kako kurkumin ima poželjan utjecaj na prevenciju i liječenje malignih bolesti. S obzirom na mogućnost aktivacije apoptoze i autofagije, utjecaja na signalne puteve te smanjenje razvoja metastaza različitim molekularnim mehanizmima, kurkuminu se pripisuju antikancerogena svojstva. Smanjuje oksidacijski stres i ima zaštitni učinak na živčani sustav (Yurdakok-Dikmen i sur., 2018).

PCB se mogu akumulirati u ljudskom organizmu i uzrokovati endokrine poremećaje, pojavu raka, smanjenu aktivnost imunološkog sustava te mogu imati toksični učinak na živčani sustav. Izloženost komercijalnoj smjesi PCB-a naziva *Aroclor* 1254 uzrokuje izmjenu diferencijacije glija stanica indukcijom promjena u signalnim putevima cikličke AMP/protein kinaze A i protein kinaze C (Yurdakok-Dikmen i sur., 2018). Glioblastom je jedan od najsmrtonosnijih oblika raka koji pogađa središnji živčani sustav i najmanje reagira na primjenu kemoterapijskog liječenja. Yurdakok-Dikmen i suradnici su proveli *in vitro* studiju utjecaja kurkumina na F98 stanice glioma štakora izloženih PCB-ima.

Predinkubacija kurkuminom u koncentracijama od $3\mu\text{g mL}^{-1}$ smanjila je proliferativni učinak *Aroclor*-a 1254 na stanice glioma, dok se citotoksični učinak povećao. Veći zaštitni učinak pokazao se predinkubacijom kurkuminom tijekom 24 sata. Može se zaključiti kako kurkumin u određenim koncentracijama ima antiproliferativni (citotoksični) učinak kao i zaštitno djelovanje na

stanice glioblastoma tretirane smjesom PCB-a (*Aroclor* 1254) (Yurdakok-Dikmen i sur., 2018).

Prenatalna izloženost PCB-ima može uzrokovati oštećenja središnjeg živčanog sustava i različite neurološke probleme. Alcigir i suradnici (2018) proveli su istraživanje o utjecaju kurkumina na promjene središnjeg živčanog sustava štakora izloženih smjesi PCB-a (*Aroclor* 1254). Istraživanje se sastojalo od 3 skupine po 10 štakora: kontrolne skupine, skupine koja je dobivala samo *Aroclor* 1254 te skupine koja je dobivala kombinaciju *Aroclor*-a 1254 i kurkumina. Kurkumin, kao snažan antioksidans i tvar koja ima zaštitni učinak na živčani sustav, smanjio je negativne posljedice izloženosti *Aroclor*-u 1254, posebice u prednjem i srednjem dijelu mozga, te se pokazao kao potencijalno dobar agens za zaštitu živčanog sustava, a u većim dozama bi mogao biti i učinkovitiji (Alcigir i sur., 2018).

2.3. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Testovima toksičnosti provjerava se ima li određena tvar štetan učinak na zdravlje čovjeka i životinja, a obavezno je testiranje lijekova, aditiva u hrani, pesticida, industrijskih kemikalija i ostalih kontaminanata porijeklom iz okoliša te različitih kozmetičkih pripravaka i tvari koje se svakodnevno koriste u kućanstvu. Testovi toksičnosti dijele se na *in vivo* i *in vitro* testove.

2.3.1. *In vivo* testovi

U *in vivo* testovima toksičnosti koriste se živi, kompletni organizmi, a dijelimo ih na testove na životinjama i klinička ispitivanja. Primjenjuju se kako bi se promatrali ukupni učinci određenih tvari na živi organizam. Određuje se akutna (primjena jednokratne doze), subakutna (ponavljane doze do 1 mjeseca), subkronična (ponavljane doze 1-3 mjeseca) i kronična toksičnost (ponavljane doze u periodu od 3 mjeseca do 2 godine). *In vivo* testovima mogu se ispitati imunotoksičnost, nefrotoksičnost, citotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost i mutagenost, reprodukcijaska toksičnost, toksikokinetički i toksikodinamički parametri ksenobiotika, kožne i očne iritacije te se mogu provesti hematološka ispitivanja (Atterwill, 1995).

2.3.2. *In vitro* testovi

Upotreba *in vitro* sustava ima široku primjenu u toksikološkim istraživanjima i predstavljaju alternativu testovima na životinjama. Alternativni test sustavi uključuju stanične frakcije i linije, primarne stanične kulture, kulture organa, dijelove tkiva i slično. Koriste se u istraživanjima molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti (Kniewald i sur., 2005).

Prednosti *in vitro* u odnosu na *in vivo* testove su visoki stupanj reproducibilnosti i standardizacije, provode se rutinski i relativno brzo, dostupan je veliki broj test-sustava, nastaje manja količina toksičnog otpada te su jeftiniji od *in vivo* testova (Miltenburger, 1994). Također, njima se mogu odrediti početne koncentracije za *in vivo* ispitivanja te se smanjuje korištenje životinja u svrhu testiranja (Atterwill, 1995).

Jedan od najvažnijih nedostataka *in vitro* sustava je odsutnost procesa apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja, ali i djelomično - izostanak validacije (Atterwill, 1995; Yoon i sur., 2012).

Koriste se u ispitivanjima mutagenosti, reprodukcijske toksičnosti, imunotoksičnosti, endokrine toksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti, kancerogenosti, toksičnosti na ciljne organe te iritacija, a njima se mogu odrediti potencijalno aktivne tvari i mehanizmi putem kojih se ostvaruje toksičnost (Atterwill, 1995).

2.4. STANIČNE KULTURE I LINIJE

Stanične kulture jedan su od najčešće korištenih alata u znanosti za proučavanje fizioloških i biokemijskih procesa u stanicama poput staničnog metabolizma i starenja, utjecaja raznih ksenobiotika na stanice te mutagenosti i kancerogenosti. Koriste se i u razvoju lijekova i proizvodnji bioloških spojeva poput cjepiva. Jedan od najvažnijih čimbenika u tehnologiji staničnih kultura je medij za uzgoj kulture koji mora osigurati dovoljno nutrijenata za život i proliferaciju stanica, kao i za odvijanje ostalih staničnih funkcija (Yao i Asayama, 2017).

Među prvim kultiviranim kontinuiranim staničnim linijama bila je stanična linija mišjih fibroblasta (L-stanice) koju je 1940. godine uspostavio Wilton R. Earle te dokazao kako je

moguća proliferacija iz samo jedne stanice. Slijedeći se njegovim primjerom, George O. Gey je 1951. godine uspostavio prvu humanu kontinuiranu staničnu liniju izoliranu iz tkiva grlića maternice zahvaćenog rakom pacijentice Henriette Lacks te je po njoj i dobila ime (HeLa stanice) (Yao i Asayama, 2017).

Stanice u kulturi mogu biti genetički jednake pa govorimo o homogenoj populaciji stanica ili klonovima, ili se stanice mogu genetički razlikovati i činiti heterogenu populaciju stanica (Butler, 2004). Razlikujemo primarne kulture životinjskih stanica, koje imaju ograničen životni vijek, i stanične linije, koje mogu biti kontinuirane i konačne (Philippeos i sur., 2012).

2.4.1. Primarne stanične kulture

Stanične kulture čine stanice izolirane iz tkiva životinja, čovjeka ili biljaka koje će nastaviti rasti uz odgovarajuće uvjete i nutrijente i tada se nazivaju primarnom kulturom. Stanice će nastaviti diobu i proliferirati će sve dok neće biti ograničene nekim čimbenikom poput nedostatka potrebnih nutrijenata (Butler, 2004). Stanice se mogu izolirati enzimskim, kemijskim ili mehaničkim putem iz zdravog ili bolesnog tkiva (Philippeos i sur., 2012). Ograničeni rast karakteristika je konačnih staničnih linija. Broj izmjena generacija naziva se „Hayflick-ov limit“, a ovisi o vrsti stanice te dobi i vrsti tkiva iz kojeg su stanice izolirane (Butler, 2004).

Prednost primarne kulture stanica je morfološka i biokemijska sličnost sa stanicama tkiva iz kojeg je izolirana pa predstavlja reprezentativan uzorak koji zadržava specifična tkivna svojstva. Nedostaci uključuju mogućnost promjene i razlike u karakteristikama stanica u odnosu na izvorne stanice nakon nekog vremena kontinuiranog rasta, njihovu heterogenost te ograničeni životni vijek (Carter i Shieh, 2015).

2.4.2. Stanične kulture u suspenziji i monosloju

Stanične kulture se dijele na kulture u suspenziji te monosloju, ovisno o tome jesu li pričvršćene za podlogu. Kulture u monosloju su pričvršćene za podlogu, dok su stanice u suspenziji raspršene unutar medija i seruma (Freshney, 2005). Većina stanica pogodna je za rast u

monosloju. Prednosti rasta stanica u monosloju su lakša promjena medija, učinkovitije izlučivanje produkata, mogućnost ispiranja od neželjenih tvari, a nedostatak je što je rast stanica ograničen površinom podloge na kojoj se uzgajaju, teško je provesti biokemijske i strukturne analize bez uništavanja stanica te su stanice pričvršćene za podlogu pa je ograničena interakcija među stanicama. Kulture u suspenziji najčešće se koriste kod stanica koje su neovisne o podlozi, poput krvnih stanica. Prednosti stanica u suspenziji su lako održavanje i manji prostor za rast te lakše praćenje parametara poput pH i koncentracije kisika (Honegger, 2001).

2.4.3. Stanične linije

Razlikujemo kontinuirane i konačne stanične linije. Konačne stanične linije se formiraju nakon prve subkultivacije, imaju ograničeni broj dioba (20-80) prije odumiranja i najčešće su euploidne. *In vitro* transformacijom konačne stanične linije dobivamo kontinuiranu koja za razliku od konačne, nema ograničeni životni vijek te je heteroploidna. Transformacije mogu biti spontane ili inducirane (kemijski ili virusima). Kontinuirane stanične linije razlikuju se od primarne kulture po morfologiji, gustoći, brzini rasta te se lakše kloniraju i održavaju (Freshney, 2005). Prednost kontinuiranih staničnih linija je to što se lakše uzgajaju u odnosu na primarnu kulturu, homogenije su te daju dosljedne i ponovljive rezultate. Glavni nedostatak je mogućnost pojave genetičkog materijala koji ne postoji u stanicama *in vivo* (Carter i Shieh, 2015).

Uzgoj stanične linije zahtjeva sterilne uvjete kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Glavni izvori kontaminacija su bakterije, gljivice i kvasci. Stoga je važno održavati aseptičke uvjete u laboratoriju, posebice laminaru, detaljnim čišćenjem radnih površina i preparata sa 70 %

-tnim etanolom. Kultivacija stanica odvija se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO₂) pri temperaturi 34-37 °C i pH vrijednosti 7,4 (Freshney, 2005).

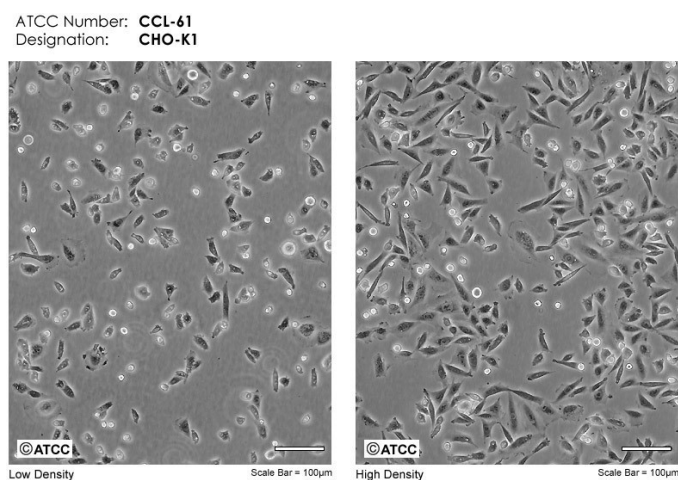
Mediji za uzgoj omogućavaju kontrolu fizikalno-kemijskih i fizioloških uvjeta uzgoja te pružaju stanicama sve što im je potrebno za rast. Medij mora sadržavati vodu, esencijalne nutrijente (ugljikohidrate, aminokiseline, vitamine), specifične faktore i faktore rasta, hormone, plinove (CO₂, O₂) te fizikalno-kemijski uvjeti moraju biti prilagođeni, ovisno o vrsti stanica koje se uzgajaju. Postoje tri vrste medija (i) osnovni medij koji sadrži aminokiseline, vitamine, anorganske soli i glukozu, (ii) *serum-free* medij koji umjesto seruma sadrži određene hormone i hranjive tvari

te (iii) medij s reduciranim serumom koji je obogaćen određenim hranjivim tvarima i faktorima životinjskog podrijetla koji mijenjaju ulogu seruma. Također, u malim količinama medij može sadržavati i antibiotike poput penicilina, ampicilina te streptomicina kako bi se smanjila mogućnost mikrobnog rasta i kontaminacije (Freshney, 2005).

Serum sadrži faktore rasta, adhezijske faktore, proteine, lipide i minerale, a može sadržavati i glukozu, keto kiseline i druge mikronutrijente. Najčešće korišteni serumi su fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) te teleći serum (engl. *bovine calf serum*, BCS), a postoji i humani te konjski serum. Serumi se dobivaju zgrušavanjem krvi životinja te se mediju dodaju u količinama od 5 do 20 % (Freshney, 2005).

2.4.4. CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - K1 stanična linija

Stanice ovarija iz odrasle ženke kineskog hrčka prvi je izolirao i kultivirao Theodore T. Puck 1957. godine i od tada CHO stanična linija ima široku primjenu u znanosti i bioprocesnom inženjerstvu zbog jednostavnosti upotrebe i mogućnosti prilagodbe. CHO stanice mogu se genetički prilagođavati te rasti i u suspenziji i u monosloju (Tang i sur., 2020). Danas se ova stanična linija uzgaja u Ham-ovom F-12 mediju za uzgoj pri 37 °C te 95 % zraka i 5 % CO₂, uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma te prolina koji je potreban za rast stanica, budući da one nemaju mogućnost sinteze ove aminokiseline (ATCC, 2020). CHO-K1 stanična linija prikazana je na Slici 6.



Slika 6. CHO-K1 stanična linija (ATCC, 2020)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese hamster ovary*)- K1 koja raste u monosloju. Stanice su subklonovi roditeljske stanične linije CHO izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka (ATCC, 2020).

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- Dulbecco's MEM/F-12, GIBCO, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS – fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- tripsin-EDTA, GIBCO, SAD
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- kurkumin, Sigma, St. Louis, SAD
- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje
- ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), SIGMA, SAD
- Neutralrot, E.Merck Ag – Damstadt, Njemačka
- boja *Coomasie Brilliant Blue* R-250, LKB, Bromma, Švedska
- destilirana voda (dH₂O)
- kalijev acetat, Kemika, Zagreb

3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO)

Sastav Dulbecco medija:

Sastojci:

aminokiseline:	Koncentracija (mg L ⁻¹)
Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin × H ₂ O	7,5
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid ×H ₂ O	17,56
L-Cistein 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid × H ₂ O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,35
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	55,79
L-Valin	25,85

vitamini:

Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,65
Niacinamid (nikotinamid)	2,02
Piridoksin hidroklorid	2
Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorid	2,17
Vitamin B ₁₂	0,68
I-inozitol	12,61

anorganske soli:

CaCl ₂	116,6
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0013
Fe(NO ₃) ₃ x 9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,417
MgCl ₂ x 6H ₂ O	61
MgSO ₄ x 7H ₂ O	100
KCl	311,8
NaHCO ₃	1200
NaCl	6995,5
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	134
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	62,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,432

ostali sastojci:

D – Glukoza	3151
HEPES	3075,4
Hipoksantin Na	2,39
Linolna kiselina	0,042
Lipoična kiselina	0,105
Fenol crvenilo	8,1
Putrescin 2HCl	0,081
Natrij piruvat	55
Timidin	0,365

PBS (*Phosphate Buffer Solution*) pufer pH=7,4

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
NaHPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

0,4 %-tna otopina *Trypan Blue*

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL
Profiltrirati.	

4 %-tna ishodna otopina *Neutral Red*

<i>Neutral Red</i>	4 g
dH ₂ O	100 mL
Sterilno profiltrirati.	

Radna otopina *Neutral Red*

ishodna otopina <i>Neutral Red</i>	125 µL
medij za uzgoj	100 mL

Otopina za odbojavanje

apsolutni etanol	50 %
ledena octena kiselina	1 %
dH ₂ O	49 %

Ishodna otopina *Kenacid Blue R*

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	0,4 g
apsolutni etanol	250 mL
dH ₂ O	630 mL

Radna otopina *Kenacid Blue*

ishodna otopina <i>Kenacid Blue</i>	88 mL
ledena octena kiselina	12 mL

Otopina za ispiranje

apsolutni etanol	10 %
ledena octena kiselina	5 %
dH ₂ O	85 %

Otopina za desorpciju

kalijev acetat	98,15 g
apsolutni etanol	700 mL
dH ₂ O	300 mL

Ishodna otopina PCB 77

PCB 77	10 mg
DMSO	3,42 mL

- napravljena je otopina PCB 77 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75 μ M PCB 77

Ishodna otopina PCB 153

PCB 153	10 mg
DMSO	2,77 mL

- napravljena je otopina PCB 153 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75 μ M PCB 153

Ishodna otopina kurkumina

kurkumin	100 mg
DMSO	1 mL

- napravljene su otopine kurkumina tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1, 2,5, 5, 10 i 20 μ M kurkumina

3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO₂, Flow Laboratories, Velika Britanija
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- spektrofotometar, Helios- γ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanije
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- 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. Uzgoj i održavanje stanica započinje naglim odmrzavanjem na 37 °C, u atmosferi od 95 % zraka i 5 % CO₂. Nakon odmrzavanja, stanice se centrifugiraju pri 1000 okretaja min⁻¹ u trajanju od 5 minuta te se uklanja supernatant. Talog stanica resuspendira se u 90 % medija za uzgoj (DMEM/F12) i 10 % FBS-a te prenosi u T-bocu radi daljnje kultivacije.

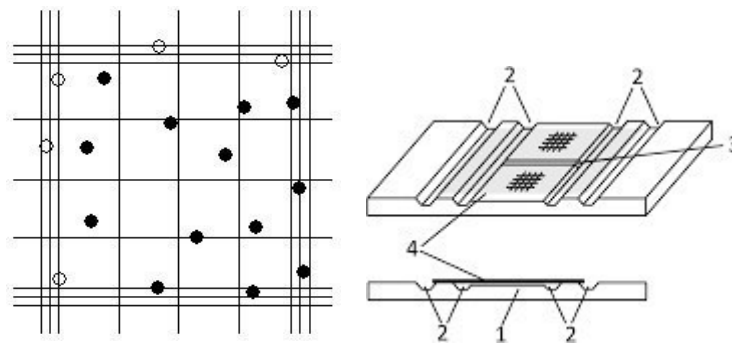
Za optimalan rast i razvoj stanica potrebni su uvjeti kontrolirane atmosfere (37 °C, 95 % zraka i 5% CO₂) koji se osiguravaju uzgojem stanica u inkubatoru, a potrebno je i redovito mijenjanje medija za uzgoj. Monoslojne stanice u T-boci prvo se ispiru od ostatka korištenog medija i seruma, a zatim ih se odvaja od površine T-boce dodatkom 1-2 mL proteolitičkog enzima tripsina (potreban kako bi se stanice odvojile jedna od druge i od površine T-boce). Zatim se dodaje medij za uzgoj koji se sastoji od 90 % DMEM/F12 i 10 % FBS-a i stanice se u tom mediju resuspendiraju. Uzima se mali uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom

Trypan Blue. Nakon što se izračuna broj stanica u uzorku, stanice se razrjeđuju na željenu koncentraciju.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom Trypan Blue

Uzorak od 20 μL suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20 μL 0,4 %-tne otopine *Trypan Blue* boje. Suspenziju se nekoliko puta resuspendira te se 20 μL nanosi na Fuchs-Rosenthalovu komoricu i stanice se broje pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojene, dok su mrtve stanice plavo obojene zbog oštećenja stanične membrane.

Fuchs-Rosenthalova komorica sastoji se od 16 kvadrata, a stanice se broje unutar središnja 4 kvadrata. Broje se sve stanice unutar kvadrata te one na desnom i donjem rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta (Slika 7).



Slika 7. Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica (FAO, 1996; Gordeev i Chetverin, 2017)

Broj stanica po mililitru medija za uzgoj određuje se tako da se izračuna srednja vrijednost broja živih stanica izbrojanih u komorici i pomnoži s 10^4 .

3.2.3. Određivanje učinka kurkumina na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica

Po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji od 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj otpipetira se u jažice na *multiwell* ploči (6-well ploča). Stanice se inkubiraju 24 sata te se zatim tretiraju različitim koncentracijama kurkumina (kurkumin se otapa u DMSO). Od 6 jažica na *multiwell* ploči jedna se prati kao kontrola uz dodatak 10 μL DMSO-a kako bi se isključio potencijalni toksični učinak otapala na proliferaciju stanica. U ostalih 5 jažica stanice su tretirane s 10 μL otopine kurkumina koje su pripravljene tako da se u mediju postignu koncentracije od 1, 2,5, 5, 10 i 20 μM .

Tretirane stanice se inkubiraju 48 sati te se tada provjerava vijabilnost stanica metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue*, a dobiveni podaci se međusobno uspoređuju kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija kurkumina na proliferaciju CHO-K1 stanica.

3.2.4. Određivanje učinka kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica

U jažice na *multiwell* ploči otpipetira se po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj te se nakon sat vremena stanice tretiraju pripremljenim otopinama kurkumina u DMSO-u (predtretman), tako da se u jažicama u mediju za uzgoj dodatkom 10 μL otopine kurkumina postignu koncentracije kurkumina od 1, 2,5, 5, 10 i 20 μM . Jedna jažica na *multiwell* ploči služi kao intaktna kontrola (Ki), u drugu (KD) i treću (KD/PCB) jažicu dodano je po 10 μL DMSO-a, a u ostale je dodano po 10 μL otopine kurkumina određene koncentracije. Stanice se zatim inkubiraju 24 sata nakon čega se tretiraju pripremljenim otopinama PCB-a. U drugu (KD) jažicu dodano je 20 μL DMSO-a, a u preostale dodano je po 20 μL 75 μM PCB-a 77, odnosno PCB 153. Inkubacija stanica nakon tretmana PCB-em trajala je 24 sata, nakon čega se vijabilnost stanica provjerava metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue*.

3.2.5. *Neutral Red* i *Kenacid Blue* metoda

Iz jažica *multiwell* ploča u kojima se nalaze naciijepljene i tretirane stanice uklanja se medij za uzgoj te se stanični monosloj ispiru s 1 mL sterilnog PBS-a. U svaku od jažica dodaje se 1 mL prethodno pripremljene radne otopine boje *Neutral Red* koja se veže unutar lizosoma živih stanica. Slijedi inkubacija tri sata na 37 °C nakon čega se uklanja otopina boje te se stanice ispiru PBS-om. U jažice se dodaje po 2 mL otopine za odbojavanje te se ploče stavljaju na tresilicu na 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

Nakon provedene *Neutral Red* metode, vijabilnost stanica provjerava se i *Kenacid Blue* metodom. Iz jažica *multiwell* ploče uklanja se otopina za odbojavanje (u metodi *Kenacid Blue* služi kao fiksativ) te se dodaje 1 mL *Kenacid Blue* boje neposredno pripremljene prije eksperimenta. Bojanje se provodi 20 minuta na tresilici nakon čega se uklanja boja i stanice se ispiru dva puta s 1 mL otopine za ispiranje i ponovno se stavljaju na tresilicu. Nakon 20 minuta na tresilici, uklanja se otopina za ispiranje i dodaje se 2 mL otopine za desorpciju te se ploče ponovno na 20 minuta ostave na tresilici. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

Dobiveni rezultati se statistički obrade i međusobno usporede kako bi se odredio utjecaj kurkumina na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica pri citotoksičnom djelovanju PCB-a.

3.3. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka 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:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2_{x_1} + S^2_{x_2}}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj

vjerojatnosti najmanje $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

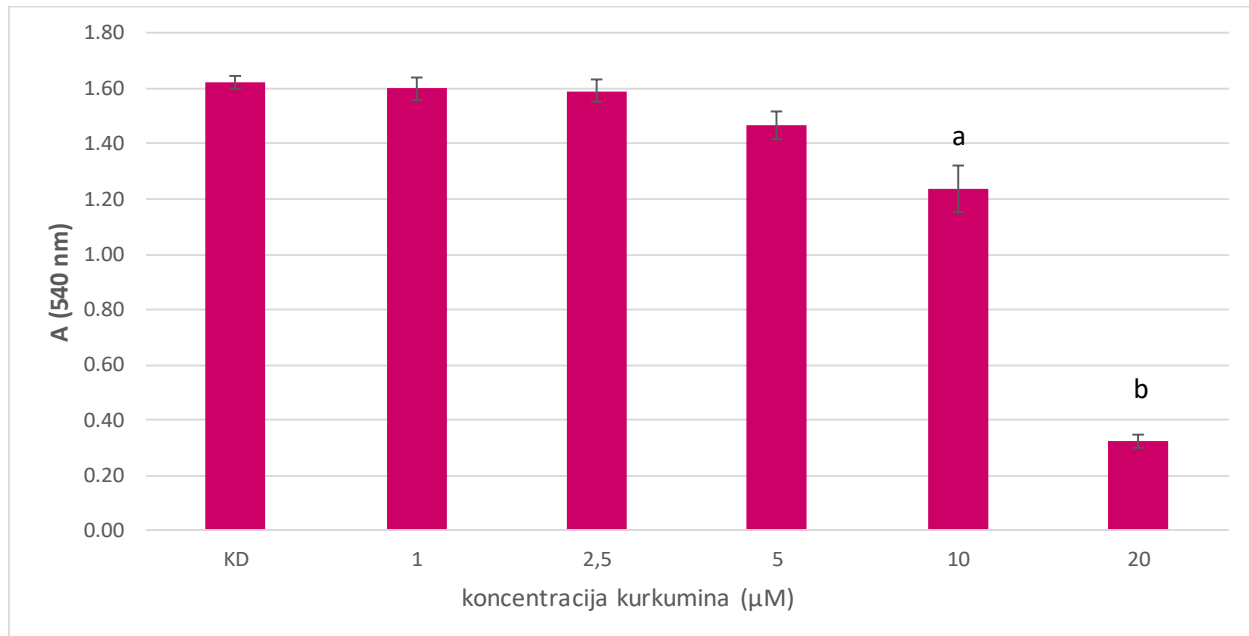
U ovom radu korištena je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese Hamster ovary*)-K1, a cilj je bio ispitati učinak kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 77 i PCB-a 153 uz pretpostavljeni protektivni učinak. Učinci kurkumina ispitani su u koncentracijama od 1, 2,5, 5, 10 i 20 μM na citotoksično djelovanje PCB-a u koncentraciji od 75 μM . Nakon nacjepljivanja 2 mL stanica pripremljenih prema protokolu u jažice *multiwell* ploča, stanice su inkubirane jedan sat nakon čega je slijedio predtretman kurkuminom tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1, 2,5, 5, 10 i 20 μM . Stanice su zatim inkubirane 24 sata, nakon čega su tretirane pripremljenim otopinama 75 μM PCB-a 77 ili PCB-a 153 i ponovno inkubirane 24 sata. Proliferacija i vijabilnost stanica tretiranih kurkuminom i PCB-em 77, odnosno PCB-em 153, praćena je metodama *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *Kenacid Blue* 48 sati nakon predtretmana s kurkuminom, tj. 24 sata nakon tretmana s PCB-em. Metodom *Trypan Blue* izbrojane su stanice pod svjetlosnim mikroskopom, pri čemu žive stanice ostaju nebojene, dok su mrtve stanice plavo obojane uslijed oštećenja stanične membrane. U metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue* pomoću spektrofotometra izmjerio se intenzitet nastalog obojenja, odnosno apsorbancija pri određenim valnim duljinama: 540 nm (*Neutral Red*) i 577 nm (*Kenacid Blue*) u odnosu na slijepu probu. Boja *Neutral Red* prolazi kroz staničnu membranu i veže se unutar lizosoma živih stanica, a boja *Kenacid Blue* veže se za ukupne stanične proteine. Dobiveni rezultati su statistički obrađeni te prikazani u obliku grafova.

4.1. UČINAK KURKUMINA NA PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA

Kurkumin (1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion) ili diferuloilmetan je narančasti, u vodi netopljivi pigment i jedan od glavnih komponenti pronađenih u podanku biljke *Curcuma longa* koji pripada skupini kurkuminoida (Lestari i Indrayanto, 2014; Pescosolido i sur., 2014). Najčešća upotreba kurkumina je u obliku začina, ali se u prehrambenoj industriji koristi i kao prirodno bojilo te konzervans (Zhou i sur., 2011). Postoji u dva tautomerna oblika: enolnom i keto obliku, a koji će oblik dominirati ovisi o pH vrijednosti medija u kojem se nalazi. Različite studije potvrdile su potencijalnu upotrebu kurkumina u prevenciji i liječenju različitih bolesti zbog svojeg protuupalnog, antioksidacijskog, antimikrobnog i antikancerogenog djelovanja (Anand i sur., 2007). Antioksidacijski učinak kurkumina može se uočiti u dva načina djelovanja: direktno djelovanje s reaktivnim radikalima ili poticanje ekspresije antioksidacijskih proteina i proteina zaduženih za zaštitu stanica, a može se objasniti strukturom kurkumina u kojoj je posebno istaknuta uloga fenolne skupine (Trujillo i sur., 2013).

Kurkumin ima značajnu kemoprotektivnu ulogu u razvitku tumora poput tumora gušterače, mozga, jetre, pluća, dojki te mnogih drugih. Inhibira NF- κ B (engl. *nuclear factor- kappa B*) čime utječe na smanjenje ekspresije gena zaduženih za apoptozu, proliferaciju i transformaciju stanica. Zbog svoje pleiotropne aktivnosti može utjecati na ekspresiju i aktivaciju mnogih staničnih regulatornih proteina koji će utjecati na upalne odgovore i zaštitu stanica. Brojne eksperimentalne i kliničke studije pokazuju kako je kurkumin siguran za ljudsku upotrebu. Međutim, zbog slabe topljivosti i smanjene biorasploživosti, biomedicinski potencijal kurkumina teško je u potpunosti istražiti, stoga još uvijek nije odobren kao sredstvo za liječenje (Pescosolido i sur., 2014).

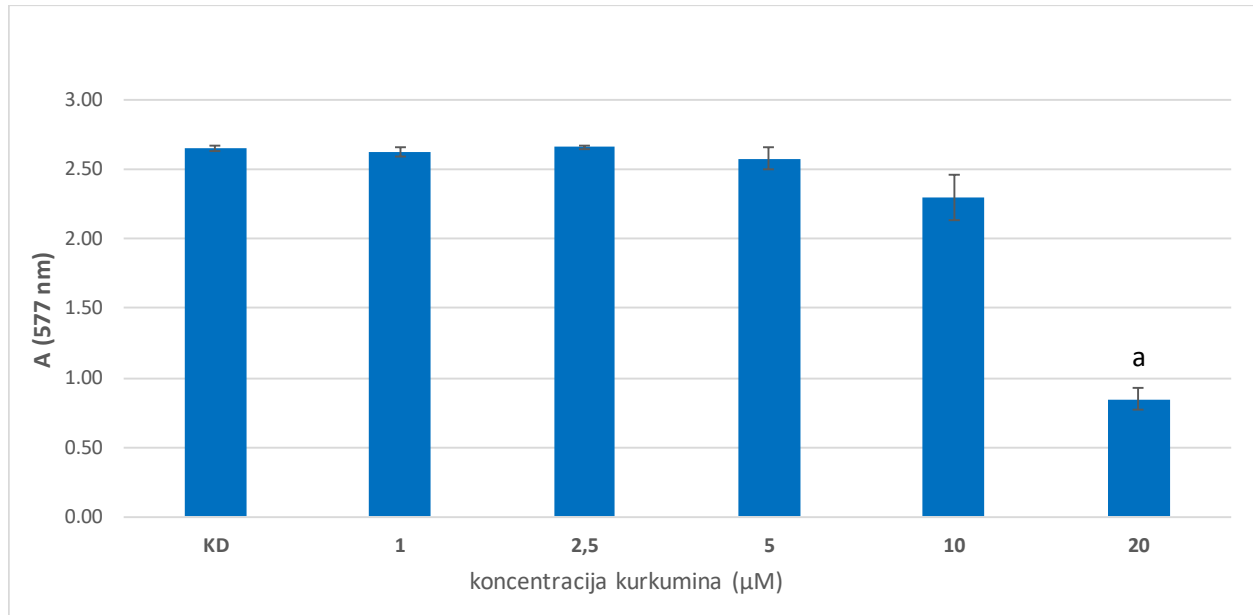
Učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica tijekom 48 sati određen je metodom *Neutral Red*, a zatim i metodom *Kenacid Blue*.



Slika 8. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* 48 sati nakon tretmana u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,025$, ^b $p < 0,001$.

Iz Slike 8 vidljivo je kako je došlo do statistički značajnog ($p < 0,001$ – $p < 0,025$) smanjenja vijabilnosti stanica tek pri višim koncentracijama kurkumina (10 μM i 20 μM) u odnosu na kontrolni uzorak (KD – stanice tretirane s DMSO-om), dok je pri koncentraciji kurkumina od 5 μM također došlo do smanjenja vijabilnosti stanica, međutim bez statističkog značaja i u puno manjoj mjeri u odnosu na koncentracije od 10 i 20 μM . Kurkumin se prema brojnim istraživanjima pokazao dobrim u prevenciji i liječenju mnogih bolesti, uključujući i rak. Neki autori nakon provedenih *in vitro* studija naglašavaju kako stanice raka odumiru tek pri tretmanu kurkuminom u koncentracijama 5 – 50 μM nakon nekoliko sati inkubacije (Burgos – Morón i sur., 2010).

Nakon provedene *Neutral Red* metode, učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica ispitan je i metodom *Kenacid Blue*.



Slika 9. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 48 sati nakon tretmana u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Možemo uočiti da je do statistički značajnog ($p < 0,001$) smanjenja vijabilnosti stanica došlo pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji kurkumina (20 μM), dok pri ostalim koncentracijama kurkumina nije došlo do izraženog smanjenja vijabilnosti stanica (Slika 9).

4.2. UČINAK KURKUMINA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-A 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA *TRYPAN BLUE*, *NEUTRAL RED* TE *KENACID BLUE*

Poliklorirani bifenili (PCB) pripadaju skupini perzistentnih organskih zagađivača (POPs) (Herceg Romanić, 2002). Zbog svoje stabilnosti i hidrofobnosti te činjenici da su teško hlapljivi, otporni na kiseline, baze i različite degradacijske procese koji se događaju u okolišu, imaju veliku tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu i hranidbenom lancu (Ghavami i Sajadi, 2010; Kmetič i sur., 2012). Upravo zbog svojih svojstava, PCB su široko rasprostranjeni u industrijskoj i komercijalnoj upotrebi kao tekućine u transformatorima, kao plastifikatori, u bojama, plastičnim i gumenim presvlakama i slično. Velike se količine zaostalih PCB-a još uvijek mogu naći u okolišu unatoč zabrani upotrebe 1980-ih (La Rocca i Mantovani, 2006).

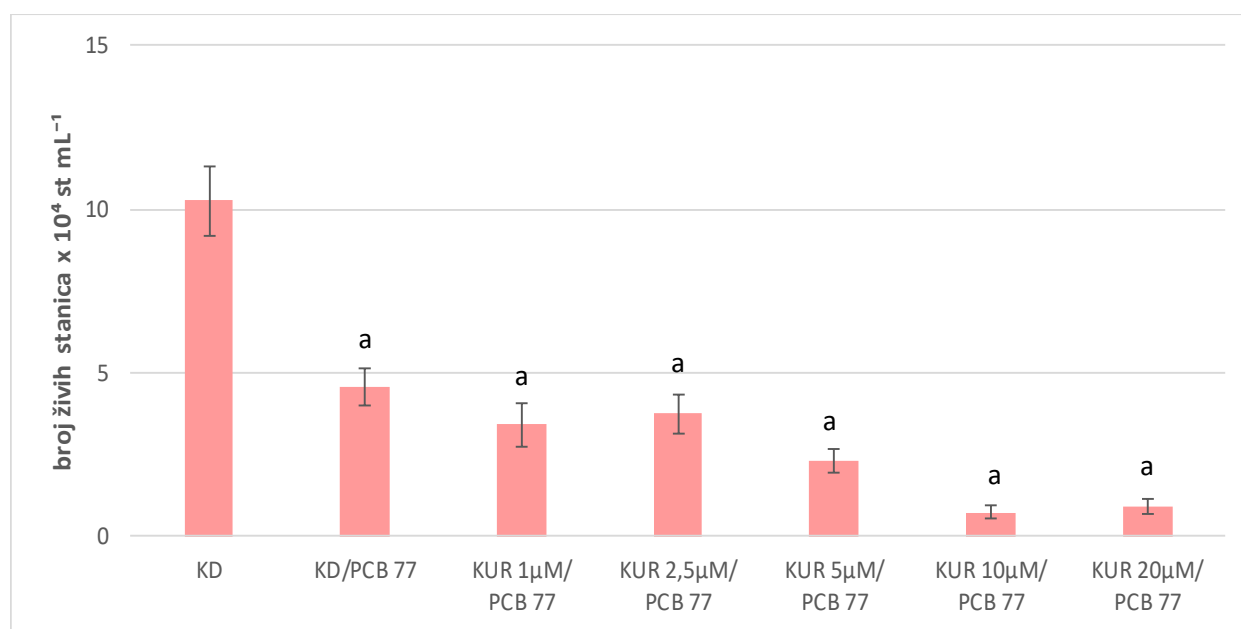
Brojne studije pokazuju toksične učinke različitih PCB kongenera na reproduktivni, živčani i imunološki sustav, mogu utjecati na mehanizme endogenih hormona i uzrokovati promjene te općenito povećavaju rizik od razvoja različitih vrsta karcinoma. Toksičnost kongenera ovisi o stupnju klorinacije i položaju klorovih atoma u strukturi (Kmetič i sur., 2012). Zbog svih tih učinaka, PCB se prema IARC-u klasificiraju kao karcinogeni za ljude (kategorija 1) (IARC, 2016).

Postoji 209 različitih PCB kongenera koji se razlikuju po položaju i broju klorovih atoma na benzenskim prstenima te konfiguraciji koja može biti planarna ili neplanarna. Planarni PCB su dioksinu slični (DL) te imaju visok afinitet za Ah receptor, a neplanarni nisu slični dioksinu (NDL) i nemaju visok afinitet za Ah receptor (Reddy i sur., 2019). U ovom radu korištena su dva kongenera, PCB 77 i PCB 153.

PCB 77 kongener ubraja se među najtoksičnije kongenere koji imaju planarnu konfiguraciju sličnu vrlo toksičnom dioksinu – 2, 3, 7, 8 – tetraklorodibenzodioksinu (TCDD), a samim time uzrokuju toksične učinke slične onima zabilježenima kod trovanja TCDD-om. Najčešće su dio smjese različitih PCB-a poput *Aroclor*-a 1254 koji se koriste u različite svrhe kao plastifikatori, usporivači gorenja i slično (Safe i sur., 1985). PCB 153 je kongener koji nema veliki afinitet za Ah receptor, a zbog svoje neplanarne konfiguracije ne uzrokuje toksične učinke kao dioksini. Brojne su studije potvrdile negativan utjecaj na zdravlje čovjeka budući da je

neurotoksičan, izaziva pretilost i poremećaje u endokrinom i reproduktivnom sustavu te predstavlja rizik od razvoja raka (Kuiper i sur., 2016).

Moguće protektivno djelovanje kurkumina na inducirano smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica djelovanjem PCB-a 77 (75 μ M) određeno je 24 sata nakon tretmana ovim kongenerom uz prethodnu inkubaciju kurkuminom (24 sata) metodom *Trypan Blue*, *Neutral Red*, a potom i metodom *Kenacid Blue*.

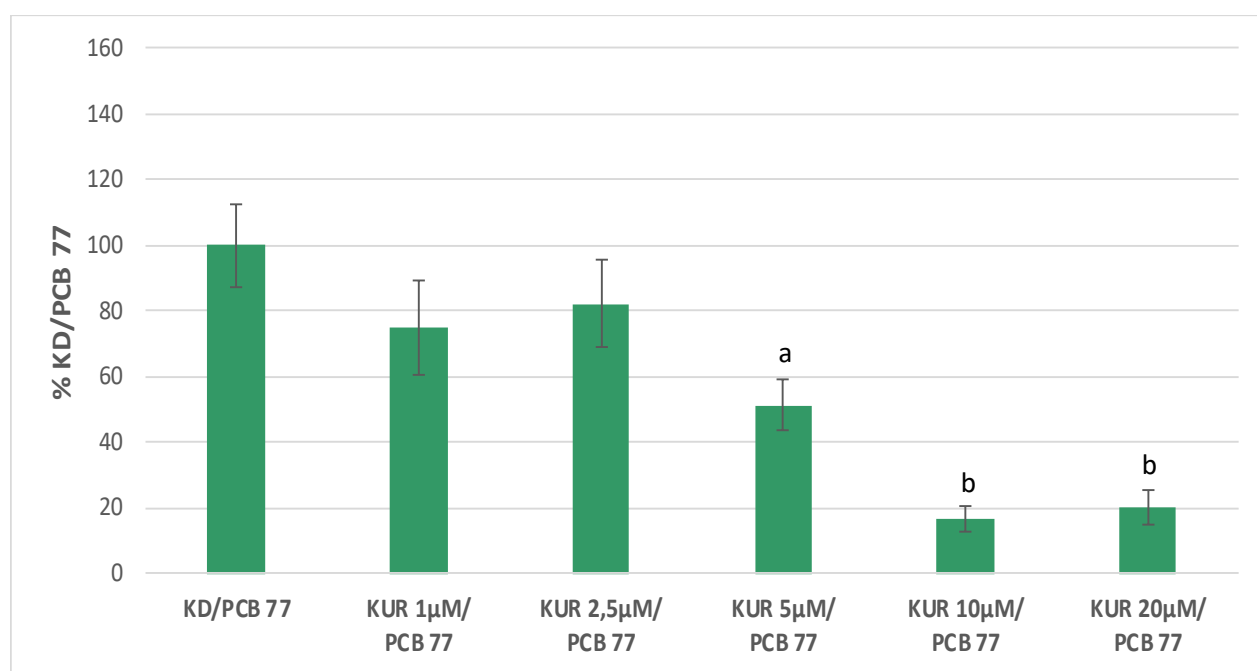


Slika 10. Učinak kurkumina (KUR 1 – 20 μ M) na broj CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μ M PCB-em 77 određen metodom *Trypan Blue* nakon 48 sati (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 77 – stanice tretirane s PCB-em 77 i DMSO-om; KUR 1 μ M/PCB 77 – KUR 20 μ M/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μ M te nakon 24 sata tretirane sa 75 μ M PCB-em 77). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na stanice tretirane s DMSO-om (KD): ^a $p < 0,001$.

Iz Slike 10 može se vidjeti citotoksični učinak PCB-a 77 na CHO-K1 stanice određen metodom *Trypan Blue* – broj stanica nakon tretmana PCB-em statistički je značajno ($p < 0,001$) niži u odnosu na broj stanica u kontrolnom uzorku (KD). Također vidljivo je da predinkubacija različitim koncentracijama kurkumina (1 – 20 μ M) nije pokazala protektivni učinak. Toksični učinak planarnog PCB-a 77 na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica uočen je i u istraživanju

koje su 2015. godine proveli Murati i suradnici. Pokazalo se kako PCB 77 ima citotoksičan učinak na staničnu proliferaciju i vijabilnost i može imati negativne posljedice na reproduktivni sustav (Murati i sur., 2015).

Učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na proliferaciju PCB-em tretiranih stanica prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77, uz predtretman kurkuminom u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 (KD/PCB 77) (Slika 11).

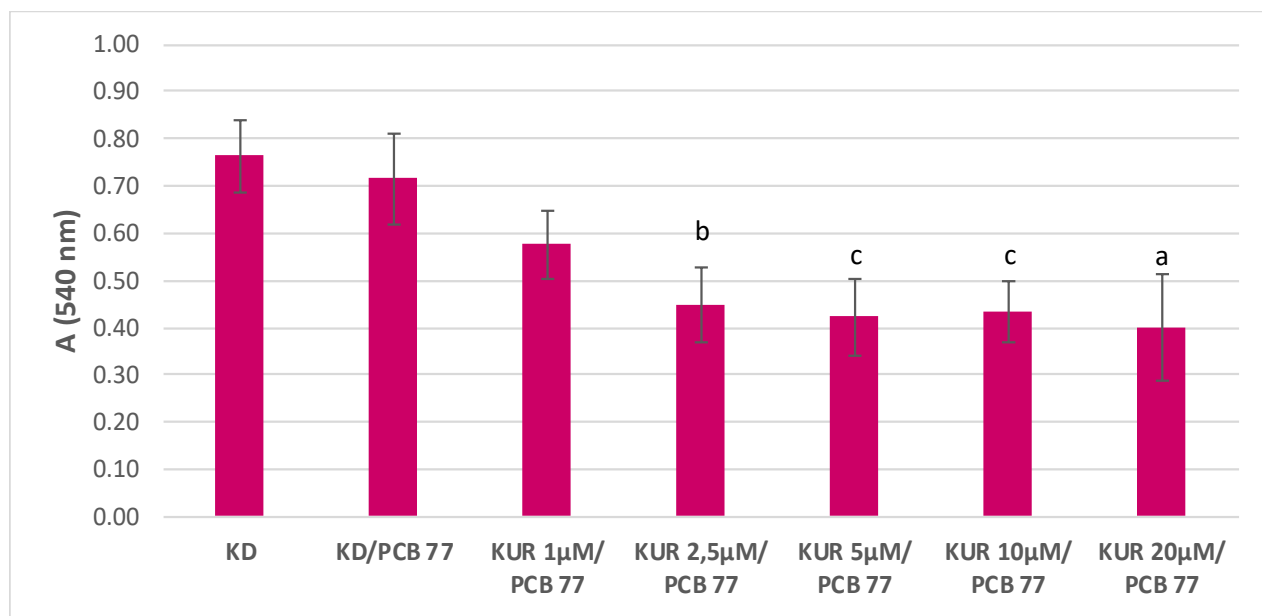


Slika 11. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 (KD/PCB 77) određen metodom *Trypan Blue*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,005$; ^b $p < 0,001$.

Provedenom metodom *Trypan Blue* uočen je statistički značajan citotoksični učinak i smanjenje broja stanica pri 5 μM koncentraciji kurkumina i 75 μM PCB-a 77 ($p < 0,005$) te izraziti citotoksični učinak pri višim koncentracijama kurkumina (10 μM i 20 μM) u kombinaciji s PCB-em 77 ($p < 0,001$) u odnosu na stanice koje su bile tretirane isključivo s PCB 77 (bez predtretmana kurkuminom). Predtretman stanica s nižim koncentracijama kurkumina (1 i 2,5 μM) koje su zatim bile izložene djelovanju PCB 77 također nije pokazao protektivan učinak te je primijećen

moćući sinergistički, inhibitoran učinak PCB-a i kurkumina na staničnu proliferaciju koji je izrazitiji pri višim dozama kurkumina (Slika 11).

Nakon provedene metode *Trypan Blue*, ispitan je mogućući protektivni učinak različitu koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) pri citotoksičnu djelovanju uzrokovanu PCB-em 77 na CHO-K1 stanicama metodu *Neutral Red*.

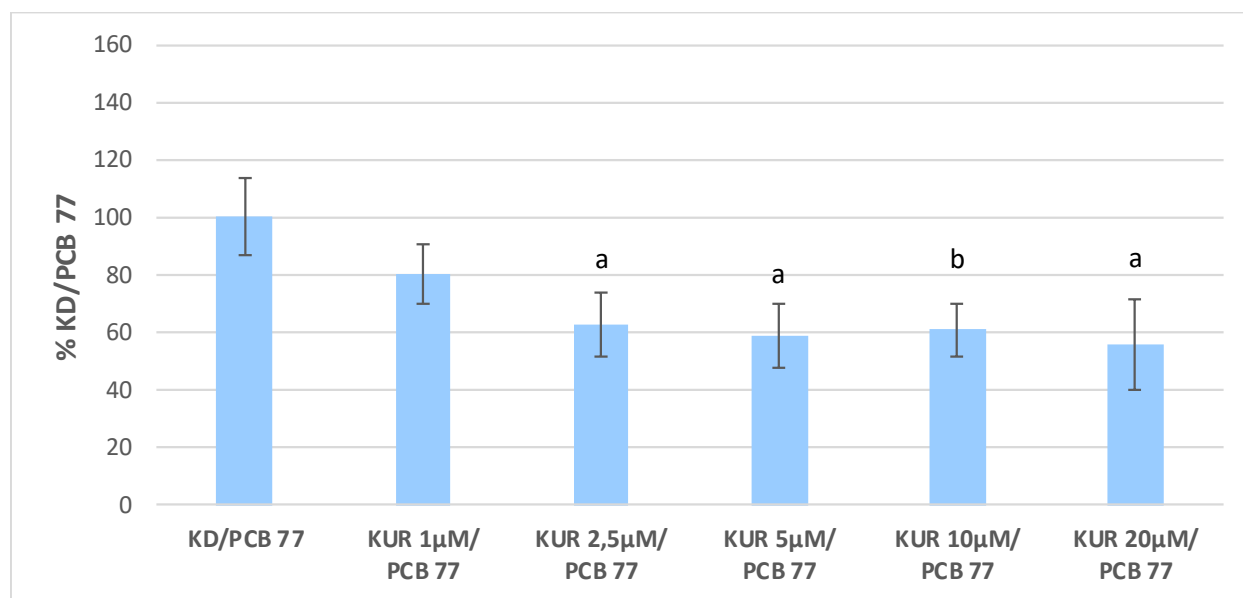


Slika 12. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 određen metodu *Neutral Red* (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 77 – stanice tretirane s PCB-em 77 i DMSO-om; KUR 1 μM /PCB 77 – KUR 20 μM /PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM te nakon 24 sata tretirane sa 75 μM PCB-em 77). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om): ^a $p < 0,025$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,005$.

Planarni PCB (poput PCB-a 77) uzrokuju poremećaje u normalnoj funkciji endotelnuh stanica i oksidacijski stres, a samim time potiču upalne odgovore u stanici (Hennig i sur., 2002). Kurkumin, kao vrlo dobar antioksidans može smanjiti oksidacijski stres u stanicama i na taj način umanjiti negativne posljedice upalnog odgovora. Ovo su potvrdili Loganes i suradnici 2017. godine u istraživanju učinka predinkubacije crijevnih epitelnuh stanica kurkuminom u koncentraciji od 1 μM , a rezultati su pokazali značajno smanjenje apoptoze stanica i moguću protektivni učinak kurkumina na stanice (Loganes i sur., 2017). Primjenom metode *Neutral Red* u

ovom istraživanju vidljivo je da kurkumin nije pokazao protektivan učinak pri tretmanu stanica s PCB 77 kao u prethodno navedenom istraživanju, dapače, primjenom viših koncentracija kurkumina (2,5 - 20 μM) uočen je statistički značajan ($p < 0,005 - p < 0,025$) pad vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak stanica (KD). Najmanji pad vijabilnosti stanica jest uočen kod predinkubacije CHO-K1 stanica koncentracijom kurkumina od 1 μM , ali nije statistički značajan (Slika 12).

Učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na staničnu vijabilnost prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 uz predtretman kurkuminom u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (KD/PCB 77) (Slika 13).

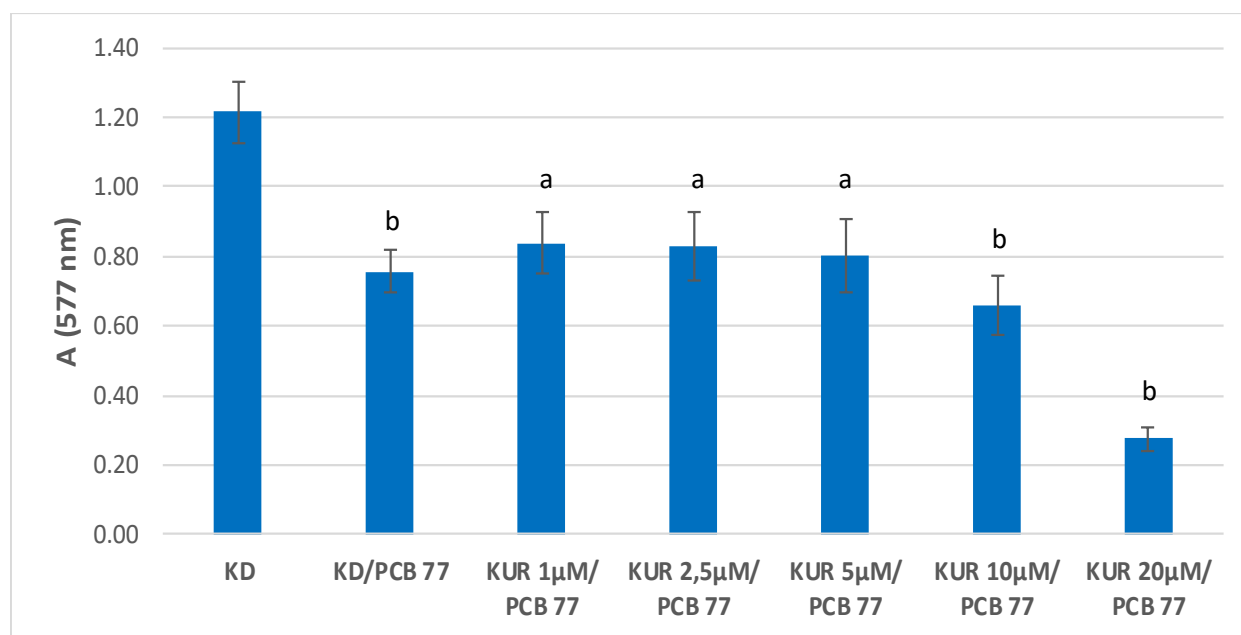


Slika 13. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 (KD/PCB 77) određen metodom *Neutral Red*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,025$.

Provedenom *Neutral Red* metodom uočeno je statistički značajno ($p < 0,05 - p < 0,025$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica kod predinkubacije stanica kurkuminom u koncentracijama 2,5 – 20 μM , a zatim i tretmanom sa 75 μM PCB-em 77 u odnosu na PCB-em tretirane stanice koje nisu bile predinkubirane kurkuminom. Niti jedna od primijenjenih koncentracija kurkumina nije pokazala protektivni učinak na citotoksičnost uzrokovanu PCB-em 77 kako je pretpostavljeno na početku eksperimenta. Najmanji pad vijabilnosti CHO-K1 stanica u

odnosu na kontrolu (KD/PCB 77) uočen je pri tretmanu stanica kurkuminom u koncentraciji od 1 μM što upućuje na buduća istraživanja u kojima bi se trebale ispitati koncentracije kurkumina niže od navedene (Slika 13).

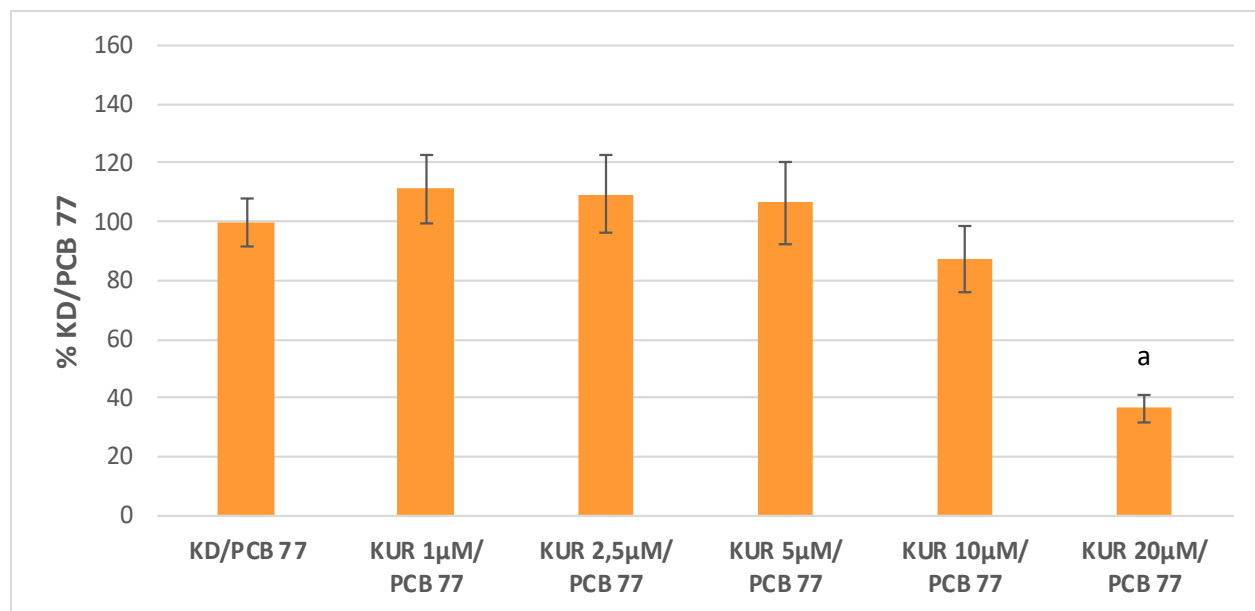
Nakon provedenih metoda *Trypan Blue* i *Neutral Red*, potencijalno protektivni učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na citotoksičnost induciranu PCB-em 77 ispitan je i metodom *Kenacid Blue*.



Slika 14. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 određen metodom *Kenacid Blue* (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 77 – stanice tretirane s PCB-em 77 i DMSO-om; KUR 1 μM /PCB 77 – KUR 20 μM /PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM te nakon 24 sata tretirane sa 75 μM PCB-em 77). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om) : ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$.

Iz Slike 14 je vidljivo da niti jedna od koncentracija kurkumina nije pokazala izraženiji protektivni učinak na PCB-em 77 uzrokovano smanjenje vijabilnosti stanica, čak štoviše, najveća primijenjena koncentracija kurkumina (20 μM) uzrokovala je dodatni pad vijabilnosti stanica.

Na Slici 15 prikazan je učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na staničnu vijabilnost izažen kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 uz predtretman kurkuminom u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (KD/PCB 77).

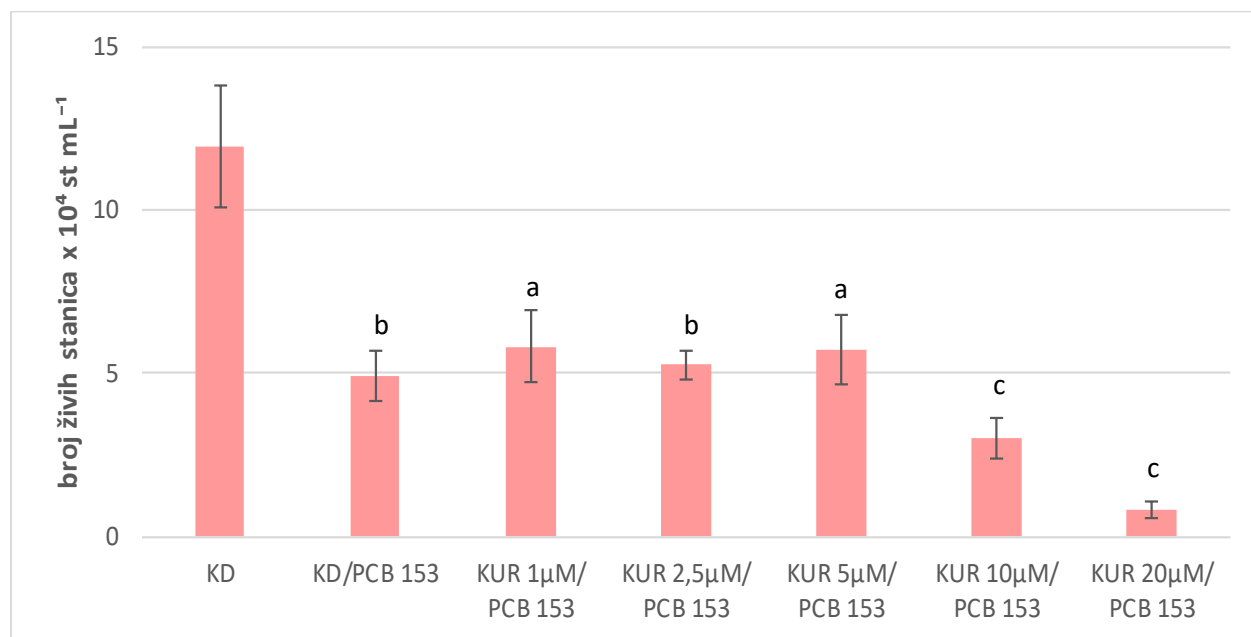


Slika 15. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 (KD/PCB 77) određen metodom *Kenacid Blue*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Iz Slike 15 možemo vidjeti kako je nakon provedene *Kenacid Blue* metode došlo do izrazitog i statistički značajnog smanjenja ($p < 0,001$) vijabilnosti CHO-K1 stanica nakon tretmana 75 μM PCB-em 77 uz predinkubaciju stanica sa 20 μM kurkuminom u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Kod predtretmana stanica nižim dozama kurkumina 1 – 5 μM i tretmana s PCB-em 77 došlo je do porasta vijabilnosti stanica u odnosu na stanice koje su tretirane samo PCB-em, no porast nije statistički značajan.

4.3. UČINAK KURKUMINA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-A 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA *TRYPAN BLUE*, *NEUTRAL RED* TE *KENACID BLUE*

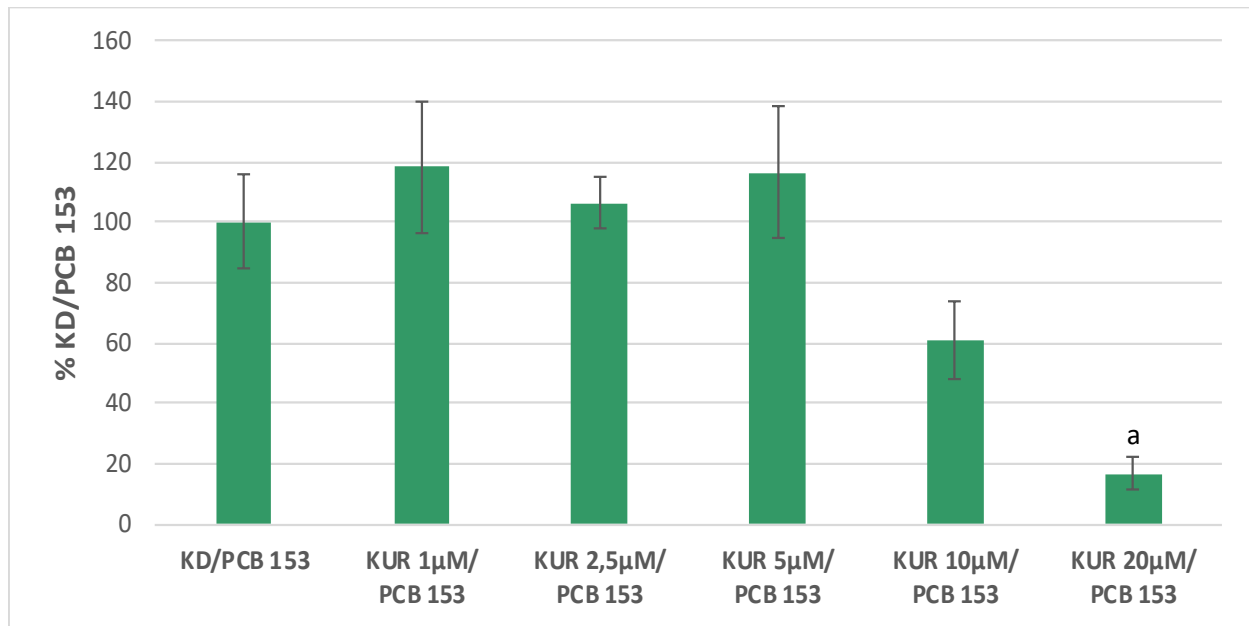
Mogući protektivni učinak kurkumina u dozama 1 – 20 μM na PCB-em 153 (75 μM) inducirano smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica određen je metodama *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *Kenacid Blue*.



Slika 16. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na broj CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue* nakon 48 sati (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 153 – stanice tretirane s PCB-em 153 i DMSO-om; KUR 1 μM /PCB 153 – KUR 20 μM /PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM te nakon 24 sata tretirane sa 75 μM PCB-em 153). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om): ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,005$; ^c $p < 0,001$.

Statistički značajna ($p < 0,005$) inhibicija proliferacije stanica i citotoksični učinak PCB-a 153 uočen je nakon tretmana stanica s PCB-em 153. Stanice predinkubirane kurkuminom (1 – 20 μM), a zatim tretirane s PCB 153 također su pokazale značajan pad u proliferaciji u odnosu na kontrolu (KD) nakon provedene *Trypan Blue* metode. Najveći pad vijabilnosti stanica uočen je primjenom većih koncentracija kurkumina (10 μM i 20 μM) ($p < 0,001$) (Slika 16).

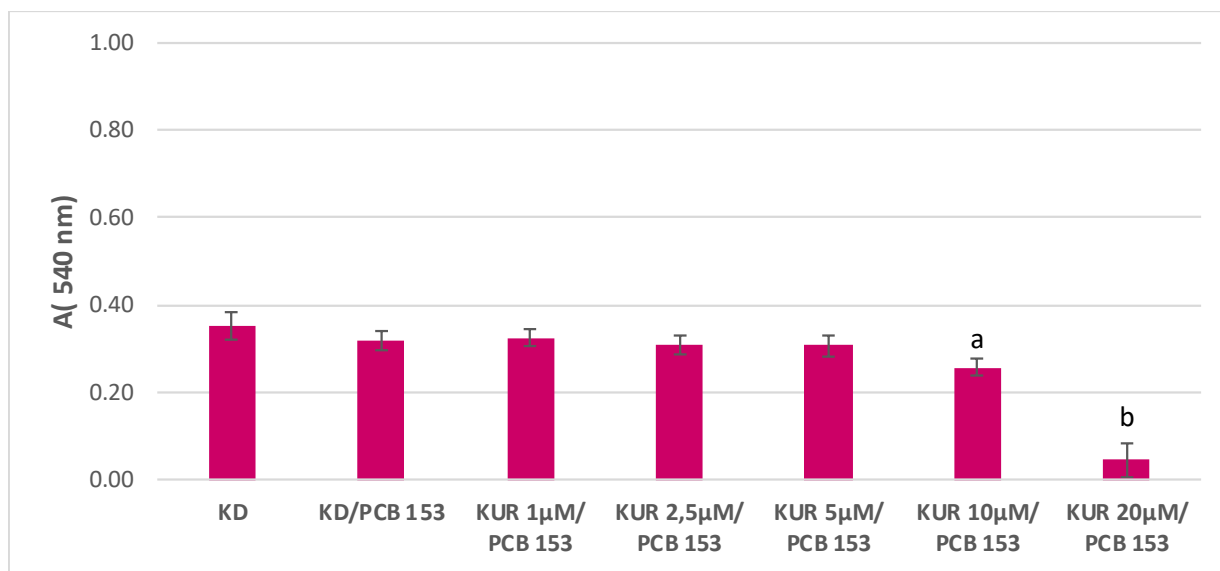
Učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na staničnu proliferaciju izražen kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 uz predtretman kurkuminom u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (KD/PCB 153) prikazan je na Slici 17.



Slika 17. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na broj CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 (KD/PCB 153) određen metodom *Trypan Blue*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica nakon provedene *Trypan Blue* metode uočeno je kod tretmana stanica sa 75 μM PCB-em 153 uz prethodnu inkubaciju s 20 μM kurkuminom u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 (bez predtretmana kurkuminom). Također je uočeno povećanje vijabilnosti PCB-em 153 tretiranih stanica, a koje su bile predinkubirane kurkuminom u nižim koncentracijama od 1, 2,5 te 5 μM , ali ovi rezultati nisu statistički značajni (Slika 17).

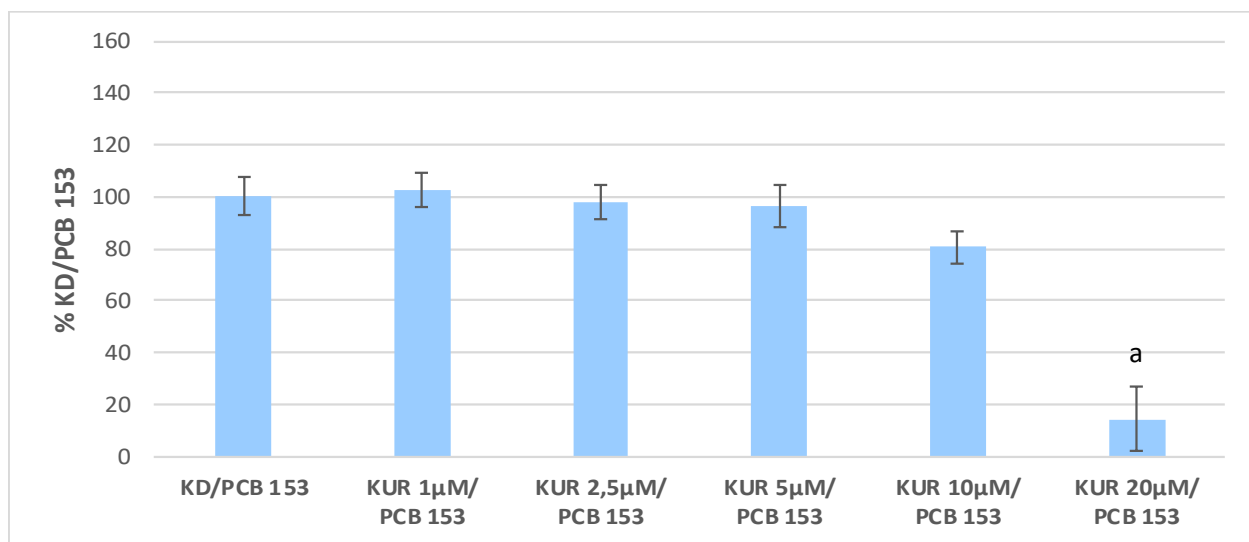
Moguće protektivno djelovanje kurkumina (1 – 20 μM) na PCB-em 153 inducirano smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica, nakon metode *Trypan Blue* praćeno je i pomoću metode *Neutral Red*.



Slika 18. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red* (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 153 – stanice tretirane s PCB-em 153 i DMSO-om; KUR 1 μM /PCB 153 – KUR 20 μM /PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM te nakon 24 sata tretirane sa 75 μM PCB-em 153). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om): ^a $p < 0,025$; ^b $p < 0,001$.

Nakon tretmana CHO-K1 stanica sa 75 μM PCB-em 153 uz prethodnu inkubaciju s različitim koncentracijama kurkumina (1 – 20 μM) metodom *Neutral Red* određeno je smanjenje proliferacije stanica u odnosu na kontrolni uzorak pri većim koncentracijama kurkumina (10 i 20 μM). Statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica uočeno je nakon predinkubacije stanica sa kurkuminom u koncentraciji od 20 μM ($p < 0,001$) (Slika 18).

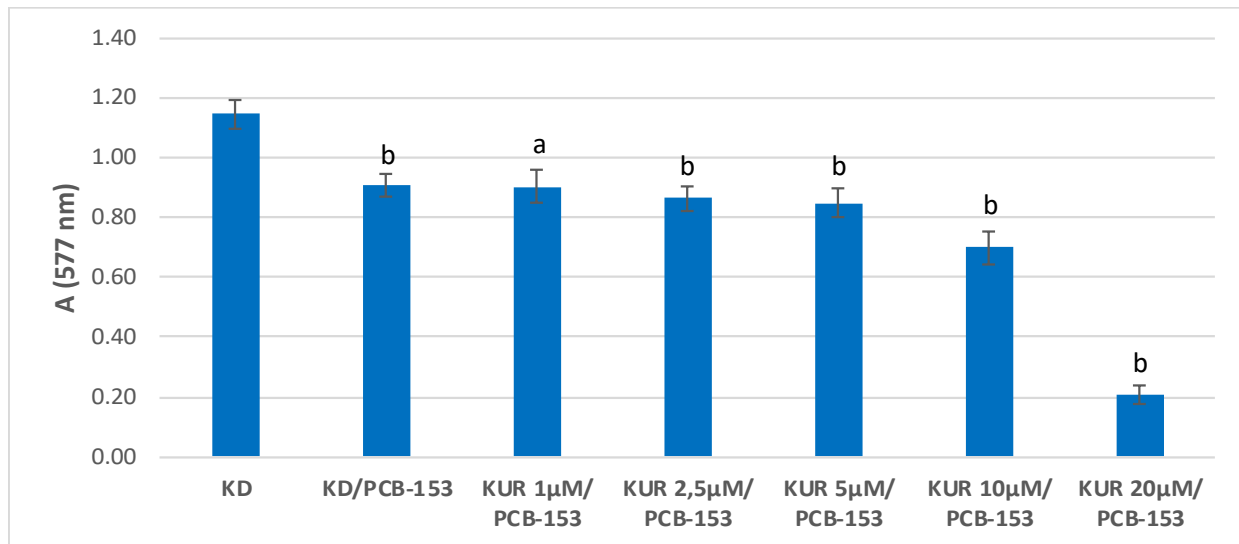
Učinak kurkumina na vijabilnost stanica određen metodom *Neutral Red* prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153, uz predtretman s kurkuminom u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (KD/PCB 153) (Slika 19).



Slika 19. Učinak kurkumina (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 (KD/PCB 153) određen metodom *Neutral Red*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$.

Iz Slike 19 možemo vidjeti kako je tretman stanica PCB-em 153 (75 μM) uz prethodnu inkubaciju kurkuminom (20 μM) uzrokovao statistički značajno ($p < 0,001$) povećano inhibitorno djelovanje na proliferaciju CHO-K1 stanica u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153. Blago smanjenje vijabilnosti stanica zamijećeno je primjenom doza kurkumina u koncentracijama od 2,5 i 5 μM i 75 μM PCB-a 153, a lagano povećanje vijabilnosti stanica uočeno je nakon tretmana PCB-em 153 i 1 μM kurkuminom u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.

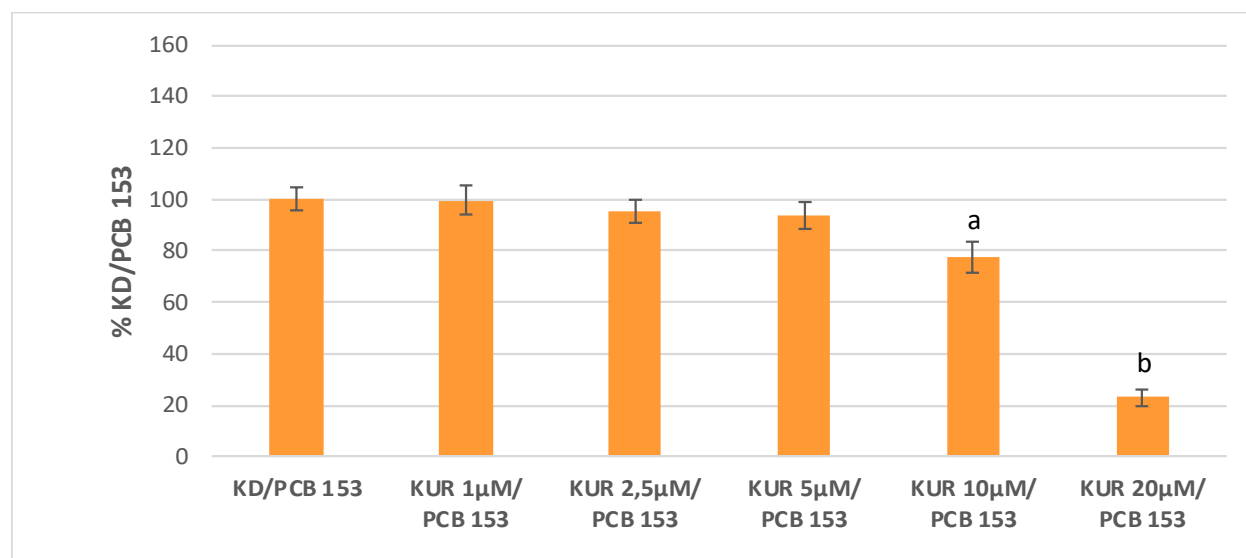
Nakon provedenih metoda *Trypan Blue* i *Neutral Red*, mogući protektivni učinak različitih koncentracija kurkumina na inducirano smanjenje stanične vijabilnosti djelovanjem PCB-a 153 ispitan je i *Kenacid Blue* metodom.



Slika 20. Učinak kurkumina (1 – 20 µM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 µM PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue* (KD – stanice tretirane s DMSO-om; KD/PCB 153 – stanice tretirane s PCB-em 153 i DMSO-om; KUR 1µM/PCB 153 – KUR 20µM/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 µM te nakon 24 sata tretirane sa 75 µM PCB-em 153). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test) u odnosu na kontrolu (KD – stanice tretirane s DMSO-om): ^a*p*<0,005; ^b*p*<0,001.

75 µM PCB 153 uzrokovao je statistički značajno (*p*<0,001) smanjenu vijabilnost stanica u odnosu na kontrolni uzorak praćeno metodom *Kenacid Blue*. Predinkubacija stanica s kurkuminom nije poboljšala vijabilnost stanica tretiranih s PCB 153, a pri višim koncentracijama kurkumin (10 i 20 µM) je pokazao inhibitorno – sinergistički učinak sa PCB-em 153 (Slika 20). Slične rezultate o toksičnom učinku neplanarnog PCB-a 153 pokazala je i *in vitro* studija koje su proveli Wojtowicz i suradnici na stanicama ovarija svinje. PCB 153 pokazao se kao endokrini modulator jer utječe na sekreciju spolnih hormona u stanicama ovarija, a dulja izloženost ovom kongeneru uzrokovala je visoku antiestrogenu aktivnost (Wojtowicz i sur., 2001).

Učinak različitih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) na proliferaciju PCB-em tretiranih stanica prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153, uz predtretman kurkuminom u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 prikazan je na Slici 21.



Slika 21. Učinak predinkubacije kurkuminom (1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 (KD/PCB 153) određen metodom *Kenacid Blue*. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$.

Provedenom *Kenacid Blue* metodom utvrđeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica kod tretmana PCB-em 153 (75 μM) uz predinkubaciju dozama kurkumina od 10 μM ($p < 0,01$), odnosno 20 μM ($p < 0,001$) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em. Primjenom doze kurkumina od 1 μM dostiže se gotovo ista vijabilnost kao i kod stanica tretiranih samo PCB-em 153, što upućuje na to da bi koncentracije kurkumina niže od ove mogle imati željeni protektivni učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica. Niti jedna od primijenjenih koncentracija kurkumina (1 – 20 μM) nije umanjila posljedice citotoksičnog učinka PCB-a 153 (Slika 21). Istraživanja koja uključuju predinkubaciju stanica različitim koncentracijama kurkumina, a zatim tretman organoklorinim spojevima su oskudna stoga je teško usporediti rezultate dobivene u ovom istraživanju s već postojećim rezultatima.

5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) uz primijenjene metode *Trypan Blue*, *Neutral Red* te *Kenacid Blue* pokazala se kao vrlo dobar alternativni test sustav za praćenje učinaka kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 77 ili PCB-a 153.
2. Statistički značajno ($p < 0,025$ – $p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica uočeno je pri tretmanu stanica s višim koncentracijama (10 i 20 μM) kurkumina u odnosu na kontrolni uzorak određeno metodom *Neutral Red*, dok je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti stanica nakon provedene *Kenacid Blue* metode uočeno samo pri najvišoj upotrijebljenoj koncentraciji kurkumina od 20 μM .
3. Statistički značajan ($p < 0,005$ – $p < 0,001$) citotoksični učinak i smanjenje broja stanica određen je *Trypan Blue* metodom nakon tretmana stanica s PCB-em 77 uz predinkubaciju kurkuminom u dozama 5 – 10 μM u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77.
4. Gubitak stanične vijabilnosti uočen je metodom *Neutral Red* nakon predinkubacije CHO-K1 stanica s kurkuminom u dozama 2,5 – 20 μM , a zatim tretiranih sa 75 μM PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77. Najmanja razlika u staničnoj proliferaciji i vijabilnosti uočena je tijekom predinkubacije stanica s kurkuminom u koncentraciji od 1 μM te tretiranih s PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77. Izrazito i statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje vijabilnosti stanica tretiranih s PCB-em 77 i predinkubiranih kurkuminom vs. stanice tretirane samo s PCB-em 77 uočeno je provedenom *Kenacid Blue* metodom pri najvišoj primijenjenoj dozi kurkumina od 20 μM . Predinkubacija stanica nižim dozama kurkumina (1, 2,5 i 5 μM) rezultirala je povećanjem stanične vijabilnosti, ali ne i statistički značajnim.
5. Metodom *Trypan Blue* uočeno je drastično smanjenje broja stanica uslijed citotoksičnog djelovanja 75 μM PCB-a 153 uz predinkubaciju stanica najvišom dozom kurkumina (20 μM) u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153. Porast broja stanica uočen je tijekom predinkubacije s nižim dozama kurkumina (1 – 5 μM) što ukazuje na mogući protektivni učinak nižih doza, ali rezultati nisu statistički značajni.
6. Usporedbom CHO-K1 stanica predinkubiranih s kurkuminom, a zatim tretiranih sa 75 μM PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153, nakon provedene *Neutral Red* metode, vidljivo je smanjenje vijabilnosti stanica pri dozi kurkumina od 20 μM , dok je najniža primijenjena doza kurkumina (1 μM) uzrokovala blago povećanje vijabilnosti.

Metodom *Kenacid Blue* statistički značajan ($p < 0,01$ – $p < 0,001$) pad vijabilnosti stanica predinkubiranih kurkuminom, a zatim tretiranih s PCB-em 153 vs. stanice tretirane samo s PCB-em 153 određen je za više primijenjene doze kurkumina (10 i 20 μM). Vijabilnost stanica predinkubiranih kurkuminom u koncentraciji od 1 μM , a zatim tretiranih sa PCB-em 153, slična je vijabilnosti stanica tretiranih samo s PCB-em 153.

7. Nakon provedenih metoda *Trypan Blue* i *Kenacid Blue* možemo zaključiti kako i planarni PCB 77 i *ortho*-supstituirani PCB 153 pokazuju citotoksične učinke na CHO-K1 stanicama i uzrokuju inhibiciju proliferacije i smanjenje vijabilnosti stanica.

8. Predtretman stanica s kurkuminom pri citotoksičnom učinku PCB-a 77 nije pokazao željeni – protektivni učinak, već se ispoljio dodatno negativni učinak, pogotovo pri najvišim primijenjenim dozama kurkumina (20 μM) što je potrebno dalje istražiti. Pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 153, kurkumin je u pojedinim slučajevima (niže doze) pokazao blagi protektivni učinak na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.

9. Potrebna su daljnja istraživanja u kojima će se ispitati učinci kurkumina na citotoksičnost induciranu PCB-ima u dozama nižim od onih primijenjenih u ovom radu, odnosno nižim od 1 μM kurkumina- posebno pri tretmanu stanica *ortho*- supstituiranim kongenerima PCB-a.

6. LITERATURA

Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. (2007) Curcumin: the Indian solid gold. *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**, 1-75.

Akram, M., Uddin, S., Ahmed, A., Usmanhani, K., Hannan, A., Mohiudin, E., Asif, M. (2010) *Curcuma Longa* and curcumin: a review article. *Rom. J. Biol.* **55**, 65-70.

Alcigir, M. E., Dogan, H. O., Yurdakok-Dikmen, B., Dogan, K., Vural, S. A., Yilmaz, F. M., Isgoren, A. (2018) An investigation of the effects of curcumin on the changes in the central nervous system of rats exposed to Aroclor 1254 in the prenatal period. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **17**, 132-143.

Alizadeh, M., Kheirouri, S. (2019) Curcumin reduces malondialdehyde and improves antioxidants in humans with diseased conditions: a comprehensive meta-analysis of randomized controlled trials. *BioMedicine* **9**, 10-22.

Allen, J. R., Norback, D. H. (1976) Pathobiological responses of primates to polychlorinated biphenyl exposure. *Proceedings of the National Conference on Polychlorinated Biphenyls. National Conference on Polychlorinated Biphenyls, Chicago*, str. 43-49.

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., Aggarwal, B. B. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharmaceutics* **4**, 807-818.

Arsenescu, V., Arsenescu, R. I., King, V., Swanson, H., Cassis, L. A. (2008) Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* **116**, 761-768.

ATCC (2020) Product Description – CHO-K1 (CCL-61). ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx#>>. Pristupljeno 05. travnja 2020.

ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated byphenyls (PCBs). ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, <<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp17.pdf>>. Pristupljeno 20. ožujka 2020.

Atterwill, C. K. (1995) Alternative method of assessing toxicity. U: *In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Vol 43 (O'Hare, S., Atterwill, C. K., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 1-9.

Aulerich, R. J., Ringer, R. K. (1977) Current status of PCB toxicity to mink, and effect on their reproduction. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **6**, 279-292.

Bonefeld-Jørgensen, E. C., Andersen, H. R., Rasmussen, T. H., Vinggaard, A. M. (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* **158**, 141-153.

Burgos-Morón, E., Calderón-Montano, J. M., Salvador, J., Robles, A., López-Lázaro, M. (2010) The dark side of curcumin. *Int. J Cancer* **126**, 1771-1775.

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/BIOS Scientific Publishers, London, New York. doi: 10.4324/9780203427835

Carter, M., Shieh, J. (2015) Cell culture techniques. U: *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 2. izd. (Carter, M., Shieh, J., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 295-310.

Crinnion, W. J. (2011) Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Altern. Med. Rev.* **16**, 5-13.

Dickerson, A. S., Ransome, Y., Karlsson, O. (2019) Human prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and risk behaviors in adolescence. *Environ. Int.* **129**, 247- 255.

Đinović-Stojanović, J., Spasić, J., Popović, A., Vranić, D., Nikčević, M., Hegediš, A., Nikolić, D. (2013) Distribucija organohlorinih pesticida i polihlorovanih bifenila u dve vrste riba iz Dunava. *Tehnol. mesa* **54**, 69-78.

EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. EFSA – European Food Safety Authority, Parma, <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/284>>. Pristupljeno 28. ožujka 2020.

EFSA (2010) Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. EFSA – European Food Safety Authority, Parma, <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1701>>. Pristupljeno 28. ožujka 2020.

FAO (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <<http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/fao/Manual%20on%20the%20Production%20and%20Use%20of%20Live%20Food%20for%20Aquaculture.pdf>>. Pristupljeno 5. travnja 2020.

Freshney, R. I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Gerhard, I., Daniel, V., Link, S., Monga, B., Runnebaum, B. (1998) Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environ. Health Perspect.* **106**, 675-681.

Ghavami, R., Sajadi, S. M. (2010) Semi-empirical topological method for prediction of the relative retention time of polychlorinated biphenyl congeners on 18 different HR GC columns. *Chromatographia* **72**, 523-533.

Gordeev, A. A., Chetverin, A. B. (2017) Methods for screening live cells. *Biochemistry* **83**, 173-222.

Grimm, F. A., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H. J., Ludewig, G., Hornbuckle, K. C., Duffel, M. W., Bergman, A., Robertson, L. W. (2015) Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Crit. Rev. Toxicol.* **45**, 245–272.

Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A. E., Robertson, L. W. (2002) Proinflammatory properties of coplanar PCBs: In vitro and in vivo evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **181**, 174-183.

Herceg Romanić, S. (2002) Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisutnost u iglicama crnogoričnog drveća. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **53**, 21-30.

Honegger, P. (2001) Overview of cell and tissue culture techniques. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **4**, 1-12.

IARC (2016) Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon, <<https://publications.iarc.fr/131>>. Pristupljeno 20. ožujka 2020.

Jankun, J., Wyganowska, M., Dettlaff, K., Jelińska, A., Surdacka, A., Watróbska-Świetlikowska, D., Skrzypczak-Jankun, E. (2016) Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation (Review). *Int. J. Mol. Med.* **37**, 1151- 1158.

Jung, J., Hah, K., Lee, W., Jang, W. (2017) Meta-analysis of microarray datasets for the risk assessment of coplanar polychlorinated biphenyl 77 (PCB77) on human health. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **9**, 161-168.

Klocke, C., Lein, P. J. (2020) Evidence implicating non-dioxin-like congeners as the key mediators of polychlorinated biphenyl (PCB) developmental neurotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-37.

Kmetič, I., Murati, T., Kvakar, K., Ivanjko, M., Šimić, B. (2012) Poliklorirani bifenili – toksičnost i rizici. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **4 (1)**, 71-80.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **56**, 195-204.

Kuiper, J., Moran, M., Cvetković-Cvrlje, M. (2016) Exposure to polychlorinated biphenyl- 153 decreases incidence of autoimmune Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *J. Immunotoxicol.* **13**, 850-860.

La Rocca, C., Mantovani, A. (2006) From environment to food: the case of PCB. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **42**, 410-416.

Leong, J. Y., Blachman-Braun, R., Patel, A. S., Patel, P., Ramasamy, R. (2019) Association between polychlorinated biphenyl 153 exposure and serum testosterone levels: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *Transl. Androl. Urol.* **8**, 666-672.

Lestari, M. L., Indrayanto, G. (2014) Curcumin. U: *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* (Brittain, H. G., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 113-204.

Loganes, C., Lega, S., Bramuzzo, M., Vecchi Brumatti, L., Piscianz, E., Valencic, E., Tommasini, A., Marcuzzi, A. (2017) Curcumin anti-apoptotic action in a model of intestinal epithelial inflammatory damage. *Nutrients* **9**, 578.

Maervoet, J., Covaci, A., Schepens, P., Sandau, C. D., Letcher, R. J. (2004) A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites. *Environ. Health Perspect.* **112**, 291-294.

Miltenburger, H. G. (1994) Cell systems for *in vitro* toxicology. U: *Animal Cell Technology Products of Today, Prospects for Tomorrow* (Spider, R. E., Griffiths, J. B., Berthold, W., ured.), Butterworth – Heinemann Ltd., Oxford, str. 697-710.

Mullerova, D., Pesta, J., Dvorakova, J., Cedikova, M., Kulda, V., Dvorak, B., Bouchalova, V., Kralickova, M., Babuska, V., Kuncova, J., Langmajerova, J., Muller, L. (2017) Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiol. Res.* **66**, 653-662.

Murati, T., Šimić, B., Brozovic, A., Kniewald, J., Gospić, A. M., Bilandžić, N., Kmetič, I. (2015) PCB 77 action in ovary cells – toxic effects, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Toxicol. Mech. Methods* **25**, 302-311.

Pescosolido, N., Giannotti, R., Plateroti, A. M., Pascarella, A., Nebbioso, M. (2014) Curcumin: therapeutical potential in ophthalmology. *Planta Med.* **80**, 249-254.

Pessah, I. N., Lein, P. J., Seegal, R. F., Sagiv, S. K. (2019) Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls and related organohalogens. *Acta Neuropathol.* **138**, 363-387.

Petriello, M. C., Hoffman, J. B., Sunkara, M., Wahlang, B., Perkins, J. T., Morris, A. J., Henning, B. (2016) Dioxin-like pollutants increase hepatic flavin containing monooxygenase (FMO3) expression to promote synthesis of the pro-atherogenic nutrient biomarker trimethylamine N-oxide from dietary precursors. *J. Nutr. Biochem.* **33**, 145-153.

Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., Mitry, R. R. (2012) Introduction to cell culture. U: *Human Cell Culture Protocols*, 3. izd. (Mitry, R. R., Hughes, R. D., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 1-13.

- Ravindranath, V., Chandrasekhara, N. (1980) Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* **16**, 259-265.
- Reddy, A. V. B., Moniruzzaman, M., Aminabhavi, T. M. (2019) Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis. *Chem. Eng. J.* **358**, 1186-1207.
- Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., Levin, W., Denomme, M. A., Fujita, T. (1985) PCBs: structure- function relationships and mechanism of action. *Environ. Health Perspect.* **60**, 47-56.
- Sargent, L., Roloff, B., Meisner, L. (1989) *In vitro* chromosome damage due to PCB interactions. *Mutat. Res.* **224**, 79-88.
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., Steward, W. P. (2005) Curcumin: the story so far. *Eur. J. Cancer* **41**, 1955-1968.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P. S. (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* **64**, 353–356.
- Simmons, S. L., Cummings, J. A., Clemens, L. G., Nunez, A. A. (2005) Exposure to PCB 77 affects the maternal behavior of rats. *Physiol. Behav.* **84**, 81-86.
- Sinkkonen, S., Paasivirta, J. (2000) Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* **40**, 943-949.
- Tang, M., Yin, S., Zhang, J., Chen, K., Jin, M., Liu, W. (2018) Prenatal exposure to polychlorinated biphenyl and umbilical cord hormones and birth outcomes in an island population. *Environ. Pollut.* **237**, 581-591.
- Tang, P., Xu, J., Louey, A., Tan, Z., Yongky, A., Liang, S., Li, Z. J., Weng, Y., Liz, S. (2020) Kinetic modeling of Chinese hamster ovary cell culture: factors and principles. *Crit. Rev. Biotechnol.* **40**, 1-17.
- Tehrani, R., Van Aken, B. (2014) Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: sources, fate, and toxicities. *Environ Sci Pollut Res Int.* **21**, 6334-6345.

Toft, G. (2014) Persistent organochlorine pollutants and human reproductive health. *Dan. Med. J.* **61**, 1-15.

Treon, J. F., Cleveland, F. P., Cappel, J. W., Atchley, R. W. (1956) The toxicity of the vapors of aroclor 1242 and aroclor 1254. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Q.* **17**, 204-213.

Trujillo, J., Chirino, Y. I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A. C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J. (2013) Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol.* **1**, 448-456.

Wojtowicz, A., Ropstad, E., Gregoraszcuk, E. (2001) Estrous cycle dependent changes in steroid secretion by pig ovarian cells in vitro to polychlorinated biphenyl (PCB 153). *Endocr. Regul.* **35**, 223-228.

WHO (2000) Polychlorinated biphenyls (PCBs). WHO – World Health Organization, Regional office for Europe, Copenhagen, <http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0016/123064/AQG2ndEd_5_10PCBs.PDF>

. Pristupljeno 20. ožujka 2020.

WHO (2003) Polychlorinated biphenyls: human health aspects. WHO - World Health Organization, Geneva, <<https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad55.pdf>>. Pristupljeno 20. ožujka 2020.

Williams, R. S., Curnick, D. J., Barber, J. L., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Perkins, M., Jobling, S., Jepson, P. D. (2020) Juvenile harbor porpoises in the UK are exposed to a more neurotoxic mixture of polychlorinated biphenyls than adults. *Sci. Total Environ.* **708**, 1-10.

Yao, T., Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 99–117.

Yoon, M., Campbell, J. L., Andersen, M. E., Clewell, H. J. (2012) Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Crit. Rev. Toxicol.* **42(8)**, 633-652.

Yurdakok-Dikmen, B., Alcigir, M. E., Dogan, H. O., Dogan, K., Vural, S. A., Yilmaz, F. M., Isgoren, A. (2018) Effects of curcumin on polychlorinated biphenyls exposed F98 glioma cells. *Bulg. J. Vet. Med.* **21(2)**, 1-11.

Zhou, H., Beeveres, C. S., Huang, S. (2011) The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets* **12**, 332-347.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long vertical stroke at the end, positioned above a horizontal line.

Dorotea Palić