

Potencijal niskotemperaturnih eutektskih otapala za zamjenu dimetilsulfoksida

Šarac, Sunčica

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:946689>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Sunčica Šarac

**POTENCIJAL
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA
ZAMJENU DIMETILSULFOKSIDA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević te uz pomoć pri izradi mag. ing. Martine Bagović.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712) pod voditeljstvom prof. dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković.



Želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na prenesenom znanju, uloženom trudu i vremenu pri izradi ovog diplomskog rada, ali i razumijevanju, strpljivosti te srdačnosti. Također se zahvaljujem i mag. ing. Martini Bagović na pomoći pri provođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Nadalje, veliko hvala mojim roditeljima bez kojih ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam što ste vjerovali u mene i omogućili mi bezbrižno studiranje!

Mojim sestrama, hvala na podršci kroz sve teške situacije, ali i za sve sretne trenutke koje smo zajedno proživjele!

Hvala mom M, bez tebe bi sve bilo puno teže.

Naposljetku, hvala cijeloj obitelji i prijateljima na pruženoj ljubavi i potpori!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

POTENCIJAL NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA ZAMJENU DIMETILSULFOKSIDA

Sunčica Šarac, univ. bacc.ing. biotechn. 0058211613

Sažetak: Zbog rastućeg broja dokaza o toksičnom djelovanju dimetilsulfoksida (DMSO) na ljudsko zdravlje potrebno je pronaći alternativna otapala koja će moći zamijeniti široko korišteni DMSO. Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su niskotoksična i biorazgradiva te se jednostavno pripremaju. U ovom radu ispitana je citotoksičnost četiri DES-a (Bet:U, TMAO:Gua, TMAO:U i GPC:U) prema HeLa i HaCaT stanicama te je najslabije citotoksično djelovanje, slabije od DMSO-a, pokazao Bet:U. Odabrani DES-ovi (Bet:U, TMAO:U i ChCl:U) također su primijenjeni kao krioprotektivni agensi pri zamrzavanju HeLa i HaCaT staničnih linija, ali niti jedno niskotemperaturno eutektičko otapalo nije iskazalo krioprotektivna svojstva jednaka ili bolja DMSO-u. Primjenom COSMOtherm programa predviđena je topljivost ferocena u hidrofilnim i hidrofobnim DES-ovima te je pokazano da su hidrofobni DES-ovi bolji izbor za otapanje ferocena. Također je ispitana mogućnost otapanja biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila u Ty:C₈ i Me:C₈ te potom učinak otopina spojeva u DES-ovima na HeLa staničnoj liniji. Pri ispitanim koncentracijama nije zapažen značajniji učinak biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na proliferaciju stanica, u odnosu na kontrolne stanice.

Ključne riječi: niskotemperaturna eutektička otapala, dimetilsulfoksid, biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila, krioprezervacija, citotoksičnost

Rad sadrži: 47 stranica, 16 slika, 1 tablicu, 66 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. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Martina Bagović, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (član)*
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenski član)

Datum obrane: 22. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

POTENTIAL OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS TO REPLACE DIMETHYL SULFOXIDE

Sunčica Šarac, univ. bacc.ing. biotechn. 0058211613

Abstract: Increasing evidence of the toxic effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on human health made it necessary to find alternative solvents that can replace the widely used DMSO. Deep eutectic solvents (DES) are low-toxic, biodegradable and easily prepared. In this study, the cytotoxicity of four DESs (Bet:U, TMAO:Gua, TMAO:U, and GPC:U) towards HeLa and HaCaT cells was investigated, with Bet:U showing the least cytotoxic effect, which was lower than that of DMSO. Selected DESs (Bet:U, TMAO:U, and ChCl:U) were also applied as cryoprotective agents for HeLa and HaCaT cell lines, but none of the deep eutectic solvents showed cryoprotective properties equal to or better than DMSO. By using the COSMO_{therm} program, the solubility of ferrocene in hydrophilic and hydrophobic DES has been predicted, demonstrating that hydrophobic DESs are a better choice for dissolving ferrocene. Additionally, the possibility of dissolving bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivative in Ty:C₈ and Me:C₈ was examined, followed by assessing the effect of solutions on HeLa cell line. At the tested concentrations, there was no significant impact of bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivative on cell proliferation compared to control cells.

Keywords: deep eutectic solvents, dimethyl sulfoxide, bioconjugates of ferrocene and 2-thiouracil derivative, cyopreservation, cytotoxicity

Thesis contains: 47 pages, 16 figures, 1 table, 66 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Kristina Radošević, PhD

Technical support and assistance: *Martina Bagović, mag. ing.*

Reviewers:

1. Ana Bielen, PhD, Associate professor (president)
2. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (member)
4. Teuta Murati, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 22nd, 2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. DIMETILSULFOKSID – OSNOVNA SVOJSTVA, PREDNOSTI I NEDOSTATCI..	3
2.2. PRIMJENA DIMETILSULFOKSIDA.....	4
2.2.1. Primjena dimetilsulfoksida za krioprezervaciju	5
2.2.2. Primjena dimetilsulfoksida za otapanje organskih spojeva.....	8
2.3. ALTERNATIVNA OTAPALA KAO ZAMJENA ZA DIMETILSULFOKSID	9
2.3.1. Alternativna otapala za krioprezervaciju.....	9
2.3.2. Alternativna otapala za otapanje organskih spojeva	10
2.4. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA	11
2.5. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	14
2.5.1. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za krioprezervaciju	15
2.5.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za otapanje organskih spojeva ..	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila	18
3.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala	18
3.1.3. Kemikalije	18
3.1.4. Puferi i otopine.....	19
3.1.5. HeLa i HaCaT stanične linije	19
3.1.6. Uređaji i oprema	20
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	20
3.2.2. Uzgoj HeLa i HaCaT stanica	21
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo.....	22
3.2.4. Ispitivanje citotoksičnosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala	22
3.2.5. Krioprezervacija HeLa i HaCaT stanica	23
3.2.6. Primjena COSMO <i>therm</i> programa za predviđanje topljivosti ferocena u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	24
3.2.7. Ispitivanje učinka otopina biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila u DES-ovima na HeLa staničnu liniju.....	24
3.2.8. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI DES-OVA I DMSO-A NA HeLa I HaCaT STANIČNIM LINIJAMA.....	27
4.2. PRIMJENA DES-OVA ZA KRIOPREZERVACIJU HeLa I HaCaT STANIČNIH LINIJA	29

4.3. PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI FEROCENA U ODABRANIM DES-OVIMA POMOĆU PROGRAMA COSMOtherm	36
4.4. UČINAK OTOPINA BIKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2- TIOURACILA U DES-OVIMA NA HeLa STANIČNU LINIJU	39
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA.....	42

1. UVOD

Dimetilsulfoksid (DMSO) je bezbojna tekućina koja se dobiva kao nusproizvod u proizvodnji papira. Polarno je otapalo u kojem se otapaju mnoge polarne i nepolarne molekule te je kao takvo pronašlo primjenu u različitim granama industrije. DMSO je često korišten u analitičkim metodama, kao medij za provođenje kemijskih reakcija te kao industrijsko otapalo za organsku sintezu. Također je, zbog svoje sposobnosti vezanja i transporta malih molekula kroz membrane korišten na području medicine prilikom formulacije lijekova. Uz sve navedeno, jedno od područja u kojem se DMSO smatra zlatnim standardom, je zasigurno područje krioprezervacije. Krioprezervacija je proces čuvanja biološkog materijala pri vrlo niskim temperaturama. Međutim, postizanje niskih temperatura pri kojima se zamrznuti materijal čuva, dovodi do stvaranja oštećenja unutar biološkog materijala. Da bi se smanjila vjerojatnost stvaranja oštećenja stanica, prilikom zamrzavanja koriste se krioprotektivni agensi. DMSO se može klasificirati kao prodirući krioprotektant niske molekularne mase te se koristi pri zamrzavanju različitih tipova stanica. Međutim, stanice koštane srži zamrznute uz primjenu DMSO-a kao krioprotektanta, mogu uzrokovati negativne nuspojave nakon transplantacije. Također je pokazano da DMSO uzrokuje promjene genoma i apoptozu stanica pri razvoju mozga, ima toksično djelovanje na embrio, a u kompleksu s biološki aktivnim molekulama, može uzrokovati smanjenje učinkovitosti takvih molekula.

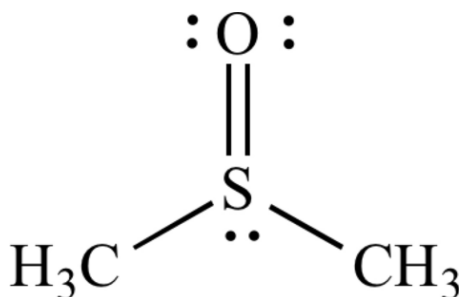
Zbog svega navedenog potrebno je pronaći otapalo koje će zamijeniti DMSO u navedenim područjima primjene. Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) definiraju se kao smjesa dvaju ili više komponenata koja ima talište niže od zasebnih komponenata. Proces pripreme DES-ova odgovara načelima zelene kemije jer se sastoji od miješanja komponenata uz blago zagrijavanje. Postoje brojni dokazi o niskoj citotoksičnosti različitih DES-ova te o mogućnosti biorazgradnje istih. Dokazano je da se mogu koristiti kao medij za provođenje enzimskih reakcija, ali i za povećanje prinosa procesa ekstrakcije. Također, postoje dokazi o uspješnoj primjeni DES-ova pri formulaciji lijekova. Nadalje, primarni metaboliti, koji se često koriste za pripravu DES-ova, pronađeni su u životinjama koje preživljavaju na vrlo niskim temperaturama što je potaknulo istraživanje primjene DES-ova na području krioprezervacije.

Cilj ovog rada bio je pronaći DES koji može zamijeniti DMSO na različitim područjima primjene. Ispitana je citotoksičnost četiri DES-a na dvije stanične linije – HeLa i HaCaT. Odabrani DES-ovi zatim su korišteni kao krioprotektivni agensi pri zamrzavanju spomenutih stanica. DES-ovi su, također, korišteni za otapanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila, sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, te je ispitan učinak otopina tih spojeva u DES-ovima na HeLa staničnu liniju.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DIMETILSULFOKSID – OSNOVNA SVOJSTVA, PREDNOSTI I NEDOSTATCI

Dimetilsulfoksid (DMSO), čija je molekulska formula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, a molekularna struktura prikazana na slici 1, se dobiva kao nusprodukt iz drvene pulpe u procesu proizvodnje papira. To je bezbojna tekućina koja je vrlo brzo pronašla primjenu kao polarno otapalo koje se može miješati s vodom te u kojem su topive brojne polarne i nepolarne molekule. Također je primijećeno da DMSO ima sposobnost vezanja te transporta malih molekula kroz membrane (Capriotti i Capriotti, 2012). Zbog navedene sposobnosti Horita i Weber (1964) su proveli istraživanje DMSO-a kao potencijalnog prijenosnika malih molekula kroz kožu i sluznicu. Uz sposobnost prolaska kroz membrane, DMSO također pokazuje i protuupalna svojstva, djeluje kao lokalni analgetik i slabi bakteriostatik (Aronson, 2016).



Slika 1. Molekularna struktura dimetilsulfoksida (Karim i sur., 2022)

Uz sve navedene prednosti i mogućnosti primjene, DMSO-a posjeduje i mnoga negativna svojstva te njegova primjena može imati neželjene nuspojave na različite sustave organa i tkiva. Prilikom pripreme za transplantaciju koštane srži, hematopoetske matične stanice se smrzavaju te se kao krioprotektant najčešće koristi DMSO. Tijekom i neposredno nakon primanja matičnih stanica primijećene su brojne nuspojave poput hipotenzije i hipertenzije, anafilaktičke reakcije te zastoja srca, a sve se mogu povezati s DMSO-om (Aronson, 2016). Međutim, Perseghin i sur. (2000) zaključili su da se postupkom krioprezervacije u kojem je ograničena ukupna količina DMSO-a uspješno može izbjeći toksičnost DMSO-a bez utjecaja na učinkovitost krioprezervacije.

Nadalje, istraživanja na životinjama pokazala su razvoj katarakte kod pasa, zečeva, svinja i zamoraca nakon primjene visokih koncentracija DMSO-a. Iako je DMSO korišten za liječenje različitih bolesti kod ljudi, ne postoje dokazi o razvoju katarakte ili drugih promjena oka kod ljudi (Randall, 1982). DMSO je korišten i kao terapija za cerebralni edem kod pacijenata s ozljedama glave. Takvi pacijenti često budu donori bubrega za transplantaciju, stoga je bilo potrebno utvrditi kakav utjecaj DMSO ima na funkciju bubrega. Istraživanje Muther i Bennett (1980) pokazalo je da DMSO kod mnogih pacijenata uzrokuje hemolizu te hemoglobinuriju tj. izlučivanje hemoglobina mokraćom zbog čega dolazi do pojave crvene diskoloracije mokraće. Unatoč navedenom, DMSO nema negativan utjecaj na funkciju bubrega. Topikalna primjena DMSO-a u visokim koncentracijama može izazvati crvenilo i pojavu plikova na koži, ali i gastrointestinalne probleme poput mučnine, povraćanja i drugih (Aronson, 2016).

2.2. PRIMJENA DIMETILSULFOKSIDA

Primjena DMSO-a u medicinskim područjima najčešće spada u tri kategorije: konzervacija organa i tkiva, kao pomoćna tvar koja poboljšava penetraciju aktivnih tvari te kao aktivna farmaceutska tvar. DMSO se u prošlosti koristio za liječenje različitih bolesti, a neke od primjena navedene su u prethodnom ulomku.

Šezdesetih godina prošlog stoljeća korištenje DMSO-a kao terapeutika uvelike je smanjeno nakon postroženja kriterija od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration, FDA*). Ipak, 1978. godine FDA je odobrila primjenu 50 %-tne otopine DMSO-a za liječenje neinfektivne upale mjehura. Koristi se i za liječenje infekcija uha, ali i smanjenje otekline kod životinja, i to samostalno ili u kombinaciji sa steroidima (Capriotti i Capriotti, 2012).

Jacob i sur. (1964) dokazali su da DMSO prolazi kroz kožu i to istraživanjem u kojem je DMSO korišten za liječenje dermatitisa. Ovo otkriće potaknulo je brojna istraživanja o učinkovitosti DMSO-a u liječenju drugih kožnih oboljenja. Ta istraživanja dokazala su učinkovitost DMSO-a u liječenju različitih kožnih promjena i oboljenja, poput sklerodermije, keloidnih te hipertrofičnih ožiljaka. Pacijenti koji boluju od sklerodermije primijetili su povećanu elastičnost kože te smanjenje boli na zahvaćenim područjima, a keloidni i hipertrofični ožiljci su se, nakon nekoliko mjeseci korištenja DMSO-a, izravnali.

DMSO se pokazao uspješnim kao aktivna tvar za liječenje dekubitusa odnosno rana nastalih zbog pritiska, kao i za liječenje nekroze kože (Capriotti i Capriotti, 2012).

Istraživanje Aguilar i sur. (2002) dalo je zanimljive rezultate vezane uz utjecaj DMSO-a na replikacijski ciklus herpes simplex virusa (HSV). DMSO utječe na stupanj infektivnosti, inhibira stupanj replikacije virusne deoksiribonukleinske kiseline te reducira razinu transkripcije mnogih virusnih gena. Zbog svega navedenog može se zaključiti da DMSO posjeduje i antivirusno djelovanje te da bi se mogao koristiti kao aktivna tvar za liječenje herpesa, a ne samo kao nosač antivirusnih lijekova.

Važna sposobnost DMSO-a je mogućnost vezanja i prenošenja malih molekula kroz različite barijere, pa tako i kroz kožnu barijeru. Postoje dokazi da DMSO može povećati difuziju aktivnih tvari kroz vanjski sloj epiderme i to narušavanjem njene funkcije kao barijere. Do toga dolazi zbog interakcija s unutarmembranskim lipidima koje uzrokuju reverzibilno pomicanje hidrofilnih „glava“. Na ovaj način stvara se permeabilniji prostor za ulazak aktivnih tvari vezanih na molekulu DMSO-a. Drugi mehanizam djelovanja DMSO-a je povećanje topljivosti slabo topljivih aktivnih tvari. Na ovaj način se penetracija poboljšava jer je na membransku barijeru transportirana viša koncentracija aktivne tvari (Capriotti i Capriotti, 2012).

2.2.1. Primjena dimetilsulfoksida za krioprezervaciju

Krioprezervacija je proces čuvanja biološkog materijala (stanica, tkiva ili čitavih organa) pri vrlo niskim temperaturama, s ciljem smanjenja brzine kemijskih reakcija, poput metabolizma, aktivnog transporta i enzimskih reakcija, unutar smrznutog materijala. Na ovaj način se smrznuti materijal može pohranjivati kroz duži vremenski period bez gubitka funkcije. Međutim, procesi koje je potrebno provesti da bi se postigle niske temperature pri kojima se smrznuti materijal čuva, neupitno uzrokuju određena oštećenja stanica. Prilikom hlađenja suspenzije stanica ispod temperature ledišta dolazi do stvaranja kristala leda u izvanstaničnom okolišu te smanjenja udjela vode u stanicama. Zbog navedenog u suspenziji dolazi do sljedećeg: 1) stvaranje osmotskog gradijenta na staničnim membranama te dehidratacija stanica i 2) koncentriranje otopljenih tvari u tekućem dijelu medija zaostalom između rastućih kristala leda. Dehidratacija stanica je poželjan efekt jer smanjuje vjerojatnost stvaranja unutarstaničnih kristala leda. Međutim, neproporcionalna dehidratacija je nepoželjna i najčešći je uzrok oštećenja povezanih sa zamrzavanjem. Koncentriranje otopljenih tvari između kristala leda ima negativne posljedice na stanice koje se nađu u tom prostoru. Takve stanice izložene su vrlo visokim koncentracijama otopljenih tvari što može dovesti do osmotskog šoka.

Postizanje ravnoteže između navedenih efekata jedan je od velikih izazova prilikom odabira brzine hlađenja suspenzije. Ukoliko se koristi proces sporog hlađenja ($<1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) doći će do dehidracije stanica zbog čega se smanjuje vjerojatnost pojave unutarstaničnih kristala leda, ali stanice koje se nalaze između kristala leda duže će biti izložene povećanim koncentracijama otopljenih tvari. S druge strane, korištenjem procesa brzog hlađenja ($>100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) izbjegava se dugotrajno izlaganje stanica visokim koncentracijama otopljenih tvari, ali može doći do pojave unutarstaničnih kristala leda (Murray i Gibson, 2022).

Zbog svih navedenih, ali i mnogih drugih, izazova, u procesu krioprezervacije koriste se krioprotektivni agensi ili krioprotektanti. Krioprotektanti se mogu podijeliti na prodiruće agense niske molekularne mase i neprodiruće agense, koji se dalje mogu podijeliti na one niske molekularne mase i one visoke molekularne mase. Prisutnost prodirućih krioprotektanata niske molekularne mase je nužna u procesu zamrzavanja. Oni zamjenjuju unutarstaničnu vodu i na taj način minimiziraju promjene volumena stanica kao i stvaranje kristala leda unutar stanica. Neki od najpoznatijih prodirućih krioprotektanata niske molekularne mase su: glicerol, etilen glikol, metanol i DMSO (Palasz i Mapletoft, 1996).

DMSO se kao krioprotektant prvi put spominje u istraživanju Lovelock i Bishop (1959) u kojem je uspoređen s glicerolom, koji je uz DMSO, jedan od najkorištenijih krioprotektanata. U navedenom istraživanju, DMSO je korišten kao krioprotektivno sredstvo za zamrzavanje ljudskih i govedih crvenih krvnih stanica te spermatozoida bika. U usporedbi s glicerolom, DMSO brže prodire u crvene krvne stanice te je potrebna manja koncentracija krioprotektanta za postizanje potpune zaštite od oštećenja koja nastaju zamrzavanjem. Za bikove spermatozoide glicerol se pokazao kao bolji krioprotektant od DMSO-a, ali je utvrđeno da je toksičnost DMSO-a, u korištenim koncentracijama, prema navedenim stanicama niska. Nakon navedenog istraživanja, mnoga istraživanja ispitivala su svojstva DMSO-a kao krioprotektanta, ali i negativne posljedice njegove primjene. Pa je tako Farrant (1964) ispitao uspješnost krioprezervacije uzoraka glatkog mišićnog tkiva uz primjenu DMSO-a kao krioprotektanta te došao do sljedećih zaključaka. DMSO djelomično štiti glatko mišićje od oštećenja koja nastaju zbog zamrzavanja te ono zadržava sposobnost kontrakcije nakon odmrzavanja.

Bitno je za naglasiti da su na uzorcima ipak primijećena određena odstupanja od kontrolnih uzoraka koja daju naslutiti da je došlo do oštećenja stanične membrane. Također, DMSO, ali i drugi ispitivani spojevi, nisu pokazali specifično farmakološko djelovanje te se da zaključiti da su mehanizmi kojim štite stanice od oštećenja prilikom zamrzavanja fizikalno-kemijski. Nadalje, Ashwood-Smith (1964) u svom istraživanju, uspješno je primijenio DMSO kao krioprotektivni agens prilikom zamrzavanja mišjih limfocita.

DMSO je od ovih početnih istraživanja korišten kao krioprotektant prilikom zamrzavanja različitih vrsta stanica i tkiva. Međutim, mnoga istraživanja pokazala su da stanice koje su zamrznute u prisustvu DMSO-a mogu izazvati negativne nuspojave nakon transplantacije. Najčešće nuspojave su mučnina, povraćanje, hipertenzija ili hipotenzija te glavobolja. Uz navedene, mogu se pojaviti i ozbiljnije nuspojave poput srčanog zastoja, usporavanja srčanih otkucaja, tj. bradikardije te zatajenja bubrega (Ruiz-Delgado i sur., 2009). Također, zanimljivo je za primijetiti da DMSO potencijalno uzrokuje otpuštanje plastifikatora iz vrećica za čuvanje krvi u stanice. Naime, plastifikatori su tvari koje se koriste za povećanje elastičnosti, stabilnosti i izdržljivosti vrećica za čuvanje krvi. Postoje dokazi da plastifikatori koji se često koriste imaju toksično djelovanje na endokrini sustav. U ovom slučaju DMSO ne djeluje kao toksična tvar, ali njegovo korištenje može izložiti stanice toksičnom djelovanju drugih spojeva (Yamaguchi i sur., 2014). Nadalje, istraživanje Hanslick i sur. (2009) pokazalo je da DMSO, čak i pri najnižim ispitivanim koncentracijama, uzrokuje apoptozu stanica prilikom razvoja mozga. Zabrinjavajuća je činjenica da prilikom transplantacije koštane srži, koja je zamrznuta uz prisustvo DMSO-a, djeca budu izložena koncentracijama DMSO-a koje su puno više od istraživanih te je moguće da i u njihovom mozgu uzrokuje slična oštećenja. Utjecaj DMSO-a na genom istraživan je u radu Verheijen i sur. (2019) te je pokazano da DMSO utječe na razinu metilacije genoma te razinu ekspresije različitih gena, uključujući one koji kodiraju za molekule mikroRNA. U procesu potpomognute reprodukcije često se koriste stanice koje su zamrznute uz dodatak DMSO-a. S obzirom da DMSO može utjecati na razinu metilacije gena koji su eksprimirani prilikom razvoja organizma, što može uzrokovati razne defekte, razvijaju se metode krioprezervacije stanica koje ne uključuju DMSO. Zbog svega navedenog, nužno je daljnjim istraživanjima pronaći krioprotektant koji je jednako ili više učinkovit od DMSO te ne iskazuje toksično djelovanje.

2.2.2. Primjena dimetilsulfoksida za otapanje organskih spojeva

DMSO je polarno otapalo u kojem su topljive polarne i nepolarne molekule te je zbog toga učestalo korišten kao medij za provođenje reakcija, industrijsko otapalo za organsku sintezu te u analitičke svrhe (Tashrifi i sur., 2020). S ciljem boljeg razumijevanja svojstava otapala Parker (1961) u svom radu ne klasificira otapala prema polarnosti, već kao protična u koja ubraja vodu, metanol i formamid te dipolarna aprotična otapala u koja spada i DMSO. Protična otapala djeluju kao proton donori, dok dipolarna aprotična otapala, iako u svom sastavu imaju vodik, ne mogu djelovati kao proton donori.

DMSO je postao važno dipolarno, aprotično otapalo ne samo zbog sposobnosti otapanja mnogih organskih i anorganskih spojeva, već i zbog lakoće proizvodnje, ali i kompatibilnosti s različitim materijalima za pohranu. Za razliku od vode, koja apsorbira svjetlost valne duljine oko 1300 μm , DMSO je vrlo proziran pri valnim duljinama između 350 i 2200 μm te se zbog toga može koristiti za spektrofotometrijske metode u infracrvenoj regiji. Također se može koristiti i za istraživanje tautomerizma pirimidina i nukleozida te NMR spektroskopiju steroida. Plinovi poput HCl, SO₂, SO₃ i NO₂ lako se otapaju u DMSO-u pri sobnoj temperaturi. Također je dobro otapalo za masti, ugljikohidrate, heterocikle i mnoge druge organske spojeve (Martin i sur., 1967).

DMSO se, uz sve već navedene primjene, koristi i na području medicine prilikom formulacije lijekova. Istraživanje Simon i sur. (2009) ispitalo je učinkovitost otopine diklofenaka, koja sadrži DMSO, za ublažavanje simptoma osteoartritisa koljena. U istraživanju su, uz navedenu otopinu, korištene i placebo otopina, otopina koja sadrži DMSO, ali ne i diklofenak, diklofenak za oralnu primjenu i kombinacija diklofenaka za oralnu i topikalnu primjenu. Iz provedenog istraživanja zaključeno je da je otopina diklofenaka koja sadrži DMSO jednako učinkovita kao i diklofenak za oralnu primjenu, ali otopina koja sadrži DMSO ima blaže nuspojave. U istraživanju Vejnovic i sur. (2010) DMSO, je uz druge spojeve, primijenjen za poboljšanje permeabilnosti ploče nokta, čime bi se poboljšala i doprema lijeka. U ovom istraživanju kao lijek korišten je kofein, a za poboljšavanje permeabilnosti, uz DMSO, korišteni su i urea, metanol, N-acetil-L-cistein, hidrofobini i drugi. Formulacije koje sadrže metanol ili DMSO pokazale su najviši koeficijent permeabilnosti, ali se ipak formulacija koja sadrži hidrofobine pokazala kao najbolja za dopremu lijeka preko ploče nokta.

Iako se pokazao kao vrlo dobro otapalo, razna istraživanja pokazala su da DMSO ima toksično djelovanje na embrio. Kitchin i Ebron (1984) ispitali su utjecaj DMSO-a i drugih otapala na proces morfogeneze embrija štakora te toksični utjecaj tih otapala na embrio.

U ovom istraživanju DMSO je pokazan kao najmanje toksično otapalo od otapala koja je miješaju s vodom, ali je i ono pokazalo toksično djelovanje u višim koncentracijama. Istraživanje Augustine-Rauch i sur. (2004), čiji je cilj bio proširiti saznanja Kitchin i Ebron (1984) te pronaći alternativna otapala koja su netoksična, još jednom je potvrdilo da DMSO ima toksično djelovanje na embrio. Nadalje, istraživanje Adler i sur. (2005) pokazalo je da DMSO uzrokuje diferencijaciju embrionalnih stanica teratokarcinoma. Korištenje DMSO-a kao nosača bioaktivnih molekula, može biti neučinkovito zbog interakcija DMSO-a i komponenata lijeka. Ovo je istraženo u radu Hall i sur. (2014) te je pokazan značajan pad u djelovanju kompleksa na različite tumorske stanične linije kada je kompleks pripremljen s DMSO-om. Sve navedeno potaknulo je istraživanja čiji je cilj pronaći otapala koja mogu biti zamjena DMSO-u.

2.3. ALTERNATIVNA OTAPALA KAO ZAMJENA ZA DIMETILSULFOKSID

2.3.1. Alternativna otapala za krioprezervaciju

S obzirom na to da je klasificiran kao prodirući krioprotektant, glavni mehanizam kojim DMSO štiti stanice prilikom zamrzavanja je penetracija u unutrašnjost stanice te istiskivanje unutarstanične vode. Ovaj mehanizam karakteristika je i drugih prodirućih krioprotektanata, pa se teoretski i oni mogu smatrati zamjenom za DMSO (Awan i sur., 2020). Uz DMSO, jedan od najpoznatijih i najčešće korištenih prodirućih krioprotektanata je zasigurno glicerol. Prvi put se kao krioprotektant spominje u radu Polge i sur. (1949) gdje je korišten za zaštitu spermatozoida od oštećenja nastalih zamrzavanjem. Od tada se često koristi u istraživanjima, ali i u medicinske svrhe. Jedna od najvažnijih primjena glicerola u medicini je zamrzavanje crvenih krvnih stanica. Međutim, i glicerol, kao i DMSO, pokazuje određena negativna svojstva i izazove. Pa tako crvene krvne stanice zamrznute uz glicerol kao krioprotektivno sredstvo, prije upotrebe, trebaju proći kroz dugotrajan proces uklanjanja glicerola (Murray i Gibson, 2022). Zbog ovih nedostataka, glicerol se ne može smatrati adekvatnom zamjenom za DMSO u području krioprezervacije. Također, ono što izdvaja DMSO od drugih prodirućih krioprotektanata je brzina penetracije u stanice te utjecaj na permeabilnost membrane.

Iz svega navedenog može se zaključiti da je poprilično izazovno pronaći krioprotektant koji iskazuje sva korisna svojstva DMSO-a, ali nema toksičan učinak. Zbog toga je jedan od pristupa znanstvenika bio razvoj krioprotektanata na bazi DMSO-a uz dodatak drugih spojeva, koji također iskazuju krioprotektivna svojstva, s ciljem smanjenja koncentracije DMSO-a, a samim time i njegove toksičnosti. Jedan od primjera je dodatak šećera u sastav krioprotektivnih agensa i, iako se disaharidi koriste puno češće, istraživanja Nusbaumer i sur. (2018) te Aramli i sur. (2015) pokazala su da krioprotektant na bazi glukoze i metanola pokazuje zadovoljavajuće rezultate. Disaharidi, poput trehaloze i saharoze, često se koriste u raznim procesima kao neprodirući krioprotektanti, ali s obzirom da zaostaju u vanstaničnom prostoru ne mogu u potpunosti zaštititi stanice. Međutim, kombinacija disaharida i prodirućeg krioprotektanta, kao DMSO-a, čak i u niskim koncentracijama, daje vrlo dobre rezultate (Awan i sur., 2020). Krioprotektanti na bazi trehaloze sa smanjenom koncentracijom DMSO-a korišteni su u istraživanjima Motta i sur. (2014), Rodrigues i sur. (2008) te Pu i sur. (2006) za zamrzavanje različitih tipova stanica te su se pokazali učinkovitim. U istraživanju Yang i sur. (2013) ispitani su krioprotektanti na bazi tri šećera (glukoza, saharoza i trehaloza) i tri poliola (ksilitol, maltol i sorbitol) te niske koncentracije DMSO-a. Navedeni krioprotektanti korišteni su prilikom zamrzavanja ljudskih hepatocita te je najbolje rezultate pokazao krioprotektant na bazi sorbitola i DMSO-a.

Uz šećere, krioprotektantima na bazi DMSO-a dodaju se i makromolekule visoke molekulske mase, poput fetalnog goveđeg seruma, hidroksietilnog škroba, dekstrana te različitih polimera, npr. polietilen glikol, metilceluloza i polivinilpirolidon. Ovaj pristup također dovodi do smanjenja korištene koncentracije DMSO-a jer makromolekule djeluju kao neprodirući krioprotektanti koji na sebe vežu vodu i na taj način sprječavaju stvaranje vanstaničnih kristala leda (Awan i sur., 2020).

2.3.2. Alternativna otapala za otapanje organskih spojeva

U istraživanju Yoganantharajah i sur. (2018) ispitana je mogućnost zamjene DMSO-a dvjema ionskim kapljevina, G3TFSA i G4TFSA. Cilj ovog rada bio je ispitati mogu li se ionske kapljevine koristiti za otapanje 4-dietilaminobenzaldehida (DEAB) te njegovo čuvanje pri sobnim temperaturama kroz dulji vremenski period. DEAB djeluje kao inhibitor retinaldehid dehidrogenaza koje sudjeluju u sintezi retinoične kiseline te je u ovom istraživanju otopljen u DMSO-u i ionskim kapljevina, nakon čega je ispitivana stabilnost spoja i sposobnost penetracije te su dobiveni slični rezultati zbog čega se navedene ionske kapljevine mogu smatrati potencijalnim alternativama DMSO-u za ovu primjenu.

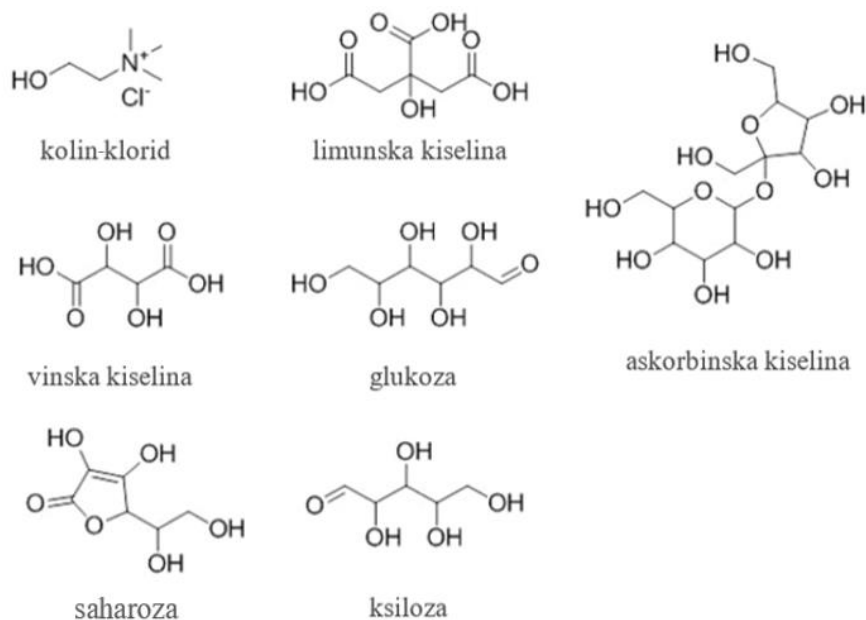
U radu Kuroda i sur. (2020) *zwitter-ionska kapljevina* (engl. *zwitterionic liquid, ZIL*) je predložena kao zamjena za DMSO u različitim područjima primjene. Pokazano je da *zwitter-ionska kapljevina* pri visokim koncentracijama iskazuje manje toksično djelovanje prema ljudskim stanicama od DMSO-a. DMSO je pri niskim koncentracijama dovodio do zaustavljanja staničnog ciklusa, na koji ispitivana kapljevina nije imala učinak. Autore je zanimalo i može li ova kapljevina otapati razne molekule, kao što DMSO otapa mnoge hidrofobne lijekove. Pokazano je da se od 12 ispitanih hidrofobnih spojeva, 8 otapa u ZIL-u, a zanimljivo je da jedan od njih nije topljiv niti u vodi niti u DMSO-u. Na temelju kemijske strukture, autori su zaključili da bi ZIL mogla biti dobar krioprotektant te i u tom području zamijeniti DMSO. ZIL je pokazala krioprotektivna svojstva jednaka komercijalno dostupnom krioprotektantu na bazi DMSO-a, ali, s obzirom da se ZIL smatra neproduktivnim krioprotektantom, ona ne može u potpunosti zamijeniti DMSO.

Još jedna od mogućih zamjena za DMSO je i dipolarno, aprotično otapalo Cyrene™, dihidrolevoglukozenon koje ima slične karakteristike kao DMSO, ali se smatra zelenom alternativom koja pokazuje nisku mutagenost i netoksičan učinak na okoliš. Ispitana je mogućnost otapanja različitih antibiotika u Cyrene™ otapalu te su dobiveni rezultati uspoređeni s otapanjem u DMSO-u. Bolja topljivost u Cyrene™ pokazana je za dva antibiotika, dok je DMSO bio bolje otapalo samo za jedan antibiotik. Također je ispitano djelovanje tako pripremljenih otopina te su dobiveni vrlo slični rezultati sa Cyrene™ i DMSO-om, zbog čega se i Cyrene™ može smatrati jednim od alternativnih otapala DMSO-u (Camp i sur., 2020).

2.4. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

U potrazi za novim otapalima, koja bi služila kao zamjena za tradicionalno korištena otapala koja imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš, znanstvenici su razvili niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*). DES-ovi se često klasificiraju kao četvrta generacija ionskih kapljevina. Ionske kapljevine (engl. *Ionic Liquids, IL*) su također razvijene kao zamjena za klasična organska otapala te se one mogu definirati kao otopljene soli koje su, pri sobnoj temperaturi, u tekućem stanju. Ono što ionske kapljevine čini dobrim otapalom je činjenica da se njihova fizikalno-kemijska svojstva mogu mijenjati različitim kombinacijama kationa i aniona (Rogers i Seddon, 2003). Iako su pronašle primjenu u mnogim područjima, utjecaj ionskih kapljevina na okoliš može predstavljati problem jer su teško biorazgradive te neodržive.

Za razliku od ionskih kapljevine, DES-ovi su manje toksični te često biorazgradivi, a imaju slična svojstva kao ionske kapljevine. DES-ovi se mogu definirati kao smjesa dvaju ili više komponenata koja, kao takva, ima značajno nižu točku tališta od zasebnih komponenata (Paiva i sur., 2014). DES-ovi nastaju kompleksacijom između donora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor, HBD*) i akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor, HBA*) koja uzrokuje delokalizaciju naboja što dovodi do već spomenutog snižavanja temperature tališta (Sekharan i sur., 2022). Ono što ih čini pogodnijim otapalom od ionskih kapljevine je činjenica da su poprilično jeftina za pripremu, postoji velik broj spojeva koji mogu biti gradivne komponente DES-ova te čistoća finalnog produkta ovisi samo o čistoći supstrata, ne postoji potreba za dodatnim pročišćavanjem (Carriazo i sur., 2012). Kao zamjena za ionske kapljevine, DES-ovi se prvi put spominju u radu Abbott i sur. (2004). U ovom radu, istraživani su DES-ovi u kojima je donor vodikove veze kolin-klorid. Kolin-klorid jedan je od najčešće korištenih spojeva za pripremu DES-ova, a uz njega često se koriste i urea, limunska kiselina, glicerol i drugi. Ukoliko se za pripremu DES-ova koriste prirodni spojevi, najčešće primarni metaboliti poput organskih kiselina, šećera i aminokiselina (slika 2), takvi DES-ovi se klasificiraju kao prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) (Paiva i sur., 2014).



Slika 2. Kemijska struktura različitih spojeva koji se mogu koristiti za pripremu NADES-ova (prema Paiva i sur., 2014)

Kao što je već navedeno, jedna od glavnih prednosti DES-ova nad ionskim kapljevina je činjenica da se DES-ovi mogu pripremiti od primarnih metabolita te bi samim time njihova toksičnost trebala biti niža od toksičnosti ionskih kapljevina. Ovu pretpostavku ispitala su mnoga istraživanja te su dobiveni različiti rezultati. Istraživanje Hayyan i sur. (2013) jedno je od prvih takvih istraživanja te je u njemu pokazano da je toksičnost DES-a viša od toksičnosti pojedinačnih komponenti od kojih je građen. Navedeno se može objasniti postojanjem sinergističkog efekta te je zbog toga potrebno ispitati toksičnost svakog DES-a prije primjene. Također je pokazano da je toksičnost DES-a u ovisnosti s viskoznošću, koncentracijom te strukturom DES-a. Ispitani DES-ovi također su pokazali toksičnost prema bakterijama te je zaključeno da bi se mogli primjenjivati kao antibakterijski agensi. Nadalje, Paiva i sur. (2014) ispitali su citotoksičnost 11 DES-ova te je pokazano da je prisutnost vinske kiseline štetna za metabolizam L929 stanica, ali osim toga, nije primijećena jasna povezanost između citotoksičnosti i gradivnih komponenta DES-ova.

Još neke od prednosti DES-ova nad ionskim kapljevina su mogućnost biorazgradnje te netoksičan utjecaj na okoliš. Ovo su neki od glavnih zahtjeva prilikom istraživanja novih otapala. U istraživanju Hou i sur. (2013) ispitana je mogućnost razgradnje DES-ova pomoću mikroorganizama izoliranih iz otpadnih voda te su svi DES-ovi pokazani kao biorazgradivi. Nadalje, u radu Radošević i sur. (2015), uz mogućnost biorazgradnje DES-ova, ispitana je i njihova citotoksičnost prema ribljoj i ljudskoj staničnoj liniji te fitotoksičnost koristeći pšenicu. Ispitana su tri DES-a na bazi kolin-klorida uz glukozu, glicerol i oksalnu kiselinu kao donore vodikove veze. Dva od tri ispitana DES-a pokazala su nisko toksično djelovanje prema ribljoj i ljudskoj staničnoj liniji, dok je jedan pokazao umjereno toksično djelovanje. Ova tri DES-a nisu pokazala fitotoksično djelovanje te su se pokazala kao lako biorazgradiva otapala. NADES-ovi se, u teoriji, mogu klasificirati kao potpuno "zelena" otapala. Proces njihove pripreme sastoji se od miješanja dvaju ili više komponenta prirodnog porijekla. U nekim slučajevima potrebno je zagrijavanje ili dodatak vode, ali proces pripreme ne generira otpadni materijal. E-faktor je jedan od glavnih pokazatelja održivosti procesa sinteze otapala te se može definirati kao omjer ukupne količine otpada i ukupne količine produkta te on u slučaju pripreme NADES-ova, u teoriji, može iznositi 0. I drugi pokazatelji, poput emisije CO₂ ili ekonomičnosti atoma pokazuju da je priprema NADES-ova u potpunosti u skladu s načelima zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

2.5. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Razvojem zelene kemije značajno je porastao broj istraživanja koja se bave pripremom, karakterizacijom i primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala. U početku su se niskotemperaturna eutektička otapala koristila prilikom depoliranja, odnosno površinske obrade i zaštite metala. Danas su DES-ovi postali učinkovita zamjena klasičnim otapalima u organskoj sintezi spojeva i biokatalizi, koriste se u elektrokemiji, proizvodnji biopolimera i nanomaterijala, a možda su najčešće korištena i istraživana kao nova otapala za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz biljnih materijala. Očekuje se da će primjena DES-ova u budućnosti obuhvatiti širok raspon industrija, od kemijske, prehrambene i farmaceutske, kao i niz temeljnih i primjenjenih istraživanja u području znanosti o životu: od biomedicine do tkivnog inženjstva.

Jedan od prvih radova u kojem se spominje primjena eutektičkih otapala je rad Gill i Vulfson (1994) u kojem je korištena heterogena eutektička otopina supstrata za provođenje enzimskih reakcija. Bilo je potrebno istražiti mogu li se u eutektičkim otopinama provoditi kemijske reakcije te zadržavaju li različiti enzimi svoju aktivnost u eutektičkim otopinama. U ovom radu korištene su različite proteaze te su mnoge od njih ostale stabilne i aktivne te su se željene enzimске reakcije provodile. Zanimljiva je činjenica da, iako DES-ovi mogu biti građeni od denaturirajućih agensa, mnogi enzimi u njima ipak zadržavaju svoju strukturu i aktivnost. Tako je u radu Durand i sur. (2013) pokazano da lipaza B iz vrste *Candida antarctica* ostaje aktivna i stabilna u DES-ovima na bazi kolin-klorida. Također je istražena primjena ove lipaze za enzimsku sintezu biodizela. U istraživanju Zhao i sur. (2013) reakcije katalizirane lipazom B, provedene u DES-ovima, rezultirale su visokim prinosima biodizela. U industriji biodizela, istražena je i sposobnost DES-ova da ekstrahiraju glicerol iz biodizela. Glicerol je jedan od glavnih nusproizvoda sinteze biodizela koji se ekstrahira raznim tehnikama koje karakteriziraju visoki troškovi te razne komplikacije prilikom njihove primjene. Tehnika koja koristi DES-ove nadilazi ove prepreke te daje dobre rezultate (Durand i sur., 2013).

Primjena različitih NADES-ova za ekstrakciju fenolnih spojeva iz cvijeta šafranike ispitana je u radu Dai i sur. (2013) te su njihova istraživanja pokazala da je ekstrakcija provedena u NADES-ovima rezultirala višim prinosima polarnih i nepolarnih metabolita u usporedbi s ekstrakcijom provedenom u konvencionalnim otapalima poput vode ili etanola. Također, rad Radošević i sur. (2016) pokazao je da NADES na bazi kolin-klorida i jabučne kiseline daje najbolje rezultate prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz grožđa. Ispitana je i biološka aktivnost ovako dobivene otopine te je pokazano da ima snažno antioksidativno i antiproliferativno djelovanje prema ljudskim tumorskim stanicama.

Ovo je dokaz da se NADES-ovi mogu koristiti, ne samo za poboljšanje procesa ekstrakcije, već i poboljšanje biološkog djelovanja ekstrakta. S obzirom na to da je topljivost slabo topljivih bioaktivnih molekula 5 do 22 000 puta viša u DES-ovima, nego u vodi, DES-ovi se mogu koristiti i kao nosači aktivnih tvari lijekova (Morrison i sur., 2009). Stott i sur. (1998) sintetizirali su eutektičke otopine ibuprofena i različitih terpena kojima se povećava permeabilnost kroz kožu te su navedene otopine primjenjivane transdermalno. Sve eutektičke otopine pokazale su poboljšanje u dopremi aktivne tvari u usporedbi s kontrolom. Nadalje, u radu Tuntarawongsa i Phaechamud (2012) uspoređena je topljivost ibuprofena u NADES-ovima i vodi te je dokazano da NADES-ovi otapaju značajno više koncentracije ibuprofena.

2.5.1. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za krioprezervaciju

Jedno od glavnih ograničenja na području krioprezervacije predstavlja upotreba samo dva krioprotektanta: DMSO-a i glicerola. Oba krioprotektanta pokazuju toksična svojstva zbog čega je stanice potrebno zamrzavati odmah nakon dodatka krioprotektanta. Zbog navedenog, krioprezervacija tkiva i cijelih organa predstavlja velik izazov jer vrijeme inkubacije nije dovoljno dugo da krioprotektant prodre u dublje slojeve stanica. Naime, jedan od glavnih razloga odbacivanja doniranih organa je nepravilno skladištenje, a to bi se moglo savladati krioprezervacijom uz odgovarajuće krioprotektivno sredstvo. Činjenica da su netoksična, jeftina za pripremu te da se njihova svojstva mogu lako prilagođavati različitim primjenama, dovela je do primjene DES-ova i u ovom području. Također, primarni metaboliti koji se koriste kao gradivne komponente NADES-ova pronađeni su u životinjama koje preživljavaju izrazito niske temperature što je također potaknulo primjenu NADES-ova za krioprezervaciju stanica.

NADES građen od trehaloze i glicerola pokazao je snažan efekt na stvaranje kristala leda unutar L929 stanica, a samim time i smanjenje oštećenja stanica uzrokovanih zamrzavanjem. Korištenjem ovog NADES-a moguće je postići jednako ili čak bolje djelovanje od DMSO-a koji se smatra zlatnim standardom za krioprezervaciju (Castro i sur., 2018). Svi NADES-ovi pripremljeni prilikom istraživanja Jesus i sur. (2021) pokazali su nisku citotoksičnost prema L929 staničnoj liniji te su pokazali podjednake rezultate kao kontrola prilikom zamrzavanja ove stanične linije. U pokusu krioprezervacije korištena je i HaCaT stanična linija te je primijećeno značajno poboljšanje u vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu. U ovom istraživanju također je pokazano da se NADES-ovi korišteni kao krioprotektanti ne trebaju uklanjati nakon odmrzavanja stanica, za razliku od prethodno spomenutih DMSO-a ili glicerola. NADES-ovi se također spominju kao novi medij za vitrifikaciju te su kao takvi testirani na već spomenutim L929 i HaCaT staničnim linijama.

Vitrifikacija se postiže kada se zamrzavanje uzoraka odvija pri brzinama zamrzavanja između 15 000 i 30 000 °C min⁻¹ te se najčešće provodi uranjanjem u tekući dušik. Korišteni NADES-ovi nisu utjecali niti na morfologiju stanica niti na proliferaciju. Isto se ne može reći za DMSO koji je značajno usporavao rast stanica te je primijećeno smanjenje sadržaja DNA unutar stanica. U istraživanju je pokazano da se različiti NADES-ovi mogu koristiti kao krioprotektanti za staničnu liniju L929, dok je za HaCaT staničnu liniju samo jedan NADES pokazao zadovoljavajuće djelovanje. Ovaj rezultat svakako je poboljšanje u odnosu na korištenje DMSO-a kao krioprotektanta jer u takvom slučaju HaCaT stanice nisu preživjele (Jesus i sur., 2022). U radu Bryant i sur. (2022) ispitivano je šest DES-ova u svrhu zamrzavanja četiri tipa stanica sisavaca te je DES pripremljen od prolina i glicerola pokazao zadovoljavajuće djelovanje za zamrzavanje svih tipova stanica. U ovom istraživanju stanice su inkubirane s DES-ovima koji su služili kao krioprotektanti prije zamrzavanja te inkubacija nije imala štetan učinak na stanice. Ovo još jednom pokazuje da su DES-ovi niskotoksična alternativa konvencionalnim krioprotektivnim agensima, a primjenom zamrzavanja s prethodnom inkubacijom omogućava se prodiranje krioprotektanta u sve slojeve stanica.

Osim krioprezervacije stanica sisavaca, istraživano je i zamrzavanje mikroorganizama poput bakterija mliječne kiseline ili kvasaca. Qiao i sur. (2018) razvili su metodu krioprezervacije bakterija mliječne kiseline uz upotrebu NADES-ova kao krioprotektanta. U tom istraživanju korišteni su različiti sojevi bakterija mliječne kiseline te je pripravljeno pet NADES-ova na bazi kolin-klorida, glicerola i etilen glikola. *Streptococcus thermophilus* je bakterijska vrsta čija je stopa preživljenja bila izrazito visoka te su daljnji eksperimenti provedeni na njoj. U tim eksperimentima pokazano je da je uz korištenje NADES-a na bazi glicerola i L-prolina očuvan strukturalni integritet stanične membrane te aktivnost unutarstaničnih enzima, laktat dehidrogenaze i β -galaktozidaze. Životinje koje preživljavaju ekstremno niske temperature bile su izvor inspiracije i za istraživanje Tian i sur. (2022) u kojem su korištena tri NADES-a kao krioprotektanti za zamrzavanje stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. NADES-ovi su pokazali zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva te nisu utjecali na morfologiju stanica, dok su na stanicama zamrznutim uz dodatak DMSO-a i glicerola primijećene određene promjene u morfologiji.

2.5.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za otapanje organskih spojeva

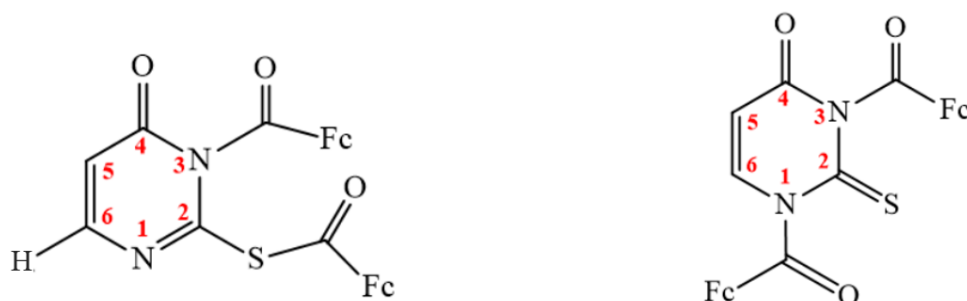
Svojtvo DES-ova da poboljšaju topljivost slabo topljivih molekula te posljedično i dopremu biološki aktivnih tvari već je spomenuta u ovom radu. Zbog navedenih svojstava istraživana je mogućnost primjene DES-ova za otapanje aktivnih supstanci raznih lijekova te drugih biološki aktivnih spojeva. Jedan od primjera je formulacija resveratrola (RES) u NADES-u koja je pokazala bolju topljivost te snažniji inhibicijski učinak prema matriks metaloproteinazi 9, enzimu koji ima ključnu ulogu u razgradnji ekstracelularnog matriksa tijekom upale, u usporedbi s formulacijom u DMSO-u. Iako su antioksidativni i protuupalni učinci RES-a dobro istraženi, klinička istraživanja često ne daju obećavajuće rezultate. Navedeno se može pripisati slaboj topljivosti spoja u vodi te slaboj biodostupnosti. Problem koji je javlja prilikom pokušaja nadilaženja ovih nedostataka je činjenica da primjenom viših doza RES-a dolazi do povećanja permeabilnosti endotela. Glavni cilj istraživanja Shamseddin i sur. (2017) bio je pronaći formulaciju RES-a koja inhibira matriks metaloproteinazu 9, već pri niskim koncentracijama. Najbolje rezultate pokazala je formulacija RES-a i NADES-a na bazi propanediola i kolin-klorida te je ta formulacija, već pri niskim koncentracijama, pokazala povećanje inhibitorne aktivnosti i biodostupnosti RES-a. Cysewski i sur. (2021) ispitali su topljivost teofilina, koji se može smatrati predstavnikom aktivnih farmaceutskih sastojaka, u NADES-ovima na bazi kolin-klorida, poliola i vode. Teofilin je slabo topljiv u vodi i mnogim organskim otapalima, ali je topljiv u DMSO-u. Zbog navedenog su rezultati dobiveni u NADES-ovima uspoređivani s rezultatima u DMSO-u. NADES-ovi su se pokazali kao bolje otapalo za teofilin od DMSO-a, a najbolje rezultate dao je NADES na bazi kolin-klorida i glicerola, uz dodatak vode. Upravo se dodavanje vode u strukturu NADES-a može smatrati zanimljivim jer su inače fizikalno-kemijska svojstva NADES-ova, pa tako i sposobnost otapanja organskih molekula, osjetljiva na dodatak vode. Još jedan od primjera NADES-a koji u svojoj strukturi sadrži određeni udio vode, a poboljšava topljivost organske molekule, je NADES pripravljen od limunske kiseline i glukoze, uz dodatak vode, korišten za otapanje oksima RS194B u radu Panić i sur. (2022). Oksim RS194B je spoj koji djeluje kao protuotrov trovanju organofosfatima koji inhibiraju djelovanje enzima acetilkolinesteraze. Glavni nedostatak ovog oksima je slaba topljivost u vodi, pa je cilj istraživanja bio pronaći formulaciju oksima u NADES-u koja će pokazivati zadovoljavajuću razinu aktivnosti. Tijekom istraživanja pokazano je da je oksim jednako stabilan u NADES-u i referentnom otapalu, a što se tiče reaktivacije acetilkolinesteraze, formulacija u NADES-u je pokazala bolje rezultate od formulacije u referentnom otapalu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila

Prilikom izrade ovog diplomskog rada, ispitana je topljivost dva biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (slika 3) u DES-ovima te učinak tako pripremljenih otopina na HeLa staničnu liniju. Biokonjugati ferocena i derivata 2-tiouracila sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Sintetizirani spojevi razlikuju se prema položaju veze ferocinilnog dijela. U spoju **1** ferocinilni dio vezan je karbonilnim mostom na položajima *S2* i *N3*, dok je u spoju **4** isti vezan karbonilnim mostom na položajima *N1* i *N3*.



Slika 3. Kemijske strukture ispitivanih biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (spojeva **1** i **4**) (Logarušić, 2023)

3.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Za izradu ovog diplomskog rada korišteno je sedam niskotemperaturnih eutektičkih otapala: betain:urea (Bet:U), trimetilamin N-oksid:gvanidin (TMAO:Gua), trimetilamin N-oksid:urea (TMAO:U), gliceril fosforil kolin:urea (GPC:U), kolin-klorid:urea (ChCl:U), timol:oktanska kiselina (Ty:C₈), mentol:oktanska kiselina (Me:C₈). Sva navedena otapala pripravljena su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu

3.1.3. Kemikalije

- DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- The CellTiter 96[®] A_{Queous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, SAD
- Destilirana voda, PBF, Zagreb, RH
- Dimetilsulfoksid, Honeywell – Riedel-de Haen, Seelze, Njemačka

3.1.4. Pufferi i otopine

PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) puffer (pH=7,4)

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄ 1,44 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- Destilirana voda do 1000 mL

Otopina tripan-plavo

- Boja tripan-plavo 0,04 g
- PBS puffer 10 mL

3.1.5. HeLa i HaCaT stanične linije

Za potrebe istraživanja provedenog u svrhu izrade diplomskog rada korištene su HeLa i HaCaT stanične linije. Obje stanične linije pripadaju adherentnom tipu stanica.

HeLa tumorska stanična linija, dobivena iz *American Type Culture Collection* banke stanica, jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u biološkim istraživanjima. HeLa stanična linija je prva ljudska stanična linija uzgojena u kulturi, a izolirana je iz raka vrata maternice pacijentice Henriette Lacks. Jedna od prvih primjena HeLa stanica, bilo je istraživanje učinkovitosti polio cjepiva, koje je namijenjeno za sprječavanje poliomijelitisa. Od tada su se HeLa stanice nastavile koristiti u mnogim istraživanjima u različitim područjima znanosti.

HaCaT ljudska stanična linija iz banke stanica *CLS Cell Lines Service GmbH* (Eppenheim, Njemačka), je spontano transformirana stanična linija keratinocita koji su izolirani iz kože odraslog čovjeka. Često se koristi u istraživanjima zbog sposobnosti *in vitro* diferencijacije i proliferacije. Primjena HaCaT stanične linije omogućila je karakterizaciju metabolizma vitamina D₃ u ljudskoj koži, ali i mnogih drugih procesa.

3.1.6. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- T-boce od 25 cm², Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak i zamrzivač (+4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Zamrzivač (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (automatske pipete, nastavci za pipete, Falcon epruvete, Eppendorf kivete, Petrijeve zdjelice, laboratorijske čaše, Erlenmeyerove tikvice, ljevci, menzure)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Sva niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom diplomskom radu pripravljena su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu, budući da se još ne mogu kupiti na tržištu. Za potrebe provođenja istraživanja pripravljeno je sedam DES-ova čije su gradivne komponente te njihovi omjeri popisani u Tablici 1.

Tablica 1. Niskotemperaturna eutektička otapala korištena pri izradi diplomskog rada

Niskotemperaturno eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenata	Udio vode [%]
betain:urea	Bet:U	1:1	17
trimetilamin N-oksid:gvanidin	TMAO:Gua	1:1	/
trimetilamin N-oksid:urea	TMAO:U	1:1	14
gliceril fosforil kolin:urea	GPC:U	1:2	7
kolin-klorid:urea	ChCl:U	1:2	10
timo:oktanska kiselina	Ty:C ₈	1:3	/
mentol:oktanska kiselina	Me:C ₈	1:1	/

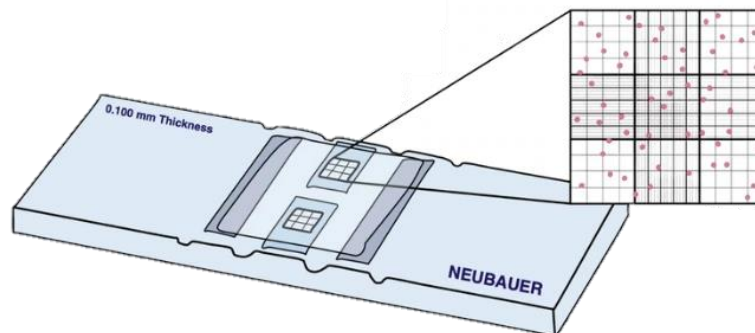
Kemikalije za pripravu DES-ova korištene su bez prethodnog pročišćavanja te su vagane na analitičkoj vagi. Odvage potrebnih kemikalija kvantitativno su prenesene u Erlenmeyerove tikvice, ukoliko je potreban dodatak vode, dodan je određeni volumen destilirane vode, nakon čega se priprava provodi uz zagrijavanje i miješanje na magnetskoj miješalici. Reakcijska smjesa zagrijava se na temperature između 40 i 60 °C, a priprava traje do 3 sata. Reakcija je završena kada kao produkt dobijemo bistru tekućinu. Priprava je provedena u nesterilnim uvjetima, ali je otapala, prije primjene na stanicama, potrebno sterilno profiltrirati.

3.2.2. Uzgoj HeLa i HaCaT stanica

HeLa i HaCaT stanične linije čuvaju se u ampulama za zamrzavanje na temperaturi od -75 °C. Nakon odmrzavanja i uklanjanja medija za zamrzavanje, stanice su resuspendirane u svježem mediju za uzgoj. Za uzgoj ovih staničnih linija korišten je DMEM medij s dodatkom 5 % FBS-a. S obzirom na to da su obje stanične linije adherentnog tipa, uzgoj se provodi u Petrijevim zdjelicama ili T-bocama. Tako pripremljene stanice, uzgajaju se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ te pri temperaturi od 37 °C. Rast stanica kontrolira se pod inverznim mikroskopom te ih se prema potrebi, s obzirom na broj stanica i stupanj popunjenosti podloge za rast, precjepkuje. Stanice su, za ispitivanje citotoksičnosti korištenih DES-ova te praćenje postotka preživljenja i sposobnosti proliferacije nakon zamrzavanja, uzgojene u pločama s 96, odnosno 24 jažice.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Broj stanica određivan je metodom tripan-plavo koja se temelji na razlici propusnosti membrana živih i mrtvih stanica. Membrana mrtvih stanica je propusna te zbog toga boja ulazi u njih i te stanice pod mikroskopom vidimo plavo obojene, dok žive stanice ostaju neobojene. Priprema stanica za bojanje započinje uklanjanjem medija iz podloge za uzgoj, nakon čega se ista ispiru PBS-om. Nakon ispiranja PBS-om, stanicama se dodaje tripsin koji će odvojiti stanice od podloge za uzgoj te se stanice inkubiraju na 37 °C kroz otprilike 5-10 minuta. Djelovanje tripsina moguće je pratiti pod inverznim mikroskopom jer stanice koje su odvojene od podloge za uzgoj poprimaju okruglasti oblik, za razliku od stanica prihvaćenih za podlogu koje su romboidnog oblika. Djelovanje tripsina prekida se dodatkom svježeg medija za uzgoj, stanice se resuspendiraju te se uzima alikvot za brojanje stanica. Volumen alikvota je 20 µL te mu se dodaje jednaki volumen otopine tripan-plavo. Pripremljena otopina nanosi se na Neubauerovu komoricu u kojoj se stanice broje. Neubauerova komorica sastoji se od 4 velika kvadrata koji su dalje podijeljeni na 16 manjih kvadratića te je prikazana na slici 4.



Slika 4. Prikaz Neubauerove komorice za brojanje stanica (Ramzan, 2023)

Stanice se broje u 4 velika kvadrata nakon čega se broj stanica po mililitru može izračunati iz formule:

$$\text{broj stanica mL}^{-1} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad (1)$$

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Nakon određivanja broja stanica brojanjem u Neubauerovoj komorici, potrebno je izračunati volumen suspenzije stanica koji je potreban za naciepljivanje stanica u ploču s 96 jažica. U svaku jažicu potrebno je naciepiti 100 µL suspenzije, a željena početna koncentracija iznosi 3×10^4 stanica mL⁻¹. Stanice se zatim inkubiraju 24 sata pri 37 °C, nakon čega se dodaju DES-ovi čija se citotoksičnost ispituje. Pripremljene su ishodne otopine otapala čija se

citotoksičnost ispitivala (Bet:U, TMAO:Gua, TMAO:U, GPC:U) u kojoj je volumni udio DES-ova bio 50 % (razrjeđenje s DMEM-om u omjeru 1:1). Obje stanične linije tretirane su različitim volumnim udjelima (0,5; 2,5 i 10 %) pripremljenih otapala, za svaki udio postavljene su četiri paralele, a kontrolne stanice nisu tretirane. Nakon dodatka niskotemperaturnih eutektičkih otapala, stanice su stavljene na inkubaciju na 37 °C tijekom 72 sata, nakon čega je učinak otapala, odnosno preživljenje stanica, određivan MTS metodom (Poglavlje 3.2.8.).

3.2.5. Krioprezervacija HeLa i HaCaT stanica

Prilikom izrade diplomskog rada, ispitivana su krioprotektivna svojstva tri niskotemperaturna eutektička otapala – Bet:U, TMAO:U i ChCl:U te je njihovo djelovanje uspoređivano s djelovanjem DMSO-a. Ova otapala korištena su kao krioprotektivni agensi prilikom zamrzavanja dvaju staničnih linija – HeLa i HaCaT. Prije zamrzavanja, stanice su odvojene od podloge za uzgoj dodatkom tripsina. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom svježeg hranjivog medija nakon čega je suspenzija stanica centrifugirana pri 3000 rpm tijekom 5 minuta. Po završetku centrifugiranja, medij i tripsin izdvojeni su u obliku supernatanta, dok se stanice nalaze u obliku taloga na dnu epruvete za centrifugiranje. Talog stanica resuspendiran je u određenom volumenu svježeg medija te je razdijeljen u ampulice za zamrzavanje. U pripremljenu suspenziju stanica dodani su korišteni krioprotektanti te je njihov volumni udio iznosio 10 %. Ovako pripremljene stanice zamrznute su na -80 °C, a postotak preživljenja i sposobnost proliferacije stanica mjeren je 7 dana, 1 mjesec, 3 mjeseca i 6 mjeseci nakon zamrzavanja. Ampulice za zamrzavanje uklonjene su iz zamrzivača na -80 °C te su stanice odmrznute postavljanjem u inkubator na temperaturu od 37 °C. Nakon odmrzavanja, stanice su resuspendirane te je izuzet alikvot za brojanje u Neubauerovoj komorici za brojanje. Ovom metodom određen je broj stanica koje su preživjele zamrzavanje što je prikazano kao postotak preživljenja. Za ispitivanje sposobnosti proliferacije preživjelih stanica, odmrznute stanice naciijepljene su na ploču s 24 jažice tako da početna koncentracija iznosi 3×10^4 stanica mL^{-1} te je rast naciijepljenih stanica praćen kroz tjedan dana.

3.2.6. Primjena COSMOtherm programa za predviđanje topljivosti ferocena u niskotemperaturnim eutektskim otapalima

COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) model koristi se za računalno predviđanje eutektske točke, koja se može definirati kao najniža temperatura pri kojoj je smjesa tekuća, i topljivosti tvari u eutektskom otapalu te kao takav šteti vrijeme, ali i druge resurse, poput laboratorijskog materijala te kemikalija. Utemeljen je na kvantno-mehaničkim metodama koje se koriste za izračunavanje raspodjele električnog naboja molekula otapala i otopljenih tvari. Korištenje COSMO-RS modela započinje konstrukcijom molekule čiju topljivost želimo ispitati u softveru TMoleX. Molekula se konstruira na način da bude optimalne geometrije te ju uz istu, karakteriziraju i volumna te površinska raspodjela električnog naboja. Sve navedeno čini tzv. σ -profil kojeg je moguće pohraniti kao izlaznu datoteku COSMO-proračuna. σ -profil se pomoću COSMOtherm programa prevodi u σ -potencijal te odgovarajući kemijski potencijal iz kojeg se dalje izračunavaju izvedena svojstva. Za predviđanje topljivosti molekule u otapalu, u COSMOtherm program se unosi konstruirana molekula ferocena, u obliku .cosmo datoteke te molekule od kojih je građeno otapalo od interesa. Postoje dvije opcije dodavanja molekula: *From database* i *From File*. Ukoliko odaberemo opciju *From database*, molekule dodajemo iz prethodno pripremljene baze podataka, dok opcijom *From File* koristimo molekule optimirane u programu TMoleX. Nakon unosa molekule čiju topljivost želimo predvidjeti te molekula otapala, u COSMOtherm softveru potrebno je definirati udjele molekula otapala i ispitivane molekule te temperaturu pri kojoj se topljivost ispituje. Izlazna datoteka nakon provođenja ispitivanja sastoji se od logaritma koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, čija je vrijednost obrnuto proporcionalna topljivosti molekule u otapalu, tj. što je vrijednost $\ln(\gamma)$ viša, topljivost molekule u tom otapalu je manja. U ovom radu korišten je programski paket BIOVIA COSMOtherm 2020 Version 20.0.0 kako bi se predvidjela topljivost ferocena u 74 DES-a. Iz dobivenih vrijednosti za topljivost ferocena odlučeno je u kojim će se DES-ovima ispitati topljivost i djelovanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila.

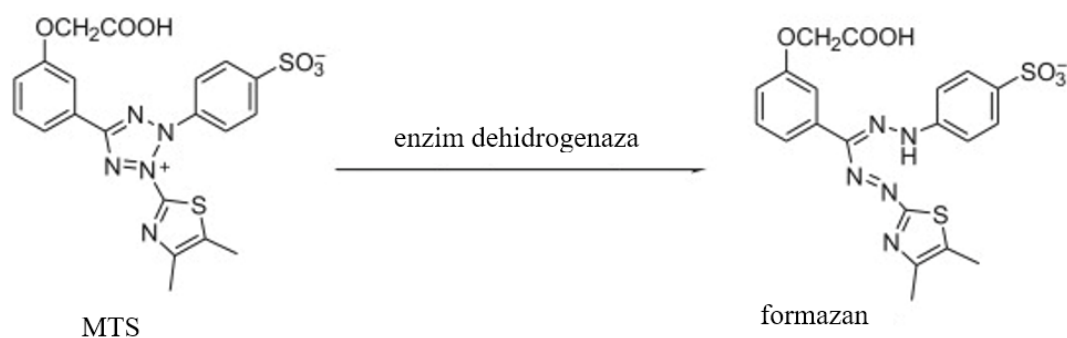
3.2.7. Ispitivanje učinka otopina biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila u DES-ovima na HeLa staničnu liniju

Uz ispitivanje citotoksičnosti niskotemperaturnih eutektskih otapala, također je ispitan učinak otopina biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila u dva niskotemperaturna eutektska otapala, Ty:C₈ i Me:C₈, na HeLa staničnu liniju. Otopina spoja **4** pripremljena je u oba otapala, dok je spoj **1** otopljen samo u Ty:C₈, jer nismo imali dovoljnu količinu

sintetiziranog spoja za pripremu ishodnih otopina u oba DES-a. U pripremljenim otopinama koncentracija spojeva iznosila je 0,25 g L⁻¹. Stanice su naciepljene na ploču s 96 jažica kako je prethodno opisano, nakon čega su tretirane koncentracijama otopina od 6,25; 2,5 i 1,25 mg L⁻¹. Uz otopine spojeva, stanice su tretirane i korištenim DES-ovima. Po dodatku DES-ova i otopina spojeva, stanice su inkubirane na 37 °C tijekom 72 sata. Nakon inkubacije, učinak otopina određen je MTS metodom.

3.2.8. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Postotak preživljenja stanica nakon tretmana određivan je MTS metodom, tj. The CellTiter 96[®] A_{Queous} One Solution Cell Proliferation Assay. To je kolorimetrijska metoda koja se temelji na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5dimetiliazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u ljubičasto obojeni formazan, koji je topljiv u mediju za uzgoj stanica (slika 5). Reakciju pretvorbe MTS-a u formazan katalizira enzim dehidrogenaza, a u reakciji kao koenzim sudjeluju NADH, odnosno NADPH. Intenzitet obojenja očitava se čitačem ploča te je proporcionalan broju živih stanica.



Slika 5. Redukcija tetrazolijeve soli u formazan (prema Kuete i sur., 2017)

Po isteku 72 sata inkubacije s ispitivanim otapalima, odnosno otopinama spojeva, u svaku jažicu se dodaje 10 μL MTS reagensa te se stanice inkubiraju 3 sata pri 37 °C. Rezultati se očitavaju na čitaču ploča koji mjeri intenzitet razvijene boje pri valnoj duljini od 490 nm, a dobivena vrijednost apsorbancije proporcionalna je broju živih stanica. Postotak preživljenja stanica može se izračunati iz sljedećeg izraza:

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog činjenice da je polarno otapalo koje se može miješati s vodom te se u njemu otapaju mnoge polarne i nepolarne molekule, dimetilsulfoksid pronašao je primjenu u različitim granama znanosti i industrije (Capriotti i Capriotti, 2012). Sposobnost vezanja malih molekula te transporta istih kroz kožnu barijeru potaknula je istraživanja u kojima se DMSO koristi kao prijenosnik različitih biološki aktivnih molekula. Zbog toga je na području medicine pronašao primjenu prilikom formulacije lijekova. Pa se tako formulacija diklofenaka koja sadrži DMSO, pokazala uspješna u ublažavanju simptoma osteoartritisa koljena (Simon i sur., 2009). Jedno od područja u kojem se DMSO najčešće koristi je svakako područje krioprezervacije. DMSO se koristi kao krioprotektivni agens koji štiti stanice od oštećenja nastalih prilikom zamrzavanja za razne stanične linije. Uz sve prednosti, DMSO iskazuje i mnoga negativna svojstva. Istraživanje Kitchin i Ebron (1984) pokazalo je da DMSO negativno utječe na embrio, Hall i sur. (2014) da formulacije lijekova s DMSO-om mogu pokazivati smanjenu efikasnost zbog interakcija DMSO-a i aktivnih komponenti lijeka, a Ruiz-Delgado i sur. (2009) da transplantirane stanice, koje su zamrznute uz DMSO kao krioprotektant, mogu izazvati negativne nuspojave. Također je dokazan negativan utjecaj DMSO-a na razvoj mozga i metilaciju i transkripciju većeg broja gena kod sisavaca (Hanslick i sur., 2009; Verheijen i sur., 2019).

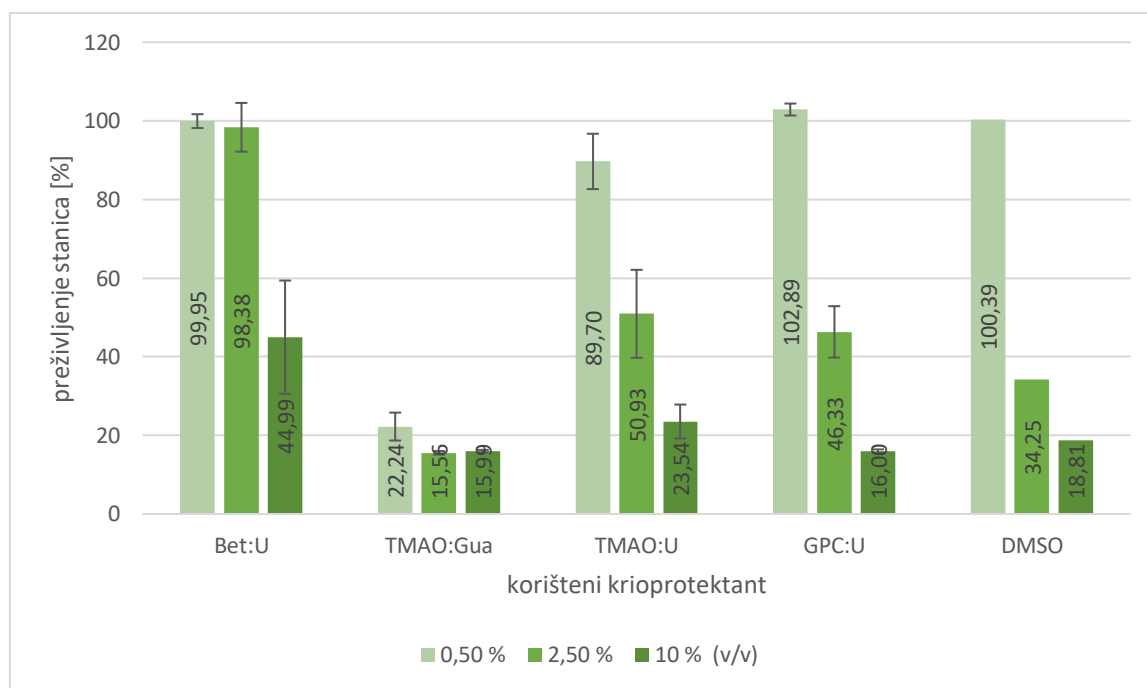
Toksičan utjecaj DMSO-a na ljudsko zdravlje doveo je do potrage za alternativnim otapalima koja ga mogu zamijeniti na svim spomenutim područjima primjene. Niskotemperaturna eutektička otapala smjesa su dvaju ili više komponenata koja ima nižu točku tališta od zasebnih komponenata (Paiva i sur., 2014). U istraživanju Radošević i sur. (2015) dokazano je da ispitani DES-ovi pokazuju nisku citotoksičnost i fitotoksičnost te da su lako biorazgradiva. Mnoga istraživanja pokazala su da se mogu koristiti za ekstrakciju različitih spojeva, kao i poboljšanje topljivosti aktivnih komponenti lijekova. Njihova primjena na području krioprezervacije također je istražena u nizu istraživanja. Činjenica da su niskotoksična, omogućava dulji period inkubacije prije zamrzavanja, koji je potreban da krioprotektant prodre u sve slojeve stanica (Bryant i sur., 2022).

Zbog svega navedenog, prilikom izrade ovog diplomskog rada, niskotemperaturna eutektička otapala primijenjena su za krioprezervaciju dvaju staničnih linija. Njihovo djelovanje uspoređeno je s djelovanjem DMSO-a kako bi se utvrdilo postoji li mogućnost zamjene DMSO-a u ovom području primjene.

Prethodno je i citotoksični učinak ispitanih DES-ova, također uspoređen s učinkom DMSO-a na dvije humane stanične linije korištene u ovom radu, HeLa i HaCaT. Nadalje, ispitana je i mogućnost otapanja organskih spojeva u DES-ovima, pri čemu su dva DES-a odabrana primjenom COSMO*therm* programa te korištena za otapanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila, a potom je ispitano djelovanje tih otopina na HeLa stanice.

4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI DES-OVA I DMSO-A NA HeLa I HaCaT STANIČNIM LINIJAMA

HeLa i HaCaT stanice su tretirane s 0,5; 2,5 i 10 % ishodnih otopina DES-ova te su inkubirane tijekom 72 sata pri 37 °C. Postotak preživljenja određen je MTS metodom te je iskazan kao postotak u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, a rezultati su prikazani na slikama 6 i 7.

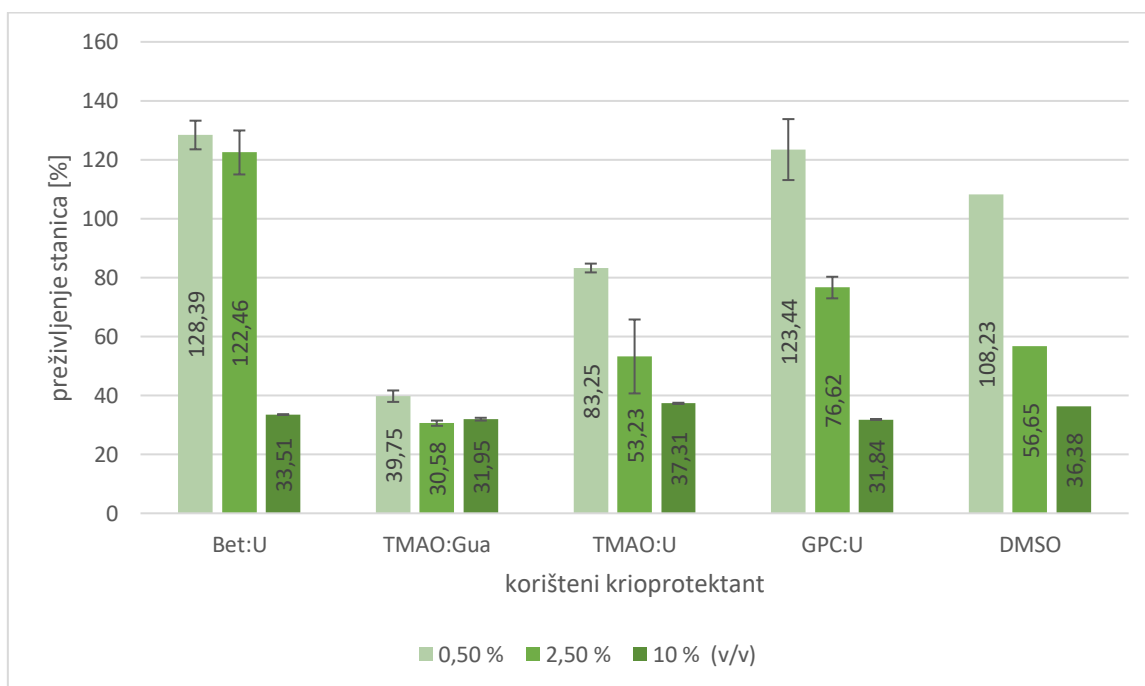


Slika 6. Djelovanje standardno korištenog krioprotektanta, dimetilsulfoksida (DMSO) i ispitivanih DES-ova, Bet:U, TMAO:Gua, TMAO:U i GPC:U nakon 72 sata u volumnim udjelima od 0,5; 2,5 i 10 % na HeLa staničnoj liniji. Preživljenje stanica iskazano je kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je citotoksično djelovanje DES-ova, ali i **DMSO**-a u korelaciji s primijenjenim volumnim udjelom. Pri najnižim korištenim volumnim udjelima (0,5 %) **Bet:U**, **GPC:U** i **DMSO** ne pokazuju citotoksično djelovanje prema HeLa stanicama (preživljenje 99,95; 102,89 i 100,39 %). Primjenom viših volumnih udjela, raste i citotoksični

učinak svih ispitanih otapala, tj. smanjuje se postotak preživljenja HeLa stanica.

Bet:U pokazalo se kao najmanje citotoksično otapalo, koje pri volumnim udjelima od 0,5 i 2,5 % ne pokazuje citotoksično djelovanje. Pri najvišem korištenom volumnom udjelu (10 %), stanice tretirane ovim otapalom, pokazuju najviši postotak preživljenja (44,99 %) u odnosu na stanice tretirane drugim otapalima, uključujući i DMSO. **TMAO:Gua** je otapalo koje je iskazalo najjači citotoksični učinak te je, već pri najnižem volumnom udjelu, preživljenje stanica bilo vrlo nisko (22,24 %).

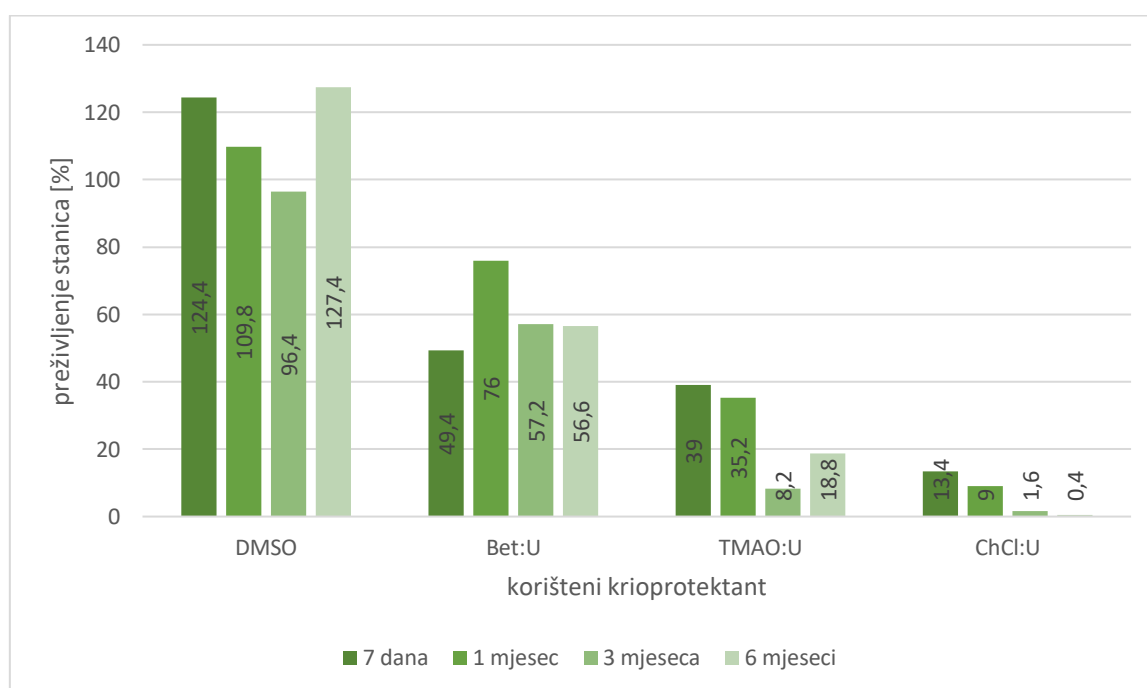


Slika 7. Djelovanje standardno korištenog krioprotektanta, dimetilsulfoksida (DMSO) i ispitivanih DES-ova, **Bet:U**, **TMAO:Gua**, **TMAO:U** i **GPC:U** nakon 72 sata u volumnim udjelima od 0,5; 2,5 i 10 % na HaCaT staničnoj liniji. Preživljenje stanica iskazano je kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Kao što je slučaj i kod HeLa stanica, i kod HaCaT stanične linije možemo primijetiti da je citotoksični učinak u korelaciji s primijenjenim volumnim udjelom. U ovom slučaju možemo vidjeti da čak tri otapala, **Bet:U**, **GPC:U** i **DMSO**, pri najnižem volumnom udjelu (0,5 %) pokazuju proliferativni učinak prema HaCaT stanicama (preživljenje 128,39; 123,44 i 108,23 %). **Bet:U**, i kod HaCaT stanica, pokazuje najslabije citotoksično djelovanje, tj. pri volumnim udjelima od 0,5 i 2,5 % pokazuje proliferativno djelovanje. Pri najvišem primijenjenom volumnom udjelu (10 %), postotak preživljenja je, za sva primijenjena otapala, podjednak (31,84 – 37,31 %) i sličan djelovanju 10% DMSO-a. **TMAO:Gua**, i prema HaCaT stanicama, iskazuje najjače citotoksično djelovanje.

4.2. PRIMJENA DES-OVA ZA KRIOPREZERVACIJU HeLa I HaCaT STANIČNIH LINIJA

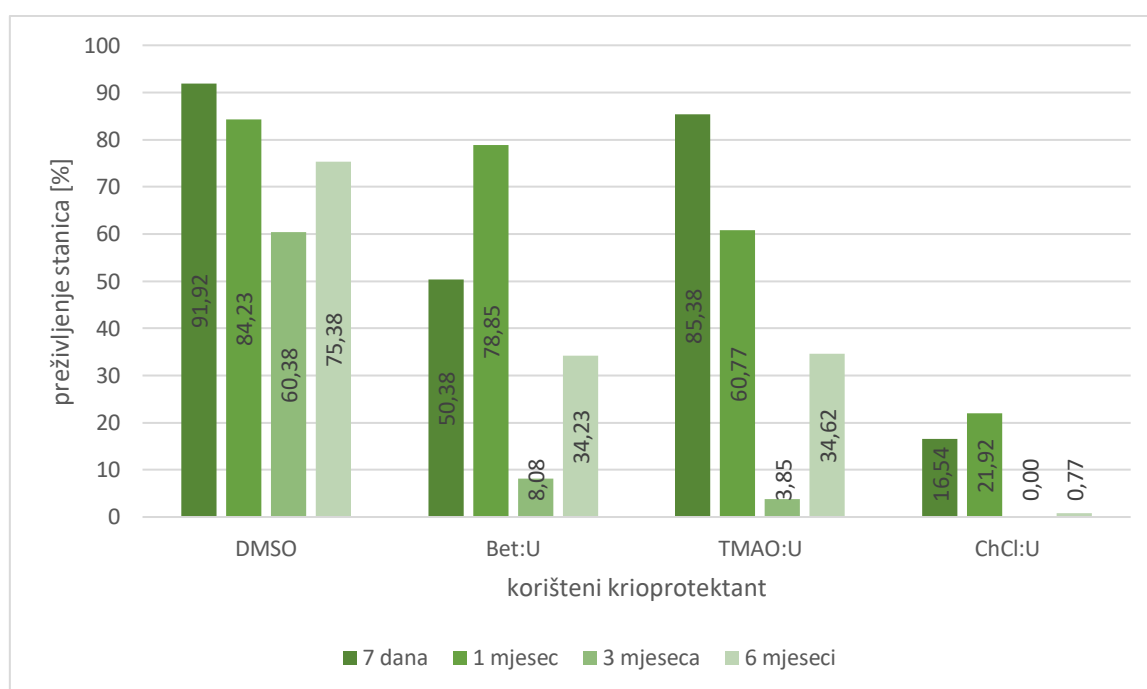
Eksperiment krioprezervacije odrađen je na način da su preživljenje i sposobnost proliferacije stanica mjerene 7 dana te 1, 3 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja stanica. Suspenziji stanica, prije zamrzavanja, dodan je standardno korišteni krioprotektant, DMSO te ispitivani DES-ovi (Bet:U, TMAO:U i ChCl:U) u volumnom udjelu od 10 %. U ampulama za zamrzavanje zamrznuto je 0,2 mL tako pripremljenih suspenzija na temperaturi od -80 °C. Na slikama 8 i 9 prikazano je preživljenje HeLa i HaCaT stanica, 7 dana te 1, 3 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja.



Slika 8. Preživljenje HeLa stanica 7 dana te 1, 3 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, dimetilsulfoksida (DMSO) i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U, u volumnom udjelu od 10 %. Preživljenje stanica iskazano je u obliku postotka u odnosu na broj stanica prije zamrzavanja.

Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da niti jedan od ispitivanih DES-ova nije pokazao krioprotektivna svojstva jednaka ili bolja od **DMSO**-a. Preživljenje stanica zamrznutih uz **DMSO** 7 dana te 1 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja je izrazito visoko. Tri mjeseca nakon zamrzavanja i u **DMSO**-u je vidljivo blago opadanje u postotku preživljenja, ali i u tom slučaju je preživljenje vrlo visoko (96,4 %).

Od ispitivanih DES-ova, najbolja krioprotektivna svojstva pokazao je **Bet:U** kod kojeg je vidljiv značajan pad u postotku preživljenja 7 dana nakon zamrzavanja kada je preživljenje iznosilo 49,4 %. Mjesec dana nakon zamrzavanja postotak preživljenja, u odnosu na preživljenje 7 dana nakon zamrzavanja, raste te iznosi 76 %. Ovo se može objasniti pretpostavkom da **Bet:U** difundira u stanice sporije od **DMSO**-a te je zbog toga mjesec dana nakon zamrzavanja, kada je prošao vremenski period potreban da otapalo difundira u stanice, postotak preživljenja viši. Postotak preživljenja 3 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja je podjednak te iznosi 57,2 i 56,6 %. **TMAO:U** se pokazao kao bolji krioprotektant od **ChCl:U**, ali nijedno od ovih otapala ne pokazuje zadovoljavajuće rezultate.

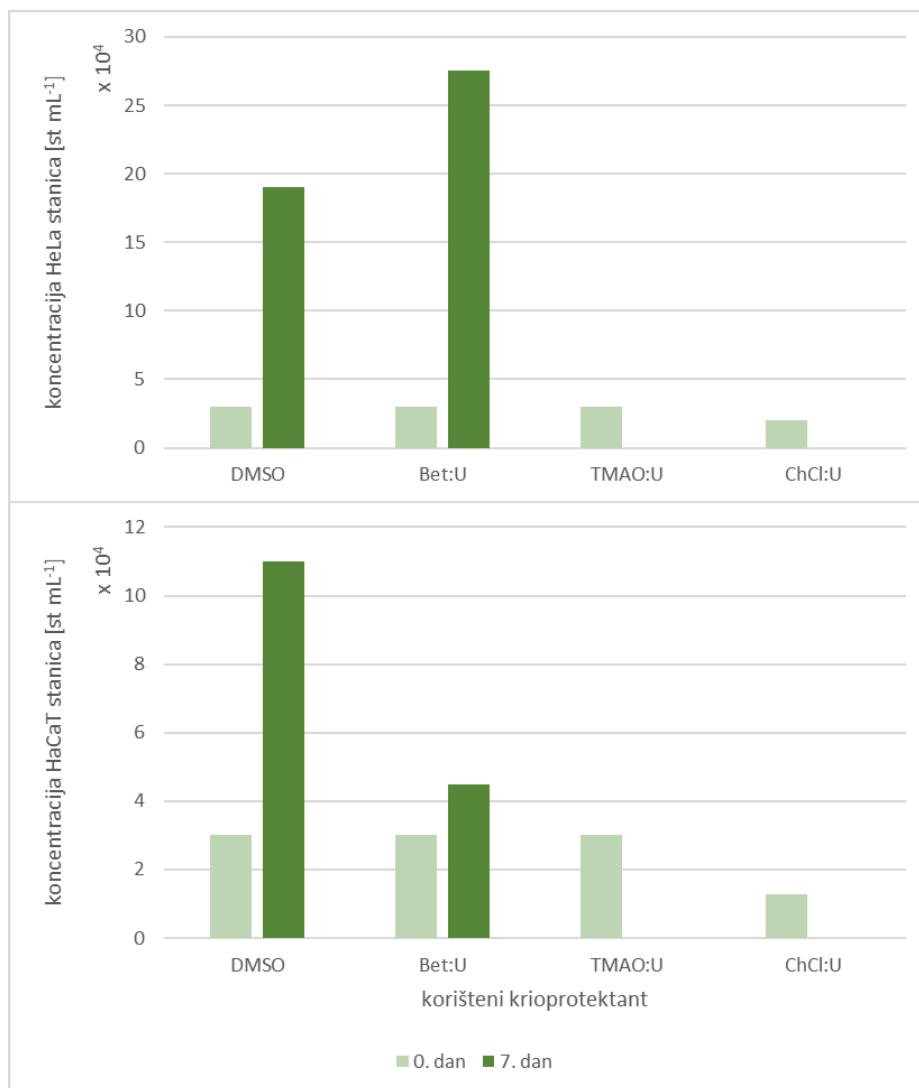


Slika 9. Preživljenje HaCaT stanica 7 dana te 1, 3 i 6 mjeseci nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, dimetilsulfoksida (DMSO) i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U, u volumnom udjelu od 10 %. Preživljenje stanica iskazano je u obliku postotka u odnosu na broj stanica prije zamrzavanja.

Kao i kod zamrzavanja HeLa stanica, niti jedan od ispitivanih DES-ova ne može zamijeniti **DMSO** na području krioprezervacije HaCaT stanica. **DMSO**, i u ovom slučaju, iskazuje vrlo zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva sa postotkom preživljenja između 60,38 i 91,92 %. Za HaCaT staničnu liniju, kao najbolje krioprotektivno sredstvo se pokazao **TMAO:U**. Upotrebom ovog krioprotektanta, postotak preživljenja 7 dana nakon zamrzavanja iznosi visokih 85,38 %. Mjesec dana nakon zamrzavanja, postotak preživljenja je niži te iznosi 60,77 %. Nakon 3 mjeseca, postotak preživljenja naglo opada na 3,85 %, ali nakon 6 mjeseci

ponovno raste na 34,62 %. Zanimljivo je za primijetiti da se ovaj DES pokazao kao vrlo loše krioprotektivno sredstvo za zamrzavanje HeLa stanica, dok u ovom slučaju pokazuje relativno zadovoljavajuća svojstva. **Bet:U** je i kod ove stanične linije pokazao značajan pad u postotku preživljenja 7 dana nakon zamrzavanja (50,38 %), ali je, kao i kod HeLa stanica, mjesec dana nakon zamrzavanja postotak preživljenja poprilično visok te iznosi 78,85 %. Tri mjeseca nakon zamrzavanja je preživljenje izrazito nisko, a 6 mjeseci nakon zamrzavanja podjednako kao i kod korištenja **TMAO:U** (34,23 %). Ono što se zasigurno može primijetiti da **ChCl:U** ne iskazuje zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva za zamrzavanje niti jedne od navedenih staničnih linija. Također se može primijetiti da u svim slučajevima, preživljenje obje stanične linije, 3 mjeseca nakon zamrzavanja nije u skladu s očekivanim te ne prati općeniti trend opadanja postotka preživljenja s duljinom vremena zamrzavanja. Navedeno može biti posljedica nedovoljno dobrog skladištenja te promjene uvjeta čuvanja stanica.

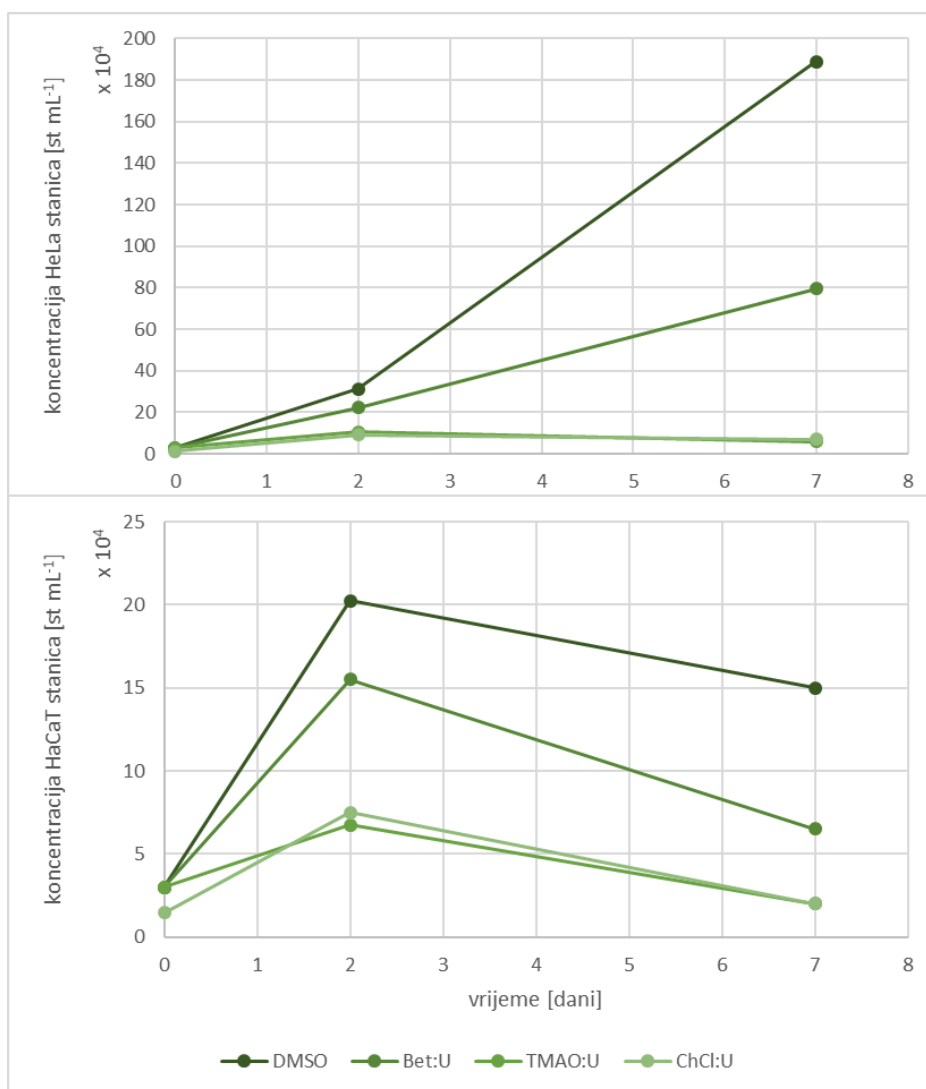
Osim postotka preživljenja stanica, također je ispitivana i sposobnost proliferacije stanica nakon odmrzavanja. Eksperiment je proveden na način da su stanice, nakon odmrzavanja i određivanja broja za izračun postotka preživljenja, nacijeppljene na ploču s 24 jažice. U svaku jažicu nacijeppljeno je 0,5 mL suspenzije u kojoj je koncentracija stanica iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Ovako nacijeppljene stanica inkubirane su na 37 °C te je njihov rast praćen u periodu od tjedan dana, a rezultati su prikazani na slikama 10, 11, 12 i 13.



Slika 10. Sposobnost proliferacije HeLa i HaCaT stanica tjedan dana nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, DMSO-a i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U.

Iz priloženih rezultata vidljivo je da, od korištenih krioprotektanata, samo **DMSO** i **Bet:U** imaju poželjna krioprotektivna svojstva prema HeLa i HaCaT stanicama. Jedino uz primjenu tih krioprotektanata, stanice nakon odmrzavanja nastavljaju rasti. To je vidljivo jer je koncentracija HeLa i HaCaT stanica, tjedan dana nakon naciepljivanja, viša od početne koncentracije koja je iznosila 3×10^4 stanica mL⁻¹. HeLa stanična linija, najbolju sposobnost proliferacije nakon zamrzavanja, očuvala je uz primjenu **Bet:U** te je koncentracija stanica tjedan dana nakon naciepljivanja iznosila $2,75 \times 10^5$ stanica mL⁻¹, dok je uz standardni krioprotektant, **DMSO** ista iznosila $1,9 \times 10^5$ stanica mL⁻¹. **TMAO:U** i **ChCl:U** nisu pokazali zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva, jer se stanice nakon odmrzavanja nisu nastavile dijeliti te tjedan dana nakon naciepljivanja nije vidljiva niti jedna živa stanica. Također je vidljivo da je početna koncentracija stanica, uz primjenu **ChCl:U** niža od željene. Navedeno je

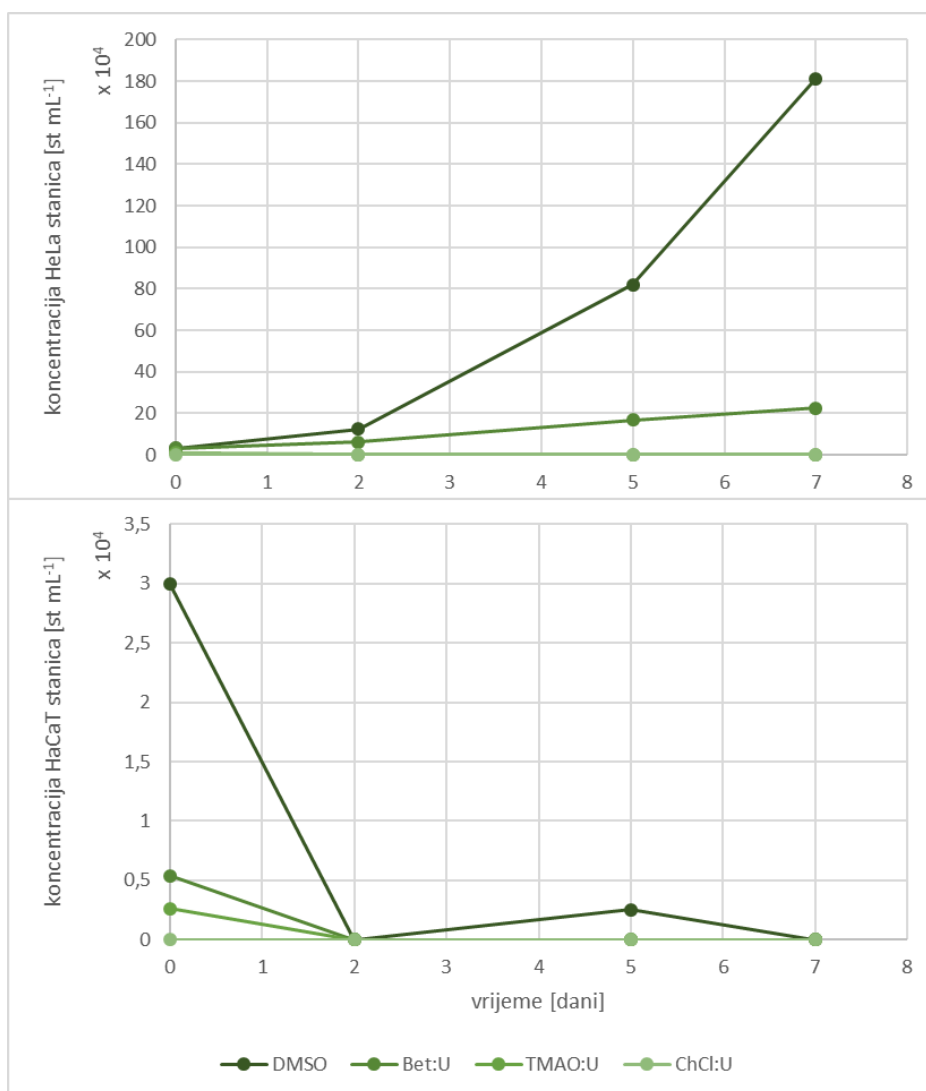
rezultat lošeg preživljenja stanica nakon zamrzavanja uz primjenu ovog krioprotektanta.



Slika 11. Sposobnost proliferacije HeLa i HaCaT stanica mjesec dana nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, DMSO-a i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U.

Mjesec dana nakon zamrzavanja, u slučaju HeLa stanica, rezultati su slični kao i tjedan dana nakon zamrzavanja. **DMSO** i **Bet:U** pokazuju poželjna krioprotektivna svojstva te stanice uz primjenu navedenih krioprotektanata rastu i razmnožavaju se. **DMSO** je, u ovom slučaju, bolje očuvao sposobnost HeLa stanica za proliferaciju te finalna koncentracija stanica, tjedan dana nakon naciepljivanja iznosi $1,89 \times 10^6$ stanica mL^{-1} , dok uz primjenu **Bet:U** ista iznosi $7,95 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . U slučaju HaCaT stanica, uz primjenu svih krioprotektanata, nije vidljiv kontinuirani rast koncentracije stanica, već broj stanica do drugog dana raste, nakon čega opada. U slučaju korištenja **DMSO**-a i **Bet:U** finalna koncentracija, sedam dana nakon naciepljivanja, je viša od početne, bez obzira na pad u odnosu na koncentraciju drugi dan. Finalna koncentracija HaCaT stanica viša je uz primjenu **DMSO**-a te iznosi $1,5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} , dok je u slučaju

primjene **Bet:U** $6,5 \times 10^4$ stanica mL^{-1} . **TMAO:U** i **ChCl:U** pokazali su podjednake rezultate kao i tjedan dana nakon zamrzavanja te su finalne koncentracije, i HeLa i HaCaT stanica, vrlo niske.

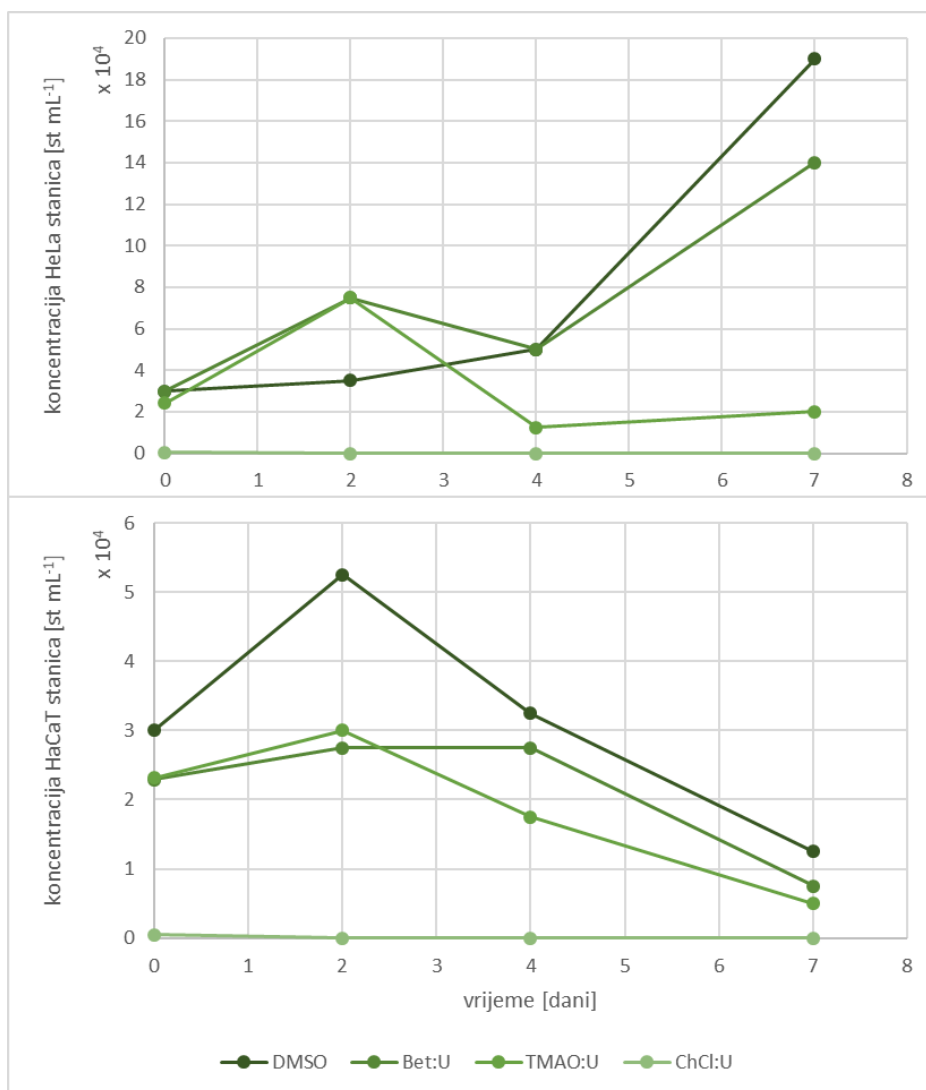


Slika 12. Sposobnost proliferacije HeLa i HaCaT stanica tri mjeseca nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, DMSO-a i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U.

Tri mjeseca nakon zamrzavanja vidljiva je jasna razlika u trendu rasta i razmnožavanja HeLa, u odnosu na HaCaT stanice. HeLa stanice očuvale su sposobnost proliferacije uz primjenu **DMSO**-a te **Bet:U**, ali usporedbom finalnih koncentracija stanica naciepljenih nakon odmrzavanja, vidljivo je da je bolji izbor za krioprotekciju ipak **DMSO**, uz čiju primjenu finalna koncentracija iznosi $1,813 \times 10^6$ stanica mL^{-1} . Primjenom **Bet:U** finalna koncentracija stanica je viša od početne te iznosi $2,25 \times 10^5$ stanica mL^{-1} , ali u usporedbi s rezultatima postignutim uz primjenu **DMSO**-a, navedeno se ne može smatrati zadovoljavajućim djelovanjem. Iz rezultata tri mjeseca nakon zamrzavanja, može se zaključiti da su HaCaT stanice osjetljivije na oštećenja

koja nastaju prilikom zamrzavanja u odnosu na HeLa stanice.

Početa koncentracija naciepljenih HaCaT stanica, samo u slučaju korištenja **DMSO**-a, odgovarala je željenoj te stanice samo uz korištenje tog krioprotektanta pokazuju slabi rast, pet dana nakon naciepljivanja. Finalne koncentracije HaCaT stanica, u svim slučajevima iznose 0 stanica mL^{-1} , što znači da niti jedna stanica, nakon zamrzavanja, nije očuvala sposobnost proliferacije. **TMAO:U** i **ChCl:U** ne pokazuju zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva jer stanice zamrznute uz primjenu navedenih krioprotektanata nisu nastavile s rastom i razmnožavanjem.



Slika 13. Sposobnost proliferacije HeLa i HaCaT stanica šest mjeseci nakon zamrzavanja uz primjenu standardnog krioprotektanta, DMSO-a i DES-ova, Bet:U, TMAO:U i ChCl:U.

Koncentracija HeLa stanica, naciepljenih šest mjeseci nakon zamrzavanja, samo uz primjenu **DMSO**-a, pokazuje kontinuirani rast te finalna koncentracija, sedam dana nakon naciepljivanja iznosi $1,9 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Koncentracija HeLa stanica zamrznutih uz primjenu

TMAO:U i **Bet:U**, dva dana nakon naciepljivanja pokazuje rast, nakon čega kreće opadati do 4. dana nakon naciepljivanja, a zatim ponovno pokazuje rast te finalna koncentracija uz primjenu **Bet:U** iznosi $1,4 \times 10^5$ stanica mL^{-1} , dok je uz primjenu **TMAO:U** niža od početne koncentracija i iznosi 2×10^4 stanica mL^{-1} . HaCaT stanice, uz primjenu **DMSO**-a, **Bet:U** i **TMAO:U**, pokazale su sposobnost proliferacije nakon zamrzavanja, što je vidljivo kao rast koncentracije stanica u odnosu na početnu koncentraciju. Međutim, finalne koncentracije, ni u jednom slučaju, nisu više od početne koncentracije. Ovo je još jedan dokaz kako su HaCaT stanice osjetljivije na oštećenja uzrokovana zamrzavanjem, u odnosu na HeLa stanice. **ChCl:U** nije pokazao zadovoljavajuća krioprotektivna svojstva prilikom zamrzavanja HeLa i HaCaT stanice.

4.3. PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI FEROCENA U ODABRANIM DES-OVIMA POMOĆU PROGRAMA COSMO_{therm}

Primjenom računalnog *software*-a COSMO-RS, smanjena je potreba za eksperimentalnim radom te ispitivanjem topljivosti ferocena u svakom odabranom DES-u, a na taj način i utrošak vremena i kemikalija. Korištenjem COSMO-RS programa, određeni su logaritmi koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$. Dobivene vrijednosti prikazuju topljivost ferocena na način da negativnija vrijednost $\ln(\gamma)$, odgovara boljoj topljivosti ferocena u odabranom otapalu. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 14 i 15. Također su prikazani i molarni omjeri komponenata DES-ova. Topljivost ferocena predviđana je u hidrofilnim DES-ovima s rastućim udjelom vode (0-50 %). Udio vode u hidrofobnim DES-ovima je 0.

		udio H ₂ O [%]	0	10	20	30	50		
	Kratice	Molarni omjer	ln(γ)						
HIDROFILNI DES									
1	B:Arg	1:1						>3	
2	B:His	1:1						2	
3	B:Lys	1:1						1	
4	B:CA	1:1						0	
5	B:EG	1:2						-1	
6	B:Glc	1:1						-2	
7	B:Gly	1:2						-3	
8	B:OxA:Gly	1:2:1						-4	
9	B:MA	1:1						-5	
10	B:MA:Glc	1:1:1						-6	
11	B:MA:Pro	1:1:1						-7	
12	B:Suc	4:1						-8	
13	B:Xyl	1:1						-9	
14	ChCl:CA	2:1							
15	ChCl:CA	1:1							
16	ChCl:EG	1:2							
17	ChCl:Fru	1:1							
18	ChCl:Glc	1:1							
19	ChCl:Glc	2:1							
20	ChCl:Gly	1:2							
21	ChCl:Mal	4:1							
22	ChCl:MA	1:1							
23	ChCl:OxA	1:1							
24	ChCl:Pro:MA	1:1:1							
25	ChCl:Suc	2:1							
26	ChCl:Sol	1:1							
27	ChCl:Sol	2:3							
28	ChCl:Sor	1:1							
29	ChCl:U	1:2							
30	ChCl:U:EG	1:2:2							
31	ChCl:U:Gly	1:2:2							
32	ChCl:Xyl	2:1'							
33	ChCl:Xyol	5:2'							
34	CA:Fru	1:1							
35	CA:Glc	1:1							
36	CA:Glc:Gly	1:1:1							
37	CA:Sor	2:3							
38	CA:Suc	1:1							
39	Fru:EG	1:2							
40	Fru:Glc	1:1							
41	Fru:Glc:EG	1:1:2							
42	Fru:Glc:Suc	1:1:1							
43	Fru:Glc:U	1:1:2							
44	Glc:EG	1:2							
45	Glc:Gly	1:2							
46	Gly:Sor	2:1							
47	MA:Fru	1:1							
48	MA:Fru:Gly	1:1:1							
49	MA:Glc	1:1							
50	MA:Glc:Gly	1:1:1							
51	MA:Sor:Gly	1:1:2							
52	MA:Suc	2:1							
53	Pro:Fru:Gly	1:1:1							
54	Pro:MA	1:1							
55	Suc:EG	1:2							
56	Suc:Glc:Fru	1:1:1							
57	Suc:Glc:U	1:1:2							
58	Sol:EG	1:2							
59	Sor:EG	1:2							
60	Xyl:EG	1:2							

Slika 14. Grafički prikaz vrijednosti ln (γ) za ferocen u hidrofilnim DES-ovima s rastućim udjelom vode (0-50 %). Nazivi spojeva od kojih su građeni odabrani DES-ovi: B – betain, Arg – arginin, His – histidin, Lys – lizin, CA – limunska kiselina, EG – etilen glikol, Glc – D-glukoza, Gly – glicerol, Ox A – oksalna kiselina, MA – jabučna kiselina, Pro – prolin, Suc – saharoza, Xyl – D-ksiloza, ChCl – kolin-klorid, Fru – D-fruktoza, Mal – D-maltoza, Sol – D-sorbitol, Sor – L-sorboza, U – urea, Xyol – ksilitol.

Predviđanjem topljivosti ferocena u hidrofilnim DES-ovima, primjenom COSMO-RS softvera, dobiveni su navedeni rezultati te se može zaključiti da je ferocen slabo topljiv u svim ispitanim hidrofilnim DES-ovima. Također je vidljivo da je topljivost ferocena slabija što je udio vode u DES-ovima viši.

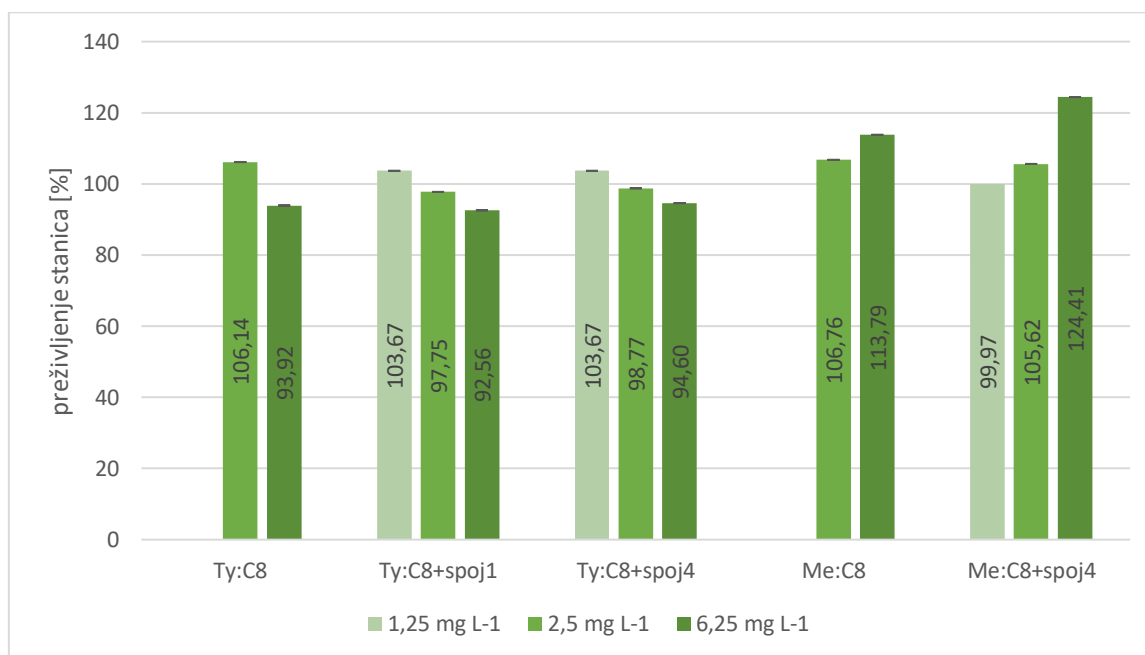
HIDROFOBNI DES			ln(γ)	
61	Me:Cam	1:1	>3	
62	Me:Cam	4:1	2	
63	Me:EU	1:1	1	
64	Me:PA	1:1	0	
65	Me:SA	4:1	-1	
66	Me:C8	1:1	-2	
67	Me:C10	1:1	-3	
68	Me:C18:2	1:1	-4	
69	Me:Ty	3:2	-5	
70	Ty:C8	1:3	-6	
71	Ty:C10	1:1	-7	
72	Ty:Cou	3:2	-8	
73	lauric acid:C8	1:03	-9	
74	lauric acid:C10	2:03		

Slika 15. Grafički prikaz vrijednosti ln (γ) za ferocen u hidrofobnim DES-ovim bez dodatka vode. Nazivi spojeva od kojih su građeni odabrani DES-ovi: Me – mentol, Cam – kamfor, EU – eukaliptol, PA – perilinska kiselina, SA – salicilna kiselina, C8 – oktanska kiselina, C10 – dekanska kiselina, C18:2 – linolna kiselina, Ty – timol, Cou – kumarin, lauric acid – laurinska kiselina.

Obzirom na predviđenu slabu topljivost ferocena u hidrofilnim DES-ovima, također je provedena i analiza topljivosti ferocena u navedenim hidrofobnim DES-ovima. Iz prikaza rezultata na slici 15 vidljivo je da su hidrofobni DES-ovi pogodniji medij za otapanje ferocena, iako niti tu nisu dobivene negativne ln (γ) vrijednosti, koje bi ukazivale na veći potencijal otapanja te grupe spojeva. Prema dobivenim rezultatima, za pripremanje otopina biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila odabrana su dva hidrofobna DES-a, Me:C₈ i Ty:C₈.

4.4. UČINAK OTOPINA BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA U DES-OVIMA NA HeLa STANIČNU LINIJU

S obzirom na to da se ferocenski biokonjugati istražuju i primjenjuju kao biološki aktivni spojevi te da mnogi posjeduju antitumorska svojstva, u ovom radu ispitan je učinak biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na HeLa staničnu liniju. Za provođenje ovog eksperimenta, HeLa stanice nacičepljene su na ploču od 96 jažica, kako je opisano u prethodnom ulomku te su pripremljene otopine biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (spoja **1** i **4**) u dva niskotemperaturna eutektička otapala. Stanice su tretirane otopinama spojeva, inkubirane na 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je MTS metodom određeno preživljenje stanica te su rezultati prikazani na slici 16.



Slika 16. Djelovanje DES-ova Ty:C₈ i Me:C₈ te otopina biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila u navedenim DES-ovima na HeLa staničnu liniju nakon 72 sata tretmana pri koncentracijama od 6,25; 2,5 i 1,25 mg L⁻¹. Preživljenje stanica iskazano je kao postotak u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Prema prikazanim rezultatima je vidljivo da niti ispitani DES-ovi, niti otopine biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (spoja **1** i **4**) ne pokazuju značajne razlike u učinku na preživljenje HeLa stanica koje je u rasponu od najniže vrijednosti 92,56 % za otopinu spoja **1** u Ty:C₈ do 124,41 % za otopinu spoja **4** u Me:C₈. Ovo ispitivanje je provedeno sa ciljem

zamjene DMSO-a, kao otapala za navedene spojeve, koji su u diplomskom radu Logarušić (2023) otopljeni u DMSO-u. Prema predikciji računalnim *software*-om COSMO-RS, koji je korišten za odabir idealnog DES-a za otapanje ferocenskih biokonjugata, kao najpovoljniji su se pokazali hidrofobni DES-ovi Ty:C₈ i Me:C₈. Navedeni DES-ovi su otopili spojeve **1** i **4** jednako dobro kao i DMSO, odnosno uspješno su pripravljene ishodne otopine spojeva **1** i **4** iste molarne koncentracije (10 mM) u DES-ovima, kao i u DMSO-u. Maksimalnu eksperimentalnu topljivost nije bilo moguće odrediti prema metodi opisanoj u radu Panić i sur. (2022) zbog nedovoljne količine sintetiziranih spojeva. Kod ispitivanja djelovanja spojeva **1** i **4** otopljenih u DES-ovima na HeLa stanice, nakon dodatka otopina u suspenziju stanica, pri višim koncentracijama (12,5 mg L⁻¹ do 125 mg L⁻¹) zamijećene su masne kapljice u mediju za kulturu stanica i u nekim slučajevima zamućenje i promjena boje medija, stoga su ispitane koncentracije niže nego u diplomskom radu Logarušić (2023). U navedenom radu najveću citotoksičnost spram HeLa stanica pokazao je spoj **4** s izračunatom IC₅₀ vrijednost 44,23 mg L⁻¹, dok je za spoj **1** ta vrijednost iznosila 79,78 mg L⁻¹, koje u ovom radu nisu ispitane zbog gore spomenutih razloga te nije moguće u potpunosti usporediti djelovanje spojeva **1** i **4** otopljenih u DES-u i DMSO-u. Najmanja ispitana koncentracija u diplomskom radu Logarušić (2023) je bila 7,81 mg L⁻¹, što je približno jednako najvećoj ispitanoj koncentraciji u ovom radu. Pri toj koncentraciji niti jedan od četiri ispitana biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila nije pokazao negativno djelovanje na rast HeLa stanica, stoga je to u skladu s navedenim ispitivanjem djelovanja spoja **1** i **4** otopljenih u DES-ovima. Slijedom navedenog potrebna su dodatna ispitivanja većeg broja DES-ova za otapanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila, kao potencijalne zamjene za DMSO.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitana niskotemperaturna eutektička otapala inhibiraju rast HeLa i HaCaT stanica. Stupanj inhibicije rasta u korelaciji je s volumnim udjelom (v/v) dodanog DES-a, odnosno inhibitorni učinak izraženiji je s povećanjem volumnog udjela otapala. **Bet:U** je otapalo koje je pokazalo najblaži učinak, dok je **TMAO:Gua** pokazalo najizraženiji inhibitorni učinak. **Bet:U** i **GPC:U** imaju slični trend djelovanja na rast HeLa i HaCaT stanica kao i organsko otapalo **DMSO**.
2. Niti jedan od ispitanih DES-ova (**Bet:U**, **TMAO:U** i **ChCl:U**) nije pokazao jednaka ili bolja krioprotektivna svojstva od **DMSO-a**. Najbolja krioprotektivna svojstva pri zamrzavanju HeLa stanica pokazao je **Bet:U**, a za zamrzavanje HaCaT stanica bio je najpovoljniji **TMAO:U**. Najlošija krioprotektivna svojstva za obje stanične linije imao je **ChCl:U**.
3. Ispitivanje sposobnosti proliferacije stanica nakon odmrzavanja dalo je slične rezultate kao ispitivanje postotka preživljenja neposredno nakon odmrzavanja. Najboljim se pri tome pokazao **DMSO**, a od ispitanih DES-ova **Bet:U**.
4. HaCaT stanice su se pokazale osjetljivijima tijekom krioprezervacije u ispitanim DES-ovima nego HeLa stanice.
5. Predviđanjem topljivosti ferocena primjenom računalnog softvera COSMO-RS pokazano je da je ferocen slabije topljiv u hidrofilnim DES-ovima te da mu topljivost opada s porastom udjela vode u strukturi DES-a. Bolja topljivost ferocena predviđena je u hidrofobnim DES-ovima bez dodatka vode.
6. DES-ovi **Ty:C₈** i **Me:C₈** korišteni su za otapanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila (spoj **1** i **4**). Otopine spoja **1** i **4** u odabranim DES-ovima nisu značajno utjecale na preživljenje HeLa stanica pri ispitanim koncentracijama. Djelovanje otopina ferocenskih biokonjugata u DES-ovima i **DMSO-u** nije bilo moguće u potpunosti usporediti zbog razlika u ispitanim koncentracijama.
7. Niskotemperaturna eutektička otapala svakako imaju potencijal kao moguća zamjena za dimetilsulfoksid, no potrebna su daljnja istraživanja u tom smjeru.

5. LITERATURA

- Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc* **126**, 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
- Adler S, Paparella M, Pellizzer C, Hartung T, Bremer S (2005) The detection of differentiation-inducing chemicals by using green fluorescent protein expression in genetically engineered teratocarcinoma cells. *Altern to Lab Anim* **33**, 91–103. <https://doi.org/10.1177/026119290503300204>
- Aguilar JS, Roy D, Ghazal P, Wagner EK (2002) Dimethyl sulfoxide blocks herpes simplex virus-I productive infection in vitro acting at different stages with positive cooperativity. Application of micro-array analysis. *BMC Infect Dis* **2**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-9>
- Aramli MS, Golshahi K, Nazari RM, Aramli S, Banan A (2015) Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Huso huso* spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **162**, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.005>
- Aronson JKBT (ur) (2016) Dimethylsulfoxide. U: Meyler's Side Effects of Drugs, 16. edn. Elsevier, Oxford, str 992–993.
- Ashwood-Smith MJ (1964) Low Temperature Preservation of Mouse Lymphocytes with Dimethyl Sulfoxide. *Blood* **23**, 494–501
- Augustine-Rauch KA, Zhang Q, Kleinman M, Lawton R, Welsh MJ (2004) A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds. *Reprod Toxicol* **18**, 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.01.006>
- Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, i ostali (2020) Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med* **15**, 1463–1491. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145>
- Bryant SJ, Awad MN, Elbourne A, Christofferson AJ, Martin A V., Meftahi N, i ostali (2022) Deep eutectic solvents as cryoprotective agents for mammalian cells. *J Mater Chem B* **10**, 4546–4560. <https://doi.org/10.1039/d2tb00573e>
- Camp JE, Nyamini SB, Scott FJ (2020) Erratum: Cyrene™ is a green alternative to DMSO as a solvent for antibacterial drug discovery against ESKAPE pathogens (RSC Medicinal Chemistry (2020) 11 (111-117) DOI: 10.1039/C9MD00341J). *RSC Med Chem* **11**, 317. <https://doi.org/10.1039/d0md90006k>
- Capriotti K, Capriotti JA (2012) Dimethyl sulfoxide: History, chemistry, and clinical utility in

- dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol* **5**, 24–26
- Carriazo D, Serrano MC, Gutiérrez MC, Ferrer ML, del Monte F (2012) Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem Soc Rev* **41**, 4996–5014. <https://doi.org/10.1039/c2cs15353j>
- Castro VIB, Craveiro R, Silva JM, Reis RL, Paiva A, Ana AR (2018) Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology* **83**, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.010>
- Cysewski P, Jeliński T, Cymerman P, Przybyłek M (2021) Solvent screening for solubility enhancement of theophylline in neat, binary and ternary NADES solvents: New measurements and ensemble machine learning. *Int J Mol Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms22147347>
- Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L. *Anal Chem* **85**, 6272–6278. <https://doi.org/10.1021/ac400432p>
- Durand E, Lecomte J, Villeneuve P (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur J Lipid Sci Technol* **115**, 379–385. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200416>
- Farrant J (1964) Pharmacological actions and toxicity of dimethyl sulphoxide and other compounds which protect smooth muscle during freezing and thawing. *J Pharm Pharmacol* **16**, 472–483. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1964.tb07496.x>
- Gill I, Vulfson E (1994) Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends Biotechnol* **12**, 118–122. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90088-4)
- Hall MD, Telma KA, Chang KE, Lee TD, Madigan JP, Lloyd JR, i ostali (2014) Say no to DMSO: Dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. *Cancer Res* **74**, 3913–3922. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0247>
- Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, i ostali (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* **34**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
- Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A, Al-Saadi MA, AlNashef IM, Mirghani MES, i ostali (2013) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193–2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>
- Horita A, Weber LJ (1964) Skin penetrating property of drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and other vehicles. *Life Sci* **3**, 1389–1395. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(64\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(64)90079-7)

- Hou XD, Liu QP, Smith TJ, Li N, Zong MH (2013) Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Cholinium Amino Acids Ionic Liquids. *PLoS One* **8**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059145>
- Jacob SW, Bischel M, Herschler RJ (1964) DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO): A NEW CONCEPT IN PHARMACOTHERAPY. *Curr Ther Res Clin Exp* **6**, 134–135
- Jesus AR, Duarte ARC, Paiva A (2022) Use of natural deep eutectic systems as new cryoprotectant agents in the vitrification of mammalian cells. *Sci Rep* **12**. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12365-4>
- Jesus AR, Meneses L, Duarte ARC, Paiva A (2021) Natural deep eutectic systems, an emerging class of cryoprotectant agents. *Cryobiology* **101**, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.05.002>
- Karim M, Boikess R, Schwartz R, Cohen P (2022) Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Arch Dermatol Res* **315**. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02494-1>
- Kitchin KT, Ebron MT (1984) FURTHER DEVELOPMENT OF RODENT WHOLE EMBRYO CULTURE: SOLVENT TOXICITY AND WATER INSOLUBLE COMPOUND DELIVERY SYSTEM. *Toxicology* **30**, 45–57
- Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Med Spices Veg from Africa Ther Potential Against Metab Inflammatory, Infect Syst Dis* 271–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kuroda K, Komori T, Ishibashi K, Uto T, Kobayashi I, Kadokawa R, i ostali (2020) Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences. *Commun Chem* **3**, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00409-7>
- Logarušić I (2023) Djelovanje biokonjugata ferocena i derivata 2-tiouracila na HeLa staničnu liniju (diplomski rad). Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lovelock JE, Bishop MW (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* **183**, 1394–1395
- Martin D, Weise A, Niclas H -J (1967) The Solvent Dimethyl Sulfoxide. *Angew Chemie Int Ed English* **6**, 318–334. <https://doi.org/10.1002/anie.196703181>
- Morrison HG, Sun CC, Neervannan S (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm* **378**, 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>
- Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC (2014) Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord

- blood. *Cryobiology* **68**, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.007>
- Murray KA, Gibson MI (2022) Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem* **6**, 579–593. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00407-4>
- Muther RS, Bennett WM (1980) Effects of Dimethyl Sulfoxide on Renal Function in Man. *JAMA J Am Med Assoc* **244**, 2081–2083. <https://doi.org/10.1001/jama.1980.03310180047034>
- Nusbaumer D, da Cunha LM, Wedekind C (2018) Comparing methanol-glucose and dimethylsulfoxide based extender for milt cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta*). *bioRxiv* 289736
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnol Adv* **14**, 127–149. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00005-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00005-5)
- Panić M, Maček Hrvat N, Štokić M, Radojčić Redovniković I, Kovarik Z, Radošević K (2022) Natural deep eutectic solvents improve the solubility of acetylcholinesterase reactivator RS194B. *Sustain Chem Pharm* **27**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100654>
- Parker AJ (1961) THE EFFECTS OF SOLVATION ON THE PROPERTIES OF ANIONS IN DIPOLAR APROTIC SOLVENTS. *Q Rev Chem Soc* **16**, 163–187
- Perseghin P, Balduzzi A, Bonanomi S, Dassi M, Buscemi F, Longoni D, i ostali (2000) Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000 261 **26**, 116–118. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702462>
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* **164**, 666
- Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC (2006) Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* **117**, 1845–1850. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000209931.24781.9c>
- Qiao Y, Cai HL, Yang X, Zang YY, Chen ZG (2018) Effects of natural deep eutectic solvents on lactic acid bacteria viability during cryopreservation. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 5695–5705. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8996-3>
- Radošević K, Čurko N, Gaurina Srček V, Cvjetko Bubalo M, Tomašević M, Kovačević Ganić K, i ostali (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *Lwt* **73**, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>

- Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Redovniković RI (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf* **112**, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>
- Ramzan M (2023) RBC Count Method - Procedure, Principle, Result. Biol. Teach. <https://biologyteach.com/rbc-count-method-procedure-principle-result/#ftoc-heading-5>. Pristupljeno 23 studeni 2023.
- Randall JO (1982) Dimethylsulfoxide and ocular involvement. *Cutan Ocul Toxicol* **1**, 147–152. <https://doi.org/10.3109/15569528209051519>
- Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC (2008) Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology* **56**, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.01.003>
- Rogers RD, Seddon KR (2003) Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science (80-)* **302**, 792–793. <https://doi.org/10.1126/science.1090313>
- Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, Rodríguez-Romo LN, López-Otero A, Hernández-Arizpe A, i ostali (2009) Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: Report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol* **122**, 1–5. <https://doi.org/10.1159/000227267>
- Sekharan TR, Chandira RM, Tamilvanan S, Rajesh SC, Venkateswarlu BS (2022) Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Biointerface Res Appl Chem* **12**, 847–860. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.847860>
- Shamseddin A, Crauste C, Durand E, Villeneuve P, Dubois G, Durand T, i ostali (2017) Resveratrol formulated with a natural deep eutectic solvent inhibits active matrix metalloprotease-9 in hormetic conditions. *Eur J Lipid Sci Technol* **119**. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700171>
- Simon LS, Grierson LM, Naseer Z, Bookman AAM, Zev Shainhouse J (2009) Efficacy and safety of topical diclofenac containing dimethyl sulfoxide (DMSO) compared with those of topical placebo, DMSO vehicle and oral diclofenac for knee osteoarthritis. *Pain* **143**, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.008>
- Stott PW, Williams AC, Barry BW (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: Enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J Control Release* **50**, 297–308. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00153-3)
- Tashrifi Z, Khanaposhtani MM, Larijani B, Mahdavi M (2020) DMSO: Yesterday's Solvent,

- Today's Reagent. *Adv Synth Catal* **362**. <https://doi.org/10.1002/adsc.201901021>
- Tian Y, Sun DW, Xu L, Fan TH, Zhang ST, Zhu Z (2022) Bioinspired Cryoprotectants Enabled by Binary Natural Deep Eutectic Solvents for Sustainable and Green Cryopreservation. *ACS Sustain Chem Eng* **10**, 7677–7691. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01578>
- Tuntarawongsa S, Phaechamud T (2012) Polymeric eutectic drug delivery system. *J Met Mater Miner* **22**
- Vejnovic I, Simmler L, Betz G (2010) Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. *Int J Pharm* **386**, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.019>
- Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, i ostali (2019) DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* **9**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Yamaguchi R, Takanashi M, Ito M, Ogawa A, Hashimoto M, Ishii Y, i ostali (2014) Plasticizer concentration in cord blood cryopreserved with DMSO. *Bone Marrow Transplant* **49**, 157–158. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.135>
- Yang B, Liu BL, Zhou XL, Shen L, Huang DH (2013) Enhanced metabolic function of human hepatocytes cryopreserved with low concentration me2so and polyol additives at -80C. *Cryo Letters* **34**, 381–387
- Yoganantharajah P, Ray AP, Eyckens DJ, Henderson LC, Gibert Y (2018) Comparison of solvate ionic liquids and DMSO as an in vivo delivery and storage media for small molecular therapeutics. *BMC Biotechnol* **18**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0442-1>
- Zhao H, Zhang C, Crittle TD (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J Mol Catal B Enzym* **85–86**, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.003>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (SUNČICA ŠARAC) 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.

Vlastoručni potpis