

# Učinci ferocenskog analoga kurkumina na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima

---

**Bajić, Ružica**

**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:159:280433>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Ružica Bajić

**UČINCI FEROCENSKOG  
ANALOGA KURKUMINA NA  
CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU  
POLIKLORIRANIM BIFENILIMA**

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



Ovaj rad je izrađen u okviru HRZZ projekta IP-2020-02-9162 „*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*“, voditeljice prof. dr. sc. Lidije Barišić.

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Teuti Murati na prihvaćenom mentorstvu, pomoći, silnom strpljenju i razumijevanju, uloženom trudu i vremenu u pisanju rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Marini Miletić na pomoći i podršci u izradi laboratorijskog dijela diplomskog rada i svim prenesenim vještinama i znanjima.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivani Kmetič na svom prenesenom znanju, korisnim savjetima, motivaciji i podršci.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi period studiranja ispunili predivnim uspomnama za cijeli život. Zahvalna sam svima na puno novih iskustava, malim i velikim projektima, lijepim i ispunjenim trenutcima, naučenim lekcijama o sebi i životu, smijehu i pozitivnoj energiji.*

*Posebno hvala mojoj mami koja je uvijek bila uz mene i pružala mi bezuvjetnu podršku, vjerujući u moj uspjeh.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

## UČINCI FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

*Ružica Bajić*, univ. bacc. nutr.  
0058207101

**Sažetak:** Cilj rada je bio ispitati mogući protektivni učinak ferocenom modificiranog polifenola kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na citotoksičnost induciranu kongenerima polikloriranih bifenila (PCB) – PCB 77 i PCB 153 (75  $\mu\text{M}$ ) u kulturi stanica ovarija (CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanična linija). U svrhu određivanja vijabilnosti i proliferacije stanica korištene su metode *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue*, a primjenom fluorimetrijske metode detektiran je učinak na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Predtretman stanica ferocenskim analogom kurkumina nije pokazao značajan učinak na vijabilnost stanica tretiranih sa PCB 77, iako je pri određenim koncentracijama analoga određeno inhibitorno djelovanje. Prilikom predinkubacije stanica analogom, a potom tretiranih sa PCB 153 nije uočen učinak na proliferaciju i vijabilnost stanica što je potvrđeno primjenom svih triju metoda. Analog je u svim ispitanim koncentracijama pokazao antioksidacijski učinak, odnosno doveo do pada razine ROS u odnosu na stanice koje su tretirane samo sa PCB 153. Statistički značajan pad razine ROS uočen je kod predtretmana stanica analogom kurkumina u koncentracijama od 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ).

**Ključne riječi:** *kurkumin, ferocen, PCB, citotoksičnost, ROS*

**Rad sadrži:** 54 stranice, 17 slika, 85 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Teuta Murati

**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Ivana Kmetič, dr. sc. Marina Miletić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Teuta Murati (mentor)
3. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

**Datum obrane:** 27. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### EFFECTS OF FERROCENE ANALOGUE OF CURCUMIN ON CYTOTOXICITY INDUCED BY POLYCHLORINATED BIPHENYLS

*Ružica Bajić, univ. bacc. nutr.*  
*0058207101*

**Abstract:** The aim of the work was to examine the possible protective effect of the ferrocene-modified polyphenol curcumin (1-20  $\mu\text{M}$ ) on cytotoxicity induced by congeners of polychlorinated biphenyls (PCBs) - PCB 77 and PCB 153 (75  $\mu\text{M}$ ) in the culture of ovarian cells (CHO (Chinese Hamster Ovary) - K1 cell line). Neutral Red, Kenacid Blue and Trypan Blue methods were used to determine cell viability and proliferation, and reactive oxygen species (ROS) formation was detected by the fluorimetric method. Pretreatment of cells with the ferrocene analogue showed no significant effect on the viability of cells treated with PCB 77, although an inhibitory effect was detected at certain analogue concentrations. No effect on cell proliferation and viability was observed when cells were preincubated with the analogue and then treated with PCB 153 (confirmed by all three methods). The analogue showed an antioxidant effect at all concentrations tested, i.e. it resulted in decrease in the level of ROS compared with cells treated with PCB 153 alone. A statistically significant decrease in ROS level was observed when cells were pretreated with curcumin analogue at concentration of 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ), 2.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.025$ ), and 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.005$ ).

**Keywords:** *curcumin, ferrocene, PCB, cytotoxicity, ROS*

**Thesis contains:** 54 pages, 17 figures, 85 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:** Teuta Murati, PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Ivana Kmetič, PhD, Full professor, Marina Miletić, PhD, Scientific assistant

#### **Reviewers:**

1. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (president)
2. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Irena Landeka Jurčević, PhD, Full professor (member)
4. Igor, Slivac, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 27<sup>th</sup>, 2023



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Toksičnost polikloriranih bifenila.....	5
2.1.2. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorobifenil).....	7
2.1.3. PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil).....	7
<b>2.2. KURKUMIN</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Kurkuma.....	8
2.2.2. Kurkuminoidi.....	8
2.2.3. Otkriće i fizikalna i kemijska svojstva kurkumina.....	9
2.2.4. Biološka svojstva kurkumina.....	10
2.2.5. Bioraspoloživost kurkumina.....	14
2.2.6. Kurkumin i poliklorirani bifenili.....	14
<b>2.3. BIOORGANOMETALNA KEMIJA</b> .....	<b>16</b>
2.3.1. Ferocen.....	16
2.3.2. Ferocenski analozi kurkumina.....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>18</b>
3.1.1. Biološki materijal.....	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Otopine i puferi.....	20
3.1.4. Oprema i uređaji.....	25
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	<b>26</b>
3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi.....	26
3.2.2. Određivanje učinka ferocenskog analoga kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.....	26
3.2.3. Određivanje učinka ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih sa PCB 153.....	28
<b>3.3. OBRADA REZULTATA</b> .....	<b>30</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM <i>NEUTRAL RED</i></b> .....	<b>32</b>
4.1.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom <i>Neutral Red</i> .....	33
4.1.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-	

K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom <i>Neutral Red</i> .....	34
<b>4.2. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM <i>KENACID BLUE</i> .....</b>	<b>36</b>
4.2.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO- K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom <i>Kenacid Blue</i> .....	36
4.2.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO- K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom <i>Kenacid Blue</i> .....	37
<b>4.3. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM <i>TRYPAN BLUE</i> .....</b>	<b>39</b>
4.3.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO- K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom <i>Trypan Blue</i> .....	39
4.3.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO- K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom <i>Trypan Blue</i> .....	40
<b>4.4. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIM SA PCB 153.....</b>	<b>42</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Poliklorirani bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*, PCB) pripadaju velikoj skupini sintetskih organokloriranih spojeva koji radi spore biorazgradnje i visoke lipofilnosti imaju tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu i unutar hranidbenih lanaca (Miletić i sur., 2021; Kmetič i sur., 2012). PCB su aromatski organski spojevi koji se sastoje od dva benzenska prstena s 1 do 10 atoma klora (Brajenović i sur., 2018). Postoji 209 mogućih izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongeneri, a razlikuju se međusobno u fizikalno-kemijskim i toksikološkim svojstvima (Klinčić i Herceg Romanić, 2011).

PCB koji se oslobađaju u okoliš vrlo su otporni na fizikalno-kemijsku i biološku razgradnju i opstaju u zraku, vodi i tlu te imaju tendenciju širenja hranidbenim lancima i nakupljanja u svim živim organizmima. Opća populacija je najviše izložena PCB-ima putem masne hrane životinjskog podrijetla poput mesa, određenih vrsta ribe i mliječnih proizvoda. Kod ljudi PCB se najviše akumuliraju u masnom tkivu, krvi i majčinom mlijeku (Brajenović i sur., 2018; Kmetič i sur., 2012). PCB se najčešće povezuju s nepovoljnim učincima na ljudsko zdravlje koji podrazumijevaju promjene u neurološkom sustavu, neuroendokrinoj funkciji, ponašanju te narušenoj imunosnoj i reproduktivnoj funkciji (Klinčić i Herceg Romanić, 2011).

U zaštiti organizma i ljudskog zdravlja svoju primjenu su pronašli polifenolni spojevi zahvaljujući terapijskim svojstvima kojima mogu djelovati na prevenciju kroničnih bolesti (Rana i sur., 2022).

Polifenolima pripada i kurkumin koji je aktivan spoj iz skupine kurkuminoida zahvaljujući kojem kurkuma ima karakterističnu žutu boju (Kotha i Luthria, 2019). Pripisuju mu se antikancerogena, protuupalna i antioksidacijska svojstva koja mu omogućuju primjenu u liječenju raznih bolesti kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, neurološke bolesti i upalne bolesti crijeva (Kocaadam i Şanlier, 2015). Smatra se da može učinkovito modulirati molekularne „mete“ koje imaju ulogu u patogenezi mnogih bolesti i na taj način sudjelovati u prevenciji i liječenju bolesti.

Nedavna istraživanja pokazala su kako pojedini bioorganometalni spojevi (biološki aktivne molekule koje sadrže barem jedan ugljik izravno vezan na metal ili metaloid) koji u strukturi imaju ferocenilnu skupinu pokazuju bolja farmakokinetička svojstva i izraženiju aktivnost u odnosu na ishodne molekule (Kowalski, 2018).

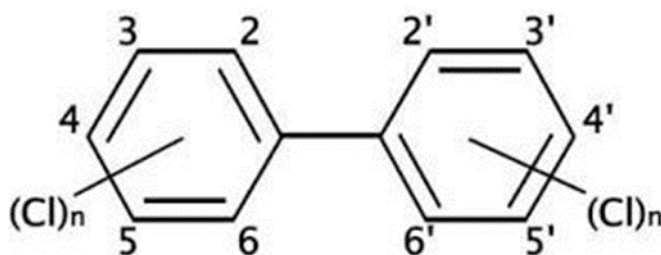
Cilj ovog rada je bio ispitati učinak predinkubacije CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanica različitim koncentracijama (1 – 20  $\mu$ M) ferocenom modificiranog polifenola kurkumina na citotoksičnost induciranu dvama strukturno različitim PCB kongenerima – planarnim PCB 77 i neplanarnim PCB 153. U svrhu određivanja vijabilnosti i proliferacije stanica korišteni su testovi *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue*, a primjenom fluorimetrijske metode detektiran je učinak na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. POLIKLORIRANI BIFENILI

PCB pripadaju velikoj skupini sintetskih organokloriranih spojeva koji imaju tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu i unutar hranidbenih lanaca. PCB uz ostale klorirane ili bromirane aromatske spojeve te organoklorirane pesticide pripadaju grupi spojeva poznatoj kao perzistentni organski zagađivači (engl. *persistent organic pollutants*, POPs) (Kmetič i sur., 2012).

PCB su molekule aromatskih struktura s dva povezana benzenska prstena u kojima su pojedini ili svi vodikovi atomi supstituirani atomima klora (Kmetič i sur., 2012). Kemijska formula PCB-a glasi  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , gdje je  $n$  broj atoma klora. S obzirom na broj i položaj klorovih atoma postoji ukupno 209 izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongeneri, a međusobno se razlikuju u fizikalno-kemijskim i toksikološkim svojstvima. Označavaju se brojevima od 1 do 209, što je prihvatila Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) (Herceg Romanić, 2002). Osnovna molekularna struktura PCB-a je prikazana na slici 1.



**Slika 1.** Kemijska struktura polikloriranih bifenila (PCB) (ATSDR, 2000)

Supstituirani atomi klora u molekuli PCB-a se mogu nalaziti u *orto* (2, 2', 6, 6'), *meta* (3, 3', 5, 5') i *para* položaju (4, 4'). Benzenski prstenovi mogu rotirati oko veze koja ih spaja tvoreći različite konfiguracije s dva moguća idealna ishoda s obzirom na položaj u ravnini. Konfiguracija može biti planarna (kada se dva benzenska prstena nalaze u istoj ravnini) i neplanarna (u kojoj se benzenski prstenovi nalaze pod kutem od 90°). Stupanj planarnosti ovisi o broju supstituiranih atoma klora u *orto* položaju. Supstitucija atoma vodika s većim atomima klora u *orto* položaju uzrokuje rotaciju benzenskih prstenova i gubitak planarne konfiguracije (ATSDR, 2000).

Čisti kongeneri bez primjesa su bezbojni i često u kristalnom obliku (Kmetič i sur., 2012). Komercijalne PCB smjese su svjetložute ili tamnožute boje. Ne kristaliziraju, čak ni na niskim temperaturama, već prelaze u konzistenciju smole. Formiraju pare koje su teže od zraka, ali ne stvaraju nikakve eksplozivne smjese sa zrakom. Imaju nisku električnu vodljivost, visoku toplinsku provodljivost i visoku otpornost prema toplinskoj razgradnji. PCB su kemijski vrlo stabilni u normalnim uvjetima međutim prilikom zagrijavanja mogu proizvesti druge otrovne spojeve (WHO, 1992).

U cijelom svijetu proizvodnja PCB-a započela je 1929. godine, a procjenjuje se da je globalna razina proizvodnje PCB-a znatno premašila količinu od 1,2 milijuna tona. Iako je proizvodnja PCB-a zabranjena od 1970-ih, oni su još uvijek izraziti zagađivači okoliša u cijelom svijetu zbog svoje visoke stabilnosti u okolišu, a kod životinja i ljudi uzrokuju toksičnost (He i sur., 2021).

PCB se nikad nisu koristili kao pojedinačni spojevi, nego kao smjese od 50 i više kongenera. Na tržište su dolazile pod raznim imenima, npr. *Aroclor* (SAD), *Phenoclor* (Francuska), *Clophen* (Njemačka), *Sovol* (Rusija) i *Kanechlor* (Japan). Proizvodili su se industrijski više od 50 godina i primjenjivali se u gotovo svakoj zemlji svijeta. Korišteni su u zatvorenim sustavima kao što su transformatori, kondenzatori, vakuumske pumpe te u otvorenim sustavima kao što su npr. usporivači požara (retardanti), dodaci pesticidima, bojama, cementu, lakovima, papiru za kopiranje, voskovima, adhezivima i mazivim uljima (Herceg Romanić, 2002).

Prisutnost PCB-a u okolišu nije prepoznata do 1966. godine kada je Jensen identificirao PCB-e u uzorcima tkiva čovjeka i divljih životinja (WHO, 2003). Američka Agencija za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency*, US EPA) je 1979. godine zabranila upotrebu PCB-a zbog mogućnosti njihove akumulacije u okolišu i uočenog štetnog učinka na ljudsko zdravlje (Kmetič i sur., 2012). Prisutnost PCB-a otkrivena je u različitim dijelovima okoliša, uključujući površinske vode, tlo, stambene zgrade (Morrison i sur., 2018). Čak su pronađeni i na mjestima gdje nikad nisu bili primjenjivani i gdje je manje izražen čovjekov utjecaj na okoliš, kao što su Arktički krug i Himalaja (Cabrerizo i sur., 2018; Gong i sur., 2014).

PCB se najviše prenose zrakom. U atmosferu dospijevaju isparavanjem tla i vodenih površina. PCB s jednim do dva supstituirana atoma klora zadržavaju se u atmosferi, oni s jednim do četiri atoma klora migriraju do polarnih područja ciklusima isparavanja i taloženja, dok oni s osam do devet supstituiranih atoma klora zaostaju vrlo blizu izvora zagađenja. U vodenim

površinama se PCB prenose procesom difuzije te djelovanjem struja, dok u tlu nemaju sklonost migriranja u podzemne vode, budući da su čvrsto vezani za čestice tla (ATSDR, 2000).

Jednom ispušteni u okoliš, vrlo se teško razgrađuju te kruže između zraka, vode i tla u prirodi. U tom kružnom kretanju zadržavaju se i progresivno nagomilavaju, posebice u masnim tkivima pojedinih pripadnika hranidbenih lanaca (Kmetič i sur., 2012). Procesom biomagnifikacije povećava se njihova koncentracija u organizmima (čak do faktora od 70 000 puta) na višim razinama hranidbenih lanaca, gdje dostižu relativno visoke, toksične koncentracije (Murati, 2015).

Opća populacija je najviše izložena PCB-ima putem masne hrane životinjskog podrijetla poput mesa, određenih vrsta ribe i mliječnih proizvoda. S obzirom na to da su PCB lipofilni i akumuliraju se u hranidbenim lancima, namirnice životinjskog podrijetla predstavljaju značajan izvor izloženosti. Više od 90 % izloženosti neplanarnim, *orto* supstituiranim kongenerima u općoj populaciji potječe od unosa putem hrane (Kmetič i sur., 2012). Prosječan dnevni unos neplanarnih PCB-a putem prehrane može se procijeniti na 10 – 45 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase (EFSA, 2005), dok je prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) prosječan dnevni unos ukupnih PCB-a kod odraslih osoba u zapadnim zemljama oko 50 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase (WHO, 2003). Ograničeni podaci o izloženosti djece u dobi do šest godina (unos dojenjem nije uključen) upućuju da je prosječan unos *orto* PCB-a u toj dobi 27 – 50 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase na dan. Usporedbom dostupnih podataka o ekspoziciji PCB-ima u djece i odraslih ustanovljeno je da je izloženost u dječjoj dobi 2,5 puta veća. Dojenčad je također visoko izložena, a time i rizična skupina obzirom na to da u njih unos PCB-a može biti dvostruko veći nego u odraslih (EFSA, 2005).

PCB su otkriveni u ljudskoj plazmi, serumu, slini, krvi iz pupkovine, tkivu placente, masnom tkivu pa čak i majčinom mlijeku (Helou i sur., 2019).

### 2.1.1. Toksičnost polikloriranih bifenila

Toksičnost kongenera PCB-a je različita i ovisi o njihovoj strukturi. Najizraženiju toksičnost imaju kongeneri koji imaju jedan ili nijedan klorov atom supstituiran u *orto* položaju, jer takvi kongeneri mogu najlakše poprimiti planarnu konfiguraciju (Weiss, 1997).

PCB se najčešće povezuju s učincima na ljudsko zdravlje koji podrazumijevaju promjene u neurološkom razvoju, neuroendokrinoj funkciji, ponašanju te narušenoj imunskoj i reproduktivnoj funkciji (Klinčić i Herceg Romanić, 2011).

Učinci visokih koncentracija PCB-a kod ljudi su postali dobro poznati nakon dvaju tragičnih slučajeva u Japanu 1968. godine (*Yusho* incident) i Tajvanu 1979. godine (*Yu-Cheng* incident) kada je došlo do kontaminacije rižinog ulja sa smjesom PCB-a i polikloriranih dibenzofurana (engl. *polychlorinated dibenzofurans*, PCDF). Zabilježeni simptomi izloženosti uključivali su povećanje i hipersekreciju Meibomovih žlijezdi u očnim vjeđama, oticanje očnih kapaka, pigmentaciju noktiju i mukoznih membrana, umor, mučninu i povraćanje (Kmetič i sur., 2012). Negativne učinke PCB-a imala su i djeca izloženih majki rođena između 1978. i 1985. godine kod kojih je zabilježena hiperpigmentacija, deformirani nokti i zubi, slabiji kognitivni razvoj do sedme godine i poremećaji u ponašanju. Kod ljudi koji su bili izloženi pronađene su i smanjene koncentracije imunoglobulina IgM i IgA, smanjeni postotak ukupnih T-stanica, citotoksičnih i pomoćnih T-stanica (Kmetič i sur., 2012).

*In vitro* i *in vivo* studije pokazale su da određeni PCB kongeneri, metaboliti PCB-a i njihove smjese mogu djelovati mehanizmima endogenih hormona oponašajući neke biološke aktivnosti estrogena kao što su prijevremeni pubertet, poremećaj funkcija maternice i indukcija estrogen ovisnih enzimatskih aktivnosti (Bonfeld-Jørgensen i sur., 2001).

Studije o učincima PCB-a na reprodukciju i reproduktivni sustavu ljudi su ograničene jer se radi o podacima koji su zabilježeni kod ljudi koji su bili profesionalno izloženi djelovanju PCB-a. S izloženosti PCB-ima povezane su menstrualne smetnje u žena i učinci na morfologiju i proizvodnju spermija, što dovodi do poteškoća u začeću. Kod žena čija je prehrana uključivala ribu Velikih jezera (kontaminirane PCB-ima) uočena je povezanost konzumacije ribe s nešto kraćim trajanjem menstrualnog ciklusa i smanjenom plodnošću. Promjene menstrualnog ciklusa također su primijećene kod žena izloženih većim dozama PCB-a tijekom *Yusho* incidenta (ATSDR, 2000).

Činjenicu da PCB predstavljaju potencijalnu reproduktivnu opasnost potvrđuju i studije na životinjama gdje su istraživanja na štakorima i miševima pokazala smanjenju stopu začeća, produljeni estrus ciklus i smanjenu seksualnu osjetljivost kod ženki, kao i negativan utjecaj na proizvodnju spermija i plodnost kod mužjaka (ATSDR, 2000). PCB mogu utjecati na reproduktivnu sposobnost životinja ometanjem endokrinih procesa životinja, ometajući funkciju organela i utječući na ekspresiju DNA metiltransferaze, ali točne mehanizme djelovanja potrebno je još detaljnije istražiti (He i sur., 2021).

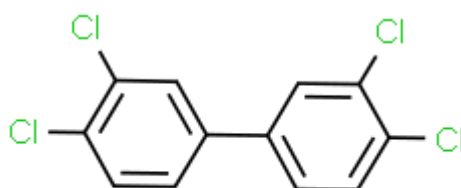
Klorirani organski zagađivači, poput PCB-a, povezani su i s razvojem ili pogoršanjem kardiovaskularnih bolesti. Brojne epidemiološke studije su pokazale da PCB mogu dovesti do



pretilosti, dijabetesa i abnormalnosti lipida, što su sve čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Perkins i sur., 2016).

### 2.1.2. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorobifenil)

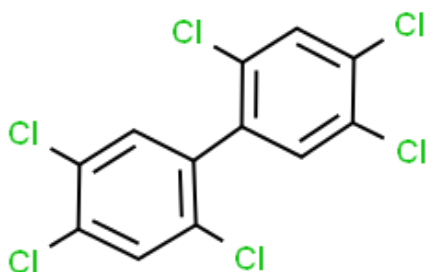
PCB 77 je planarni, dioksinu sličan kongener PCB-a. Radi položaja klorovih atoma na bifenilnoj molekuli, PCB 77 se smatra jednim od najtoksičnijih planarnih kongenera PCB-a (Gilroy i sur., 1998). Kemijska formula PCB 77 je  $C_{12}H_6Cl_4$ , a strukturna formula prikazana je na slici 2. Različitim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima dokazano je njegovo teratogeno, mutageno, kancerogeno, hepatotoksično i neurotoksično djelovanje (Murati, 2015).



**Slika 2.** Strukturna formula PCB 77 (RCS, 2023a)

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

PCB 153 je neplanarni kongener PCB-a ( $C_{12}H_4Cl_6$ ) koji sadrži atome klora vezane u dva *orto*, dva *meta* i dva *para* položaja (slika 3). Radi velike otpornosti na degradaciju, jedan je od najrasprostranjenijih PCB kongenera u okolišu (Murati, 2015). Smatra se manje opasnim od ostalih kongenera. Izloženost PCB 153 može dovesti do poremećaja endokrinih funkcija, negativnih učinaka na reproduktivne organe i DNA oštećenja (Venkatesha i sur., 2010).



**Slika 3.** Strukturna formula PCB 153 (RCS, 2023b)

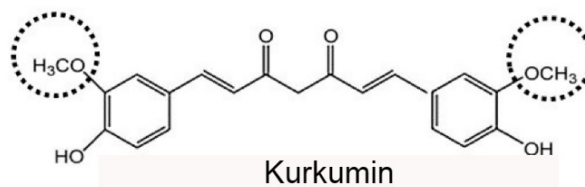
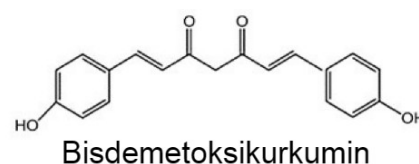
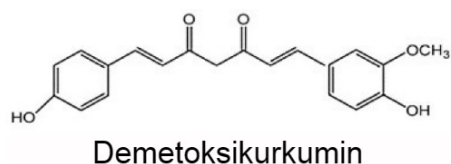
## 2.2. KURKUMIN

### 2.2.1. Kurkuma

Kurkuma (lat. *Curcuma longa*) je biljka iz porodice đumbira (*Zingiberaceae*), koja potječe iz Indije i uzgaja se u jugoistočnoj Aziji, Kini, i Latinskoj Americi. Kurkuma je začin koji se dobiva iz korijena istoimene biljke i koristi se u pripremi curryja u Indiji i drugim azijskim zemljama radi svog okusa i boje. Indija je zemlja koja je najveći proizvođač i vodeći izvoznik kurkume (Kotha i Luthria, 2019). Zbog boje i okusa kurkuma je u Europi prozvana „indijskim šafranom“ (Aggarwal i sur., 2007). Osim što je poznata kao začin u pripremi hrane, kurkuma se u azijskim zemljama tisućama godina koristi u medicinske svrhe i ima mnogobrojne prednosti u prevenciji i liječenju mnogih stanja u ayurvedskoj i tradicionalnoj kineskoj medicini (Kocadam i Şanlier, 2015). Kurkuma se spominje čak i u spisima Marka Pola kojima opisuje svoje putovanje u Kinu i Indiju, dok je u Europu je prvi puta uvezena u 13. stoljeću od strane arapskih trgovaca (Aggarwall i sur., 2007). Tijekom vladavine Britanaca u Indiji kurkuma je kombinirana s raznim drugim začinima i preimenovana u *curry* prah, kako se i danas naziva u Europi. Kotha i Luthria (2019) opisuju da prema kemijskom sastavu kurkuma sadrži približno 70 % ugljikohidrata, 13 % vlage, 6 % proteina, 6 % eteričnih ulja (felandren, sabinen, cineol, borneol, zingiberen i seskviterpeni), 5 % masti, 3 % mineralnih tvari (kalij, kalcij, fosfor, željezo i natrij), 3-5 % kurkuminoida i vitamine u tragovima (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C i niacin).

### 2.2.2. Kurkuminoidi

Kurkuminoidi su bioaktivni polifenolni spojevi i mješavina su tri glavna spoja: kurkumina (kurkumin I; 77 %), demetoksikurkumina (kurkumin II; 17 %), i bisdemetoksikurkumina (kurkumin III; 3 %) (Kotha i Luthria, 2019; Prasad i sur., 2014). Strukturna formula kurkumina (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>; 1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta 1,6-dien-3,5-dion) prikazana je na slici 4 zajedno sa strukturom ostalih kurkuminoida.



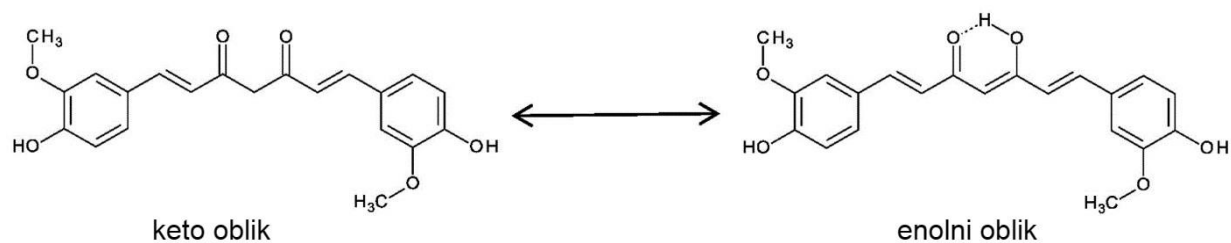
**Slika 4.** Strukturne formule kurkuminoida (prema Pulido-Moran i sur., 2016)

### 2.2.3. Otkriće i fizikalna i kemijska svojstva kurkumina

Polifenol kurkumin je aktivan spoj iz skupine kurkuminoida koji daje kurkumi karakterističnu žutu boju. Kurkumin su prvi izolirali Vogel i Pelletier 1815. godine iz korijena biljke *Curcuma longa* i definirali ga kao „tvar koja daje žutu boju“. Vogel Jr. je 1842. godine prvi put pročistio kurkumin. Strukturnu formulu kurkumina desetljećima je pokušalo opisati nekoliko kemičara da bi 1910. godine Melabedzka i suradnici objavili strukturu kurkumina kao diferuloilmetan ili 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil). Tri godine kasnije, Lampe i Melobedzka su objavili metodu za sintezu kurkumina, a 1953. godine Srinivasan je utvrdio postojanje kurkuminoida analizom kurkume kromatografijom (Kotha i Luthria, 2019; Kocaadam i Şanlier, 2015).

Aktivni sastojak kurkumina je diferuloilmetan, hidrofobni polifenol karakteristične žute boje. U kemijskom smislu kurkumin je bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićeni  $\beta$ -diketon, linearni diarilheptanoidni spoj. Arilni prstenovi mogu biti supstituirani različitim brojem hidroksi (-OH) ili metoksi (-OCH<sub>3</sub>) skupina na simetričan ili asimetričan način da bi se dobili analozi kurkumina ili kurkuminoida (Epstein i sur., 2010). Aktivnost kurkumina određuju tri reaktivne funkcionalne skupine – diketonska skupina i dvije fenolne skupine (Miletić, 2022). Kurkumin je spoj narančasto-žute boje, temperature tališta 183 °C (NCBI, 2023), praktički netopljiv u vodi pri kiselom i neutralnom pH, ali je topiv u metanolu, etanolu, dimetilsulfoksidu i acetonu. Kurkumin može postojati u dva tautomerna oblika: keto i enolnom (slika 5). Enolni oblik kurkumina ima tri ionizirajuća protona, koja odgovaraju enolnoj skupini i dvije fenolne skupine. U kiselim i neutralnim uvjetima prevladava keto oblik, a kurkumin djeluje kao snažan donator vodika, dok u

alkalnim uvjetima prevladava enolni oblik. Kurkumin je pokazao osjetljivost na svjetlost, te se preporučuje da biološki uzorci koji sadrže kurkumin budu zaštićeni od svjetlosti (Prasad i sur., 2014).



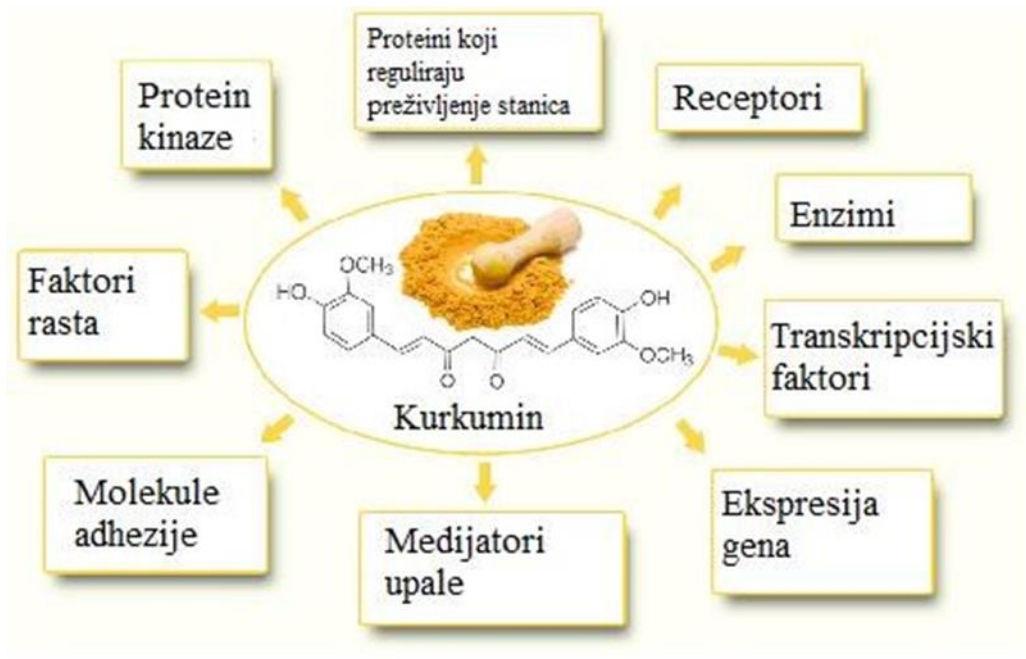
**Slika 5.** Tautomerni oblici kurkumina (prema Jankun i sur., 2016)

#### 2.2.4. Biološka svojstva kurkumina

U ayurvedskoj medicini kurkumin se od davnina koristio u liječenju ozljeda, kožnih bolesti, opekline i infekcija oka (Hatcher i sur., 2008). U posljednjih 30 godina kurkumin je pokazao terapijski učinak u liječenju raka, autoimunih, metaboličkih i neuroloških bolesti, bolesti jetre, kardiovaskularnih i plućnih bolesti te drugih upalnih bolesti (Kocaadam i Şanlier, 2015).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na snažnu antimikrobnu aktivnost kurkumina. Od provedenih studija o antibakterijskom djelovanju kurkumina najznačajnija su ona u kojima se ispitalo djelovanje kurkumina na *Helicobacter pylori*. Antivirusni učinci kurkumina pokazuju potencijal ovog spoja i njegovih derivata kao mogućeg kandidata za razvoj novih antivirusnih lijekova iz prirodnih izvora, ali takva upotreba kurkumina zahtijeva daljnja istraživanja. Antifungalna aktivnost kurkumina dokazana je u istraživanjima u kojima je korištena *Candida* i *Paracoccidioides brasiliensis* (Moghadamtousi i sur., 2014).

Smatra se da kurkumin može učinkovito modulirati molekularne „mete“ koje imaju ulogu u patogenezi mnogih bolesti i tako sudjeluje u prevenciji i liječenju bolesti (slika 6). Ovaj spoj igra važnu ulogu u regulaciji citokina, kinaza, enzima, faktora transkripcije, faktora rasta, receptora, metastatskih i apoptotičkih molekula u gotovo svim fazama razvoja bolesti. Utvrđeno je da je njegova struktura sklona visokoj razini metoksilacije i niskoj razini hidrogenacije i to svojstvo kurkuminu povećava aktivnost hvatanja slobodnih radikala. Takva struktura vjerojatno omogućuje kurkuminu antikancerogeno, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (Kocaadam i Şanlier, 2015). Također utvrđeni su i hepatoprotektivni, nefroprotektivni, antitrombotski, kardioprotektivni, hipoglikemijski i antireumatski učinci kurkumina (Anand i sur., 2007).



**Slika 6.** Molekularne „mete“ kurkumina (prema Lopresti i sur., 2012)

Kurkumin se smatra antioksidansom zbog  $\beta$ -diketonske skupine u svojoj strukturi. Najvažniji mehanizmi, zahvaljujući kojima kurkumin posjeduje svoju antioksidacijsku aktivnost, su inhibicija superoksidnih radikala, vodikovog peroksida i dušikovog oksida. Kurkumin također pojačava aktivnost mnogih antioksidacijskih enzima kao što su katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i hem oksigenaza-1 što posljedično dovodi do smanjenja peroksidacije lipida (Pulido-Moran i sur., 2016). Peroksidacija lipida je lančana reakcija posredovana slobodnim radikalima, koja dovodi do oštećenja staničnih membrana, a inhibicija peroksidacije kurkuminom uglavnom se pripisuje “hvatanju“ slobodnih radikala. Još jedan važan mehanizam je da se kurkumin može razgraditi u trans-6-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-2,4-diokso-5-heksanal, ferulinsku kiselinu, feruloilmetan i vanilin u bazičnom pH unutar 30 minuta. Od navedenih spojeva ferulinska kiselina i vanilin su dobro poznati antioksidansi (Menon i Sudheer, 2007). Osim toga, kurkumin može povećati aktivnost enzima za detoksifikaciju ksenobiotika u jetri i bubrezima, štiteći od procesa karcinogeneze (Pulido-Moran i sur., 2016).

Kurkumin može smanjiti upalu interakcijom s mnogim molekulama koje sudjeluju u upalnim procesima (Pulido-Moran i sur., 2016). Protuupalno djelovanje postiže modulirajući upalni odgovor tako da smanjuje aktivnost enzima odgovornih za produkciju proupalnih spojeva

te inhibira njihovu produkciju (Jurenka, 2009). Studijama je identificirano niz različitih molekula uključenih u upalne procese koje su inhibirane kurkuminom uključujući fosfolipazu, lipooksigenazu, ciklooksigenazu-2 (COX-2), leukotriene, tromboksan, prostaglandine, dušikov oksid, kolagenazu, elastazu, hijaluronidazu, tumorski faktor nekroze-alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) i interleukine (Chainani-Wu, 2003). Za kurkumin se navodi da svoju učinkovitost pokazuje inhibicijom proliferacije upalnih stanica, metastaziranja i angiogeneze (Shehzad i sur., 2013). Akutna i kronična upala važan je čimbenik rizika za kardiovaskularne, neurodegenerativne i metaboličke bolesti, pretilost, dijabetes tipa II i neke vrste raka. Kurkumin se smatra učinkovitim za liječenje raznih upalnih bolesti kao što su pretilost, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, neurološke bolesti i upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) (Kocaadam i Şanlier, 2015).

Učinci kurkumina na kardiovaskularne bolesti su povezani s njegovom sposobnošću inhibicije agregacije trombocita, inhibicije upalnog odgovora, snižavanja LDL (engl. *low density lipoprotein*) i povišenja HDL (engl. *high density lipoprotein*) kolesterola, inhibicije sinteze fibrinogena i inhibicije oksidacije LDL kolesterola (Aggarwal i sur., 2007). Zahvaljujući snažnom antioksidacijskom djelovanju kurkumin ima sposobnost inhibirati lipidnu peroksidaciju te se pokazao osobito učinkovitim u prevenciji oksidacije kolesterola u krvi smanjujuću rizik od progresije ateroskleroze (Peschel i sur., 2007). Meta analiza je pokazala da je suplementacija kurkuminom povezana sa značajnim smanjenjem razine cirkulirajućeg C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP), snažnog prediktora i neovisnog faktora rizika od razvoj kardiovaskularnih bolesti (Sahebkar, 2014).

Utvrđeno je da je upala primarni uzrok razvoja dijabetesa tipa II i da razni upalni citokini, faktori transkripcije i enzimi imaju važnu ulogu u početku i napredovanju te bolesti (Kocaadam i Şanlier, 2015). Ističe se da kurkumin ima svojstva kao što su smanjenje proizvodnje glukoze u jetri, suzbijanje upalnog odgovora koji proizlazi iz hiperglikemije, povećanje ekspresije gena za GLUT2, GLUT3 i GLUT4 transportere glukoze, povećanje unosa glukoze u stanice i zahvaljujući tim svojstvima može smanjiti razinu glukoze u krvi. Iz navedenih razloga kurkumin ima povećan učinak na antihiperglikemijsku i inzulinsku osjetljivost (Ghorbani i sur., 2014).

Suplementacija kurkuminom značajno smanjuje proizvodnju upalnih citokina i povećava razinu adiponektina u krvnoj plazmi pretilih i osoba prekomjerne tjelesne mase. Nadalje, kurkumin može regulirati nekoliko molekularnih ciljeva uključujući faktore transkripcije,

signalne putove i druge složene regulacijske sustave u adipoznom tkivu što rezultira supresijom i smanjenjem kronične upale niskog stupnja prisutne kod pretilosti (Vari i sur., 2021).

Starenje je značajan faktor rizika za razvoj neurodegenerativnih bolesti. Smatra se da kurkumin može djelovati na mehanizme starenja te može spriječiti promjene u staničnim proteinima do kojih dolazi zbog tog procesa. Stoga se ukazuje da kurkumin može pomoći u održavanju homeostaze proteina što može biti učinkovito u prevenciji bolesti povezanih sa starenjem (Monroy i sur., 2013). Kurkumin je pokazao neuroprotektivnu ulogu smanjujući kognitivno propadanje i progresiju određenih neuroloških bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i multipla skleroza (Kocaadam i Şanlier, 2015).

IBD je iscrpljujući imunološki poremećaj koji je okarakteriziran kroničnom upalom probavnog trakta, a uključuje Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis (Shehzad i sur., 2013). Moguća protektivna uloga kurkumina u tom poremećaju je putem inhibicije slobodnih radikala, povećavajući antioksidanse i utječući na višestruke signalne putove (Baliga i sur., 2012).

Korištenje kurkumina za liječenje kožnih bolesti poznato je od davnih vremena u ayurvedskoj medicini gdje je široko korišteno kao metoda liječenja infekcija oka, ugriza, opekline i akni (Kocaadam i Şanlier, 2015). U današnje vrijeme kurkumin može biti učinkovit protiv raznih kožnih bolesti kao što su dermatitis, psorijaza i skleroderma. Psorijaza je kronična bolest kože koja je karakterizirana hiperproliferacijom i abnormalnom diferencijacijom keratinocita (Prasad i sur., 2014). Kurkumin može zaštititi kožu „hvatanjem“ slobodnih radikala i smanjenjem upale putem inhibicije nuklearnog faktora- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor-kappa B*, NF- $\kappa$ B) i citokina (Thangapazham i sur., 2007).

Alergija i astma su proupalne bolesti posredovane putem upalnih citokina (Shehzad i sur., 2013). Kurkumin pruža zaštitu od alergija putem suzbijanja oslobađanja histamina iz mastocita (Yano i sur., 2000). Kod alergija i astme se pokazalo da hidrosilne skupine kurkumina utječu na smanjenje alergijske reakcije te imaju pozitivan učinak na širenje suženog dišnog puta i povećanje antioksidacijskog kapaciteta. Kurkumin također uzrokuje smanjenje Th2 odgovora smanjenjem proizvodnje IgE protutijela i citokina (Kurup i Barrios, 2008).

Protuupalni mehanizmi uključeni u antikarcinogeni potencijal kurkumina uključuju: inhibiciju NF- $\kappa$ B i COX-2 (povišene razine COX-2 su povezan s mnogim vrstama raka), inhibiciju metabolizma arahidonske kiseline putem lipoksigenaze i uklanjanje slobodnih radikala koji nastaju na tom putu, smanjenu ekspresiju upalnih citokina IL 1b, IL 6 i TNF-- $\alpha$  (što rezultira inhibicijom rasta stanica raka), smanjenu regulaciju enzima (kao što je protein kinaza

C, koji posreduju u upali i proliferaciji tumorskih stanica) (Jurenka, 2009). Pokazalo se da kurkumin inhibira proliferaciju brojnih tumorskih staničnih linija putem regulacije antiapoptotskih proteina, aktivacije kaspaza i indukcije tumor supresorskih gena kao što je *TP53*. Također, kurkumin potiskuje angiogenezu tumora putem supresije angiogenskih citokina (Aggarwal i sur., 2007).

#### 2.2.5. Bioraspoloživost kurkumina

Unatoč dokazanoj učinkovitosti i sigurnosti primjene, bioraspoloživost kurkumina predstavlja veliki problem. Niske razine kurkumina u serumu i tkivima (neovisno o načinu izloženosti), brz metabolizam i eliminacija iz tijela su glavni faktori koji smanjuju bioraspoloživost kurkumina (Anand i sur., 2007). Niska bioraspoloživost kurkumina značajno limitira terapijske učinke ovog spoja, pa se provode brojna istraživanja s ciljem razvoja metoda koje će povećati njegovu bioraspoloživost (Devassy i sur., 2015). Upotreba liposomalnog kurkumina, nanočestica kurkumina, micela kurkumina i fosfolipidnih kompleksa su obećavajuće nove formulacije za koje se čini da pridonose povećanju bioraspoloživosti te time i potencijalnoj široj medicinskoj primjeni ovog spoja (Anand i sur., 2007). Razmatra se i korištenje sintetskih strukturnih analoga kurkumina nastalih kemijskim modifikacijama kao što su dodavanje fenolne i hidroksilne skupine, aciliranje, alkiliranje, glikozilacija i amino acilacija (Prasad i sur., 2014).

#### 2.2.6. Kurkumin i poliklorirani bifenili

Nekoliko *in vivo* i *in vitro* istraživanja pokazalo je da kurkumin može djelovati inhibitorno na pojavu oksidacijskog stresa i razvoja brojnih bolesti. Ciljevi istraživanja koje su proveli Doğan i Alçiğir (2019) bili su ispitati učinke prenatalne izloženosti *Arocloru* 1254 na DNK tkiva središnjeg živčanog sustava te utvrditi učinak kurkumina na štetno djelovanje uzrokovanom smjesom PCB-a. Mladunci štakora raspoređeni su u tri skupine: skupina koja je primala *Aroclor* 1254 (skupina 1), skupina koja je primala *Aroclor* 1254 i kurkumin (skupina 2) i kontrolna skupina (skupina 3). Histopatološke promjene uočene su u cerebralnom korteksu i cerebelumu mladunaca štakora izloženih *Arocloru* 1254. Izloženost PCB-u utjecala je na metilaciju i hipometilaciju DNK i uzrokovala oštećenje DNK cerebralnog korteksa u prenatalnom razdoblju. Za kurkumin je dokazan protektivan učinak na oštećenje DNK izazvano PCB-ima u malom mozgu i moždanoj kori (Doğan i Alçiğir, 2019).



Cilj istraživanja Alçiğir i sur. (2018) bio je otkriti oštećenja koja nastaju u središnjem živčanom sustavu mladunaca štakora izloženih *Aroclor* 1254 smjesi PCB-a u prenatalnom razdoblju te pokazati inhibicijski učinak kurkumina, koji je jak antioksidans i neuroprotektivna tvar. U istraživanju su odrasli ženke i mužjaci štakora podijeljeni u tri skupine: prva koja je dobivala samo *Aroclor* 1254, druga koja je dobivala i *Aroclor* 1254 i kurkumin i kontrolna skupina. Mladunci štakora iz triju skupina su uspoređivani s obzirom na patomorfološka oštećenja. Rezultati su pokazali da je *Aroclor* 1254 uzrokovao oštećenje središnjeg živčanog sustava mladunaca u prenatalnom razdoblju, a kurkumin je smanjio te negativne učinke, posebno u prednjem i srednjem mozgu (Alçiğir i sur., 2018).

PCB djeluju hepatotoksično, te mogu biti uzrokom hepatocelularnog karcinoma. Tharappel i sur. (2008) ispitali su učinke nekoliko antioksidacijskih fitokemikalija na inhibiciju tumora uzrokovanog sa PCB 77. Kao potencijalan inhibitor odabran je i kurkumin jer ima dokazano antioksidacijsko djelovanje (Joe i sur., 2004). Istraživanje je pokazalo da prehrambeni antioksidansi uključujući i kurkumin nisu bili učinkoviti u inhibiciji promicanja tumora pomoću PCB-a. Ovi rezultati također pokazuju da je indukcija oksidacijskog stresa PCB-ima možda nije mehanizam u promicanju tumorske aktivnosti (Tharappel i sur., 2008).

U studiji koju su proveli Aydin i sur. (2016) cilj je bio istražiti mogući zaštitni učinak kurkumina na citotoksičnost uzrokovanu *Aroclorom* 1254 u jetrenim stanicama. Utvrđeno je da kurkumin ima zaštitni učinak na citotoksičnost potaknutu smjesom PCB kongenera, dok je kod ispitivanja genotoksičnosti kurkumin značajno smanjio oštećenje DNK izazvano *Aroclorom* 1254 (Aydin i sur., 2016).

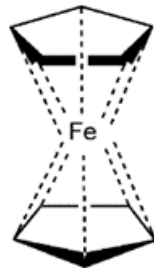
## 2.3. BIOORGANOMETALNA KEMIJA

Prije tridesetak godina počelo se razvijati novo znanstveno područje nazvano bioorganometalna kemija koja se danas definira kao disciplina koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula (Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Glavna obilježja ovog znanstvenog područja su sinteza, reakcije i primjena organometalnih kompleksa s biogenim ligandima (Severin i sur., 1998). Pojam „bioorganometalna kemija“ prvi puta je uveo Gerard Jaouen 1985. godine, koji ga je definirao kao istraživanje biomolekula ili biološki aktivnih molekula koje sadrže barem jedan ugljik izravno vezan na metal ili metaloid (Hartinger i Dyson, 2009). Pojam je zapravo obuhvaćao komplekse nastale korištenjem klasičnih organometalnih liganda (npr. CO, alkili,  $\pi$ -vezane vrste) ili biomolekula (steroidi, aminokiseline, šećeri, peptidi, DNA, vitamini, enzimi, antitijela) vezanih izravnim metal– ugljikov vezama, ali svima je zajednička njihova sposobnost da igraju bitnu ulogu u biološkim procesima (Jaouen i sur., 2006).

### 2.3.1. Ferocen

Otkriće ferocena [ $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2$ ] prije sedamdeset godina značajno je utjecalo na kemijska istraživanja i dalo ključni poticaj za uspostavu i brzo širenje organometalne kemije, koja se nastavila velikom brzinom sve do danas (Štěpnička, 2022). Ferocen je najpoznatiji organometalni spoj iz skupine metallocena karakteristične “sendvič” strukture u kojoj su dva ciklopentadienilna prstena vezana na  $\text{Fe}^{2+}$  (slika 7) (Toma i Vrčec, 2020). Ferocen je stabilan spoj, nije toksičan, biološki je inertan i elektrokemijski aktivan, pri čemu pokazuje reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju i služi kao unutarnji standard za elektrokemijska mjerenja u organskim otapalima (Singh i sur., 2019). Otkriveno je da ferocen ima nekoliko izvanrednih svojstava: topljivost u uobičajenim organskim otapalima, stabilnost do 400 °C, reaktivnost kao superaromatski elektrofil i blagu i reverzibilnu oksidaciju oko +0,4 V prema zasićenoj kalomel elektrodi (Čakić Semenčić i Barišić, 2017).

Zahvaljujući lakoj funkcionalizaciji ugljikovih atoma na jednom ili oba ciklopentadienilna prstena, sintetiziran je velik broj ferocenskih konjugata koji sadrže organske ili anorganske fragmente pokrivajući tako različita područja znanstvenih istraživanja, od katalize, dizajna optičkih materijala i biosenzora do novih biološki aktivnih spojeva (Toma i Vrčec, 2020). Mnogi ferocenski konjugati pokazuju biološku aktivnost poput antitumorske, antibakterijske, antiparazitske i antifungalne (Patra i Gasser, 2017).



**Slika 7.** Struktura ferocena (Werner, 2012)

### 2.3.2. Ferocenski analozi kurkumina

Arezki i sur. (2011) sintetizirali su osam novih ferocenskih analoga kurkumina kovalentnim vezanjem tri različita ferocenska liganda na organske kurkuminoide supstituirane s metoksilnom i hidroksilnom skupinom na aromatskim prstenovima. Prisutnost ferocenilne jedinice poboljšala je biološku aktivnost većine novih ferocenskih analoga kurkumina (Arezki i sur., 2011).

Antioksidacijski kapaciteti ferocenil supstituiranih derivata kurkumina uključujući 1,7-bis(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-4-feroceniliden-hepta-1,6-dien-3,5-dion (FCU), 1-(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-3-hidroksi-7 ferocenil-hepta-1,4,6-trien-5-on (FFT) i 1-(*p*-hidroksi-*m*-metoksifenil)-5-ferocenil-penta-1,4-dien-3-on (FDZ) ispitani su na stanicama kojima je različitim spojevima inducirana oksidacija DNK. Pokazalo se da uvođenje ferocenilne skupine u kurkumin pojačava antioksidacijsku sposobnost FCU, FFT i FDZ (Li i Liu, 2011).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biološki materijal

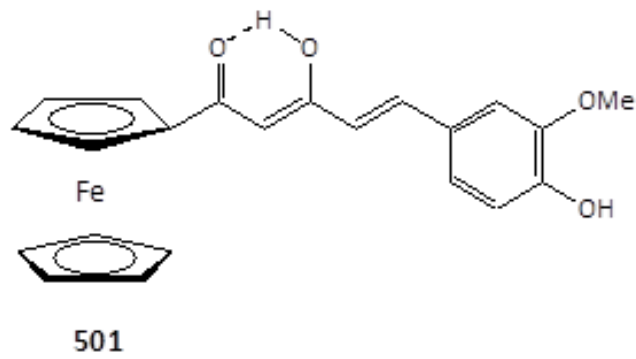
U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korištena je stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO-K1) koja raste u monosloju. Stanice su subklonovi roditeljske stanične linije CHO izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka (ATCC, 2023). Ova stanična linija uzgaja se u *Dulbecco's DMEM/F-12* mediju za uzgoj uz dodatak 5 – 20 % fetalnog goveđeg seruma.

##### 3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- *Dulbecco's MEM/F-12*, GIBCO, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS – fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD
- 0,25 % *Trypsin-EDTA 1X* (tripsin-EDTA), GIBCO, SAD
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma, St. Louis, SAD
- ferocenski analog kurkumina, Laboratorij za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska (slika 8)
- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija
- ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), SIGMA, SAD
- *Neutralrot*, E.Merck Ag – Damstadt, Njemačka
- boja *Coomasie Brilliant Blue R-250*, LKB, Bromma, Švedska
- DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA - *Cellular ROS Assay Kit* (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
- destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- natrijev klorid (NaCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska

- kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dinatrijev hidrogenfosfat, bezvodni (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska



**Slika 8.** Struktura diketonskog ferocenskog analoga kurkumina

### 3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO)

Sastav Dulbecco medija:

Sastojci:

<b>aminokiseline:</b>	Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> )
Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin × H <sub>2</sub> O	7,5
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid ×H <sub>2</sub> O	17,56
L-Cistein 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid × H <sub>2</sub> O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,35
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triptofan	9,02
L-Tirozin	55,79
L-Valin	25,85

**vitamini:**

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

**anorganske soli:**

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

**ostali sastojci:**

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

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

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

**0,4 %-tna otopina *Trypan Blue***

<i>Trypan Blue</i>	0,08 g
PBS pufer	20 mL
Profiltrirati.	

**4 %-tna ishodna otopina *Neutral Red***

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



**Radna otopina *Neutral Red***

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

**Otopina za odbojavanje**

apsolutni etanol	50 %
ledena octena kiselina	1 %
dH <sub>2</sub> O	49 %

**Ishodna otopina *Kenacid Blue R***

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

**Radna otopina *Kenacid Blue***

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

**Otopina za ispiranje**

apsolutni etanol	10 %
ledena octena kiselina	5 %
dH <sub>2</sub> O	85 %

**Otopina za desorpciju**

kalijev acetat	98,15 g
apsolutni etanol	700 mL
dH <sub>2</sub> O	300 mL

**Ishodna otopina PCB 77**

PCB 77	10 mg
DMSO	3,42 mL

- pripremljena je otopina PCB 77 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75  $\mu$ M PCB 77

**Ishodna otopina PCB 153**

PCB 153	10 mg
DMSO	2,77 mL

- pripremljena je otopina PCB 153 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75  $\mu$ M PCB 153

**Ishodna otopina ferocenskog analoga kurkumina**

Ferocenski analog kurkumina	24,2544 mg
DMSO	3 mL

- pripremljene su otopine ferocenskog analoga kurkumina tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5; 10 i 20  $\mu$ M

#### 3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

- inkubator s kontroliranom atmosferom, IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, Flow Laboratories, Ujedinjeno Kraljevstvo
- komora za sterilan rad (laminar) HMC SafeGUARD Pro 1200, HMC Europe, Njemačka
- inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- spektrofotometar, Helios- $\gamma$ , Thermo Electron Corporation, Ujedinjeno Kraljevstvo
- čitač mikrotitarskih pločica INFINITE 200 PRO, Tecan Austria, Austrija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- hladnjak za čuvanje stanica na -80 °C, New Brunswick Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo
- vibracijska miješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

## 3.2. METODE RADA

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

CHO-K1 stanice čuvaju se u ampulama u hladnjaku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80 % Dulbecco's MEM/F12 medija, 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a. Uzgoj i održavanje stanica započinje naglim odmrzavanjem ampula na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  te se stanice resuspendiraju u 10 mL medija za uzgoj (90 % Dulbecco's MEM/F12 medijai 10 % FBS-a) te prenose u T-bocu (površine  $25\text{ cm}^2$ ) radi daljnje kultivacije. Za optimalan rast i razvoj stanica potrebni su uvjeti kontrolirane atmosfere ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ ) koji se osiguravaju uzgojem stanica u inkubatoru, dok rad s kulturama stanica zahtijeva sterilne uvjete koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad (laminaru). Kako bi se stanicama osigurale potrebne hranjive tvari i dovoljno površine za rast, potrebno je periodički mijenjati medij za uzgoj i precjepljivati stanice. Monoslojne stanice u T-boci prvo se ispiru od ostatka korištenog medija i seruma (PBS-om ili tripsinom), a zatim ih se odvaja od površine T-boce dodatkom 1mL proteolitičkog enzima tripsina. Nakon što se pod mikroskopom vidi da su se stanice odvojile od površine, od površine T-boce, u T-bocu se dodaje pripremljeni medij za uzgoj te se stanice resuspendiraju. Uzima se mali uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue* (postupak opisan u poglavlju 3.2.2.1.). Nakon što se izračuna broj stanica u uzorku, stanice u T-boci se razrjeđuju na koncentraciju  $1 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj te se nastavlja daljnja kultivacija stanica.

### 3.2.2. Određivanje učinka ferocenskog analoga kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica

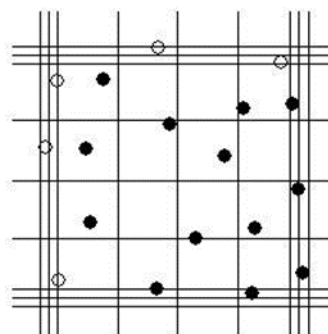
U svaku od 6 jažica na *multiwell* ploči naciepljeno je po 2 mL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u mediju za uzgoj (Dulbecco's MEM/F12 medij uz dodatak 10 % FBS-a) u koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Sat vremena po naciepljivanju stanica slijedio je tretman stanica s 10  $\mu\text{L}$  otopine ferocenskog analoga kurkumina tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije analoga od 1; 2,5; 5; 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata CHO-K1 stanice su tretirane s 20  $\mu\text{L}$  odabranog PCB kongenera (PCB 77 ili PCB 153) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75  $\mu\text{M}$ . Kontrolni uzorak predstavljaju stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen ferocenski analog kurkumina te istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen PCB kongener (ukupno 15  $\mu\text{L}$  DMSO-a  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj). Nakon dodatne

24-satne inkubacije stanica u CO<sub>2</sub> inkubatoru u kontroliranoj atmosferi, vijabilnost i proliferacija stanica prati se metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue*.

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

Uzorak od 20 µL suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica resuspendira se s 20 µL 0,4 %-tne otopine *Trypan Blue* boje. Suspenziju se nekoliko puta resuspendira te se 20 µL nanosi na Fuchs-Rosenthalovu komoricu i stanice se broje pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojene, dok su mrtve stanice plavo obojene zbog oštećenja stanične membrane. Fuchs-Rosenthalova komorica sastoji se od 16 kvadrata, a stanice se broje unutar središnja 4 kvadrata (slika 9). Broje se sve stanice unutar kvadrata te one na desnom i donjem rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta. Površina komorice iznosi 0,0625 mm<sup>2</sup>, a dubina 0,2 mm.

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



**Slika 9.** Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica (FAO, 1996)

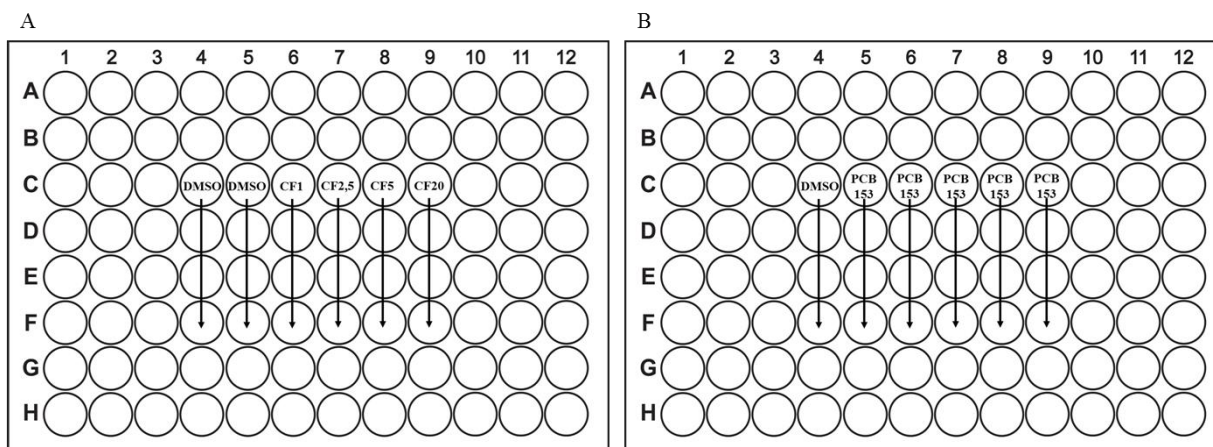
### 3.2.2.2. *Neutral Red* i *Kenacid Blue* metoda

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

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

### 3.2.3. Određivanje učinka ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih sa PCB 153

Na *multiwell* ploču tamnog dna s 96 jažica nacijepi se po 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji  $2,5 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj u DMEM/F12 uz dodatak 10 % FBS i ferocenskog analoga kurkumina tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5 i 20  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice dodaje se 100  $\mu\text{L}$  DCFH-DA u koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$ . Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37 °C. Slijedi ispiranje puferom i tretman pripremljenom otopinom PCB kongenera (PCB153) tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75  $\mu\text{M}$  (slika 10). Potom se provodi inkubacija od 3 sata u inkubatoru pri 37 °C, a intenzitet fluorescencije mjeri se pri  $\lambda_{\text{ex/em}} = 485/535$  nm prije inkubacije te nakon trosatne inkubacije stanica. Kontrolni uzorak su stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen ferocenski analog kurkumina te stanice tretirane samo sa PCB 153.



**A – 1. dan:** DMSO – stanice u mediju za uzgoj + DMSO ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ); CF1 – CF20 – stanice u mediju za uzgoj + odgovarajuća koncentracija ferocenskog analoga kurkumina (1; 2,5; 5; 20  $\mu\text{M} - 5 \mu\text{L mL}^{-1}$ )  
**B – 2. dan:** DMSO – medij za uzgoj + DMSO ( $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ ); PCB153 – medij za uzgoj + 75  $\mu\text{M}$  PCB ( $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ )

**Slika 10.** Praćenje učinka ferocenskog analoga kurkumina (CF) na razinu reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 staničnoj liniji tretiranoj sa PCB 153

### 3.3. OBRADA REZULTATA

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

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

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

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

$N$ = ukupan broj uzoraka u skupini

$x_i$ = pojedinačne vrijednosti uzoraka

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

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

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



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak ferocenskog analoga kurkumina na citotoksičnost induciranu različitim PCB-kongenerima – dioksinu sličnim PCB 77 i neplanarnim, *ortho*-supstituiranim PCB 153. U tu svrhu korištena je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - K1. Diketonski ferocenski analog kurkumina (slika 8) sintetiziran je u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta s ciljem poboljšanja biološkog djelovanja i biodostupnosti ishodnog spoja - kurkumina. Nakon naciepljivanja stanica u jažice *multiwell* ploča, stanice su inkubirane jedan sat. Zatim su stanice tretirane ferocenskim analogom kurkumina tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5; 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Stanice su potom inkubirane 24 sata, nakon čega su tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 ili PCB 153. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 ili PCB 153 određen je metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue* 48 sati nakon predtretmana s ferocenskim analogom kurkumina, tj. 24 sata nakon tretmana sa PCB kongenerima.

Za metode *Neutral Red* i *Kenacid Blue* spektrofotometrom je izmjeren intenzitet nastalog obojenja, odnosno apsorbancija pri određenim valnim duljinama (540 nm za *Neutral Red* i 577 nm za *Kenacid Blue* u odnosu na slijepu probu).

U nastavku istraživanja ispitan je učinak ferocenskog analoga kurkumina na razinu ROS induciranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 primjenom iste stanične kulture. U tu svrhu korišten je DCFDA kit za mjerenje razine ROS-a u stanicama koji se bazira na ulasku nefluorescentnog spoja DCFDA u stanicu. DCFDA djelovanjem staničnih esteraza prelazi u spoj koji oksidacijom pomoću ROS daje fluorescentni DCF - spoj čija se fluorescencija može izmjeriti i dovesti u odnos s količinom ROS-a u stanici.

Rezultati dobiveni navedenim metodama su statistički obrađeni te grafički prikazani na slikama 11 – 17.

#### 4.1. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM *NEUTRAL RED*

Poliklorirani bifenili su skupina postojanih organskih spojeva kojima visoka lipofilnost i spora biorazgradnja omogućava bioakumulaciju u okolišu (Miletić i sur., 2021). PCB su aromatske molekule s dva povezana benzenska prstena u kojima su pojedini ili svi vodikovi atomi supstituirani atomima klora (Kmetič i sur., 2012). Postoji ukupno 209 izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongenerima (Herceg Romanić, 2002). Položaj i broj atoma klora na bifenilnoj jezgri molekule daju različita fizikalna, kemijska i biološka svojstva PCB-ima. Stoga su PCB podijeljeni u dvije različite kategorije. Prva kategorija su „dioksinu slični“ PCB radi sličnosti u strukturi i toksičnosti s polikloriranim dibenzo-*p*-dioksinima. Najznačajnije svojstvo ove skupine je odsutnost atoma klora u *orto* položajima, što omogućuje takvim kongenerima planarnu konfiguraciju. Druga kategorija su kongeneri koji nisu slični dioksinu, a to su oni kongeneri koji imaju jedan ili više atoma klora prisutnih u *orto* položajima što smanjuje planarnost molekule (Liu i sur., 2020). Epidemiološke studije otkrile su da je izloženost PCB-ima usko povezana s negativnim učincima na ljudsko zdravlje poput razvoja kardiovaskularnih bolesti, bolesti jetre, hormonskih poremećaja, poremećaja reproduktivnog i imunskog sustava, nepovoljnih neuroloških učinaka i genotoksičnosti (Liu i sur., 2020).

Povoljan učinak na ljudsko zdravlje pokazali su polifenolni spojevi štiteći organizam od raznih kroničnih bolesti zahvaljujući brojnim terapijskim svojstvima (Rana i sur., 2022).

Kurkumin je prirodni polifenol i glavna aktivna komponenta kurkume. Stotinama godina kurkuma se koristi kao tradicionalni lijek u Kini i Indiji za liječenje mnogih bolesti kao što su dijabetes, zarazne i autoimune bolesti (Hatcher i sur., 2008). Kao polifenolni antioksidans, kurkumin je pokazao kemoprotektivna, neuroprotektivna i protuupalna svojstva. Kliničke studije pokazale su prednosti njegove upotrebe kod zdravstvenih tegoba uključujući rak, poremećaje imunskog sustava, kardiovaskularne bolesti, Alzheimerovu bolest i artritis (Liu i sur., 2016). Unatoč dokazanoj učinkovitosti, niska bioraspoloživost kurkumina predstavlja veliki problem jer značajno limitira terapijske učinke ovog spoja, pa se provode brojna istraživanja s ciljem razvoja metoda koje će povećati njegovu bioraspoloživost (Devassy i sur., 2015; Anand i sur., 2007).

Zato je značajan razvoj bioorganometalne kemije jer su nedavna istraživanja pokazala kako pojedini bioorganometalni spojevi (biološki aktivne molekule koje sadrže barem jedan ugljik izravno vezan na metal ili metaloid) koji u strukturi imaju ferocenilnu skupinu pokazuju bolja

farmakokinetička svojstva i izraženiju aktivnost u odnosu na ishodne molekule (Kowalski, 2018).

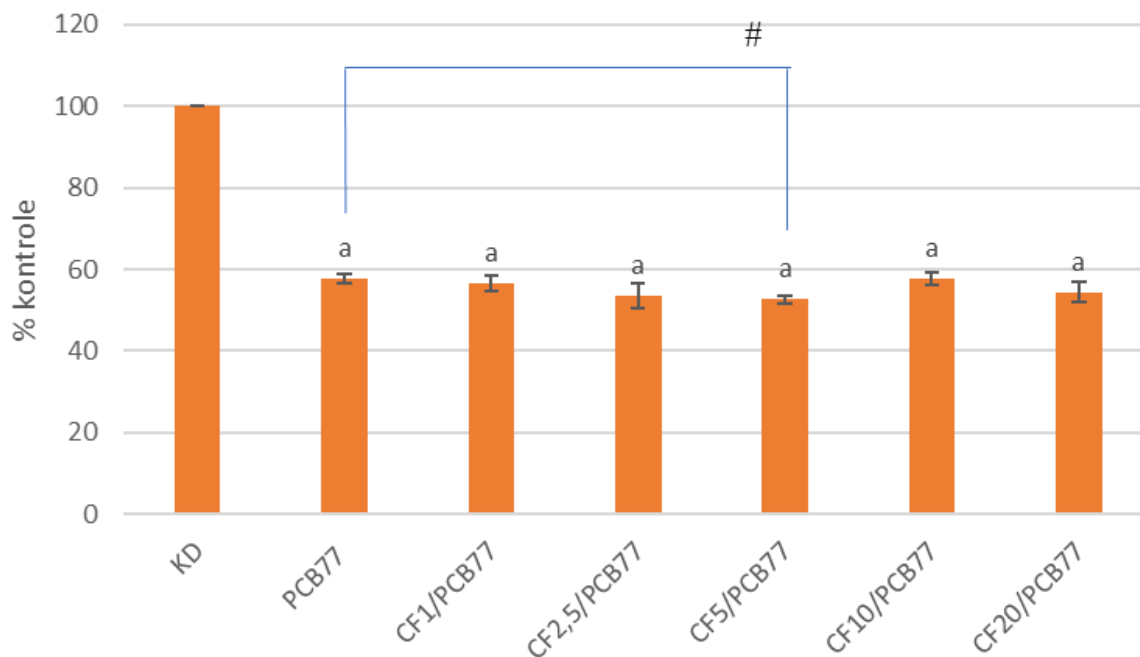
U Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta sintetiziran je diketonski ferocenski analog kurkumina (slika 8) s ciljem poboljšanja biološkog djelovanja i biodostupnosti ishodnog spoja (kurkumina), a njegova aktivnost pri citotoksičnom djelovanju PCB-a ispitana je primjenom *Neutral Red* metode. Ova metoda se temelji na vezanju boje unutar stanica prilikom čega boja *Neutral Red* prolazi kroz staničnu membranu i veže se unutar lizosoma živih stanica (Repetto i sur., 2008).

#### 4.1.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom *Neutral Red*

Učinak predinkubacije 1 – 20  $\mu\text{M}$  analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 praćen je pomoću metode *Neutral Red* (mjerenjem intenziteta nastalog obojenja spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu) 24 sata nakon tretmana stanica tim PCB kongenerom. Na slici 11 prikazani su rezultati kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane otapalom - DMSO-om).

Tretman CHO-K1 stanica s *non-orto*, dioksinu sličnim kongenerom planarne konfiguracije (PCB 77) statistički značajno ( $p < 0,001$ ) je smanjio vijabilnost i proliferaciju stanica u odnosu na kontrolni uzorak (KD) za 42,39 %. Murati i sur. (2015) u istraživanju su također pokazali smanjenu vijabilnost CHO-K1 stanica prilikom tretmana stanica s planarnim PCB 77. Također, i u uzorcima stanica koje su predinkubirane ferocenskim analogom kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ), a potom nakon 24 sata tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 zabilježeno je statistički značajno ( $p < 0,001$ ) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolu (KD) praćeno *Neutral Red* metodom. Predtretman stanica ferocenskim analogom kurkumina u svim ispitanim koncentracijama nije pružio zaštitni učinak na vijabilnost stanica tretiranih sa PCB 77, čak je pri koncentraciji analoga od 5  $\mu\text{M}$  uočen blag, ali statistički značajan ( $p < 0,01$ ) pad vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 77. Resveratrol, još jedan spoj iz skupine polifenola, pokazao je sličan učinak ferocenskom analogu kurkumina. U istraživanju Petković (2019) kod stanica predtretiranih s resveratrolom, a zatim inkubiranih sa PCB 77 u odnosu na one tretirane samo sa PCB 77 primijećeno je sinergističko inhibitorno djelovanje na vijabilnost CHO-K1 stanica što se podudara s rezultatima ovog istraživanja za učinak

ferocenskog analoga kurkumina.

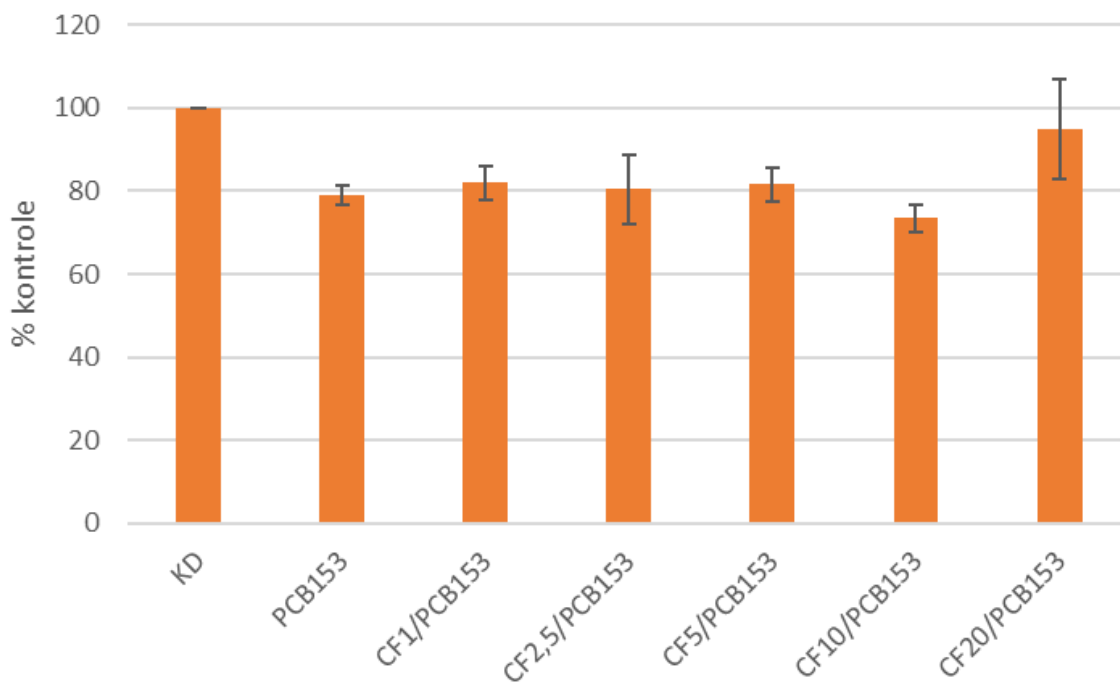


KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s 1–20  $\mu\text{M}$  CF, a potom tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolu (KD): <sup>a</sup> $p < 0,001$ ; u odnosu na stanice tretirane sa PCB 77: <sup>#</sup> $p < 0,01$

**Slika 11.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

#### 4.1.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom *Neutral Red*

*Neutral Red* metodom ispitan je i učinak različitih koncentracija ferocenskog analoga kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) pri citotoksičnom djelovanju neplanarnog, *orto* – supstituiranog PCB kongenera (PCB 153) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica, a rezultati su prikazani na slici 12 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj).



KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L DMSO mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M PCB 153}$ ; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s 1 –20  $\mu\text{M CF}$ , a potom tretirane 75  $\mu\text{M PCB 153}$

**Slika 12.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M PCB 153}$  određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

Tretman stanica ovarija sa 75  $\mu\text{M PCB 153}$  pokazao je citotoksično djelovanje i smanjenje vijabilnosti stanica za 20,93 % u odnosu na kontrolu (slika 12), što ukazuje na jače toksično djelovanje dioksinu sličnog kongenera PCB 77 (slika 11) u odnosu na *orto*-supstituiran PCB 153 praćeno *Neutral Red* metodom. Vijabilnost CHO-K1 stanica predinkubiranih analogom kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ), a nakon 24 sata tretiranih sa 75  $\mu\text{M PCB 153}$  je smanjena u odnosu na kontrolni uzorak. Predtretman CHO-K1 stanica ferocenskim analogom kurkumina, koje su zatim tretirane sa PCB 153 u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 153 pokazuje blagi protektivan učinak, ali nije statistički značajan (slika 12).

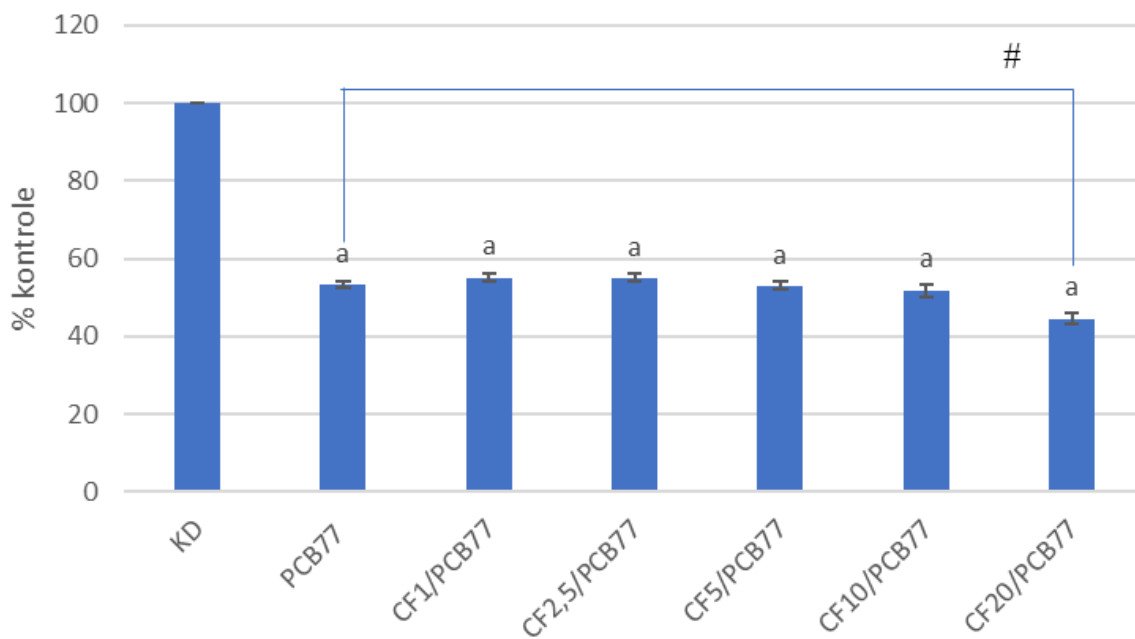
## 4.2. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM *KENACID BLUE*

Metoda *Kenacid Blue* se temelji na vezanju boje unutar stanica odnosno boja *Kenacid Blue* se veže za ukupne stanične proteine (Bradford, 1976).

### 4.2.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 praćen je i metodom *Kenacid Blue* mjerenjem intenziteta nastalog obojenja spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj).

Iz slike 13 vidljivo je da je 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 uzrokovao statistički značajno ( $p < 0,001$ ) smanjenje vijabilnosti od 46,62 % u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s DMSO-om, KD). Smanjenje vijabilnosti stanica tretiranih sa PCB 77 određeno *Kenacid Blue* metodom je malo izraženije od smanjenja vijabilnosti određene metodom *Neutral Red* (42,39 %). Vijabilnost CHO-K1 stanica predinkubiranih ferocenskim analogom kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ), a zatim tretiranih sa PCB 77 također je statistički značajno ( $p < 0,001$ ) niža u odnosu na kontrolni uzorak. Pri tretmanu stanica planarnim kongenerom PCB 77, analog kurkumina ne pokazuje zaštitni učinak na staničnu vijabilnost. Štoviše, inhibitorni učinak je izražen i statistički značajan ( $p < 0,001$ ) pri najvišoj ispitanoj koncentraciji analoga (20  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na stanice tretirane samo sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 što ukazuje na mogući sinergistički inhibitorni učinak PCB 77 i ispitanog ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica. Cai i sur. (2021) su proučavali učinak kurkumina na bioraspoloživost dioksinu sličnih polikloriranih bifenila. Nije primjećen značajan učinak na bioraspoloživost PCB-a, ali je kurkumin smanjio toksičnost PCB-a u jetri muških štakora, dok kod ženskih nije (Cai i sur., 2021).

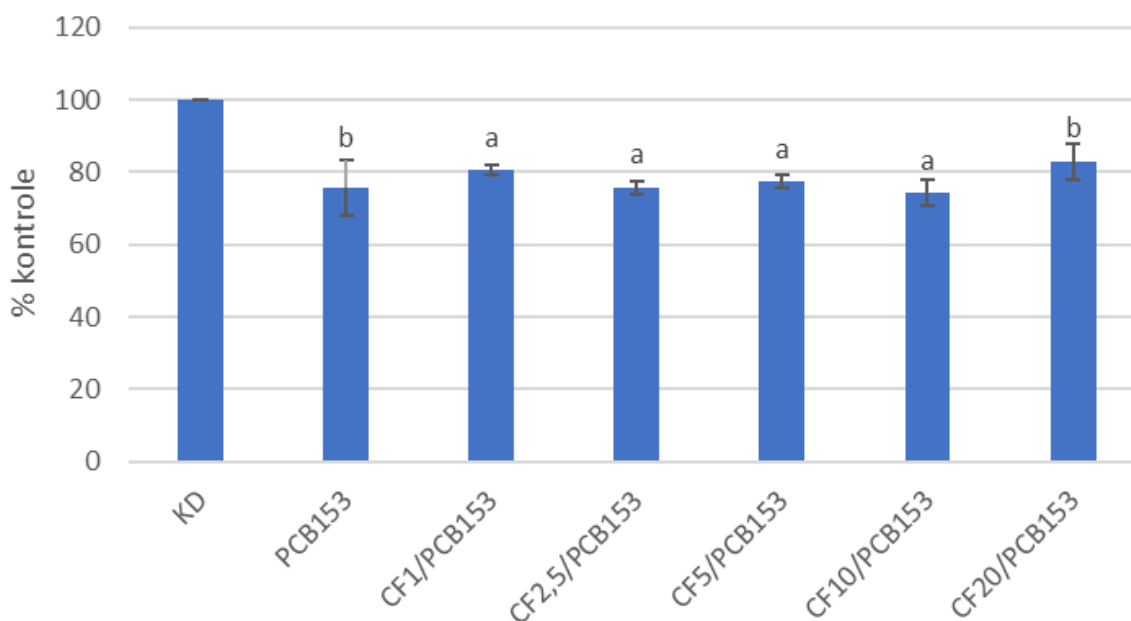


KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s 1 – 20  $\mu\text{M}$  CF, a potom tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolu (KD): <sup>a</sup> $p < 0,001$ ; u odnosu na stanice tretirane sa PCB 77: <sup>#</sup> $p < 0,001$

**Slika 13.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

#### 4.2.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak različitih koncentracija ferocenskog analoga kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) pri citotoksičnom djelovanju neplanarnog PCB 153 ispitan je i *Kenacid Blue* metodom, a na slici 14 prikazani su dobiveni rezultati kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj).



KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 153; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s 1–20  $\mu\text{M}$  CF, a potom tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 153. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolu (KD): <sup>a</sup> $p < 0,005$ , <sup>b</sup> $p < 0,05$

**Slika 14.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

Tretman CHO-K1 stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 uzrokovao je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje vijabilnosti u odnosu na stanice tretirane s DMSO-om te je stanična vijabilnost smanjena za 24,31 %. U usporedbi sa smanjenjem vijabilnosti stanica koje je određeno *Neutral Red* metodom (20,93 %), *Kenacid Blue* metodom detektirani učinak je bio nešto izraženiji. I istraživanjem Miletić i sur. (2021) potvrđena je inhibicija proliferacije i vijabilnosti CHO-K1 stanica nakon tretmana sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153. Kongener PCB 77 (slika 13) pokazao se toksičnijim na vijabilnost i proliferaciju stanica ovarija u odnosu na neplanarni PCB 153 (slika 14) praćeno metodom *Kenacid Blue*. CHO-K1 stanice koje su predinkubirane ferocenskim analogom kurkumina, a zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 isto tako su pokazale statistički značajnu ( $p < 0,005$  -  $p < 0,05$ ) smanjenu vijabilnost u odnosu na kontrolu. Predtretman ferocenskim analogom kurkumina u svim ispitanim koncentracijama nije statistički značajno utjecao na vijabilnost stanica u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 153, iako je uočen blagi porast vijabilnosti stanica (slika 14). U istraživanju Kowalski (2018) proučavani su razni ferocenski



derivati kurkumina i njihovo biološko djelovanje u usporedbi s kurkuminom. Ferocenski derivati kurkumina pokazali su, u odnosu na kurkumin, izraženiji antikancerogeni učinak koji se očitovao smanjenjem vijabilnosti stanica porijeklom iz kanceroznog tkiva, što ukazuje na potencijal ferocenske skupine u poboljšanju bioloških svojstava kurkumina u svrhu ciljanog antiproliferativnog djelovanja (Kowalski, 2018).

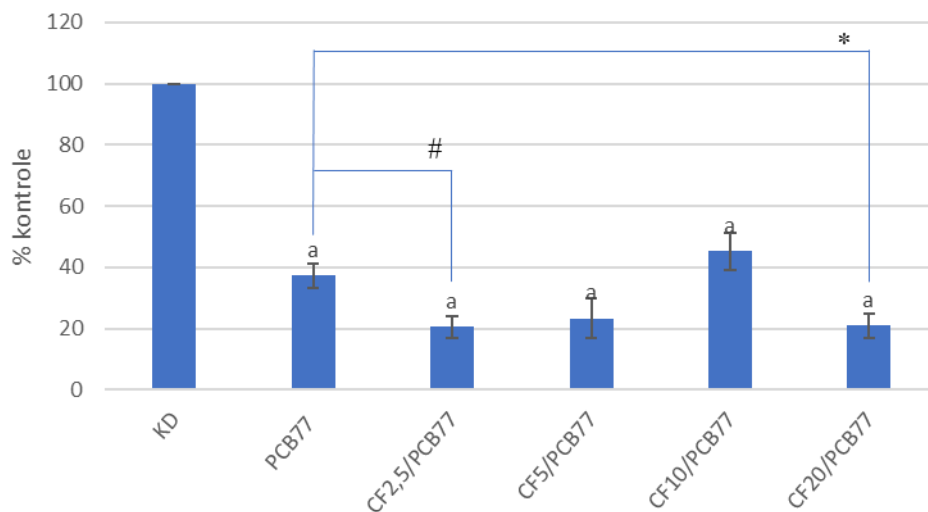
#### **4.3. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA ODREĐEN METODOM *TRYPAN BLUE***

Metoda *Trypan Blue* omogućava brojanje stanica pod svjetlosnim mikroskopom, pri čemu su mrtve stanice plavo obojene radi oštećenja stanične membrane i propusnosti za boju *Trypan Blue*, dok žive stanice ostaju neobojene (Piccinini i sur., 2017).

##### **4.3.1. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 određen metodom *Trypan Blue***

Osim primjenom spektrofotometrijskih metoda *Neutral Red* i *Kenacid Blue*, učinak ferocenskog analoga kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 (75  $\mu\text{M}$ ) određen je i brojanjem stanica pod svjetlosnim mikroskopom uz prethodno bojenje *Trypan Blue* bojom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 15 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om).

Provedenom *Trypan Blue* metodom pokazano je da je PCB 77 (75  $\mu\text{M}$ ) doveo do statistički značajnog ( $p < 0,001$ ) citotoksičnog učinka i smanjenja vijabilnosti CHO-K1 stanica od 63 % u odnosu na kontrolni uzorak. To je znatno veći postotak inhibicije u odnosu na rezultate dobivene *Kenacid Blue* (46,62 %) i *Neutral Red* metodom (42,39 %) koji su približno sličnih vrijednosti što ukazuje da je kod *Trypan Blue* metode utvrđen najjači učinak PCB-a 77 na vijabilnost i proliferaciju stanica te da je ta metoda najosjetljivija u detekciji citotoksičnih učinaka PCB 77.



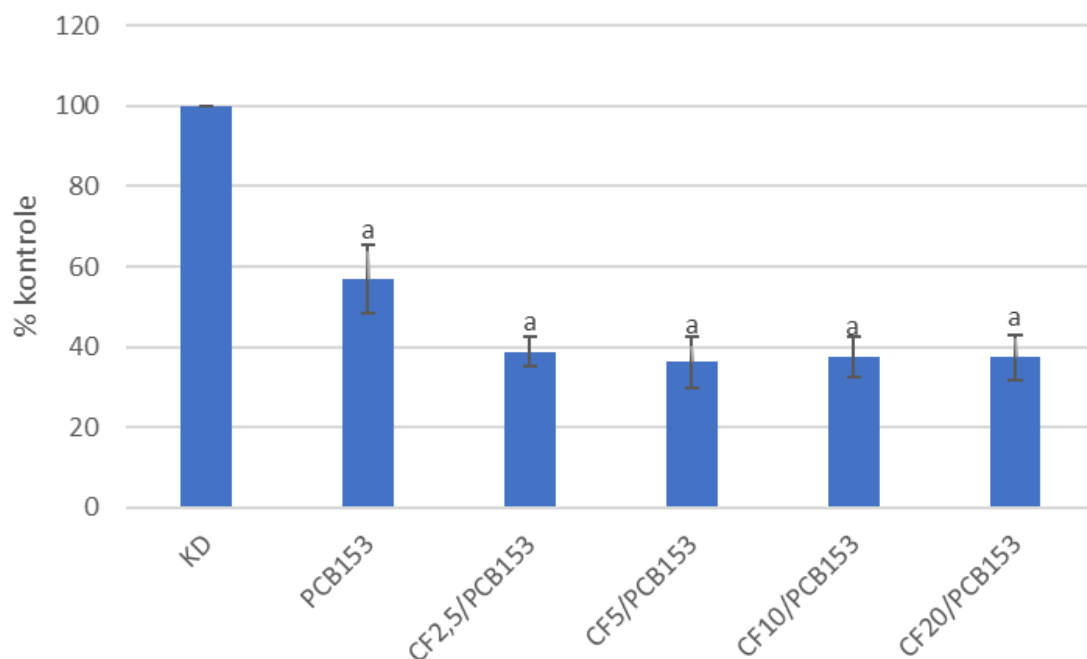
KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s 1 – 20  $\mu\text{M}$  CF, a potom tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 77. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolu (KD): <sup>a</sup> $p < 0,001$ ; u odnosu na stanice tretirane PCB 77: # $p < 0,01$ , \* $p < 0,025$

**Slika 15.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

Predinkubacija stanica ferocenskim analogom kurkumina koje su potom tretirane sa PCB 77 rezultirala je statistički značajnim ( $p < 0,001$ ) inhibitornim učinkom na staničnu vijabilnost i proliferaciju u odnosu na stanice tretirane samo otapalom (kontrolni uzorak), dok je u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 77 predinkubacija stanica s 2,5  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  ferocenskim analogom kurkumina te potom tretiranih sa PCB 77 rezultirala statistički značajnim ( $p < 0,01$  -  $p < 0,025$ ) inhibitornim učinkom na vijabilnosti i proliferaciju stanica.

#### 4.3.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 153 određen metodom *Trypan Blue*

Učinak predinkubacije različitih koncentracija ferocenskog analoga kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 praćen je i pomoću metode *Trypan Blue*, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na slici 16 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om).



KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M}$  PCB 153; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s 1 –20  $\mu\text{M}$  CF, a potom tretirane s 75  $\mu\text{M}$  PCB 153. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na kontrolu (KD): <sup>a</sup> $p < 0,001$

**Slika 16.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica  $\pm$  standardna pogreška

Statistički značajna ( $p < 0,001$ ) inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica i citotoksični učinak kongenera PCB 153 od 43 % uočen je nakon tretmana stanica tim kongenerom u odnosu na kontrolni uzorak. Postotak inhibicije određen *Kenacid Blue* metodom iznosio je 24,31 %, a *Neutral Red* 20,93 %, što pokazuje da je toksičnost PCB-a 153 najizraženija mjerena *Trypan Blue* metodom, a također se podudara i s usporedbom metoda primijenjenih za određivanje toksičnosti PCB 77. Analogom predtretirane CHO-K1 stanice, a potom tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj) su pokazale statistički značajno smanjenje ( $p < 0,001$ ) stanične vijabilnosti i proliferacije, a u odnosu na stanice tretirane samo sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 vijabilnost stanica je smanjena, no učinak nije statistički značajan (slika 16). Ovi rezultati su usporedivi s istraživanjem Jurišić (2021) gdje je ferocenski konjugat kurkumina (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) smanjio vijabilnost stanica u odnosu na kontrolni uzorak što ukazuje na inhibični učinak ferocenskih derivata kurkumina neovisno o tretmanu PCB-om.

#### 4.4. UČINAK FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIM SA PCB 153

ROS koje nastaju različitim izvanstaničnim i unutarstaničnim djelovanjem imaju ulogu u rastu, diferencijaciji smrti stanica (Zhang i sur., 2016). ROS se mogu podijeliti u dvije skupine: slobodni radikali i neradikali. Slobodni radikali uključuju superoksid ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil ( $\bullet OH$ ), dušikov oksid ( $NO\bullet$ ), organski radikal ( $R\bullet$ ), peroksil radikal ( $ROO\bullet$ ), alkoksilni radikal ( $RO\bullet$ ) i dr. U neradikale se ubrajaju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), organski hidroperoksid ( $ROOH$ ), hipoklorid ( $HOCl$ ), peroksinitrit ( $ONO^-$ ), nitrozoperoksikarbonatni anion ( $ONOOCO_2^-$ ), nitrokarbonatni anion ( $O_2NOCO_2^-$ ), dušikov dioksid ( $N_2O_2$ ) (Liou i Storz, 2010).

U fiziološkom stanju, razina staničnih ROS je stabilna i uravnotežena, a ravnoteža se održava staničnim procesima koji ih proizvode i eliminiraju. Izvori staničnog ROS-a mogu biti biološki procesi: u prvom redu to je mitohondrijski oksidativni metabolizam koji oslobađa ROS kao nusproizvod ili iz drugih reakcija. Osim bioloških procesa ROS nastaje i u procesima staničnog odgovora na ksenobiotike, citokine i bakterije gdje ROS nastaje kao dio puta prijenosa signala ili kao dio obrambenog mehanizma stanice (Zhang i sur., 2016). Kod nižih koncentracija ROS pokazuju korisne učinke regulacijom unutarstanične signalizacije i homeostaze, dok pri višim razinama ROS uzrokuje oštećenja proteina, lipida i DNA (Prasad i sur., 2017).

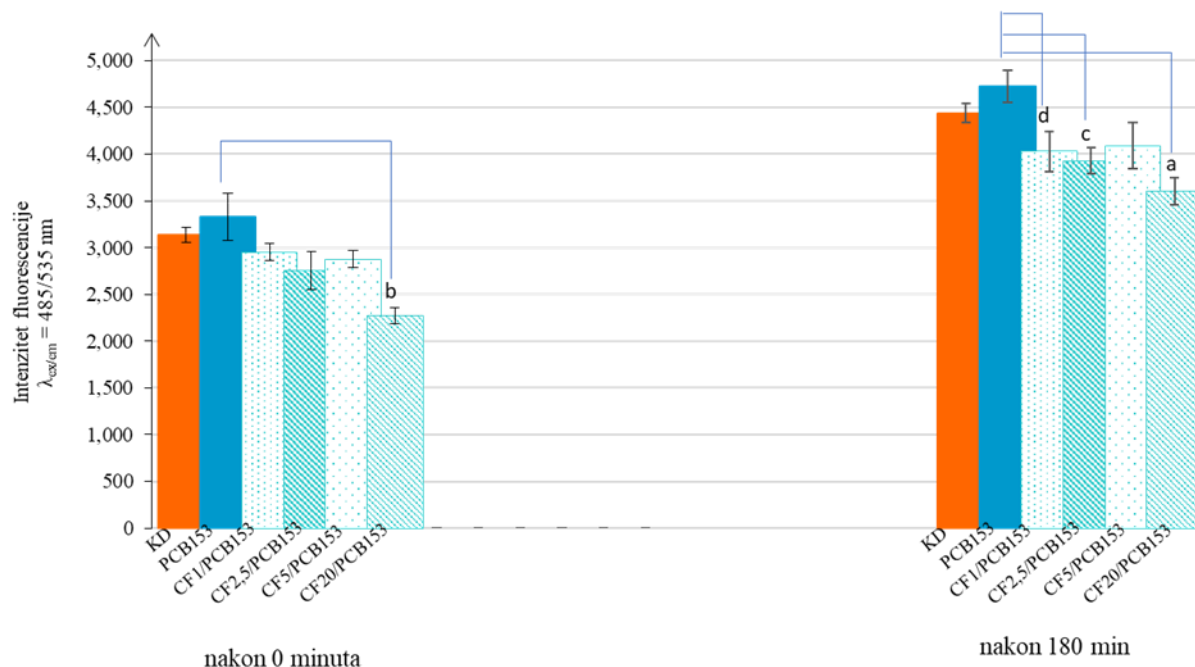
Antioksidacijski obrambeni sustavi u ljudskom tijelu održavaju ravnotežu između proizvodnje i neutralizacije ROS-a i uključuju superoksid dismutazu, katalazu, glutation peroksidazu, glutation reduktazu, glutation S-transferazu i glutation. Ako dođe do neravnoteže između ROS i antioksidacijskih obrambenih sustava dolazi do nastanka oksidacijskog stresa (Prasad i sur., 2017).

Toksično djelovanje PCB-a dovodi do nastajanja ROS, a PCB također ometaju enzime i signalne putove povezane s antioksidacijskom obranom, što dovodi do nastajanja oksidacijskog stresa (Liu i sur., 2020).

Oksidacijski stres povezan je s općim procesom starenja i stanične smrti, a ROS sudjeluju u mnogim bolestima povezanim sa starenjem, uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest i kardiovaskularne bolesti. Također povećana razina ROS-a povezuje se i s nastankom raka (Brieger i sur., 2012).

Budući da su epidemiološke studije pokazale da su ljudi koji konzumiraju velike količine

voća i povrća bogatih antioksidansima boljeg zdravlja, razvio se interes za ispitivanjem raznih spojeva s potencijalnim antioksidacijskim djelovanjem i njihovog mogućeg utjecaja na razinu ROS-a i posljedično smanjenje prevalencije bolesti povezanih s ROS-om (Brieger i sur., 2012).



KD – kontrola, stanice tretirane s 15  $\mu\text{L DMSO mL}^{-1}$  medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75  $\mu\text{M PCB 153}$ ; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20  $\mu\text{M}$ , a potom tretirane 75  $\mu\text{M PCB 153}$ . Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane sa PCB 153:

<sup>a</sup> $p < 0,005$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,025$ , <sup>d</sup> $p < 0,05$

**Slika 17.** Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20  $\mu\text{M}$ ) na razinu reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 stanicama tretiranim s 75  $\mu\text{M PCB 153}$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ( $\lambda_{\text{ex/em}}=485/535 \text{ nm}$ )  $\pm$  standardna pogreška

Suvremena medicinska istraživanja identificirala su kurkumin kao spoj koji posjeduje jaka antioksidacijska svojstva. Kurkumin izravno reagira sa superoksidnim anionom, hidroksilnim radikalima i vodikovim peroksidom. Također kurkumin aktivira antioksidacijske sustave povećanjem ekspresije antioksidacijskih enzima kao što su glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i hem oksigenaza 1 (Yu i sur., 2019).

Nakon što je ispitan učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju

CHO-K1 stanica tretiranih sa PCB 77 i PCB 153 metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue*, promatrao se i učinak tog novosintetiziranog spoja na razinu ROS koje nastaju kao posljedica tretmana stanica sa PCB 153, jednim od najzastupljenijih i najperzistentnijih PCB kongenera u okolišu i biološkim tkivima (Miletić i sur., 2021).

Tretmanom CHO-K1 stanica sa PCB 153 dolazi do povećanja razine ROS u odnosu na kontrolni uzorak (KD) (slika 17). Miletić i sur. (2021) su također pokazali da PCB 153 inducira stvaranje ROS u stanicama ovarija, ovisno o primijenjenoj dozi. Isto tako Mariussen i sur. (2002) su dokazali da je PCB 153 (25 i 50  $\mu\text{M}$ ) povećao razinu ROS u kulturi zrnatih stanica malog mozga štakora u odnosu na kontrolu. Kod stanica predinkubiranih ferocenskim analogom kurkumina (1– 20  $\mu\text{M}$ ), a zatim tretiranih sa PCB 153 uočen je pad razine ROS u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 153, pri čemu je statistički značajno ( $p<0,01$ ) niža razina zabilježena pri tretmanu stanica 20  $\mu\text{M}$  ferocenskim analogom. Nakon inkubacije od 180 minuta, sve ispitane koncentracije ferocenskog analoga kurkumina su pokazale antioksidacijski učinak, odnosno dovele do pada razine ROS u odnosu na stanice koje su tretirane samo sa PCB 153. Statistički značajno smanjenje ROS zabilježeno je prilikom predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina pri koncentracijama 1  $\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ ); 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,025$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p<0,005$ ) u CHO-K1 stanicama tretiranima 75  $\mu\text{M}$  PCB 153. U istraživanju Yu i sur. (2019) niske koncentracije kurkumina (1 – 5  $\mu\text{M}$ ) nisu utjecale na vijabilnost C2C12 stanica (stanična linija mioblata miša), ali su inducirale blagi porast razine ROS dostignuvši vrhunac 2 sata nakon tretmana. Predtretman s 5  $\mu\text{M}$  kurkumina spriječio je oštećenje stanica izazvano visokim razinama glukoze (35 mM). S druge strane visoke koncentracije kurkumina (10 – 50  $\mu\text{M}$ ) dovele su do snažnog povećanja razine ROS i smanjenja vijabilnosti stanica (Yu i sur., 2019).

Ovi rezultati pokazuju potencijalni antioksidacijski učinak ferocenskog analoga kurkumina jer uzrokuje smanjenje razine ROS kod stanica tretiranih sa PCB 153, no unatoč tome to se nije značajnije odrazilo i na učinak analoga na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih istim PCB kongenerom (slike 12, 14 i 16).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) i kolorimetrijske *in vitro* metode *Neutral Red*, *Kenacid Blue* i *Trypan Blue* pokazale su se kao dobar *in vitro* test sustav za praćenje učinka ferocenskog analoga kurkumina pri citotoksičnom djelovanju PCB 77 ili PCB 153.
2. Svim primijenjenim kolorimetrijskim metodama određen je statistički značajan ( $p < 0,001$ ) citotoksičan učinak planarnog PCB 77 na CHO-K1 stanice. *Orto* supstituiran PCB 153 uzrokuje statistički značajnu ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) inhibiciju proliferacije i smanjenje vijabilnosti stanica potvrđeno metodama *Kenacid Blue* i *Trypan Blue*. Planarni PCB 77 je toksičniji kongener za CHO-K1 kulturu stanica u odnosu na neplanarni PCB 153.
3. Predtretman stanica ferocenskim analogom kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) u svim ispitanim koncentracijama nije pružio zaštitni učinak na vijabilnost stanica tretiranih sa PCB 77 (praćeno *Neutral Red* metodom), čak je pri koncentraciji analoga od 5  $\mu\text{M}$  uočen statistički značajan ( $p < 0,01$ ) pad vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 77. Vijabilnost stanica predinkubiranih analogom, a potom tretiranih sa PCB 153 je blago povišena, no nije statistički značajno promijenjena u odnosu na stanice tretirane samo tim PCB kongenerom.
4. Metodom *Kenacid Blue* određen je statistički značajan ( $p < 0,001$ ) pad vijabilnosti stanica nakon tretmana stanica sa PCB 77 uz predinkubaciju ferocenskim analogom kurkumina u dozi od 20  $\mu\text{M}$  u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 77. U odnosu na stanice tretirane samo s neplanarnim PCB 153, predtretman analogom (1-20  $\mu\text{M}$ ) pokazao je blagi protektivan učinak, no nije statistički značajno utjecao na vijabilnost i proliferaciju stanica određenu *Kenacid Blue* metodom.
5. Statistički značajna ( $p < 0,01$  –  $p < 0,025$ ) smanjena vijabilnost i proliferaciju stanica zabilježena je primjenom *Trypan Blue* metoda prilikom predinkubacije CHO-K1 stanica s 2,5  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  ferocenskim analogom kurkumina te potom tretiranih sa PCB 77 u odnosu na stanice tretirane samo tim planarnim kongenerom. Analogom predtretirane CHO-K1 stanice, a potom tretirane sa PCB 153 u odnosu na stanice tretirane samo sa PCB 153 pokazale su smanjenu vijabilnost, no učinak nije statistički značajan.

6. Predtretman CHO-K1 stanica ferocenskim analogom kurkumina (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) nije pružio zaštitni učinak na vijabilnost stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 ili PCB 153. Prilikom predinkubacije stanica analogom, a potom tretiranih sa PCB 77 zabilježen je pri pojedinim koncentracijama i primjenom sve tri metode čak i sinergistički inhibitorni učinak na vijabilnost i proliferaciju stanica.
7. Ferocenski analog kurkumina pokazao je potencijalan antioksidacijski učinak jer je zabilježen statistički značajan pad razine ROS u koncentracijama analoga od 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) prilikom tretmana CHO-K1 stanica sa PCB 153 u odnosu na stanice koje su tretirane samo tim PCB kongenerom.



## 6. LITERATURA

Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H (2007) Curcumin: the Indian solid gold. U: Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S (ured.) *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer, berlin, str. 1-75.

Alcigir ME, Dogan HO, Dikmen BY, Dogan K, Vural SA, Yilmaz FM i sur. (2018) An Investigation of the Effects of Curcumin on the Changes in the Central Nervous System of Rats Exposed to Aroclor 1254 in the Prenatal Period. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **17**(2), 132-143. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180315170146>

Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* **4**(6), 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>

Arezki A, Chabot GG, Quentin L, Scherman D, Jaouen G, Brulé E (2011) Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *Med Chem Comm* **2**(3), 190-195. <https://doi.org/10.1039/C0MD00231C>

ATCC (2023) Product Description – CHO-K1 (CCL-61). ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx#>. Pristupljeno 27. srpnja 2023.

ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated byphenyls (PCBs). ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17-c4.pdf>. Pristupljeno 27. srpnja 2023.

Aydin S, Erkekoglu P, Kocer Gumusel B, Basaran N (2016) Effects of curcumin on Aroclor 1254-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Lett* **258**, 249. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1882>

Baliga MS, Joseph N, Venkataranganna MV, Saxena A, Ponemone V, Fayad R (2012) Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. *Food Funct* **3**(11), 1109-17. <https://doi.org/10.1039/c2fo30097d>

Bonfeld-Jørgensen EC, Andersen HR, Rasmussen TH, Vinggaard AM (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* **158**, 141–153. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00368-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00368-1)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Brajenović N, Brčić Karačonji I, Jurič A (2018) Levels of polychlorinated biphenyls in human milk samples in European countries. *Arh Hig Rada Toksikol* **69** (2), 135-153. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3120>

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* **142**, 13659. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13659>

Cabrerizo A, Muir DCG, De Silva AO, Wang X, Lamoureux SF, Lafrenière MJ (2018) Legacy and Emerging Persistent Organic Pollutants (POPs) in Terrestrial Compartments in the High Arctic: Sorption and Secondary Sources. *Environ Sci Technol* **52**(24), 14187-14197. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05011>

Cai D, Chen Q, Han J, Song J, Meng Z, Zheng Y i sur. (2021) Effects of curcumin on the bioavailability of dioxin-like pollutants in rats. *Sci Rep* **11**, 12461. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92085-3>

Chainani-Wu N (2003) Safety and anti-Inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* **9**(1), 161-8. <https://doi.org/10.1089/107555303321223035>

Čakić Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90** (4), 537-569. <https://doi.org/10.5562/cca3246>

Devassy J, Nwachukwu I, Jones P (2015) Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr Rev* **73**(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu064>

Doğan HO, Alçiğir ME (2019) Assessment of epigenetic changes and oxidative DNA damage in rat pups exposed to polychlorinated biphenyls and the protective effect of curcumin in the prenatal period. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **30**(3). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0182>

EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. EFSA – European Food Safety Authority, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/284.htm>. Pristupljeno 28. srpnja 2023.

Epstein J, Sanderson IR, MacDonald TT (2010) Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Brit J Nutr* **103**, 1545-1557. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993667>

FAO (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <<http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/fao/Manual%20on%20the%20Production%20and%20Use%20of%20Live%20Food%20for%20Aquaculture.pdf>>. Pristupljeno 28. srpnja 2023.

Ghorbani Z, Hekmatdoost A, Mirmiran P (2014) Anti-hyperglycemic and insulin sensitizer effects of turmeric and its principle constituent curcumin. *Int J Endocrinol Metab* **12**(4), 18081. <https://doi.org/10.5812/ijem.18081>

Gilroy C, Connell BJ, Singh A, Suidgeest P, Chu I (1998) PCB congener 77-induced ultrastructural alterations in the rat liver: a quantitative study. *Toxicology* **127**, 179-185. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(98\)00041-9](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(98)00041-9)

Gong P, Wang X, Li S, Yu W, Li J, Kattel DB i sur. (2014) Atmospheric transport and accumulation of organochlorine compounds on the southern slopes of the Himalayas, Nepal. *Environ Pollut* **192**, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.05.015>

Hartinger CG, Dyson PJ (2009) Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem Soc Rev* **38**(2), 391-401. <https://doi.org/10.1039/b707077m>

Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV (2008) Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1631-1652. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7452-4>

He Q-L, Zhang L, Liu S-Z (2021) Effects of Polychlorinated Biphenyls on Animal Reproductive Systems and Epigenetic Modifications. *Bull Environ Contam Toxicol* **107**(3), 398-405. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03285-6>

Helou K, Harmouche-Karaki M, Karake S, Narbonne J-F (2019) A review of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Lebanon: Environmental and human contaminants. *Chemosphere* **231**, 357-368. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.109>

Herceg Romanić S (2002) Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisustnost u iglicama crnogoričnog drveća. *Arh Hig Rada Toksikol* **53** (1), 21-30.

Jankun J, Wyganowska M, Dettlaff K, Jelińska A, Surdacka A, Watróbska-Świetlikowska D i sur. (2016) Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *Int J Mol Med* **37** (5), 1151-1158. doi: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2524>

Jaouen G, Beck W, McGlinchey MJ (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Jaouen, G. (ured.) *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, Wiley-VCH, Weinheim, str. 1-37. <https://doi.org/10.1002/3527607692.ch1>

Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR (2004) Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44** (2), 97-111. <https://doi.org/10.1080/10408690490424702>

Jurenka JS (2009) Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* **14** (2), 141-53.

Jurišić A (2021) Učinci polifenola i ferocenskih konjugata polifenola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama ovarija (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Klinčić D, Herceg Romanić S (2011) Chemical methods for determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in biological material. *Arh Hig Rada Toksikol* **62**, 77-89. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2052>

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

Kocaadam B, Şanlıer N (2015). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**(13), 2889–2895. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>

Kotha RR, Luthria DL (2019) Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* **24**(16), 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>

Kowalski K (2018) Recent developments in the chemistry of ferrocenyl secondary natural product conjugates. *Coord Chem Rev* **366**, 91-108. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.008>

Kurup VP, Barrios CS (2008) Immunomodulatory effects of curcumin in allergy. *Mol Nutr Food Res* **52**(9), 1031-9. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700293>.

Li PZ, Liu ZQ (2011) Ferrocenyl-substituted curcumin: can it influence antioxidant ability to protect DNA? *Eur J Med Chem* **46**(5), 1821-1826. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.041>

Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* **44**(5), 479-496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>

Liu J, Tan Y, Song E, Song Y (2020) A Critical Review of Polychlorinated Biphenyls Metabolism, Metabolites, and Their Correlation with Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* **33**(8), 2022-2042. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00078>

Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D i sur. (2016) Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target* **24**(8), 694–702. <https://doi.org/10.3109/1061186x.2016.1157883>

Lopresti A, Hood S, Drummond P (2012) Multiple antidepressant potential modes of action of curcumin: a review of its anti-inflammatory, monoaminergic, antioxidant, immunomodulating and neuroprotective effects. *J Psychopharmacol* **26** (12), 1512- 24. <https://doi.org/10.1177/0269881112458732>

Mariussen E, Myhre O, Reistad T, Fonnum F (2002) The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* **179**(3), 137-44. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9353>

Menon VP, Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* **595**, 105-25. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_3)

Miletić M, Murati T, Šimić B, Bilandžić N, Brozović A, Kmetič I (2021) *Ortho*-substituted PCB 153: effects in CHO-K1 cells. *Arh Hig Rada Toksikol* **72** (4), 326-332. <https://doi.org/10.2478/aiht-2021-72-3588>

Miletić M (2022) Selekcija biološki aktivnih tvari sa zaštitnim učincima na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K (2014) A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int* **2014**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/186864>

Monroy A, Lithgow GJ, Alavez S (2013) Curcumin and neurodegenerative diseases. *Biofactors* **39**(1), 122-32. <https://doi.org/10.1002/biof.1063>

Morrison GC, Andersen HV, Gunnarsen L, Varol D, Uhde E, Kolarik B (2018) Partitioning of PCBs from air to clothing materials in a Danish apartment. *Indoor Air* **28**(1), 188-197. <https://doi.org/10.1111/ina.12411>

Murati T, Šimić B, Brozović A, Kniewald J, Miletić Gospić A, Bilandžić N, Kmetič I (2015) PCB 77 action in ovary cells – toxic effects, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Toxicol Mech Methods* **25**(4), 302-311. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1028605>

Murati T (2015) Studija citotoksičnih učinaka polikloriranih bifenila (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

NCBI (2023) Curcumin. NCBI - The National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>. Pristupljeno 30. kolovoza 2023.

Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>

Perkins JT, Petriello MC, Newsome BJ, Hennig B (2016) Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**(3), 2160-72. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4479-6>

Peschel D, Koerting R, Nass N (2007) Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem* **18**(2), 113-9. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.03.007>

Petković T (2019) Evaluacija učinaka resveratrola pri tretmanu stanica polikloriranim bifenilima određena *in vitro* metodama (diplomski rad). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A (2017) Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures - expected reliability of the Trypan Blue assay. *Biol Proced Online* **19**, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>

Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK (2017) Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* **387**, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>

Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB (2014) Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv* **32**(6), 1053-1064. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>

Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa Mc (2016) Curcumin and Health. *Molecules* **21**(3), 264. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>

Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE (2022) Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem* **46**(10), 14264. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>

Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija. *Kem Ind* **60** (2), 61–79.

RCS (2023a) ChemSpider: 3,3',4,4'-PCB, RCS - Royal Society of Chemistry, Cambridge, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33281.html?rid=404ea35e-5e53-4bf8-810c-ec8304b682c8%20>. Pristupljeno 5. rujna 2023.

RCS (2023b) ChemSpider: 2,2',4,4',5,5'-PCB, RCS - Royal Society of Chemistry, Cambridge, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33983.html?rid=c914515d-7c00-43e6-965c-e938870e135b>. Pristupljeno 5. rujna 2023.

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability-cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Sahebkar A (2014) Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis. *Phytother Res* **28**(5), 633-42. <https://doi.org/10.1002/ptr.5045>

Severin K, Bergs R, Beck W (1998) Bioorganometallic Chemistry – Transition Metal Complexes with  $\alpha$ -Amino Acids and Peptides. *Angew Chem Int* **37**, 1634–1654.

Shehzad A, Rehman G, Lee YS (2013) Curcumin in inflammatory diseases. *Biofactors* **39**(1), 69-77. <https://doi.org/10.1002/biof.1066>

Singh A, Lumb I, Mehra V, Kumar V (2019) Ferrocene-appended pharmacophores: an exciting approach for modulating biological potential of organic scaffolds. *Dalton Trans* **48**, 2840-2860. <https://doi.org/10.1039/C8DT03440K>

Štěpnička P (2022) Forever young: the first seventy years of ferrocene. *Dalton Trans* **51**(21), 8085-8102. <https://doi.org/10.1039/d2dt00903j>

Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK (2007) Beneficial role of curcumin in skin diseases. *Adv Exp Med Biol* **595**, 343-57. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_15)

Tharappel JC, Lehmler HJ, Srinivasan C, Robertson LW, Spear BT, Glauert HP (2008) Effect of antioxidant phytochemicals on the hepatic tumor promoting activity of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77). *Food Chem Toxicol* **46**(11), 3467-3474. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.023>

Toma M, Vrček V (2020) Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza. *Kem Ind* **69** (13). <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.025>

Vari R, Scazzocchio B, Silenzi A, Giovannini C, Masella R (2021) Obesity-Associated Inflammation: Does Curcumin Exert a Beneficial Role? *Nutrients* **13**(3), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu13031021>

Venkatesha VA, Kalen AL, Sarsour EH, Goswami PC (2010) PCB-153 exposure coordinates cell cycle progression and cellular metabolism in human mammary epithelial cells. *Toxicol Lett* **196**, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.04.005>

Weiss B (1997) Pesticides as a source of developmental disabilities. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **3**, 246-56.

Werner H (2012) At least 60 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of the sandwich complexes. *Angew Hem Int* **51**, 6052-6058. <https://doi.org/10.1002/anie.201201598>

WHO (1992) Environmental Health Criteria 140 - Polychlorinated biphenyls and terphenyls. WHO – World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38678/9241571403-eng.pdf?sequence=1>. Pristupljeno 27. srpnja 2023.

WHO (2003) Health risks of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution. WHO – World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/107471/e78963.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Pristupljeno 28. srpnja 2023.

Yano S, Terai M, Shimizu KL, Futagami Y, Horie S, Tsuchiya S i sur. (2000) Antiallergic activity of *Curcuma longa* (II) features of inhibitory actions on histamine release from mast cells. *Nat Med* **54**, 325-329.

Yu T, Dohl J, Elenberg F, Chen Y, Deuster P (2019) Curcumin induces concentration-dependent alterations in mitochondrial function through ROS in C2C12 mouse myoblasts. *J Cell Physiol* **234**, 6371-6381. <https://doi.org/10.1002/jcp.27370>.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y i sur. (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ružica Bajić  
Ružica Bajić