Selekcija biološki aktivnih tvari sa zaštitnim učincima na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima

Miletić, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:159:523418

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marina Miletić

SELEKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI SA ZAŠTITNIM UČINCIMA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marina Miletić

SELEKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI SA ZAŠTITNIM UČINCIMA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Marina Miletić

SELECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH PROTECTIVE EFFECTS ON CYTOTOXICITY INDUCED BY POLYCHLORINATED BIPHENYLS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
PhD Ivana Kmetič, Full Professor

Zagreb, 2022

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 2. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2020./2021. održanoj dana 23. studenog 2020., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na 8. redovitoj elektroničkoj sjednici, održanoj 16. ožujka 2021. u 352. akademskoj godini (2020./2021.).

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za toksikologiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Kmetič, u okviru potpora Sveučilišta u Zagrebu *Selekcija biološki aktivnih tvari s protektivnim učincima na toksičnost induciranu perzistentnim organoklornim spojevima, Učinci polifenola na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima, Selekcija biološki aktivnih tvari s protektivnim učincima na toksičnost induciranu polikloriranim bifenilima, Usporedba protektivnih učinaka antioksidacijskih tvari na citotoksičnost induciranu ortho- supsitutiranim ili dioksinu sličnim kongenerima polikloriranih bifenila.*

Informacije o mentoru:
Dr. sc. Ivana Kmetič, redovita je profesorica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

ŽIVOTOPIS

Profesorica Ivana Kmetič rođena je 5. siječnja 1974. godine u Zagrebu, Hrvatska. Visokoškolsko obrazovanje iz područja biotehnologije završila je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je diplomirala 1998. godine i stekla akademski stupanj diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije, smjer biokemijsko inženjerstvo. Doktorski studij smjer Biotehnologija-bioprocesno inženjerstvo završila je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obranom disertacije pod naslovom *„Primjena kulture životinjskih stanica na studiju citotoksičkih učinaka pesticida“* te stekla akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti 10. srpnja 2008. godine. Prof. dr. sc. Ivana Kmetič zaposlena je od 2001. godine u Laboratoriju za toksikologiju najprije kao znanstveni novak na poslovima mlađeg asistenta, zatim u suradničkom zvanju asistenta te višeg asistenta, a godine 2009. izabrana je u znanstveno-nastavno zvanje docent (zn. područje Biotehničke znanosti, zn. polje Biotehnologija, grana Otpadne tvari). Habilitacijsko predavanje održala je na temu: *„Alergijske reakcije na hranu – modificiranje alergenih svojstava proteina procesiranjem hrane“*. Zvanje izvanredne profesorice stječe 04. svibnja 2016. te redovite profesorice 21. rujna 2021. godine potvrdom Senata Sveučilišta u Zagrebu. Od trenutka zaposlenja sudjeluje u izvođenju nastave, a kasnije postaje nositeljem kolegija na preddiplomskom i diplomskim studijima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta: Osnove toksikologije, Toksikologija hrane, Toksikologija te Metodika znanstvenog rada i zaštita intelektualnog vlasništva. Na poslijediplomskom doktorskom studiju *„Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam“* nositelj je predmeta Ekotoksikologija i toksikologija hrane te Metodika znanstvenog rada, a na poslijediplomskom specijalističkom studiju *„Kvaliteta i sigurnost hrane“* nositelj je predmeta Toksikološki aspekti sigurnosti hrane. Koautorica je jednog sveučilišnog udžbenika, jedne znanstvene knjige, a pod njenim mentorstvom izrađeno je više od 30 diplomskih i završnih radova. Usavršavala se na edukacijskim tečajevima: *“High throughput assays in toxicological testing”* – EUROTOX 2005, Poljska, *“EUROTOX Basic Toxicology Course”* – Slovenija, 2003., te *„Apoptoza“*, IRB, 2005. Program pedagoško-psihološke izobrazbe položila je 2001. godine na Učiteljskoj akademiji Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstvena istraživanja prof. dr. sc. Ivane Kmetič vezana su uz područje opće i primijenjene toksikologije, primarno obuhvaćaju izučavanje toksičnog djelovanja perzistentnih organskih zagađivača i endokrinih modulatora, *in vivo* i *in vitro* toksikološka ispitivanja. Recentna znanstvena istraživanja odnose se na identifikaciju intracelularnih mehanizama toksičnog

djelovanja organoklornih spojeva te selekciju i identifikaciju mogućih protektivnih tvari. Tijekom svog znanstvenog rada objavila je ukupno 33 znanstvena članka od kojih je 21 znanstveni rad klasificiran u a1 skupini. Objavljeni znanstveni radovi citirani su ukupno oko 150 puta (izvor: *Clarivate Analytics Web of Science*), *h*-index: 8 (*WoS*).

Dobitnica je nagrade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za objavljen znanstveni rad u najbolje rangiranom časopisu u 2015. godini u području kemije. Od 2013. godine obnaša dužnost voditeljice Laboratorija za toksikologiju.

Članica je Hrvatskog toksikološkog društva i Hrvatskog društva za biotehnologiju.

Zahvala

Neizmjerno sam zahvalna prof. dr. sc. Ivani Kmetič i doc. dr. sc. Teuti Murati na njihovom vodstvu, stalnoj podršci, inspiraciji i spremnosti da podijele svoje ogromno znanje. Hvala im što su mi stvorile dom izvan doma, a utjecaj koji su imale na mene daleko je veći od čisto akademskog. Bila mi je velika čast i privilegija biti dijelom maloga tima Laboratorija za toksikologiju.

♥

Zahvalu svakako zaslužuju kolegice i kolege koji su nesebično pomagali bilo savjetima, bilo ustupanjem prijeko potrebnih uređaja, ali i brojnim zabavnim i veselim trenucima.
Svi napori uloženi u ovaj projekt ne bi bili mogući bez podrške i pomoći mnogih pojedinaca, kojima izražavam svoju iskrenu zahvalnost.

♥

Ogromno hvala mojim curama (Feri, Sanji, Jeleni, Gabi, Ani, Ivani) i ekipi iz Gorice (Nini, Mateji, Alenu, Luki) za poticaje i potporu te za sve nezaboravne trenutke sreće i veselja.

♥

Najveće hvala mojoj obitelji, naročito majci, na bezuvjetnoj podršci i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 547.979.4:57.085.2:661.723:676.017.8(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

SELEKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI SA ZAŠTITNIM UČINCIMA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

Marina Miletić, mag. nutr., mag. ing. techn. aliment.

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Mentor: prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Kratki sažetak: Polikloririrani bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*, PCB) su perzistentni organski zagađivači okoliša koji pokazuju mnogobrojne negativne učinke na okoliš te na zdravlje ljudi (oksidacijski stres, inflamatorni učinak, endokrina modulacija, mutagenost). U ovom istraživanju su primjenom *in vitro* test sustava ispitani potencijalni zaštitni učinci dva odabrana polifenola – resveratrola (RSV) i kurkumina (CRC), kao i ferocenskih analoga polifenola (ferocenski triacilni derivat resveratrola – RF i ferocenski analog kurkumina – CF) na citotoksičnost induciranu odabranim PCB kongenerima – PCB 77 („*dioksinu sličan*“, planarni tetraklorobifenil) i PCB 153 („*ne-dioksinu sličan*“, neplanarni heksaklorobifenil). Prethodno su na stanicama ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) i kanceroznoj hepatocelularnoj staničnoj liniji (Hepa1-6) utvrđene doze polifenola i njihovih analoga koje ne djeluju toksično na stanice: 2,5 – 20 μM RSV; 1 – 20 μM CRC; 2,5 – 100 μM RF i 1 – 20 μM CF. Za oba PCB kongenera (75 μM) utvrđen je statistički značajan inhibitorni učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica, a izraženiji citotoksični učinak određen je za PCB 77. Zaštitni učinci RSV, CRC, RF i CF iskazani su prvenstveno na citotoksičnost induciranu PCB-em 153. Primjenom *in vitro* metoda najizraženiji zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu PCB-em 153 utvrđen je za RF i to u svim ispitanim koncentracijama, dok su pozitivni učinci RSV-a i CRC-a utvrđeni samo pri najnižim ispitanim dozama (≤ 2,5 μM). Zaštitni učinak RSV-a na citotoksičnost induciranu PCB-em 77 nije utvrđen niti jednom od primijenjenih metoda, već je određen sinergistički antiproliferativni učinak RSV-a i planarnog kongenera PCB-a. Analiza stanične smrti metodom protočne citometrije pokazala je da predinkubacija RSV-om i CRC-om djeluje zaštitno pri izloženosti CHO-K1 stanica *ortho*-supstituiranom kongeneru, dok je pri izloženosti planarnom kongeneru određen sinergistički proapoptotski učinak što je u korelaciji s primijenjenim metodama praćenja vijabilnosti. Oba analoga polifenola poboljšala su vijabilnost kulture i pokazala antiapoptotski učinak pri tretmanu PCB-em 153, za razliku od citotoksičnosti inducirane PCB-em 77, gdje je samo CF pokazao zaštitni učinak. Usporedbom učinaka svih ispitanih spojeva (RSV, CRC, RF, CF) na oksidacijski stres induciran PCB-ima, utvrđeno je da RF ima najizraženije antioksidacijsko djelovanje (u dozama 1 – 20 μM) pri tretmanu stanica PCB-em 77.

Broj stranica: 206
Broj slika: 110
Broj tablica: 6
Broj literaturnih navoda: 245
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: resveratrol, kurkumin, ferocenski analozi polifenola, PCB 77, PCB 153, *in vitro* test sustavi, citotoksičnost, stanična smrt, oksidacijski stres
Datum obrane: 18. veljače 2022.
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. doc. dr. sc. Teuta Murati, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
3. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, Hrvatski veterinarski institut
4. izv. prof. dr. sc. Veronika Kovač, Prehrambeno-biotehnološki fakultet (zamjena)

Rad je pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **PhD thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
UDC: 547.979.4:57.085.2:661.723:676.017.8(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Biotechnology

SELECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH PROTECTIVE EFFECTS ON CYTOTOXICITY INDUCED BY POLYCHLORINATED BIPHENYLS

Marina Miletić, MSc

Thesis performed in Laboratory for Toxicology, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb
Supervisor: PhD Ivana Kmetič, Full Professor

Short abstract: Polychlorinated biphenyls (PCBs) are persistent organic pollutants that show numerous adverse effects on the environment and human health (oxidative stress, inflammatory effects, endocrine modulation, mutagenicity). In this study, the potential protective effects of two selected polyphenols - resveratrol (RSV) and curcumin (CRC), as well as their ferrocene analogues (ferrocene triacyl derivative of resveratrol - RF and ferrocene analogue of curcumin - CF), on cytotoxicity induced by selected PCB congeners - PCB 77 (*"dioxin-like"*, planar tetrachlorobiphenyl) and PCB 153 (*"non-dioxin-like"*, non-planar hexachlorobiphenyl) were studied using an *in vitro* test systems. Previously, doses of polyphenols and their analogues, which have no toxic effects on cells, were determined on Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) and on the hepatocellular carcinoma cell line (Hepa1-6): 2.5 - 20 μM RSV; 1 - 20 μM CRC; 2.5 - 100 μM RF and 1 - 20 μM CF. A statistically significant inhibitory effect on CHO-K1 cell viability was found for both PCB congeners (75 μM), with a more pronounced cytotoxic effect determined for PCB 77. The protective effects of RSV, CRC, RF and CF were most evident in PCB 153-induced cytotoxicity. Using *in vitro* methods, the most pronounced protective effect on PCB 153 induced cytotoxicity was found for RF at all concentrations tested, whereas the beneficial effects of RSV and CRC were found only at the lowest doses tested ($\leq$ 2.5 μM). The protective effect of RSV on PCB 77-induced cytotoxicity was not detected by any of the methods used, but a synergistic antiproliferative effect of RSV and planar PCB congener was determined. Analysis of cell death by flow cytometry showed that preincubation with RSV and CRC had a protective effect on exposure of CHO-K1 cells to *ortho*-substituted congener, whereas exposure to planar congener was found to have a synergistic proapoptotic effect that correlated with the viability monitoring methods used. Both polyphenol analogues improved culture viability and showed an antiapoptotic effect in PCB 153-treated cells, in contrast to PCB 77-induced cytotoxicity where only CF showed a protective effect. Comparing the effects of all tested compounds (RSV, CRC, RF, CF) on PCB-induced oxidative stress, RF was found to have the most pronounced antioxidant effect (doses 1 - 20 μM) in PCB 77-treated cells.

Number of pages: 206
Number of figures: 110
Number of tables: 6
Number of references: 245
Original in: Croatian
Keywords: resveratrol, curcumin, ferrocene analogues of polyphenols, PCB 77, PCB 153, *in vitro* test systems, cytotoxicity, cell death, oxidative stress
Date of the Thesis defense: February 18th, 2022
Reviewers:
1. PhD Teuta Murati, Assistant Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
2. PhD Kristina Radošević, Associate Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
3. PhD Jelka Pleadin, Full Professor, Croatian Veterinary Institute
4. PhD Veronika Kovač, Associate Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology (substitute)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

SAŽETAK

Polikloriranі bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*, PCB) pripadaju skupini perzistentnih organskih zagađivača (engl. *persistent organic pollutants*, POPs), koji zbog velike otpornosti na biološku, kemijsku i fotolitičku razgradnju imaju tendenciju perzistiranja u okolišu. Izrazito su lipofilni što doprinosi njihovoj bioakumulaciji u masnome tkivu i biomagnifikaciji kroz hranidbeni lanac. Brojnim istraživanjima dokazano je da PCB izazivaju kronični oksidacijski stres i upalne reakcije te da iskazuju toksično djelovanje na imunološki, reproduktivni i živčani sustav. Kemijsku strukturu PCB-a čine dva povezana benzenska prstena, a s obzirom na broj (1 – 10) i položaj (*ortho-*, *meta-*, *para-*) atoma klora na bifenilnom prstenu, teoretski je moguća sinteza 209 različitih kongenera. Zbog izuzetne stabilnosti i svojstva biomagnifikacije u okolišu, još uvijek predstavljaju veliku opasnost za okoliš i zdravlje ljudi i životinja. Iako se radi na njihovom uklanjanju, štetni učinci se i dalje uočavaju, a podaci o njihovim toksičnim učincima još su relativno malobrojni.

Polifenolnim spojevima poput resveratrola (RSV) i kurkumina (CRC) pripisuju se brojna blagotvorna svojstva (primarno protuupalna, antioksidacijska, antikancerogena), a za PCB-e su utvrđena štetna djelovanja poput izazivanja oksidacijskog stresa i upalnih reakcija, te štetnog djelovanja na reproduktivni sustav. Stoga su u okviru istraživanja ovog rada ispitani mogući zaštitni učinci dva odabrana polifenolna spoja – RSV i CRC na citotoksičnost induciranu različitim PCB kongenerima – PCB 77 („*dioksinu sličan*“, *non-ortho*-supstituiran, planarni tetraklorobifenil) i PCB 153 („*ne-dioksinu sličan*“, *ortho*-supstituiran, neplanarni heksaklorobifenil). S obzirom da je bioorganometalna kemija rastuće multidisciplinarno znanstveno polje, a da se bioorganometalnim spojevima pripisuju svojstva poboljšane apsorpcije i aktivnosti u odnosu na ishodni polifenolni spoj, dodatno su ispitani i mogući zaštitni učinci ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF) i ferocenskog analoga kurkumina (u kojemu je benzilidenska skupina zamijenjena ferocenom; CF). Kao *in vitro* test sustavi korištene su stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *chinese hamster ovary*, CHO-K1) i kancerozna hepatocelularna stanična linija (engl. *murine hepatoma*, Hepa1-6), a kao *in vitro* metode za određivanje stanične vijabilnosti i proliferacije korištene su četiri validirane metode – *Neutral Red* (*NR*), *Kenacid Blue* (*KB*), *MTT* (*(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid*) i *Trypan Blue* (*TB*).

U prvom dijelu studije provedena su sveobuhvatna *in vitro* ispitivanja učinaka polifenola (RSV i CRC) i njihovih ferocenskih analoga (RF i CF) na staničnu vijabilnost, proliferaciju, razinu intracelularnog ROS-a (antioksidacijsko/prooksidacijsko djelovanje) te na procese staničnog odumiranja. RSV (2,5 – 100 μM) i RF (2,5 – 100 μM) pokazali su različitu biološku aktivnost na vijabilnost CHO-K1 stanica (utvrđeno *NR*, *KB*, *MTT* i *TB* metodama) u vremenskom intervalu inkubacije od 48 sati. RSV je pri dozama > 20 μM djelovao inhibitorno na rast stanica, dok RF pri istim dozama nije ispoljio antiproliferacijski učinak, već je u pojedinim koncentracijama djelovao stimulatorno. CRC (1 – 100 μM) i njegov analog CF (1 – 100 μM) pokazali su o dozi ovisan inhibitoran učinak na staničnu vijabilnost, a izraženiji učinak uočen je za CRC. Iz određenih IC_{50} vrijednosti (doza pri kojoj je postignuta 50%-tna inhibicija staničnog rasta i vijabilnosti) za polifenole i njihove analoge nakon 48 sati inkubacije CHO-K1 stanica, kao najtoksičniji spoj istaknuo se CRC, dok je za RF uočeno da nema citotoksično djelovanje. IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti za RSV i CRC niže su u odnosu na one dobivene za RF i CF što ukazuje na značajno izmjenjenu biološku aktivnost uvođenjem ferocena u strukturu molekule.

Citotoksičnost RSV-a na Hepa1-6 staničnoj liniji izraženija je u odnosu na CHO-K1, dok je CRC u obje stanične linije pokazao podjednak učinak (temeljem IC_{50} vrijednosti nakon 72 sata inkubacije). Ferocenski analozi polifenola ispoljili su znatno niži inhibitorni učinak na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica u odnosu na RSV i CRC, što je u skladu i s istraživanjima provedenima na CHO-K1 staničnoj liniji. RF je u odnosu na CF pokazao manje izražen inhibitorni učinak na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica. Polifenoli i njihovi ferocenski analozi pokazali su antioksidacijski i antiapoptotski učinak na CHO-K1 stanicama, pri čemu su RSV i RF, u odnosu na CRC i CF, bili u tome učinkovitiji.

U drugom dijelu istraživanja određeni su učinci polifenola i ferocenskih analoga polifenola na citotoksično djelovanje PCB kongenera (PCB 77 i PCB 153). Za oba PCB kongenera (75 μM) utvrđen je statistički značajan inhibitorni učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*, a izraženiji citotoksični učinak određen je za „*dioksinu sličan*“ PCB 77. Oba kongenera, i PCB 77 i PCB 153 statistički značajno su uzrokovala povećanje razine ROS-a u stanicama. PCB kongeneri uzrokuju smrt CHO-K1 stanica primarno putem apoptoze, a također je jači učinak uočen za PCB 77.

RSV u koncentraciji 2,5 μM pokazao je blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 153 (utvrđeno metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*), a kod *NR* i *TB* metoda taj učinak je i statistički značajan. Pri višim koncentracijama RSV-a (10 i 20 μM) dolazi do sinergistički inhibitornog učinka na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 153. Pri tretmanu stanica PCB-em 77, RSV nije pokazao zaštitni učinak, štoviše utvrđen je inhibitorni učinak na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 77, a predinkubiranih s RSV-om u dozama > 2,5 μM, u odnosu na stanice kojima RSV nije dodan. Neovisno o PCB kongeneru, CRC (10 i 20 μM) nije pokazao zaštitni učinak na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica. Niže koncentracije CRC-a (1 – 5 μM) pokazale su blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 77 ili PCB-em 153 što je određeno metodama *MTT* i *TB*.

Izražen zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu *ortho*-supstituiranim kongenerom, pokazao je RF u dozama ≥ 35 μM (dokazano svim *in vitro* metodama). Vijabilnost stanica predinkubiranih s najvišom dozom RF-a (100 μM), a potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 bila je približno ista onoj u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s DMSO-om), što RF izdvaja kao potencijalnu bioaktivnu tvar zaštitnog djelovanja pri toksičnom djelovanju perzistentnih organoklornih spojeva. Zaštitni učinak RF-a ipak nije uočen pri tretiranju stanica PCB-em 77. Predinkubacija stanica CF-om (1 – 20 μM) nije utjecala na vijabilnost i proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153, osim statistički značajnog inhibitornog učinka CF-a pri koncentracijama ≥ 5 μM na vijabilnost stanica tretiranih PCB-em 153 uočeno metodom *TB*.

Pozitivni zdravstveni učinci polifenola rezultat su, između ostalog, njihovog protuupalnog i antioksidacijskog djelovanja, stoga su u istraživanju mogućeg zaštitnog djelovanja na ROS induciran PCB-ima korišteni RSV i CRC te njihovi analozi RF i CF. Smanjenje razine ROS-a u CHO-K1 stanicama tretiranim PCB-em 77, a predinkubiranim RSV-om uočeno je pri nižim koncentracijama RSV-a od 1 μM i 2,5 μM. Pri tretmanu stanica PCB-em 153 uočen je statistički značajan antioksidacijski učinak primijenom 20 μM RSV-a. Istraživanjem učinka predinkubacije CHO-K1 stanica s CRC-om na razinu ROS-a nastalih djelovanjem PCB kongenera utvrđeno je smanjenje razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB kongenerima pri dozama CRC-a ≤ 2,5 μM. Međutim, porastom koncentracije CRC-a uočava se prooksidacijski učinak, koji je i statistički značajan pri koncentraciji CRC-a od 5 μM kod tretmana PCB-em 153.

Predinkubacija stanica s RF-om koje su tretirane PCB-em 77 uzrokovala je statistički značajno smanjenje razine ROS-a pri 1 – 20 μM RF-u (u odnosu na stanice tretirane samo

PCB kongenerom). Međutim, RF nije djelovao antioksidacijski prilikom tretmana stanica PCB-em 153, već je pri višim dozama (5 i 20 μM) uočen statistički značajan prooksidacijski učinak. CF (1 – 2,5 μM) uzrokovao je smanjenje razine ROS-a nakon tretmana stanica PCB kongenerima, s tim da je taj pad statistički značajan pri 2,5 μM CF-u nakon tretmana PCB-em 77 i 1 μM CF-u nakon tretmana PCB-em 153. Međutim, prooksidacijski učinak vidljiv je pri višim primijenjenim koncentracijama CF-a (5 i 20 μM), s tim da je taj porast izraženiji nakon tretmana stanica planarnim PCB-em 77.

Analiza stanične smrti metodom protočne citometrije pokazala je da RSV i RF nemaju zaštitni učinak na CHO-K1 stanice tretirane PCB-em 77. Primijećen je sinergistički stimulatorni učinak RSV-a i PCB-a 77 te RF-a i PCB-a 77 na indukciju stanične smrti primarno apoptozom. Prilikom tretmana stanica *ortho*-supstituiranim PCB kongenerom, zaštitni učinak pokazali su i RSV i RF, pri čemu je RF u svim ispitanim koncentracijama (2,5 – 100 μM) poboljšao staničnu vijabilnost te smanjio udio stanica u apoptozi i nekrozi. CRC nije pokazao zaštitni učinak na odumiranje stanica inducirano PCB-em 77. Proapoptotska aktivnost izražena je pri 20 μM CRC-u u stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77. Od svih ispitanih polifenola i njihovih ferocenskih analoga jedino je CF pokazao antiapoptotski učinak na indukciju stanične smrti PCB-em 77. Također, uočen je zaštitni učinak CRC-a i CF-a na toksičnost PCB-a 153, pri čemu se kao učinkovitiji pokazao CF.

Dosadašnje spoznaje vezane uz *in vitro* praćenje mogućih mehanizama zaštite stanica pojedinim biološki aktivnim, antioksidacijskim tvarima su ograničene. Stoga, pozitivni rezultati protektivnog učinka, primarno ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (koji se pokazao učinkovitim pri citotoksičnosti induciranoj neplanarnim PCB kongenerom), dobiveni ovom studijom predstavlju snažan doprinos istraživanjima na ovom području. Na temelju provedenih istraživanja omogućena je selekcija biološki aktivnih tvari (i onih doza) koje mogu ublažiti citotoksične učinke PCB-a te pridonijeti razvoju novih ferocenskih analoga polifenola poboljšane aktivnosti.

KLJUČNE RIJEČI: resveratrol, kurkumin, ferocenski analozi polifenola, PCB 77, PCB 153, *in vitro* test sustavi, citotoksičnost, stanična smrt, oksidacijski stres

SUMMARY

Polychlorinated biphenyls (PCBs) belong to the group of persistent organic pollutants (POPs), that tend to persist in the environment due to their high resistance to biological, chemical and photolytic degradation. They are extremely lipophilic, which contributes to their bioaccumulation in adipose tissue and biomagnification in the food chain. Numerous studies have shown that PCBs cause chronic oxidative stress and inflammatory responses and have toxic effects on the immune, reproductive and nervous systems. The chemical structure of PCBs consists of two benzene rings, and given the number (1 – 10) and position (*ortho-*, *meta-*, *para-*) of chlorine atoms on the biphenyl ring, the synthesis of 209 different congeners is theoretically possible. Due to their exceptional stability and biomagnification properties in the environment, they remain a major threat to the environment and human and animal health. Although efforts have been made to eliminate them, adverse effects are still observed and little data is available on their toxic effects.

Polyphenolic compounds such as resveratrol (RSV) and curcumin (CRC) have been shown to possess a number of beneficial properties (mainly anti-inflammatory, antioxidant, anticancer) whereas for PCBs, numerous adverse effects have been noted (oxidative stress, inflammatory responses, neurotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity, immunotoxicity). Therefore, this study determined the possible protective effects of two selected polyphenolic compounds – RSV and CRC on cytotoxicity induced by different PCB congeners – PCB 77 (*"dioxin-like"*, *non-ortho*-substituted, planar tetrachlorobiphenyl) and PCB 153 *"non-dioxin-like"*, *ortho*-substituted, non-planar hexachlorobiphenyl). Considering that bioorganometallic chemistry is a growing multidisciplinary scientific field and that bioorganometallic compounds are attributed to enhance absorption and activity properties compared to the parent polyphenolic compound, the possible protective effects of the ferrocene triacyl derivative of resveratrol (RF) and the ferrocene analogue of curcumin (CF) were further tested. The Chinese hamster ovary cell line (CHO-K1) and the liver cancer cell line (Hepa1-6) were used as *in vitro* test systems and four validated methods were used as *in vitro* methods to determine the viability and proliferation of the cells – Neutral Red (NR), Kenacid Blue (KB), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and Trypan Blue (TB).

In the first part of the study, comprehensive *in vitro* methods were performed with the aim to determine the effects of polyphenols (RSV and CRC) and their ferrocene analogs (RF and CF) on cell viability, proliferation, intracellular ROS (antioxidant/prooxidant activity) and cell death processes. RSV (2.5 – 100 μM) and RF (2.5 – 100 μM) showed different biological activity on the viability of CHO-K1 cells (determined by NR, KB, MTT and TB methods). RSV had an inhibitory effect on cell growth at doses > 20 μM, while RF showed no antiproliferative effect at the same doses. CRC (1 – 100 μM) and its analog CF (1 – 100 μM) showed a dose-dependent inhibitory effect on cell viability, and a more pronounced effect was observed for CRC. From the determined IC_{50} values (dose at which 50% inhibition of cell growth and viability is achieved) for the polyphenols and their analogs after 48 h incubation of CHO-K1 cells, CRC emerged as the most toxic compound, while no cytotoxic effect was observed for RF. The IC_{20}, IC_{50}, and IC_{80} values for RSV and CRC were lower than those obtained for RF and CF, indicating a marked change in biological activity due to the introduction on ferrocene into the molecular structure.

The cytotoxicity of RSV on Hepa1-6 cell culture was more pronounced compared with CHO-K1, whereas CRC showed the same effetc in both cell lines (based on IC_{50} values after 72 hours of incubation). The ferrocene analogs of polyphenols showed a significantly lower inhibitory effect on the viability and proliferation of Hepa1-6 cells compared to RSV and CRC, which is consistent with the studies performed on the CHO-K1 cell line. RF showed a less pronounced inhibitory effect on Hepa1-6 cell viability and proliferation compared with CF. Polyphenols and their ferrocene analogs showed antioxidant and antiapoptotic effects on CHO-K1 cells, with RSV and RF being more effective than CRC and CF.

In the second part of the study, the effects of polyphenols and ferrocene analogs of polyphenols on the cytotoxic activity of PCB congeners (PCB 77 and PCB 153) were determined. For both PCB congeners (75 μM), a statistically significant inhibitory effect on the viability of CHO-K1 cells was detected by the methods NR, KB, MTT and TB, and more pronounced cytotoxic effect was determined for the *"dioxin-like"* PCB 77. Both PCB 77 and PCB 153 caused statistically significant increase in ROS levels. The PCB congeners cause CHO-K1 cell death primarily by apoptosis, although a stronger effect was also observed for PCB 77.

RSV at a concentration of 2.5 μM showed a slight protective effect on cells treated with PCB 153 (determined by methods NR, KB, MTT, and TB), and for the methods NR and TB this effect was statistically significant. At higher RSV concentrations (10 and 20 μM), a synergistic inhibitory effect on proliferation of cells treated with PCB 153 was observed. After treatment of cells with PCB 77, RSV showed no protective effect. Moreover, an inhibitory effect on cell proliferation was observed after cotreatment with PCB 77 and RSV at doses > 2.5 μM (compared to cells not preincubated with RSV). Regardless of the PCB congener, CRC (10 and 20 μM) showed no protective effect on the viability and proliferation of CHO-K1 cells. Lower concentrations of CRC (1 – 5 μM) showed a slight protective effect on cells treated with PCB 77 or PCB 153, as determined by MTT and TB methods.

A pronounced protective effect on cytotoxicity induced by *ortho*-substituted congener was demonstrated by RF at doses ≥ 35 μM (observed by all *in vitro* methods). The viability of cells pre-incubated with the highest dose of RF (100 μM) and then treated with 75 μM PCB 153 was approximately the same as in the control sample (cells treated with DMSO), pointing out RF as a potential bioactive compound in reducing the toxic effect of persistent organochlorine compounds. However, the benefit of RF was not observed in cells treated with PCB 77. Pre-incubation of cells with CF (1 – 20 μM) did not affect the viability and proliferation of cells treated with PCB 77 or PCB 153, except for a statistically significant inhibitory effect of CF at concentrations ≥ 5 μM on cells treated with PCB 153 observed by the TB method.

The beneficial health effects of polyphenols are due in part to their anti-inflammatory and antioxidant actions. Therefore, RSV and CRC and their ferrocene analogs (RF and CF) were used in the study of possible protective effects on PCB-induced ROS. At lower RSV concentrations (1 μM and 2.5 μM), a reduction in ROS was observed in CHO-K1 cells treated with PCB 77. A statistically significant antioxidant effect using 20 μM RSV was observed when cells were treated with PCB 153. A decrease in ROS levels in CHO-K1 cells preincubated with CRC (≤ 2.5 μM) and treated with PCB was observed compared to cells treated with PCB congeners alone. However, an increase in CRC concentration showed a prooxidant effect regardles PCB used.

Preincubation with RF of cells treated with PCB 77 resulted with a statistically significant decrease in ROS levels at 1 – 20 μM RF (compared with cells treated with the

PCB congener alone). However, when cells were treated with PCB 153, RF had no antioxidant effect, but a statistically significant increase in ROS was observed at higher doses (5 and 20 μM). CF (1 – 2.5 μM) caused a decrease in ROS levels after treatment of cells with PCB congeners, and this decrease was statistically significant at 2.5 μM CF after treatment with PCB 77 and at 1 μM CF after treatment with PCB 153. However, the prooxidant effect was determined at higher applied concentrations of CF (5 and 20 μM), and this increase was more pronounced after treatment of cells with planar PCB (PCB 77).

Analysis of cell death by flow cytometry showed that RSV and RF had no protective effect on CHO-K1 cells treated with PCB 77. A synergistic stimulatory effect of both RSV and PCB 77 and of RF and PCB 77 on the induction of cell death primarily by apoptosis was observed. When cells were treated with *ortho*-substituted PCB congener, both RSV and RF showed a protective effect, with RF improving cell viability and reducing the proportion of cells in apoptosis and necrosis at all concentrations applied (2.5 – 100 μM). CRC showed no protective effect on cell death induced by PCB 77. Proapoptotic activity was remarkable at 20 μM CRC in cells treated with 75 μM PCB 77. Of all the polyphenols and their ferrocene analogs tested, only CF showed an antiapoptotic effect on cell death induced by PCB 77. In addition, a protective effect of CRC and CF on PCB 153 toxicity was observed, with CF being more effective.

Current knowledge on *in vitro* monitoring of possible cell protection mechanisms with certain biologically active antioxidant substances is limited. Therefore, the results of the protective effect, especially of the ferrocene triacyl derivative of resveratrol (shown to be effective in cytotoxicity induced by non-planar PCB congener), obtained in this study represent an important contribution to research in this scientific field. Based on the research conducted, it is possible to select biologically active compounds (and dosages) that can attenuate the cytotoxic effects of PCBs and contribute to the development of new ferrocene analogs of polyphenols with improved activity.

KEY WORDS: resveratrol, curcumin, ferrocene analogues of polyphenols, PCB 77, PCB 153, *in vitro* test systems, cytotoxicity, cell death, oxidative stress

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI 3
2.1.1. Klasifikacija polifenola 3
2.2. BIOORGANOMETALNA KEMIJA 8
2.2.1. Ferocen 9
2.3. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB) 10
2.3.1. Klasifikacija PCB-a 11
2.3.2. Izvori i izloženost PCB-ima 15
2.3.3. Toksikokinetika i toksičnost PCB-a 17
2.4. OKSIDACIJSKI STRES I SLOBODNI RADIKALI 19
2.4.1. Polifenoli i oksidacijski stres 20
2.4.2. PCB i oksidacijski stres 22
2.5. STANIČNA SMRT 23
2.5.1. Apoptoza 24
2.5.2. Nekroza 26
2.5.3. Polifenoli i stanična smrt 27
2.5.4. PCB i stanična smrt 28
2.6. UČINCI POLIFENOLA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA 28
2.7. TESTOVI TOKSIČNOSTI 30
2.7.1. Klasični (*in vivo*) testovi toksičnosti 31
2.7.2. Alternativni (*in vitro*) testovi toksičnosti 31
3. MATERIJALI I METODE 35
3.1. MATERIJALI 35
3.1.1. Biološki materijali 35
3.1.2. Kemikalije 36
3.1.3. Otopine i puferi 36
3.1.4. Oprema i uređaji 41
3.2. METODE RADA 41
3.2.1. Uzgoj i održavanje CHO-K1 i Hepa1-6 staničnih linija 41
3.2.2. Metode za određivanje vijabilnosti i proliferacije stanica 42
3.2.3. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 i Hepa1-6 stanica 44
3.2.4. Određivanje učinka ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 i Hepa1-6 stanica 44

3.2.5. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama 45
3.2.6. Analiza stanične smrti nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom, kurkuminom, ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola ili ferocenskim analogom kurkumina 46
3.2.7. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima kongenerima u CHO-K1 stanicama 47
3.2.8. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih PCB kongenerima 48
3.2.9. Analiza stanične smrti CHO-K1 stanica tretiranih PCB kongenerima uz predinkubaciju s resveratrolom, kurkuminom, ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola ili ferocenskim analogom kurkumina 49
4.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 50
4. REZULTATI 51
4.1. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA 51
4.1.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* 51
4.1.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 52
4.1.3. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT* 53
4.1.4. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* 54
4.1.5. IC vrijednosti za resveratrol na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue* 55
4.1.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* 57
4.1.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 57
4.1.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT* 58
4.1.9. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* 59
4.1.10. IC vrijednosti za kurkumin na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue* 60
4.2. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU Hepa1-6 STANICA 62
4.2.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red* 62

4.2.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 63
4.2.3. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT* 64
4.2.4. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue* 65
4.2.5. IC vrijednosti za resveratrol na Hepa1-6 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue* 66
4.2.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red* 67
4.2.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 68
4.2.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom 69
4.2.9. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue* 70
4.2.10. IC vrijednosti za kurkumin na Hepa1-6 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue* 71
4.3. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA FORMIRANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA 72
4.3.1. Učinak resveratrola na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama 73
4.3.2. Učinak kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama 74
4.4. STANIČNA SMRT NAKON TRETMANA CHO-K1 STANICA RESVERATROLOM ILI KURKUMINOM 74
4.4.1. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom 75
4.4.2. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica kurkuminom 79
4.5. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA 83
4.5.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* 83
4.5.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 84
4.5.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT* 85
4.5.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* 86
4.5.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* 87
4.5.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 88

4.5.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT* 89

4.5.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* 90

4.6. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU Hepa1-6 STANICA 91

4.6.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red* 92

4.6.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 92

4.6.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT* 93

4.6.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue* 94

4.6.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red* 95

4.6.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue* 96

4.6.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT* 97

4.6.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue* 98

4.7. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA FORMIRANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA 99

4.7.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama 100

4.7.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama 100

4.8. STANIČNA SMRT NAKON TRETMANA CHO-K1 STANICA FEROCENSKIM TRIACILNIM DERIVATOM RESVERATROLA ILI FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA 101

4.8.1. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola 102

4.8.2. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim analogom kurkumina 104

4.9. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA 106

4.9.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red* 106

4.9.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue* 107

4.9.3.Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT* 108

4.9.4.Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue* 109

4.9.5. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*..... 110

4.9.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue* 111

4.9.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT* 112

4.9.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue* 114

4.10. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA 115

4.10.1. Učinak resveratrola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima 116

4.10.2. Učinak kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima 117

4.11. STANIČNA SMRT CHO-K1 STANICA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA UZ PREDINKUBACIJU S RESVERATROLOM ILI KURKUMINOM 118

4.11.1. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s resveratrolom..... 119

4.11.2. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s kurkuminom 124

4.12. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA 130

4.12.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*..... 130

4.12.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue* 133

4.12.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*..... 135

4.12.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue* 137

4.12.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red* 139

4.12.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*..... 139

4.12.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*..... 140

4.12.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*..... 141

4.13. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA 142

4.13.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima..... 143

4.13.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima 144

4.14. STANIČNA SMRT CHO-K1 STANICA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA UZ PREDINKUBACIJU S FEROCENSKIM TRIACILNIM DERIVATOM RESVERATROLA ILI FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA..... 146

4.14.1. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola 146

4.14.2. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s ferocenskim analogom kurkumina..... 152

5. RASPRAVA 158

6. ZAKLJUČCI 179

7. LITERATURA 182

POPIS KRATICA

7-AAD	7-aminoaktinomicin D
ACD	slučajna stanična smrt (engl. *accidental cell death*)
AhR	aril ugljikovodični receptor (engl. *aryl hydrocarbon receptor*)
ATSDR	Agencija za toksične tvari i registar bolesti (engl. *The Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)
CAR	konstitutivni androstan receptor (engl. *constitutive androstane receptor*)
CAT	katalaza (engl. *catalase*)
CF	ferocenski analog kurkumina
CHO-K1	stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*)
DCF	2', 7' – diklorofluorescin
DCFH-DA	2', 7' – diklorodihidrofluorescein diacetat
DMSO	dimetilsulfoksid
EGCG	epigalokatehin-3-galat
ER	receptor estrogena (engl. *estrogen receptor*)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)
GPx	glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)
GR	glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase*)
GSH	glutation (engl. *glutathione*)
GST	glutation S-trasferaza (engl. *glutathione S-trasferase*)
Hepa1-6	kancerozna hepatocelularna stanična linija (engl. *murine hepatoma*)
HO-1	hemoksigenaza-1 (engl. *hemeoxygenase-1*)
Hsp90	protein toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein 90*)
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)
KB	*Kenacid Blue*
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
NCCD	Odbor za nomenklaturu stanične smrti (engl. *The Nomenclature Committee on Cell Death*)
NF-κB	nuklearni faktor κB (engl. *nuclear faktor κB*)
NR	*Neutral Red*
Nrf2	nuklearni faktor eritroid 2 povezan s faktorom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*)

pAkt	fosforilirana protein kinaza B (engl. *phosphorylated protein kinase B*)
PCB	poliklorirani bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*)
POPs	perzistentni organski zagađivači (engl. *persistent organic pollutants*)
PS	fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*)
PXR	pregnan-X receptor (engl. *pregnane-X receptor*)
RCD	regulirana stanična smrt (engl. *regulated cell death*)
RF	ferocenski triacilni derivat resveratrola
RNS	reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
RyR	receptor rijanodina (engl. *ryanodine receptor*)
SOD	superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)
TB	*Trypan Blue*
TBHP	*tert*-butil hidroperoksid
TEF	faktor ekvivalentne toksičnosti (engl. *toxicity equivalent factors*)
TEQ	ekvivalent toksičnosti (engl. *toxic equivalents*)

1. UVOD

Biološka aktivnost je specifična sposobnost određenog molekularnog entiteta da postigne definirani biološki učinak (Jackson i sur., 2007). Od početka 19. stoljeća veliki broj biološki aktivnih sekundarnih metabolita biljnog podrijetla ima komercijalnu primjenu kao lijekovi, arome ili kao druge vrste posebnih kemikalija. Prirodni proizvodi dobiveni kao biljni izolati mogu se koristiti izravno ili mogu poslužiti kao početni materijal za sintezu novih aktivnih tvari. Uz to, prirodni proizvodi su prikladni kao ishodni spojevi za naknadno oblikovanje strukturno srodnih molekula koje su aktivnije ili manje toksične (Kinghorn, 1987). Važne biološki aktivne tvari koje imaju zdravstvene učinke uključuju fitosterole, tokoferole, karotenoide, koenzim Q10, kurkumin, ekstrakte češnjaka, resveratrol (Sharif i sur., 2018; Žlabur i sur., 2018).

Ekosustav je kontinuirano kontaminiran različitim zagađivačima od kojih su brojni otporni na kemijske, biološke i fotolitičke reakcije razgradnje. Zagađivači koji već dugo postoje u našem okolišu nazivaju se perzistentnim organskim zagađivačima (engl. *persistent organic pollutants,* POPs), a čine ih pesticidi, industrijske kemikalije te nusproizvodi industrijskih procesa (Alharbi i sur., 2018). POPs spojevi bioakumuliraju se u ljudskom i životinjskom tkivu i biomagnificiraju u hranidbenom lancu te imaju potencijalno značajne štetne učinke na ljudsko zdravlje i okoliš. Izloženost POPs spojevima može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme, uključujući određene karcinome, urođene mane, nefunkcionalni imunološki i reproduktivni sustav, veću osjetljivost na bolesti, pa čak i smanjenu inteligenciju. Zbog postojanosti u okolišu, bioakumulacije, biomagnifikacije te učincima opasnima za biotu, najveća pažnja pridaje se organoklornim POPs spojevima poput polikloriranih dibenzo-*p*-dioksina (engl. *polychlorinated dibenzo-p-dioxins*, PCDD), polikloriranih dibenzofurana (engl. *polychlorinated dibenzofurans*, PCDF) i polikloriranih bifenila (engl. *polychlorinated biphenyls,* PCB) (Zacharia, 2019). Poliklorirani bifenili (PCB) su skupina aromatskih kemijskih spojeva u kojima su neki ili svi atomi vodika vezani na bifenilni prsten supstituirani atomima klora (WHO/IARC, 2015). Njihova upotreba ograničena je 1970-ih, a svjetska zabrana je na snazi tek od 2001. godine (Stockholmska konvencija) (Totland i sur., 2016). Ovisno o broju (1 – 10) i položaju *(ortho-, meta-, para-*) atoma klora na molekuli bifenila, postoji 209 različitih PCB kongenera (Vergani i sur., 2017), a broj i položaj atoma klora na bifenilnim prstenima utječu na svojstva pojedinog kongenera (Tan i sur., 2004). Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer,* IARC) 2013. godine kategorizirala je PCB-e kao kancerogene skupine I na temelju dokaza o kancerogenosti za ljude i pokusne životinje (Pathiraja, 2018). Prema ATSDR-u (engl. *The Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) konstantno su

prisutni na popisu 10 najtoksičnijih zagađivača, a s obzirom na ekološke učinke i prema Stockholmskoj konvenciji, PCB moraju biti uklonjeni iz okoliša do 2025. godine (Sharma i sur., 2018). Unatoč usvajanju restriktivnih pravila, do danas se još uvijek otkrivaju određene koncentracije PCB-a u zraku, morskoj vodi i sedimentima plovnih puteva, iako su koncentracije u odnosu na one iz kasnih 70-ih pale na četvrtinu ili manje (Abella i sur., 2016). Budući da se PCB mogu bioakumulirati i biomagnificirati kroz hranidbeni lanac, opća populacija izložena je prvenstveno putem kontaminirane hrane (masna riba, meso i mliječni proizvodi) (Meeker i Hauser, 2010).

Bioorganometalna kemija je rastuće multidisciplinarno polje koje obuhvaća sintezu i proučavanje organometalnih kompleksa od biološke važnosti (Heilmann i sur., 2008), a u posljednjih dvadeset godina uloga ferocena privlači veliku pozornost. Modificiranjem prirodnih proizvoda i lijekova uvođenjem ferocena u njihovu strukturu uočeni su značajni učinci na biološku aktivnost takvih molekula (Tiwari i sur., 2011). Lipofilna svojstva ferocena omogućuju učinkovito prodiranje kroz stanične membrane, što ga čini vrlo atraktivnim za biološku primjenu (Navarro i sur., 2012) te se ferocenski spojevi intenzivno istražuju u antikancerogenim i antimikrobnim studijama (Čakić Semenčić i Barišić, 2017).

Ispitivanje toksičnosti provodi se kako bi se okarakterizirali potencijalno štetni učinci kemikalija na zdravlje ljudi, zdravlje životinja ili na okoliš te s ciljem osiguravanja najsigurnije moguće upotrebe kemikalija i proizvoda koji sadrže kemikalije (Worth, 2019). Tehnologija stanične i tkivne kulture zauzima središnje mjesto u modernim biomedicinskim istraživanjima, a stanice u kulturi su koristan modelni sustav za proučavanje normalnih fizioloških i biokemijskih procesa u stanicama te se mogu koristiti i u dijagnostičke svrhe. Glavna prednost korištenja sustava stanične kulture je konzistentnost i reproducibilnost (Verhoeckx i sur., 2015), a upotreba kultura stanica kao testnog modela sastavni je dio znanstvenog istraživanja (ATCC, 2020a).

U okviru istraživanja ovog doktorskog rada, primjenom *in vitro* modela – stanične linije ovarija kineskoga hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary,* CHO-K1) i kancerozne hepatocelularne stanične linije (engl. *murine hepatoma,* Hepa1-6), ispitat će se biološka aktivnost polifenola resveratrola (RSV) i kurkumina (CRC) te njihovih ferocenskih analoga (ferocenski triacilni derivat resveratrola – RF, ferocenski analog kurkumina – CF). Cilj rada je i odrediti moguće zaštitne učinke navedenih spojeva na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima – PCB 77 (planarni, „*dioksinu sličan*“) te PCB 153 (neplanarni „*ne-dioksinu sličan*“) te izdvojiti one spojeve (i odrediti one doze) koji su se pri tome pokazali najučinkovitiji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI

Biološki aktivne tvari dogovorom se definiraju kao *„esencijalni i neesencijalni spojevi koji se pojavljuju u prirodi, dio su hranidbenog lanca i mogu imati utjecaja na ljudsko zdravlje“*. Takvi se kemijski spojevi u literaturi klasificiraju kao fitokemikalije, koje se često svrstavaju u nekoliko skupina: polifenolni spojevi, karotenoidi, glukozinolati, dijetalna vlakna, alkaloidi (Žlabur i sur., 2018).

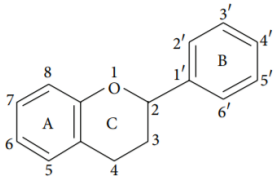
Posljednjih desetljeća, zbog otkrića antioksidacijskih učinaka te uloge u prevenciji kroničnih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma ili dijabetesa tipa 2, zanimanje za polifenolne spojeve znatno je poraslo (Neveu i sur., 2010). Polifenoli čine jednu od najopsežnijih i sveprisutnih skupina sekundarnih metabolita u biljnom carstvu. Predstavljaju izrazito diferenciranu skupinu, ne samo s obzirom na kemijsku strukturu, već i s obzirom na njihovu biološku aktivnost. Pojavljuju se konjugirani sa šećerima, karboksilnim i organskim kiselinama, aminima, lipidima i drugim fenolima (Figueira i sur., 2017). Uglavnom nastaju prirodno kao proizvodi biljnog sekundarnog metabolizma koji potječu iz puta šikimata/fenilpropanoida ili puta poliketida, ali također se mogu kemijski sintetizirati ili polusintetizirati (Hanhineva, 2010; Souto i sur., 2019). Strukturna raznolikost proteže se od jednostavnih monofenolnih spojeva (npr. *p*-hidroksicinaminske kiseline) do velikih polimernih makromolekula poput proantocijanidina i elagitanina (Hanhineva, 2010).

In vitro i *in vivo* studije pokazuju da polifenoli zahvaljujući raznolikoj bioaktivnosti posjeduju antiinflamatorno, antioksidacijsko, antikancerogeno i neuroprotektivno djelovanje (Hanhineva, 2010; Xiao i Högger, 2015). Međutim, iako se polifenoli i druge fitokemikalije od davnina koriste u tretmanu mnogih bolesti, njihov način djelovanja još uvijek nije potpuno jasan. U početku su ih povezivali s uklanjanjem slobodnih radikala i antioksidacijskim djelovanjem, no trenutna istraživanja ukazuju na to da polifenoli pokreću složenije zaštitne mehanizme na staničnoj i molekularnoj razini, što može biti najvažnije za sprječavanje kancerogeneze izazvane toksikantima iz okoliša (Lagoa i sur., 2020).

2.1.1. Klasifikacija polifenola

Polifenoli su strukturno okarakterizirani prisutnošću jedne ili više fenolnih jedinica, tj. aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih (-OH) skupina, koje se mogu povezati s različitim organskim kiselinama i/ili ugljikohidratima te im struktura može varirati od jednostavne molekule do složenog polimera (Durazzo i sur., 2019; Souto i sur., 2019). Opće prihvaćena klasifikacija podrazumijeva podjelu polifenola u dvije glavne skupine – flavonoide

i neflavonoide, a u obzir se uzima broj fenolnih prstena u strukturi, strukturni elementi koji se vežu na te prstene te vrsta supstituenata koji su vezani na prstene (Souto i sur., 2019). Okosnicu strukture flavonoida čine dva benzenska prstena (A i B) povezana s tri atoma ugljika, koji se spajaju u heterociklički prsten s kisikom (C) (Slika 1). Kao rezultat hidroksilacije i razlika u prstenu C, flavonoidi se mogu dalje razdijeliti u posebne podskupine (flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, antocijanidi, flavanoni i izoflavoni) (Souto i sur., 2019).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida (Souto i sur., 2019)

Neflavonoidi imaju nešto varijabilniju strukturu te uključuju C6-C1 i C6-C3 fenolne kiseline koje su razvrstane u dvije glavne skupine – benzojeve i cimetne kiseline te C6-C2-C6 stilbene (Piccolella i Pacifico, 2015).

2.1.1.1. Stilbeni

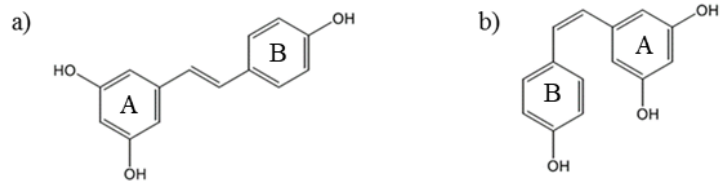
Stilbene strukturno karakterizira prisustvo 1,2-difeniletilenske jezgre sa supstituiranim hidroksilima na aromatskim prstenima, a postoje u obliku monomera ili oligomera (Vasantha Rupasinghe i sur., 2014). Također, postoje dva izomerna oblika 1,2-difeniletilena: (E)-stilben (*trans*-stilben), koji nije sterički ometan i (Z)-stilben (*cis*-stilben), koji je sterički ometan i zbog toga je manje stabilan (Slika 2) (Likhtenshtein, 2012; Zeka i sur., 2018).



Slika 2. Kemijska struktura stilbena (1) *trans*-stilben, (2) *cis*-stilben (Likhtenshtein, 2012)

Najviše proučavani stilben je resveratrol (Vasantha Rupasinghe i sur., 2014), a prvi ga je izolirao Michio Takaoka 1939. godine iz korijena biljke *Veratrum grandiflorum* (Gerszon i sur., 2014). Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben; $C_{14}H_{12}O_3$) je prirodni polifenolni fitoaleksin, koji nastaje biosintezom u biljkama djelovanjem enzima stilben sintaze kao odgovor na stres iz okoliša (klimatske promjene te izloženost ozonu, sunčevoj svjetlosti i teškim metalima), ali i kao odgovor na infekcije uzrokovane patogenim mikroorganizmima (Athar i sur., 2009; Luca i sur., 2019). Molekulu resveratrola čine dva aromatska prstena povezana etilenskim mostom. Prsten A ima dvije -OH skupine na položajima C3 i C5, a prsten B ima jednu -OH skupinu na

C4'. Zbog dvostruke C-C veze (etilenska jedinica u strukturi), resveratrol se pojavljuje u dva stereoizomera – *trans* i *cis* (Slika 3), koji se u odgovarajućim uvjetima mogu transformirati jedan u drugi (Tian i Liu, 2019; Ahmadi i Ebrahimzadeh, 2020). *Trans*-resveratrol je stabilan na sobnoj i tjelesnoj temperaturi u kiselim uvjetima, a kada pH postane alkalan, resveratrol se brzo razgrađuje. Izloženost toplini i ultraljubičastom zračenju može uzrokovati izomerizaciju *trans*-resveratrola u *cis*-resveratrol (Athar i sur., 2009; Tian i Liu, 2019).



Slika 3. Konfiguracije molekule resveratrola (a) *trans,* (b) *cis* (Tian i Liu, 2019)

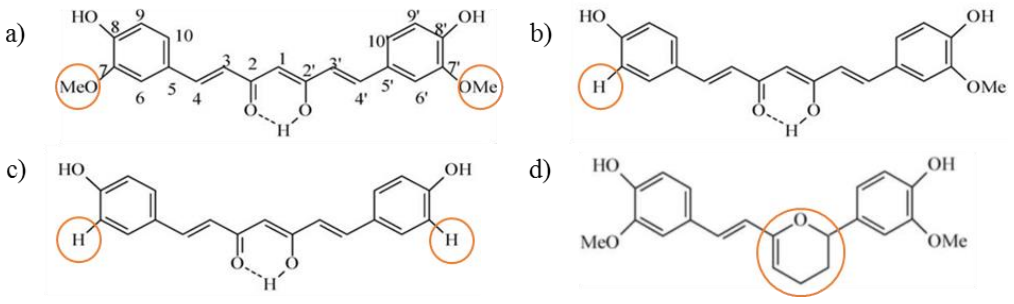
Iako su crno grožđe i crno vino glavni prehrambeni izvori, resveratrol je izoliran iz više od 70 biljnih vrsta (npr. bobičasto voće, kikiriki, šljive, mahunarke). Također, prisutan je i u namirnicama poput *Itadori* čaja i soje, ali i različitom cvijeću i drveću (npr. stablo orhideje, čemerika, eukaliptus i smreka) (Ahmadi i Ebrahimzadeh, 2020). Zbog svojih bioloških i farmakoloških aktivnosti resveratrol od svojeg otkrića izaziva zanimanje znanstvene zajednice. Ima snažna antioksidacijska, antikancerogena, protuupalna, kardioprotektivna i neuroprotektivna svojstva (Luca i sur., 2019), a zbog utjecaja na rast stanica, apoptozu, angiogenezu i metastazu kancerogenih stanica, potencijalna upotreba pronašla se u kemoprevenciji i kemoterapiji različitih karcinoma (npr. dojke, debelog crijeva, pluća, jajnika, gušterače, prostate) (Ahmadi i Ebrahimzadeh, 2020). Mnoštvo bioloških učinaka resveratrola uglavnom je uzrokovano obiljem i raznolikošću molekulskih ciljeva ovog spoja (npr. ciklooksigenaze/lipooksigenaze, kinaze, sirtuin, faktori transkripcije, citokini, DNA polimeraza i dr.). Pretpostavlja se da resveratrol ima složeno fiziološko djelovanje zbog svoje sposobnosti moduliranja različitih biokemijskih puteva u mikromolarnom rasponu doza (Luca i sur., 2019). Sve više istraživanja pokazuje snažno citoprotektivno djelovanje resveratrola. Tako je inkubacija uzgojenih neurona hipokampusa s resveratrolom zaštitila od neurotoksičnosti inducirane dušikovim monoksidom. Tretman stanica hipokampusa štakora resveratrolom (15 – 40 μM) doveo je do aktivacije protein kinaze C, čime je umanjena toksičnost inducirana β-amiloidima (Bisht i sur., 2010). Prema istraživanjima, inkubacija stanica glatkih mišića aorte štakora (engl. *aortic smooth muscle cells*, ASMC) s 25, 50 i 100 μM resveratrola tijekom 24, 48 i 72 sata značajno je povećala stanične antioksidanse i enzime faze II (npr. superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation (GSH), glutation reduktaza (GR), glutation

peroksidaza (GPx), glutation S-trasferaza (GST)) u ovisnosti o koncentraciji i/ili vremenu (Bisht i sur., 2010). Istraživanja Chen i sur. (2009) ukazuju na to da tretman resveratrolom embrionalnih kardiomiocita štakora izloženih ishemiji sprječava apoptozu. Izlaganje kardiomiocita resveratrolu (20 μM) u ishemijskim uvjetima, povisilo je ekspresiju sirtuina 1, koji je odgovoran za staničnu obranu i preživljavanje kao odgovor na oksidacijski stres, ali je smanjilo ekspresiju transkripcijskih faktora FOXO1 (engl. *forkhead box protein O1*), koji posreduju u transkripciji gena prilikom oksidacijskog stresa, popravljanju DNA, zaustavljanju staničnog ciklusa i apoptozi (Chen i sur., 2009).

Nakon oralnoga unosa, apsorpcija resveratrola u ljudi je oko 75%. Pretpostavka je da se uglavnom odvija transepitelijalnom difuzijom, ali metabolizam u crijevima i jetri dovodi do oralne bioraspoloživosti manje od 1% (Francioso i sur., 2014). Kako bi se poboljšala bioraspoloživost, moguća je sinteza strukturnih analoga resveratrola s poboljšanim učincima. Takvi analozi mogu biti korisni u prevenciji i liječenju različitih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, karcinom, pretilost i neurodegenerativne bolesti (Kuršvietienė i sur., 2016). Brojni analozi resveratrola razlikuju se od izvorne molekule u pogledu broja, položaja ili identiteta funkcionalnih skupina. Unapređenje biološke aktivnosti resveratrola postiže se modifikacijom broja i položaja aromatskih skupina, umetanjem dugih alkilnih ili funkcionaliziranih lanaca kao i adicijom acilnih lanaca na hidroksilne skupine. Provedene su opsežne studije u kojima se pokazalo kako sintetizirani analozi pokazuju bolju biološku aktivnost od resveratrola (Tian i Liu, 2019).

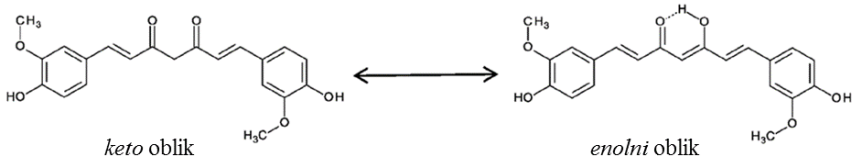
2.1.1.2. Kurkuminoidi

Kurkuminoidi (Slika 4) su polifenolni spojevi diarilheptanoidi (C6-C7-C6), koji se sintetiziraju u biljkama djelovanjem poliketidnih sintaza tipa III. Biosinteza se temelji na kondenzaciji fenilpropanoida i malonil-koenzima A (Rodrigues i sur., 2015). Izolirani su iz biljke *Curcuma longa* i daju joj karakterističnu žutu pigmentaciju (Jayaprakasha i sur., 2005).



Slika 4. Strukture kurkuminoida: a) kurkumin, b) demetoksikurkumin, c) bisdemetoksikurkumin, d) ciklokurkumin (Jayaprakasha i sur., 2005)

Među kurkuminoidima, kurkumin se smatra najznačajnijim u doprinosu različitim farmakološkim aktivnostima biljke *C. longa* (Ngo i sur., 2019). Kurkumin (diferuilolmetan, [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion], $C_{21}H_{20}O_6$), hidrofobni je polifenol karakteristične žute boje. U kemijskom smislu to je bis-α, β-nezasićeni β-diketon, linearni diarilheptanoid, gdje su dva *oksi*-supstituirana arilna prstena povezana preko lanca od sedam ugljikovih atoma. Arilni prsteni mogu se supstituirati različitim brojem -OH ili metoksi (-OCH_3) 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, a u fiziološkim uvjetima može postojati u keto i u enolnom obliku, koji koegzistiraju u ravnoteži (keto-enolni tautomerizam) (Slika 5) (Jankun i sur., 2016).



Slika 5. Keto-enolni tautomerizam kurkumina (Jankun i sur., 2016)

Ravnoteža keto i enolnog oblika ovisi o polarnosti i pH vrijednosti otapala. Enolni oblik dominira u alkalnom pH, vodenim otopinama i organskim polarnim otapalima, dok keto oblik dominira u kiselim ili neutralnim otapalima i prevladava u krutoj fazi i nepolarnim otapalima. Metabolizam keto oblika usmjeren je na redukciju i konjugaciju, koja je posredovana -OH skupinama (Luca i sur., 2019).

Pretpostavka je da se snažna antineoplastična svojstva kurkumina protiv širokog spektra karcinoma (kolorektalni, gušterače, dojke, prostate, pluća) ostvaruju proapoptotskim, antiproliferativnim, antioksidacijskim i protuupalnim mehanizmima (Devassy i sur., 2015; Luca i sur., 2019). Također, kurkumin i njegovi analozi smanjuju citotoksičnost izazvanu raznim vrstama toksina. Prema istraživanju Sood i sur. (2001), nakon što su humane stanice proksimalnih tubula (engl. *human proximal tubule cells*, HK-2) tretirane kurkuminom došlo je do smanjenja štetnih učinaka šiga toksina (Stx 1 ili 2), povećala se vijabilnost stanica, smanjila populacija nekrotičnih stanica i fragmentacija DNA (Sood i sur., 2001). Scapagnini i sur. (2006) su svojim istraživanjima utvrdili da je kurkumin (5 – 25 μM) značajno povećao ekspresiju hemoksigenaze-1 (engl. *hemeoxygenase-1*, HO-1) u astrocitima i neuronima štakora aktivacijom Nrf2 transkripcijskog faktora (engl. *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*) štiteći tako stanice od oksidacijskog stresa (Scapagnini i sur., 2006).

Međutim, studije apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja kurkumina sugeriraju da kurkumin prolazi kroz brzi metabolizam, što se navodi kao osnovni uzrok niske bioraspoloživosti u sistemskoj cirkulaciji (Basnet i Skalko-Basnet, 2011). Zbog nedovoljne apsorpcije u tijelu, velike brzine metabolizma i brze eliminacije iz tijela, bioraspoloživost kurkumina je ograničena što značajno ograničava njegove terapeutske učinke (Kocaadam i Şanlier, 2015). Oralno primijenjeni kurkumin ograničeno se apsorbira u tankom crijevu, nakon čega slijedi metabolizam u crijevima i jetri, te brzo izlučivanje fecesom i urinom. Nakon *per os* primijene kurkumina u laboratorijskih štakora, utvrđena je oralna bioraspoloživost polifenola niža od 1% (Luca i sur., 2019).

Recentne znanstvene studije usmjerene su prema poboljšanju bioraspoloživosti kurkumina i drugih kurkuminoida (Rodrigues i sur., 2015). Za poboljšanje farmakokinetičkog profila i bioraspoloživosti kurkumina neki autori navode četiri strategije koje bi se mogle koristiti: (1) liposomi, micele i fosfolipidni kompleksi; (2) glukuronidacija/ometanje metabolizma istodobnom primjenom kurkumina s pomoćnim sredstvima poput piperina; (3) nanočestice i (4) emulgirajuća ili disperzijska sredstva (Mirzaei i sur., 2016). Istraživanja su usmjerena i na keliranje metala na kurkumin kako bi se povećala citotoksičnost matične molekule (Arezeki i sur., 2011). Kurkumin tvori snažne komplekse s većinom poznatih metalnih iona te je α, β-nezasićeni β-diketonski dio kurkumina izvrsno kelirajuće sredstvo (Priyadarsini, 2014). Istraživanja s ferocenil kurkuminoidima, sintetiziranih kovalentnim sidrenjem tri različita ferocenil liganda u organske kurkuminoide supstituiranih -OCH_3 i -OH skupinama na aromatskim prstenima pokazala su da je prisutnost ferocenilne jedinice poboljšala biološku aktivnost većine novih ferocenilnih kurkuminoida (Arezeki i sur., 2011).

2.2. BIOORGANOMETALNA KEMIJA

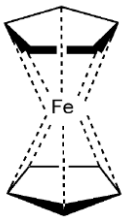
Bioorganometalna kemija je rastuće multidisciplinarno polje koje obuhvaća sintezu i proučavanje organometalnih kompleksa biološke važnosti, a jedna od najperspektivnijih primjena bioorganometalne kemije je u području razvoja lijekova (Heilmann i sur., 2008).

Pojam „*bioorganometalna kemija*“ prvi je puta primijenjen 1985. godine za sintezu i proučavanje organometalnih vrsta od biološkog i medicinskog značaja. Istraživanjima se došlo do brojnih novih rezultata koji su zahtijevali objedinjujući pojam za identificiranje ove vrste istraživanja kao cjeline. Pojam je zapravo obuhvaćao komplekse formirane pomoću klasičnih organometalnih liganada (npr. CO, alkila, π-vezanih vrsta) ili biomolekula (steroidi, aminokiseline, šećeri, peptidi, DNA, vitamini, enzimi, antitijela) vezanih izravnim vezama

metal-ugljik, a svima je zajednička bitna ulogu koju imaju u raznim biološkim procesima (Jaouen i sur., 2006).

2.2.1. Ferocen

Od 1951. godine kada su Kealy, Pauson i Miller otkrili ferocen, te 1952. kada je strukturno okarakteriziran, razvijaju se nova područja kemije te je omogućeno bolje razumijevanje strukture, vezivanja i reaktivnosti (Heinze i Lang, 2013). Ferocen (Fc; $Fe(\eta^5\text{-}C_5H_5)_2$) je organometalni spoj kod kojeg je željezo smješteno između dva ciklopentadienilna prstena, a pripada skupini metalocena (Slika 6) (Bhatt, 2016). Izuzetna stabilnost ferocena pripisuje se ciklopentadienilnoj skupini koja stjecanjem negativnog naboja postaje „aromatska“ (Kealy i Pauson, 1951), a jednaka nezasićenost svakog atoma ugljika ciklopentadienilnog aniona sugerira da dvije takve jedinice mogu simetrično formirati kovalentne veze sa Fe^{2+} (Wilkinson i sur., 1952).

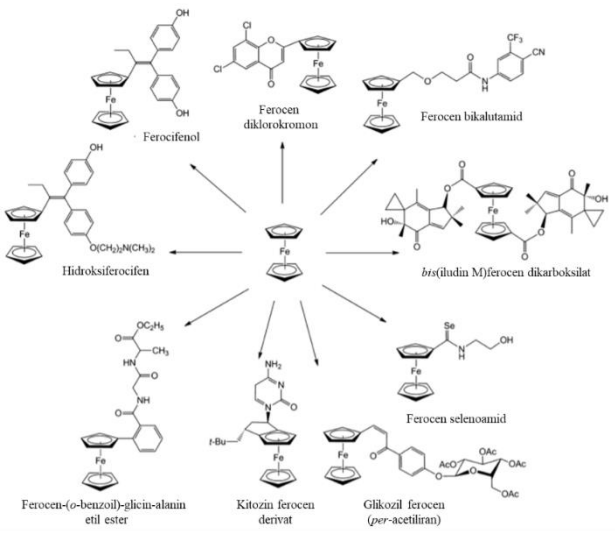


Slika 6. Prijedlog strukture ferocena Woodwarda i Wilkinsona (Werner, 2012)

Supstitucija benzena ferocenskom jezgrom u bioaktivnom spoju dovodi do značajnih promjena u molekularnim svojstvima poput topljivosti, hidrofobnosti i lipofilnosti (Larik i sur., 2016). Zbog svojih izuzetnih karakteristika (stabilnost u biološkom mediju, redoks aktivnost, lako prodiranje kroz staničnu membranu (zbog lipofilnosti), niska toksičnost, sklonost kemijskim modifikacijama), feroceni su privukli mnogo pažnje na području bioorganometalne kemije (Čakić Semenčić i Barišić, 2017). Integracija ferocenskih dijelova u aktivne spojeve i lijekove rezultira poboljšanjem biološke aktivnosti spojeva (Larik i sur., 2016). Redoks aktivnost ferocenilne skupine može dodati vrijedne sinergističke učinke na citotoksičnost (Astruc, 2007), a povezivanjem reaktivnog metalnog dijela s organskom molekulom komplementarne funkcije u biomolekularni spoj, može dovesti do poboljšanja antikancerogenih svojstava (Hartinger i sur., 2012).

Sintetski derivati ferocena (Slika 7) se mogu podijeliti na nekonjugirane i konjugirane. Kod nekonjugiranih derivata ferocenila, ugljikov lanac ili jednostavna skupina pričvršćena je na jedan ili dva ciklopentadienilna prstena u ferocenu. S druge strane, kod sinteze konjugiranih derivata uvodi se druga funkcionalna skupina koja tvori konjugirani sustav s

ciklopentadienilnim prstenom u ferocenu. Budući da je ferocen inertan prema oksidaciji u atmosferi, zaključeno je da sintetski derivati ferocena mogu biti nova vrsta antioksidanasa, u kojima ostale organske skupine mogu poboljšati bioraspoloživost ferocena ili veliki konjugirani sustavi formirani između ferocenila i drugih organskih skupina mogu imati povećanu antioksidacijsku učinkovitost (Liu, 2011). Modificiranjem prirodnih proizvoda i lijekova uvođenjem ferocena u njihovu strukturu, uočeni su značajni učinci na biološku aktivnost takvih molekula. U skupini ferocenilnih spojeva, čija se struktura temelji na kosturu molekule resveratrola antikancerogena aktivnost (u nanomolarnim dozama) pripisuje se redoks djelovanju ferocena (Tiwari i sur., 2011). U seriji ferocenskih kurkuminoida, nekoliko spojeva pokazalo je bolji antitumorski učinak od ishodnih kurkuminoida, s nižim vrijednostima $IC_{50/48h}$ i/ili većom selektivnošću prema mišjim B16 stanicama melanoma (u usporedbi s citotoksičnošću prema zdravim NIH 3T3 stanicama) (Braga i Silva, 2013).



Slika 7. Primjeri struktura ferocenskih analoga (prema Braga i Silva, 2013)

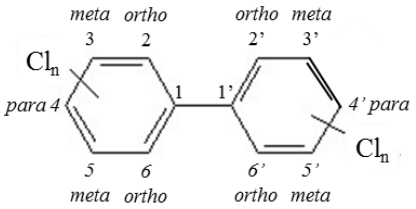
2.3. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)

Poliklorirani bifenili pripadaju skupini perzistentnih organskih zagađivača (POPs), koji zbog velike otpornosti na biološku, kemijsku i fotolitičku razgradnju imaju tendenciju perzistiranja u okolišu (Mostafalou, 2015; Chi i sur., 2018). Skupina su aromatskih kemijskih spojeva u kojima su neki ili svi atomi vodika vezani na bifenilni prsten supstituirani atomima klora (WHO/IARC, 2015). Zbog visoke toplinske vodljivosti i kemijske inertnosti izvorno su korišteni kao dielektrične tekućine i tekućine za prijenos topline, rashladna sredstva, maziva, usporivači gorenja (retardanti) i plastifikatori (Perkins i sur., 2016). ATSDR ih je rangirao kao petu najopasniju tvar 2011. i 2013. godine (Tilley i Fry, 2015). Prema IARC-u su do 2013. godine bili klasificirani kao „*vjerojatno kancerogeni za ljude*“ (grupa 2A), a od 2013. godine klasifikacija je promijenjena u „*kancerogeni za ljude*“ (grupa 1) (WHO/IARC, 2015). Mjesto i

broj supstituiranih atoma klora i prostorna struktura molekule određuju ne samo fizikalna i kemijska svojstva PCB-a, već i njihovu raspodjelu i brzinu razgradnje u okolišu, te njihovu biotransformaciju i toksičnost (Żwierełło i sur., 2020).

2.3.1. Klasifikacija PCB-a

Obzirom na broj (1 – 10) i položaj (*ortho-, meta-, para-*) atoma klora na bifenilnom prstenu, polikloririrane bifenile čini 209 različitih kongenera (Yilmaz i sur., 2006). Kemijska formula je $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, gdje *n* označava broj atoma klora vezanih na bifenilnom prstenu (Herceg Romanić, 2002), a položaji ugljika na prstenima su označeni brojevima od 1 (1') do 6 (6') (*ortho* – 2, 2', 6, 6', *meta* – 3, 3', 5, 5', *para* – 4, 4') (Slika 8) (WHO, 2000; WHO/IARC, 2015).

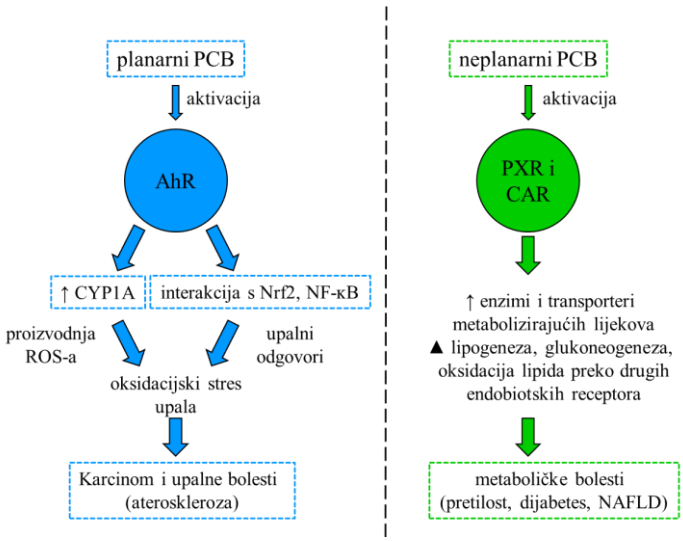


Slika 8. Osnovna kemijska struktura polikloriranih bifenila (prema Horwat i sur., 2015)

PCB se klasificiraju prema stereokemijskim razlikama temeljenim na vezanju atoma klora na molekulu bifenila. Budući da je atom klora veći od atoma vodika, stvara više steričkih smetnji, što utječe na planarnost molekule (WHO/IARC, 2015; Perkins i sur., 2016). *Non-ortho-* ili *mono-ortho-* supstituirani PCB poprimaju planarnu konfiguraciju te se nazivaju planarni ili koplanarni kongeneri. Kod ostalih kongenera se zbog zamjene atoma vodika većim atomima klora u *ortho-* položajima, aromatski prsteni rotiraju te se gubi planarna konfiguracija pa se nazivaju neplanarnim ili nekoplanarnim kongenerima (WHO/IARC, 2015; Perkins i sur., 2016). Planarnim PCB-ima nedostaje supstitucija klorom u *ortho-* položaju i nazivaju se „*dioksinima sličnim*" zbog djelovanja na aril ugljikovodični receptor (engl. *aryl hydrocarbon receptor*, AhR) koje je slično djelovanju dioksina. Neplanarne PCB-e, s dva ili više atoma klora u *ortho-* položaju, smatra se „*nedioksinima sličnim*" jer imaju malu ili nikakvu aktivnost prema AhR-u (Fritsch i Pessah, 2013). Nomenklatura PCB kongenera temelji se na strukturi PCB-a koju su izvorno numerirali Ballschmiter i Zell 1980. godine. Svakom kongeneru pripisuje se broj (engl. *BZ number*), počevši od monokloriranih PCB kongenera (PCB 1), a završavajući s jedinim dekakloriranim kongenerom (PCB 209). Fizikalna i kemijska svojstva PCB-a razlikuju se kako se stupanj kloriranja povećava – što je više atoma klora vezano za molekulu, to je veća lipofilnost i talište, a niža je topljivost u vodi. Zbog lipofilnih i hidrofobnih svojstava, PCB su visoko topljivi u većini organskih otapala, ulja i masti (Hens i Hens, 2018). Bezbojne su do

svijetložute boje, nemaju miris i okus i mogu biti ili uljna tekućina ili kruta tvar, ne kristaliziraju, čak ni na niskim temperaturama (međutim, pretvaraju se u čvrste smole), a neki PCB kongeneri su hlapljivi (Kodavanti, 2014).

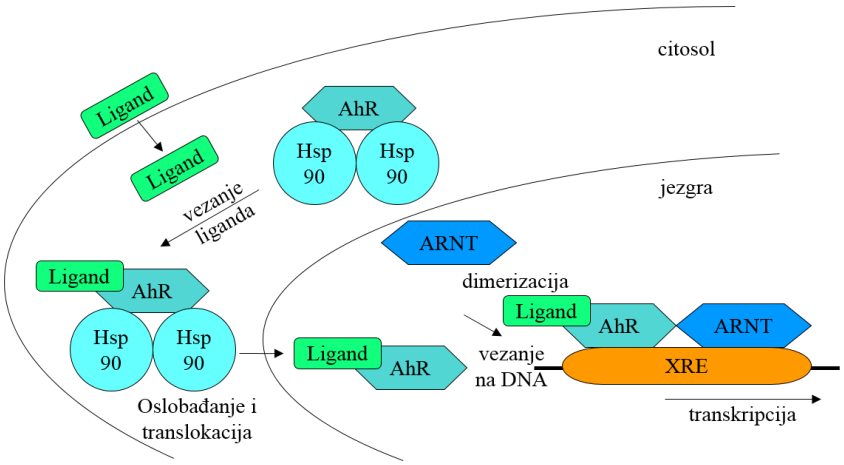
Iako mehanizmi djelovanja i neplanarnih i planarnih PCB-a mogu rezultirati upalom, oksidacijskim stresom i toksičnošću, neplanarni PCB iskazuju toksična svojstva primarno kroz endokrine poremećaje, neurotoksičnost i mehanizme povezane s imunotoksičnošću, dok planarni PCB pokazuju toksičnost putem mehanizama ovisnih o AhR-u (Gupta i sur., 2018). Neplanarni PCB mogu djelovati kao ligandi nekih nuklearnih receptora poput pregnan-X receptora (engl. *pregnane-X receptor*, PXR), konstitutivnog androstan receptora (engl. *constitutive androstane receptor*, CAR), receptora rijanodina (engl. *ryanodine receptor*, RyR) te receptora estrogena (engl. *estrogen receptor*, ER). Zbog navedenih aktivnosti, ovu skupinu PCB-a često nazivaju *„fenobarbitalima sličnim PCB-ima"*. Mnogo neplanarnih PCB-a može aktivirati CAR i PXR, što može rezultirati različitim staničnim odgovorima, poput povišene transkripcije CYP2B i CYP3A gena, kao i do pojačane proliferacije stanica, potisnute apoptoze i inhibirane intercelularne komunikacije (Al-Salman i Plant, 2012; Chen i Liu, 2019). Povišena toksičnost planarnih PCB-a u odnosu na druge kongenere pripisuje se činjenici da imaju strukturu i obrazac klorinacije slične visokotoksičnom 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksinu (TCDD) (Slika 9).



Slika 9. Mehanizmi toksičnosti različitih PCB kongenera (prema Gupta i sur., 2018) [kratice: AhR: aril ugljikovodični receptor; CAR: konstitutivni androstan receptor; CYP1A: citokrom P450 1A; NAFLD: nealkoholna masna bolest jetre; NF-κB: nuklearni faktor κB; Nrf2: nuklearni faktor eritroid 2 povezan s faktorom 2; PXR: pregnan-X receptor]

Opsežni *in vivo* i *in vitro* testovi pokazali su da planarni PCB dijele mnoga toksična svojstva s polikloriranim dioksinima i dibenzofuranima, uključujući sposobnost indukcije imunotoksičnosti, teratogenosti, embriotoksičnosti, hepatotoksičnosti, reproduktivne

toksičnosti i aktivnosti MFO (engl. *mixed function oxidase*) jetrenih enzima (Metcalfe i Haffner, 1995). Dio toksičnosti planarnih PCB-a odvija se putem odgovora posredovanog receptorima, a uključuje vezanje na citosolni AhR, nakon čega slijede promjene u ekspresiji gena (Danis i sur., 2006). Izlaganjem PCB-ima i njihovim ulaskom u stanicu (Slika 10), u citoplazmi dolazi do vezanja za AhR, koji je prisutan u kompleksu s Hsp90 (engl. *heat shock protein 90*) te onemogućuju ulazak AhR-a u jezgru. Zbog vezanja liganda na AhR dolazi do otpuštanja Hsp90 i translokacije kompleksa s visokim afinitetom za DNA u jezgru (Kmetič i sur., 2012). U staničnoj jezgri se ligand-AhR kompleks povezuje s ARNT-om (engl. *AhR nuclear translocator*), koji se veže na specifičnu regulatornu sekvencu gena XRE (engl. *xenobiotic-responsive element*) te potom moduliraju transkripciju gena, sintezu i metabolizam hormona i razinu receptora (Endo i sur., 2003; Fritsch i Pessah, 2013). Poznato je da planarni PCB induciraju CYP1A, koji je glavni enzim odgovoran za metaboličku aktivaciju promutagena i prokancerogena (Danis i sur., 2006), te je jedan od najbolje istraženih biokemijskih učinaka planarnih kongenera indukcija određenih enzima citokroma P450 (CYP), posebno CYP1A1 budući da je ekspresija gena CYP1A1 posredovana AhR-om (Endo i sur., 2003; Fritsch i Pessah, 2013).



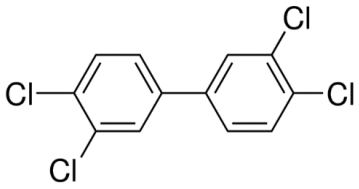
Slika 10. Aktivacija Ah receptora (prema Kmetič i sur., 2012)
[kratice: AhR: aril ugljikovodični receptor; ARNT: AhR nuklearni translokator; Hsp90: protein toplinskog šoka 90; XRE: element odgovora na ksenobiotik]

Međutim, nisu svi negativni biološki učinci PCB-a pripisani ovom mehanizmu. Mnogi PCB mogu iskazati toksičnost kao endokrini modulatori ili imunosupresivi na različite načine kao što su promjena enzimskih aktivnosti (kinaze i fosfolipaze), poremećaj homeostaze Ca^{2+} ili modulacija ekspresije gena (Danis i sur., 2006).

Prototipovi *ortho*- i *non-ortho*-supstituiranih PCB-a su PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorobifenil) i PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil) (Fadhel i sur., 2002).

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

PCB 77 ($C_{12}H_6Cl_4$) (Slika 11) je *non-ortho-*, „*dioksinu sličan*“ kongener s planarnom konfiguracijom i relativno visokom razinom toksičnosti. Jedan je od najtoksičnijih planarnih kongenera i zbog prisutnosti u brojnim komercijalnim mješavinama (npr. *Aroclor*) obiluje u hranidbenom lancu. PCB 77 je od posebnog regulatornog interesa zbog toksičnosti za sisavce i ljude, za koju se čini da je primarno posredovana putem masnog tkiva (Dai i sur., 2018). Također, identificiran je i kao potencijalni endokrini modulator koji može povećati rizik od reproduktivnog i razvojnog oštećenja (Murati i sur., 2015).

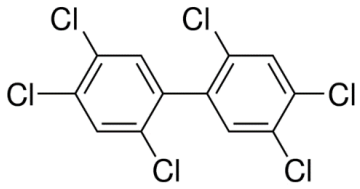


Slika 11. Struktura planarnog PCB-a 77 (Merck KGaA, 2019a)

Brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima utvrđeno je teratogeno, mutageno, kancerogeno, hepatotoksično i neurotoksično djelovanje ovog kongenera (ATSDR, 2000). *In vivo* istraživanje Faqi i sur. (1998) pokazalo je maksimalnu koncentraciju PCB-a 77 u jetri i testisima jedan tjedan nakon tretmana štakora. Koncentracija je pala četiri tjedna nakon tretmana u oba organa, ali je i dalje značajna količina bila uočljiva u jetri, kao i u testisima osam tjedana nakon tretmana. Mužjaci štakora tretirani PCB-em 77 imali su značajno smanjen broj spermija jedan i četiri tjedna nakon tretmana (Faqi i sur., 1998). Rezultati istraživanja Arsenescu i sur. (2008) na miševima pokazala su da PCB 77 dovodi do povećanja mase jetre i sistoličkog tlaka, povišene koncentracije kolesterola u serumu te do razvoja ateroskleroze (Arsenescu i sur., 2008), dok su rezultati istraživanja Ghosh i sur. (2010) pokazala da izlaganje humanih stanica karcinoma jetre (HepG2) i normalnih stanica bubrega (HK2) kongeneru PCB 77 izaziva ubrzano odumiranje stanica procesom apoptoze (Ghosh i sur., 2010). Neposredno nakon izlaganja mladih ženki riba zebrica (lat. *Danio rerio*) PCB-u 77, došlo je do smanjenja proteina nalik vitelogeninu (prekursor žumanjka koji transportira proteine i lipide iz jetre kroz krv do rastućih oocita gdje postaje dio žumanjka). Ovi rezultati sugeriraju da je izloženost PCB-u 77 tijekom kritičnog razdoblja diferencijacije spolnih žlijezda smanjila vitelogenezu kod mladih zebrica, koja je trajala do odrasle dobi, utječući na normalan razvoj ženske spolne žlijezde (Quintaneiro i sur., 2019).

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

PCB 153 ($C_{12}H_4Cl_6$) (Slika 12) je di-*ortho*-, „*ne-dioksinu sličan*“ kongener koji je perzistentan i u okolini i u ljudskom tijelu. Jedan je od tri dominantna PCB kongenera u ljudskom masnom tkivu i kongener je s najvećom koncentracijom u majčinom mlijeku (Hussain i sur., 2000). Pretpostavlja se da ovaj kongener inducira neurobihevioralni deficit putem gestacijskog i laktacijskog prijenosa, a poznat je i kao promotor kancerogeneze. Često se smatra predstavnikom svih ostalih kongenera, čineći gotovo 10% ukupne količine PCB-a i oko 33% ukupnih „*ne-dioksinu sličnih*“ PCB-a izmjerenih u različitim proizvodima od ribe i morskih plodova (Grilo i sur., 2014).



Slika 12. Struktura neplanarnog PCB-a 153 (Merck KGaA, 2019b)

PCB 153 je kongener za kojeg se zna da djeluje kao promotor tumora u jetri glodavaca i uzrokuje indukcije enzima slične prototipskomu promotoru tumora fenobarbitalu (Strathmann i sur., 2006). U humanoj staničnoj liniji jetre (Huh7) PCB 153 je imao značajan utjecaj na ekspresiju gena posredovanih PXR/CAR, značajno povećavajući ekspresiju CYP3A gena za približno 7,6 puta u odnosu na kontrolu (Al-Salman i Plant, 2012). Istraživanja na stanicama karcinoma dojke (MCF-7) pokazuju da PCB 153 (0,1 – 1 μM) povećava proliferaciju MCF-7 u većoj mjeri od 17 β-estradiola (Ptak i sur., 2010). PCB 153 stimulirao je proliferaciju stanica adenokarcinoma prostate osjetljive na androgen (LNCaP) induciranu androgenom pri niskim koncentracijama, dok je pri visokim koncentracijama inhibirao proliferaciju induciranu testosteronom (Endo i sur., 2003).

2.3.2. Izvori i izloženost PCB-ima

PCB su prvi puta sintetizirani u Njemačkoj 1881. godine, komercijalna proizvodnja započela je 1929., a masovna 1945. godine (Bursian i sur., 2011; Gupta i sur., 2018). Njihova upotreba je ograničena 1970-ih, a svjetska zabrana je na snazi od 2001. godine (Stockholmska konvencija) (Totland i sur., 2016). Između 1920-ih i ranih 1980-ih godina proizvedeno je približno 1,5 milijuna tona PCB-a širom svijeta, što je rezultiralo ispuštanjem njihove značajne količine u okoliš (Sharma i sur., 2018). Smjese PCB-a proizvodile su se pod različitim nazivima, uključujući *Aroclor* (SAD), *Clophen* (Njemačka), *Phenoclor* i *Pyralene* (Francuska), *Fenclor* (Italija), *Fenochlor* (Španjolska), *Kanechlor* (Japan) i *Sovol* (bivši SSSR) (Gupta i sur.,

2018). Ovisno o stupnju klorinacije i njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, PCB su se koristili kao stabilni izolatori fluida u visokonaponskim električnim transformatorima, u kondenzatorima velikog kapaciteta, kao izmjenjivači topline te kao ljepila, sredstva za uklanjanje prašine, usporivači gorenja, hidraulična maziva i plastifikatori u bojama, tintama, tonerima i tiskarskim bojama (Beyer i Biziuk, 2009). Kroz okoliš se kreću u skladu s *efektom skakavca*, hlapeći iz tla u zrak za toplog vremena i padajući na tlo na mjestima gdje su temperature niže (Gomes i sur., 2013). Više klorirani PCB povezani su sa česticama u atmosferi, tlu i sedimentu, dok manje klorirani kongeneri postoje u plinovitoj fazi i mogu se transportirati na veće udaljenosti. Kao posljedica toga, tla uglavnom sadrže veći udio više kloriranih kongenera, dok zrakom dominiraju manje klorirane frakcije (Van Aken i sur., 2010).

Unatoč zabrani proizvodnje prije nekoliko desetljeća, PCB su i dalje vrlo prisutni u urbanim sredinama i kontinuirano se oslobađaju u malim koncentracijama putem urbanih i industrijskih aktivnosti (Horwat i sur., 2015). Prijetnja su za okoliš zbog visoke adsorpcijske sposobnosti u tlu, niske topljivosti u vodi, značajne stabilnosti u okolišu i u ljudskim tkivima te toksičnosti. Kao rezultat atmosferskog transporta, postali su sveprisutni zagađivači okoliša, koji se nalaze i na mjestima gdje se nikada nisu koristili, poput polarnih područja i dubokih oceana. PCB se mogu bioakumulirati i biomagnificirati kroz hranidbeni lanac, te je opća populacija izložena prvenstveno putem kontaminirane hrane (Meeker i Hauser, 2010), ali i udisanjem i dermalnom apsorpcijom (WHO/IARC, 2015). Prisutni su u cijelom hranidbenom lancu te su otkriveni u gotovo svim uzorcima hrane (uzorci životinjskog podrijetla poput jaja, mlijeka, ribljeg ulja pokazali su najveće koncentracije, dok su u uzorcima biljnog podrijetla bili u značajno nižim koncentracijama) (Passatore i sur., 2014). Epidemiološke studije pokazale su da izloženost PCB-ima može uzrokovati endokrine i razvojne poremećaje, disfunkcije reproduktivnih procesa i imunološkog sustava, razvoj određenih vrsta karcinoma, alergija i bolesti kardiovaskularnog i živčanog sustava. Smatra se da su PCB (kao i dioksini i bisfenoli) uključeni u razvoj metaboličkih poremećaja, poput dijabetesa melitusa tipa 2, inzulinske rezistencije i pretilosti, jer djeluju putem AhR i NF-κB signalnih puteva i na taj način mijenjaju ekspresiju važnih gena povezanih s upalnim čimbenicima, antioksidacijskim sustavom, metabolizmom lipida i hormonskim sustavom (Żwierełło i sur., 2020). Također, izloženost PCB-ima mijenja normalnu endokrinu signalizaciju oponašanjem djelovanja endogenog hormona vezanjem na receptore hormona, blokiranjem receptora ili interferiranjem u metabolizam steroida. Postojeće studije o izloženosti PCB-u i reproduktivnoj funkciji kod ljudi pokazale su različite zdravstvene učinke, uključujući smanjenu pokretljivost spermija, smanjenje plodnosti te raniju menarhu (Warner i sur., 2012)

2.3.3. Toksikokinetika i toksičnost PCB-a

Distribucija PCB-a u tijelu ovisi o strukturi i fizikalno-kemijskim karakteristikama pojedinih kongenera, a također ovisi i o dozi. U većini životinjskih vrsta zamijećen je visoki unos u jetru (zbog velike perfuzije krvi) i mišiće (zbog relativno velikog volumena). Nakon toga, osobito više klorirani kongeneri se redistribuiraju u masno tkivo i kožu, što odražava njihov visoki afinitet prema tkivima s visokim sadržajem lipida (WHO, 2000). PCB se u polarne metabolite metaboliziraju mikrosomskim monooksigenaznim sustavom kataliziranim citokromom P450. Kongeneri koji pokazuju visoki afinitet za AhR, poput *non-ortho*-supstituiranih PCB kongenera, mogu biti snažni induktori CYP1 obitelji, uključujući CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1. Suprotno tome, kongeneri koji imaju *ortho*- supstitucijski obrazac induciraju enzime iz porodica CYP2 i CYP3, što sliči indukciji fenobarbitalom (WHO, 2003).

Metabolizam PCB-a može se podijeliti u dvije faze. U fazi I molekula može ući u reakcije oksidacije, redukcije ili hidrolize pri čemu se najčešće metabolizira u reaktivnije i/ili polarnije spojeve (Quinete i sur., 2017). Nesupstituirani *meta*- i *para*- ugljikovi atomi su poželjno mjesto za oksidaciju, dok hidroksilacija planarnih PCB-a obično prevladava u *para*- položaju u najmanje kloriranom fenilnom prstenu, a brzina metabolizma općenito opada s porastom supstitucije klorom. Neplanarni PCB se obično hidroksiliraju u *meta*- položaju (ATSDR, 2000). U fazi II spojevi se mogu konjugirati s glukuronskom kiselinom, sulfatom ili glutationom, a za nastale konjugate se očekuje laka eliminacija mokraćom ili fecesom. Metabolizmom PCB-a također mogu nastati i reaktivni međuprodukti poput arenskih oksida, što dovodi do stvaranja kinona i semikinona, za koje se pokazalo da reagiraju s DNA (Quinete i sur., 2017).

Koncept ekvivalenata toksičnosti (engl. *toxic equivalents*, TEQ) uveden je za procjenu i regulaciju rizika, zbog činjenice da TCDD-u slični spojevi normalno postoje u okolišnim i biološkim uzorcima. Primjenjujući ovaj koncept, 1997. godine PCB kongenerima dodijeljeni su faktori ekvivalentne toksičnosti (engl. *toxicity equivalent factors*, TEF) od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO). TEF kongenera „*sličnih dioksinu*“ u odnosu na TCDD utvrđuju se iz *in vitro* i *in vivo* ispitivanja te se uspoređuje relativna toksičnost pojedinih kongenera s onom TCDD-a (TEF_{TCDD}=1) (ATSDR, 2000; WHO, 2000; EFSA, 2005). Koncentracija ili doza svake aktivne komponente (PCB kongener) množi se s pripadajućim TEF-om da bi se dobio TEQ (ATSDR, 2000). Toksičnost PCB-a ovisi o kutu nagiba između prstena i broju supstituiranih atoma klora. Planarni PCB kongeneri *„pakiraju“* se urednije jer su dva benzenska prstena u istoj ravnini, dok su kod neplanarnih PCB kongenera benzenski prsteni pod određenim kutem (zamjena atoma vodika u *ortho*- pozicijama s većim

atomima klora prisiljava aromatske prstenove na rotaciju iz planarne konfiguracije), što rezultira različitim hidrofobnim učincima i različitim potencijalom akumulacije u adipocitima i masnom tkivu (Manzetti i sur., 2014; WHO/IARC, 2015). Najtoksičniji PCB kongeneri, 3,3',4,4'-tetra (PCB 77) te 3,3',4,4',5-penta (PCB 126) i 3,3',4,4',5,5'-heksaklorobifenil (PCB 169) su izostereomeri TCDD-a i izazivaju mnoge toksične učinke karakteristične za halogenirane aromatske tvari. Ova tri spoja imaju nekoliko zajedničkih strukturnih svojstava: (1) supstituente klora u oba *para*- položaja, (2) supstituciju klorom u najmanje jednom *meta*-položaju na oba fenilna prstena i (3) ne sadrže supstituente u *ortho*- položaju (Safe i Hutzinger, 1984).

Akutni poremećaji nastaju kao posljedica slučajnih ili profesionalnih izloženosti koje su povezane s visokim dozama i odvijaju se u kratkom vremenskom razdoblju. Akutni poremećaji zabilježeni su kod slučajnih trovanja PCB-ima poput Yusho bolesti 1968. godine koja je zahvatila oko 14 000 ljudi (Japan) i Yu-Cheng bolesti 1979. godine koja je zahvatila približno 2000 ljudi (Tajvan). Tijekom tih slučajeva došlo je do masovnog trovanja PCB-ima kod ljudi koji su konzumirali rižino ulje, koje je prethodno tijekom proizvodnje kontaminirano PCB-ima i polikloriranim dibenzofuranima. Uobičajeni simptomi uključivali su dermalna i očna oštećenja poput klorakni, kožnih osipa i očnih lezija, nepravilan menstrualni ciklus i kancerogenezu (Gupta i sur., 2018). PCB iskazuju i neurotoksične učinke. Istraživanja Shain i sur. (1991) pokazala su da neki *ortho*-supstituirani kongeneri inhibiraju tirozin hidroksilazu, enzim koji ograničava brzinu u sintezi dopamina (Shain i sur., 1991). Brojni *ortho*-supstituirani kongeneri uzrokuju akutnu smrt cerebelarnih stanica, možda interferencijom s homeostazom kalcija. Prema istraživanjima, *ortho*-supstituirani kongeneri mijenjaju transport kalcija kroz mikrosomalne membrane djelovanjem na RyR, što sugerira da je to uobičajeni mehanizam toksičnog djelovanja *ortho*-supstituiranih PCB-a (Hussain i sur., 2000). S obzirom na ulogu jetre u metaboličkoj regulaciji, poremećaji funkcije jetre uzrokovani izloženošću PCB-ima mogu eskalirati u povezane metaboličke poremećaje kao što su inzulinska rezistencija i dijabetes, pretilost, dislipidemija i metabolički sindrom. Učinci PCB-a na jetru uključuju karcinom jetre, bezalkoholnu bolest masne jetre i bezalkoholni steatohepatitis, koje su u korelaciji s povišenjem jetrenih enzima, uključujući γ-glutamiltransferazu, alanin transaminazu i aspartat transaminazu (Gupta i sur., 2018). Longitudinalne studije, u kojima su se razine PCB-a u serumu pratile nekoliko godina, pokazale su povezanost između sistemske izloženosti PCB-ima i neuroloških, imunoloških, limforetikularnih, genetskih i endokrinih učinaka. Izloženost PCB-ima izravno je povezana s različitim vrstama karcinoma, poput karcinoma dojke, prostate i testisa (Hens i Hens, 2018).

Izlučivanje PCB kongenera ovisi o njihovoj brzini metaboliziranja u polarnije spojeve (Chen i sur., 1982; WHO, 2000). Kod većine kongenera vidljivo je dvofazno uklanjanje, gdje je početni poluživot relativno kratak za sve kongenere, ali kasniji poluživot je mnogo duži i ovisi o strukturi. Velika je varijacija poluživota između različitih PCB kongenera ovisno o broju i položaju atoma klora (ovisno o kongeneru raspon je od nekoliko do 450 dana). Metaboliti svih do sada proučenih kongenera eliminiraju se prvenstveno putem žuči i fecesa. Međutim, manje klorirani kongeneri izlučuju se u većoj mjeri mokraćom (iako manje od 5%) od onih više kloriranih kongenera (WHO, 2000).

2.4. OKSIDACIJSKI STRES I SLOBODNI RADIKALI

Oksidacijski stres je neuravnoteženo stanje u kojem prekomjerne razine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), uključujući superoksidne radikale, vodikov peroksid, hidroksilne radikale, singlenti kisik, peroksilni radikal, peroksinitrit i dušični oksid, premašuju endogeni antioksidacijski kapacitet, što dovodi do oksidacije različitih makromolekula, poput enzima, proteina, DNA i lipida (Vasantha Rupasinghe i sur., 2014). Oksidacijski stres može utjecati na mnoge biološke procese poput apoptoze, proliferacije stanica te upalne reakcije (Yoshikawa i Naito, 2002). U kliničkim studijama oksidacijski stres povezan je s mnogim degenerativnim bolestima kao što su ateroskleroza, karcinom, moždani udar, astma, hiperoksija, artritis, dermatitis, kataraktogeneza, oštećenje mrežnice i hepatitis (Pandey i Rizvi, 2011).

Slobodni radikali su skupina visoko reaktivnih molekula s jednim ili više nesparenih elektrona (Ozcan i Ogun, 2015), a izvori nastanka ROS-a mogu biti i endogeni i egzogeni. Potencijalni endogeni izvori uključuju mitohondrije, metabolizam citokroma P-450 i peroksisome te aktivaciju upalnih stanica. Međutim i niz egzogenih procesa dovodi do nastanka ROS-a (Valko i sur., 2006). Egzogena proizvodnja slobodnih radikala može nastati kao rezultat izloženosti zagađivačima okoliša, teškim metalima, određenim lijekovima (ciklosporin, gentamicin i bleomicin), kemijskim otapalima, dimu cigareta, alkoholu i zračenju. Kad egzogeni spojevi prodru u tijelo, oni se razgrađuju ili metaboliziraju, a slobodni radikali nastaju kao nusproizvodi. Proizvodnja ROS-a u osnovi se oslanja na enzimske i neenzimske reakcije. Enzimske reakcije koje mogu generirati ROS su one uključene u respiratorni lanac, sintezu prostaglandina, fagocitozu i sustav citokroma P-450 (Pizzino i sur., 2017). ROS induciraju aktivnost antioksidacijskih enzima, kao što su SOD, CAT, GR, GST i GPx te oni zajedno djeluju ili na uklanjanju ROS-a ili na reaktiviranju enzima preko višestrukih regulatornih puteva, uključujući AhR i Nrf2 (Vasantha Rupasinghe i sur., 2014; Chen i sur., 2017).

Prirodni antioksidacijski obrambeni mehanizmi uz navedene enzime uključuju i neenzimske molekule poput GSH-a, askorbinske kiseline i α-tokoferola (Vasantha Rupasinghe i sur., 2014). Antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima te na taj način ublažavaju stanično oštećenje prekidajući inače štetne lančane reakcije slobodnih radikala (Obrenovich i sur., 2010). Budući da su ROS po svojoj prirodi oksidansi direktno utječu na redoks status stanice. Visoke koncentracije ROS-a uzrokuju staničnu smrt, niske koncentracije superoksidnog radikala i vodikovog peroksida zapravo potiču proliferaciju u širokom rasponu staničnih linija. ROS tako mogu imati vrlo važnu fiziološku ulogu kao sekundarni glasnici (Valko i sur., 2006).

2.4.1. Polifenoli i oksidacijski stres

Bioaktivni spojevi u biosustavima (poput humanih stanica) mogu imati antioksidacijsku ulogu, a antioksidacijski spojevi su inhibitori procesa oksidacije zbog svoje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala. Antioksidacijsko djelovanje biljnih vrsta izravno je u korelaciji sa sadržajem vitamina i raznih fenolnih fitokemikalija poput flavonoida, glikozida i alkaloida. Kemijski spojevi koji pokazuju najsnažnije antioksidacijske učinke su polifenolni spojevi. U ljudskom tijelu polifenolni spojevi pokazuju pozitivan učinak kroz nekoliko mehanizama: (1) uklanjanje slobodnih radikala (antioksidacijski učinak), (2) zaštita i regeneracija ostalih antioksidanasa (npr. vitamina E), (3) kelatna svojstva oksidirajućih metalnih iona (vežu se za metalne ione i na taj način inhibiraju njihovu apsorpciju i učinak). Antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva prvenstveno ovisi o broju -OH skupina, njihovom položaju u molekuli, ali i o vrsti supstitucije na aromatskom prstenu. Točnije, energija veze između atoma vodika i atoma kisika u -OH skupini koja je vezana na aromatski prsten u molekuli fenola manja je nego u alifatskim spojevima (alkani, aldehidi, alifatski alkoholi i masti), stoga takvi polifenolni spojevi lakše doniraju (oslobađaju) atom vodika koji se veže na slobodni radikal (nespareni elektron) (Žlabur i sur., 2018). Sposobnost polifenola da spriječe ili značajno uspore bolesti povezane s oksidacijskim stresom (npr. karcinom), u velikoj se mjeri pripisuje njihovoj intrinzičnoj sposobnosti neutralizacije, deaktivacije ili suzbijanja ROS-a. Ispitivanja antioksidanasa na staničnim kulturama otkrila su da polifenoli povoljno djeluju na antioksidacijske enzime ili citoprotektivne proteine, koji imaju važnu ulogu u staničnoj zaštiti ili, naprotiv, smanjuju proliferaciju stanica te pokazuju učinke koji induciraju apoptozu. Podaci dobiveni procjenom učinaka nekih čistih polifenola ili njihovih kompleksa na unutarstanično redoks stanje podupiru njihovo anti- i prooksidacijsko djelovanje, koje u velikoj mjeri ovisi o koncentraciji polifenola i o tipu stanica (Piccolella i Pacifico, 2015).

Resveratrol se navodi kao jedan od najmoćnijih antioksidanasa (Pandey i Rizvi, 2011). Antioksidacijsko djelovanje resveratrola ovisi o rasporedu funkcionalnih skupina u strukturi molekule. Stoga, konfiguracija, supstitucija i ukupni broj -OH skupina značajno utječu na nekoliko mehanizama antioksidacijske aktivnosti, poput uklanjanja slobodnih radikala i sposobnosti keliranja metalnih iona (Salehi i sur., 2018). Studije strukture pokazale su da antioksidacijska svojstva resveratrola ovise o prisutnosti tri -OH skupine u položajima 3, 4' i 5 pričvršćene na aromatske prstene koje resveratrolu omogućuju uklanjanje slobodnih radikala. Antioksidacijska svojstva resveratrola povezana su i s njegovom sposobnošću poticanja ekspresije endogenih antioksidacijskih enzima. U zdravih štakora, primjena resveratrola povećala je aktivnost nekih detoksikacijskih enzima, istovremeno smanjujući učinak prooksidacijskog malondialdehida u mozgu miševa (Libro i sur., 2016). Međutim, resveratrol pokazuje bifazne učinke ovisno o dozi te njegov učinak ovisi o njegovom redoks statusu, tj. hoće li djelovati kao antioksidans ili prooksidans. U niskim koncentracijama djeluje kao antioksidans koji može zaštititi od oštećenja DNA i oksidacijskog stresa, a s druge strane, u visokoj koncentraciji, djeluje kao prooksidans promičući oštećenje DNA i povećavajući oksidacijski stres. Niske i visoke koncentracije nude korisne učinke u prevenciji nastanka karcinoma (kemopreventivno) i u liječenju raka (citotoksično) (Kuršvietienė i sur., 2016; Shaito i sur., 2020).

Kurkumin se opsežno proučava kao moćan antioksidans zbog svoje sposobnosti izravnog uklanjanja ROS-a. Smatra se da kurkumin posjeduje snažna antioksidacijska svojstva zbog -OH i -OCH_3 skupina u strukturi, koje zajedno poboljšavaju uklanjanje slobodnih radikala (Devassy i sur., 2015; Kocaadam i Şanlier, 2015). Prisutnost dva strukturalna elementa, β-diketonske strukture i -OH skupine u aromatskom prstenu, vodeći su čimbenici antioksidacijskog potencijala kurkumina (Malik i Mukherjee, 2014). U *in vitro* istraživanjima pokazalo se da kurkumin može ukloniti hidroksilne i superoksidne radikale, a smatra se da je njegovo antioksidacijsko djelovanje približno četverostruko veće od djelovanja α-tokoferola (Libro i sur., 2016). Učinak kurkumina na slobodne radikale provodi se pomoću nekoliko različitih mehanizama: (i) može ukloniti različite oblike slobodnih radikala, (ii) može modulirati aktivnost enzima koji sudjeluju u neutralizaciji slobodnih radikala, (iii) može inhibirati enzime koji stvaraju ROS (Hewlings i Kalman, 2017). Prooksidacijska aktivnost kurkumina posebno je izražena u prisutnosti prijelaznih metala, tj. njihovih iona, poput iona željeza i bakra (Malik i Mukherjee, 2014). Nekoliko izvještaja u kojima se kurkumin prikazuje kao prooksidans pokazala su da prooksidacijski i antioksidacijski učinci kurkumina ovise o dozi i kemijskom okruženju (npr. dostupnost slobodnih Cu^{2+} iona) (Basnet i Skalko-Basnet, 2011).

Snažno antikancerogeno svojstvo kurkumina pripisuje se njegovom antioksidacijskom učinku koji sprječava lipidnu peroksidaciju i oštećenja DNA posredovanih slobodnim radikalima. Međutim, sve veći broj istraživanja pokazuje da je antikancerogeni učinak kurkumina posljedica njegove prooksidacijske aktivnosti zbog indukcije nastanka ROS-a (Khan i sur., 2012).

2.4.2. PCB i oksidacijski stres

Produkcija ROS-a tijekom izloženosti ili metabolizma PCB-a otkriveno je u sustavima bez stanica (engl. *cell-free systems*), u stanicama u kulturi i u studijama na laboratorijskim životinjama, a primarna mjesta učinka oksidacijskog stresa izazvanog PCB-ima su lipidi, proteini i DNA (Twaroski i sur., 2001). U fiziološkim okolnostima u kojima je glavni put metabolizma PCB-a putem citokroma P-450, primarni fenolni metaboliti PCB-a mogu proći drugu hidroksilaciju i dalje se oksidirati dajući reaktivne hidrokinone i kinone, koji mogu generirati semikvinone. Pretpostavlja se da bi ovaj put metabolizma PCB-a mogao stvoriti radikale koji bi mogli posredovati u citotoksičnosti dovodeći do povećanja razine ROS-a (Zhu i sur., 2009). Metabolizam PCB-a povećava količinu ROS-a u stanicama, pa rezultirajuća upala može uzrokovati oštećenje endotelnih stanica. Podaci iz literature pokazuju da planarni PCB (npr. PCB 77 i PCB 126), izazivaju upalu ovisnu o aktivaciji AhR-a, što rezultira povećanom proizvodnjom ROS-a i ekspresijom proupalnih gena (Żwierełło i sur., 2020). Aktivacijom AhR-a PCB utječu na regulaciju upalnih citokina, uključujući interleukine (IL-6, IL-2) i TNFα (engl. *tumor necrosis factor alpha*), stvaranje ROS-a i indukciju antioksidacijskih enzima. Neravnoteža koja nastaje zbog količine proizvedenog ROS-a i nemogućnosti eliminacije takvih reaktivnih međuprodukata, rezultira oksidacijskim stresom i oštećenjem tkiva (Gupta i sur., 2018). *In vitro* i *in vivo* studije potvrđuju vezu između oksidacijskog stresa izazvanog PCB-ima i neuroloških poremećaja. Zbog visokog sadržaja lipida u živčanim stanicama i njihovim intenzivnim metabolizmom kisika, pokazuju izuzetnu osjetljivost na velike količine ROS-a generirane toksičnim učincima PCB-a (Żwierełło i sur., 2020).

Poznato je da stvaranje ROS-a dovodi do oksidacijskog stresa koji potom dovodi do oštećenja stanica, mutageneze, kancerogeneze i stanične smrti. Stoga, metabolički oksidacijski stres izazvan PCB-ima i njihovim metabolitima može igrati važnu ulogu u citotoksičnosti stanica sisavaca. Iako postoji sve više dokaza da PCB uzrokuju oksidacijski stres, precizna identifikacija ROS-a te unutarstanični izvori ROS-a odgovorni za toksičnost PCB-a ostaju još uvijek nerazumljivi (Zhu i sur., 2009).

2.5. STANIČNA SMRT

Mnoštvo eksperimentalnih dokaza otkrivaju i sve detaljnije opisuju skup genetski kodiranih mehanizama za ciljano uklanjanje suvišnih, nepovratno oštećenih i/ili potencijalno štetnih stanica (Galluzzi i sur., 2018). Višestanični organizmi koriste fiziološke mehanizme stanične smrti za razvoj i morfogenezu, za kontrolu broja stanica i kao obrambenu strategiju za uklanjanje zaraženih, mutiranih ili oštećenih stanica (Vaux i Korsmeyer, 1999).

Stanična smrt je izrazito organizirana temeljna aktivnost koja je jednako složena u regulaciji kao što su dioba i diferencijacija stanica. U fiziološkom kontekstu embrionalnog razvoja i obnove tkiva, te kao patološki odgovor na ozljedu stanica i infekciju patogenima, stanična smrt je uključena u mehanizme koji kontroliraju razvoj, homeostazu i imunološku regulaciju višestaničnih organizama. To uključuje održavanje funkcije epitelne barijere, uništavanje mikroba, adaptivni imunološki odgovor, recikliranje bioloških makromolekula, unutarstanično signaliziranje i očuvanje genomskog integriteta (Giampietri i sur., 2014; Tait i sur., 2014; Danial i Hockenbery, 2018). Stanična smrt može se pojaviti u višestrukim oblicima kao odgovor na različite stresove, posebno oksidacijski stres. Gubitak kontrole u regulaciji stanične smrti pridonosi pojavi karcinoma, neurodegenerativnih poremećaja, autoimunih i zaraznih bolesti te ozljeda (Tait i sur., 2014; Tang i sur., 2019).

Rana klasifikacija oblika stanične smrti ovisila je o morfološkim i strukturnim obilježjima pojedinih tkiva i stanica. Shweichel i Merker su 1973. godine objavili morfološki sustav znakova za klasificiranje stanične smrti u tipove I (apoptoza), II (autofagija) i III (nekroza). Sva tri tipa stanične smrti mogu biti izvršena kroz različite, a ponekad i preklapajuće signalne puteve uključene kao odgovor na specifične podražaje (Green i Llambi, 2015; Tang i sur., 2019). Odbor za nomenklaturu stanične smrti (engl. *The Nomenclature Committee on Cell Death,* NCCD) je 2005. godine formulirao preporuke i smjernice za klasifikaciju stanične smrti (Kroemer i sur., 2005). NCCD predlaže novu klasifikaciju signalnih puteva temeljenih na biokemijskim i funkcionalnim razmatranjima te ukazuje da se tipovi stanične smrti mogu svrstati u dvije široke, međusobno isključive kategorije – slučajne (engl. *accidental cell death* – ACD) i regulirane (engl. *regulated cell death* – RCD) stanične smrti. ACD su uzrokovane teškim oštećenjima, uključujući fizičke, kemijske i mehaničke podražaje te nisu osjetljive na farmakološke ili genetske intervencije bilo koje vrste. RCD uključuju genetski kodirane molekularne sustave, stoga se tijek RCD-a može mijenjati pomoću farmakoloških i/ili genetskih intervencija usmjerenih na ključne komponente takvih sustava (Galluzzi i sur., 2018). U posljednjem desetljeću opisani su brojni novi oblici stanične smrti (Tablica 1) i pojavilo se

mnoštvo novih *in vitro* i *in vivo* studija koje su okarakterizirale nove oblike RCD-a s pripadajućim regulatornim signalnim putevima (Feoktistova i Leverkus, 2015).

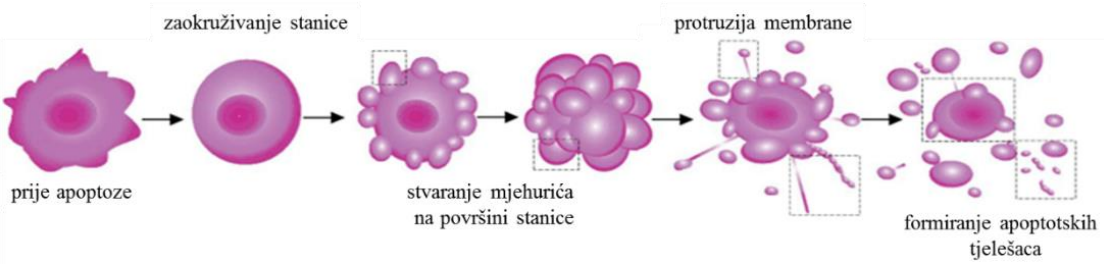
Tablica 1. Novi oblici regulirane stanične smrti (RCD) (Tang i sur., 2019)

Lizosomalna stanična smrt (engl. *lysosomal cell death*)
Piroptoza (engl. *pyroptosis*)
NEToza (engl. *NETosis*)
Nekroptoza (engl. *necroptosis*)
Entoza (engl. *entosis*)
Partanatos (engl. *parthanatos*)
Feroptoza (engl. ferroptosis)
Okseiptoza (engl. *oxeiptosis*)
Alkaliptoza (engl. *alkaliptosis*)

2.5.1. Apoptoza

Apoptoza (grč. ἀπόπτωσις, *apóptōsis*) je prvi identificiran genetski programiran proces stanične smrti (Eisenberg-Lerner i sur., 2009). Evolucijski je očuvan i strogo reguliran, a bitan je u fiziologiji jer oblikuje složena tkiva tijekom embriogeneze te uklanja stanice koje su dosegle određenu starosnu dob ili čiji su genomi nepopravljivo oštećeni (Birge i sur., 2016).

Apoptoza je latentni mehanizam svojstven većini stanica, a aktivira se kada je stanica lišena bitnih faktora za preživljavanje. Alternativno, apoptoza se može izazvati namjerno, bilo pomoću određenih tipova teških staničnih oštećenja ili kao odgovor na ekstracelularne signale koji se prenose specifičnim ligandima koji induciraju staničnu smrt (Ashkenazi i Salvesen, 2014). Apoptozu karakterizira sakupljanje stanica (piknoza), ispupčenje membrane (protruzija), formiranje apoptotskih tjelešaca, fragmentacija DNA te kondenzacija kromatina (Slika 13) (Tang i sur., 2019).



Slika 13. Faze procesa apoptoze (prema Tixeira i sur., 2017)

Apoptoza se javlja normalno tijekom razvoja i starenja te kao homeostatski mehanizam za održavanje stanične populacije u tkivima. Također se pojavljuje i kao obrambeni mehanizam u

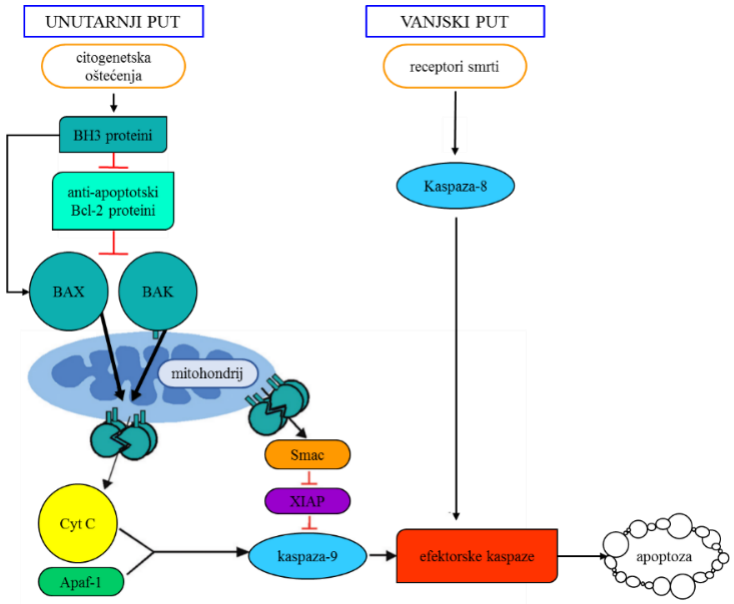
obliku imunološke reakcije tijekom bolesti i kada toksični agensi oštećuju stanice. Iako postoji široki raspon podražaja i stanja (fizioloških i patoloških) koji mogu potaknuti apoptozu, sve stanice neće nužno umrijeti kao odgovor na isti podražaj. Zračenje ili lijekovi koji se koriste za kemoterapiju dovode do oštećenja DNA u nekim stanicama, što može dovesti do apoptotske smrti putem p53 ovisnog puta. Hormoni, kao što su kortikosteroidi, mogu dovesti do apoptotske smrti u nekim stanicama (npr. timociti) (Elmore, 2007).

Središnji apoptotski enzimski aparat sastoji se od proteolitičkih enzima kaspaza – citoplazmatskih cisteinil-aspartatno-specifičnih endoproteaza (Žlender, 2003; Ashkenazi i Salvesen, 2014), koje se dijele u dvije kategorije – (1) inicijatorske kaspaze (npr. kaspaza-8, -9), koje se nalaze samo kod ljudi i njihova aktivacija je potrebna za aktiviranje drugog seta kaspaza, (2) izvršiteljskih ili efektorskih kaspaza (npr. kaspaza-3, -7) (Ashkenazi i Salvesen, 2014). Apoptotski podražaji potiču aktivaciju jedne ili više inicijatorskih kaspaza preko specifičnih oligomerizacijskih platformi. Inicijatori zatim pokreću kaskadnu proteolitičku stimulaciju efektorskih kaspaznih zimogena. Aktivirani enzimi potiču apoptotsku smrt stanice cijepanjem stotina ili čak tisuća strukturno i funkcionalno kritičnih proteina unutar stanice (Ashkenazi i Salvesen, 2014).

Staničnu smrt kontroliraju proteini Bcl-2 (engl. *B cell lymphoma 2*) i to primarno izravnim veznim interakcijama koje reguliraju permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP), što dovodi do nepovratnog oslobađanja intermembranskih proteina, otpuštanja citokroma c iz mitohondrija te kasnije do aktivacije kaspaza i apoptoze. Bcl-2 proteini dijele jednu ili više od četiri visoko očuvane homologne domene Bcl-2 (BH1 – BH4) te se na temelju njihovih struktura i unutarstaničnih funkcija, ali i po stupnju homologije dijele u 3 skupine: (1) sub-obitelj koja uključuje Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/a1 (anti-apoptotski proteini; dijele homologiju unutar sve četiri regije; BH1 – BH4), (2) sub-obitelj koja uključuje Bax, Bak, Bok (pro-apoptotski proteini; sadrže tri homologne domene; BH1 – BH3, iako je u nekih uočena homologija i unutar BH4 domene) i (3) sub-obitelj koja uključuje Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma (pro-apoptotski; dijele homologiju unutar BH3 domene) (Miletić i sur., 2021).

Razlikujemo vanjski (ekstrinzični) put apoptoze, koji uključuje receptore smrti ili direktno djelovanje enzima citotoksičnih T-limfocita (perforin, granzim B) te unutrašnji (intrinzični) mitohondrijski put apoptoze (Žlender, 2003). Vanjski put ili put posredovan receptorima smrti prima i obrađuje izvanstanične signale koji induciraju smrt i koji djeluju preko tih receptora na površini stanica (Derakhshan i sur., 2016; Dasgupta i sur., 2017). Nasuprot tome, unutarnji put prima i integrira unutarstanične signale i funkcije kroz mitohondrije (Dasgupta i sur., 2017).

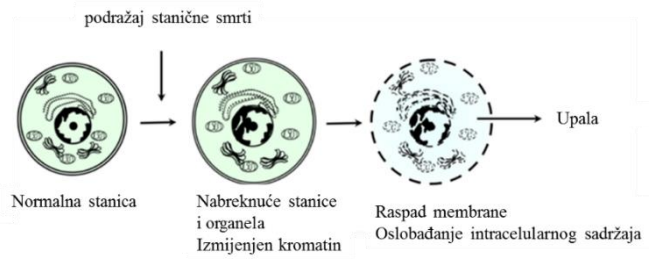
Aktivacija unutarnjeg ili mitohondrijskog puta inducirana je citogenetskim oštećenjima uzrokovanima zračenjem ili kemoterapijom. Takav stres uzrokuje permeabilizaciju mitohondrija i oslobađanje apoptogenih proteina, uključujući citokrom c (Cyt C) i SMAC (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases*) iz mitohondrija u citosol. Citosolni Cyt c stupa u interakciju s Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*), stvarajući multimerni kompleks apoptosom, koji aktivira kaspazu-9 i -3 (Slika 14) (Derakhshan i sur., 2016).



Slika 14. Unutarnji *vs.* vanjski putevi apoptoze (prema Dai i sur., 2016)
[kratice: Apaf-1: faktor aktivacije apoptotske proteaze 1; Bad, Bax: pro-apoptotski Bcl-2 proteini; Cyt C: citokrom C; SMAC: drugi mitohondrijski aktivator kaspaza; XIAP: X-vezan inhibitor apoptoze]

2.5.2. Nekroza

Za razliku od apoptoze, nekroza (grč. *νέκρωσις, nékrōsis*) se smatra nereguliranom i neprogramiranom staničnom smrti (Feoktistova i Leverkus, 2015). Tradicionalno se nekroza opisuje kao pasivni i nekontrolirani proces, iniciran vanjskim čimbenicima kao što su ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, toksini, virusne i bakterijske infekcije. Obično se ne povezuje s aktivacijom kaspaza, te se smatra da posreduje u smrti stanica kao odgovor na oštećenje ili u patologiji, a ne tijekom normalnog razvoja (Nikoletopoulou i sur., 2013). Karakterizirana je nabreknućem organela i stanica, gubitkom integriteta plazmine membrane te njenim brzim raspadom, što rezultira lizom stanica i nekontroliranim oslobađanjem unutarstaničnog sadržaja unutar nekrotičnog organa u izvanstanični prostor te oštećenjem susjednih stanica što posljedično dovodi do aktivacije imunološkog sustava (Slika 15) (Jha i Kitsis, 2011; Negroni i sur., 2015). Također, izlaganje stanica nepovoljnim uvjetima (mehanička sila, toplina, hladnoća i toksini) uzrokuje nekrozu (Hotchkiss i sur., 2009).



Slika 15. Morfološke karakteristike procesa nekroze (prema Escobar i sur., 2015)

Brojni organeli i stanični procesi uključeni su u nekrotičnu smrt stanice, ali još uvijek nije jasno kako su međusobno povezani. Uobičajeni posrednici procesa nekroze su kalcijevi ioni (Ca^{2+}), koji uzrokuju preopterećenje mitohondrija kalcijem, različite bioenergetske učinke te aktivaciju proteaza i fosfolipaza. Nekrozu između ostalog potiču i ROS time što uzrokuju disfunkciju mitohondrija, deregulaciju homeostaze iona i gubitak integriteta membrane. Disfunkciju mitohondrija odražava niska razina ATP-a i podudara se s poremećajem metabolizma što potom dovodi do pojave nekroze. Poli-ADP-riboza polimeraza (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP) je enzim koji tijekom popravka višestrukih lomova lanaca DNA može iscrpiti stanične spremnike ATP-a, a njegovom inhibicijom ublažit će se nekroza u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama i u drugim vrstama oštećenja (Miletić i sur., 2021).

2.5.3. Polifenoli i stanična smrt

Prirodni polifenolni spojevi koji su prisutni u našoj prehrani, poput genisteina, kvercetina, kurkumina, resveratrola mogu izmijeniti signalne puteve i inducirati staničnu smrt (Hasima i Ozpolat, 2014; Feitelson i sur., 2015). Većina mehanizama djelovanja antikancerogenih biljnih derivata inducira apoptotsku staničnu smrt koja može biti intrinzična ili ekstrinzična, a ovisna je o kaspazi i/ili p53 putu ili su to neovisni mehanizmi. Istraživanjima je otkriveno da polifenoli inhibicijom nuklearnog faktora κB (engl. *nuclear faktor κB*, NF-κB), fosfatidilinozitol 3-kinaze i hipoksijom induciranog faktora 1 inhibiraju ključne signalne puteve koji doprinose proliferaciji stanica karcinoma (Gali-Muhtasib i sur., 2015). Tretman staničnih linija jajnika (A2780, CaOV3, ES-2, TOV112D, A1947) resveratrolom rezultirao je inhibicijom rasta i staničnom smrti apoptotskim i neapoptotskim mehanizmima. Visoke koncentracije resveratrola (150 μM) povezane su s povećanjem udjela apoptotskih stanica u kulturi što je dokazano prisutnošću hipodiploidnih stanica, te kondenzacijom kromatina i nuklearnom fragmentacijom (Gali-Muhtasib i sur., 2015). Istraživanjima je otkriveno da kurkumin inducira apoptozu u različitim tumorskim stanicama, uključujući stanice leukemije, karcinoma debelog crijeva, prostate i dojke. Kurkumin regulira aktivnost NF-κB, potiskujući tako transformaciju stanica. Utvrđeno je da kurkumin smanjuje aktivnost NF-κB i i razine proteina ciklin D1 te povećava

ekspresiju negativnog regulatora staničnog ciklusa (p21) što rezultira aktivacijom apoptotskih puteva u stanicama karcinoma (Gali-Muhtasib i sur., 2015; Haverić i sur., 2018). Kurkumin u koncentracijama 20 – 25 μM inducira apoptozu u tumorskim stanicama, dok više koncentracije povećavaju udio nekrotičnih stanica (Haverić i sur., 2018).

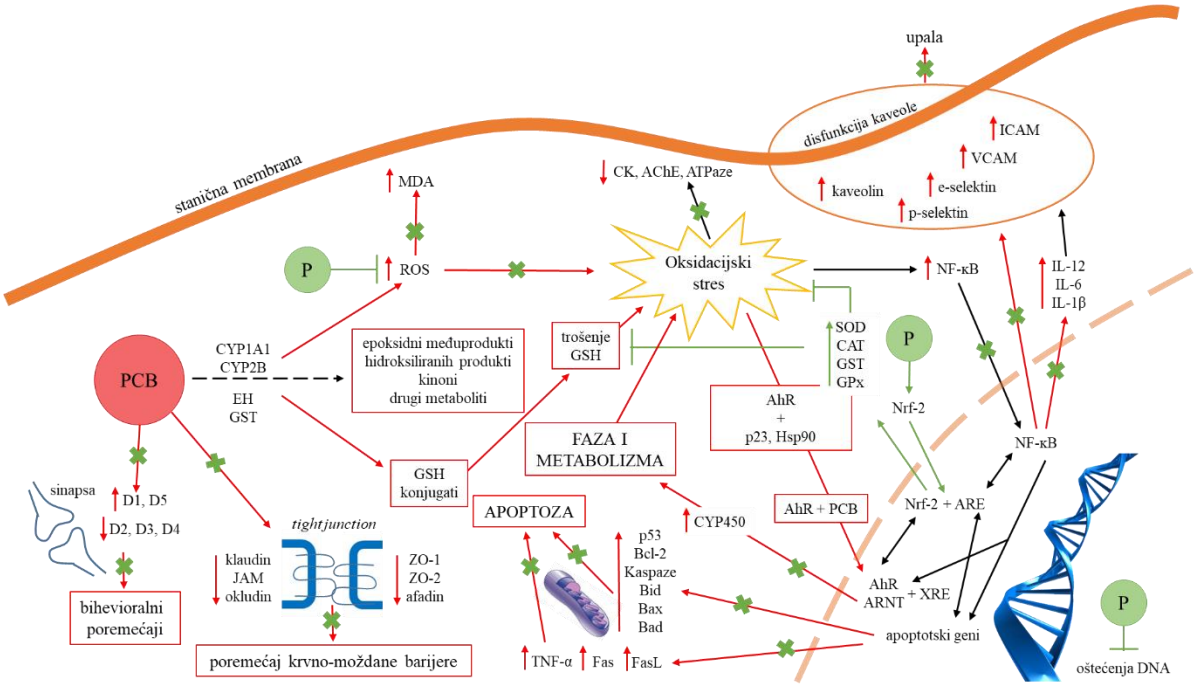
2.5.4. PCB i stanična smrt

In vitro studije pokazale su da PCB mogu potaknuti apoptozu u neuronima i sugeriraju da je ovaj učinak djelomično posredovan povećanom razinom ROS-a, a podaci *in vivo* studija potvrđuju da PCB moduliraju apoptozu u mozgu u razvoju (Jang i Lein, 2010). Neplanarni PCB (PCB 52, PCB 153 i PCB 180) i planarni PCB (PCB 77 i PCB 118) induciraju staničnu smrt (apoptozu) u stanicama humanog karcinoma dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) i stanicama humanog bubrega (HK2) aktivacijom kaspaza (Hashmi i sur., 2017). Studija Ghosh i sur. (2010) pokazuje da PCB 153 i PCB 77 u eksperimentalnim uvjetima značajno induciraju gubitak vijabilnosti stanica u humanim kulturama jetre i bubrega. U jetri se inducira mitohondrijski (intrinzični) put apoptoze potaknut PCB-em 153, u usporedbi s nuklearnim apoptotskim putem induciranim PCB-em 77 (Ghosh i sur., 2010).

2.6. UČINCI POLIFENOLA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

PCB zbog svoje toksičnosti i svojstva biomagnifikacije i bioakumulacije predstavljaju značajan rizik i za okoliš i za ljude. Istraživanja utjecaja prehrane na zdravlje pokazala su da prehrana obogaćena polifenolima i antioksidansima smanjuje oksidacijski stres i upale izazvane PCB-ima (Gupta i sur., 2018). Iako se polifenoli i druge fitokemikalije od davnina koriste u tretmanu mnogih bolesti, njihov način djelovanja još uvijek nije potpuno razjašnjen. U početku su ih povezivali s uklanjanjem slobodnih radikala i antioksidacijskim djelovanjem, međutim, trenutna istraživanja ukazuju na to da polifenoli pokreću složenije zaštitne mehanizme na staničnoj i molekularnoj razini, što može biti najvažnije za sprječavanje kancerogeneze izazvane toksikantima iz okoliša (Lagoa i sur., 2020). Metaboličke transformacije PCB-a povećavaju razinu ROS-a i značajno smanjuju količinu GSH-a, što inducira oksidacijski stres. Poremećaj u oksido-redukcijskom sustavu dovodi do oštećenja DNA, apoptoze, upale i disfunkcije unutar kaveola te do oštećenja u sinapsama i krvno-moždanoj barijeri (Żwierełło i sur., 2020). Zaštitni učinci polifenola proizlaze iz njihovog utjecaja na razinu i aktivnost antioksidacijskih enzima. Polifenoli suzbijaju toksične učinke PCB-a inducirajući ekspresiju gena koji kodiraju antioksidacijske enzime i koji posreduju u uklanjanju ROS-a, čime uspostavljaju oksido-redukcijsku ravnotežu te inhibiraju kaskadu proapoptotskih i proupalnih

signala (Slika 16) (Żwierełło i sur., 2020). Istraživanjima na polifenolima otkriveno je da uz to što štite od oksidacijskog stresa, upale i toksičnosti posredovanih PCB-ima, također vežu te spojeve te tako doprinose smanjenju tjelesnog opterećenja PCB-ima (Petriello i sur., 2014).



Slika 16. Utjecaj polifenola na toksičnost PCB-a (prema Żwierełło i sur., 2020)
[kratice: AChE: acetilkolinesteraza; AhR: aril ugljikovodični receptor; ARE: element antioksidacijskog odgovora; Bcl-2: *B-cell lymphoma 2* protein; Bad, Bax, Bid: pro-apoptotski Bcl-2 proteini; CAT: katalaza; CK: kreatin kinaza; CYP: citokrom P450; D1 – D5: receptori dopamina; EH: epoksid hidrolaza; Fas: FS7-površinski antigen; FasL: Fas ligand; GPx: glutation peroksidaza; GSH: glutation; GST: glutation S-transferaza; Hsp90: protein toplinskog šoka 90; ICAM: molekula intercelularne adhezije; Il: interleukin; JAM: spojna adhezijska molekula; MDA: malondialdehid; NF-κB: nuklearni faktor κB; Nrf-2: nuklearni faktor eritroid 2 povezan s faktorom 2; P: polifenoli; PCB: poliklorirani bifenili; p23: protein 23; p53: protein 53; ROS: reaktivne kisikove vrste; SOD: superoksid dismutaza; TNF: faktor nekroze tumora; VCAM: adhezijski protein vaskularnih stanica; XRE: element odgovora na ksenobiotik; ZO1-ZO2: zonula occludens proteini]

Postoje *in vitro* dokazi koji pokazuju zaštitni učinak antioksidanasa poput kvercetina i epigalokatehin-3-galata (EGCG) protiv upale izazvane PCB-em 77, a za vitamine C i E pokazano je da štite od oksidacijskog stresa uzrokovanoga PCB-ima (Gupta i sur., 2018). Istraživanje Murati i sur. (2017) pokazalo je da predinkubacija vitaminom E CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 i PCB-em 153 dovodi do smanjenja razine nastalog ROS-a (Murati i sur., 2017).

Polifenoli mogu djelovati i putem AhR i Nrf2 posredovanih mehanizama kako bi se spriječila upala izazvana PCB-ima (Chen i sur., 2017). EGCG i kvercetin inhibiraju stanični oksidacijski stres izazvan dioksinom i PCB-ima smanjenjem stvaranja ROS-a, modulacijom mehanizama AhR i NF-κB te regulacijom Nrf2-povezanih antioksidacijskih gena (Lagoa i sur.,

2020). Prema istraživanjima Hoffmana i Henninga (2017), konzumacija zelenog čaja može smanjiti oksidacijske i upalne reakcije povezane s izloženosti PCB-u 126 kroz regulaciju antioksidacijskih enzima. EGCG pokazuje epigenetsku regulaciju NF-κB ciljnih gena, smanjujući mehanizme upale endotelnih stanica izazvane PCB-em 126. Pokazano je da resveratrol djeluje na primarni receptor planarnih PCB-a, AhR, ograničava njegovu aktivaciju i naknadnu proupalnu signalnu kaskadu. EGCG može spriječiti crijevnu apsorpciju lipida i visoko lipofilnih organskih spojeva i potaknuti direktno izlučivanje PCB-a (Petriello i sur., 2014). Rezultati studije Baker i sur. (2013) pokazuju da suplementacija resveratrolom u potpunosti sprječava PCB-em 77 uzrokovano smanjenje inzulinske tolerancije. PCB 77 dovodi do izrazitog pada razine fosforilirane protein kinaze B (engl. *phosphorylated protein kinase B,* pAkt) enzima stimuliranog inzulinom u masnom tkivu, a taj je učinak inhibiran resveratrolom. U uzgojenim adipocitima PCB 77 povećao je oksidacijski stres i smanjio inzulinom stimulirane omjere pAkt/Akt te unos glukoze, a ovisno o koncentraciji resveratrola ti učinci PCB-a 77 su smanjeni. Rezultati također pokazuju da resveratrol smanjuje oksidacijski stres izazvan PCB-em 77 u masnom tkivu i istovremeno poboljšava signalizaciju Nrf2 (Baker i sur., 2013).

2.7. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Ispitivanja toksičnosti provode se u okviru sigurnosnih procjena za različite vrste kemikalija i proizvoda (Worth, 2019). Preklinička ispitivanja toksičnosti u različitim biološkim sustavima otkrivaju specifične toksične učinke ovisno o vrsti organizma, organu i dozi. Toksičnost tvari može se promatrati (i) proučavanjem slučajnih izloženosti određenoj tvari, (ii) *in vitro* testovima upotrebom stanica/staničnih linija, (iii) *in vivo* upotrebom pokusnih životinja (Parasuraman, 2011). Toksikološka ispitivanja mjere učinke ograničene izloženosti laboratorijske životinje jednokratnim dozama toksične tvari – akutna toksičnost (iritacija kože i oka, akutna sistemska toksičnost), kao i ponavljanim, dugotrajnim dozama – kronična toksičnost. Također ispituje se moguća citotoksičnost, genotoksičnost i mutagenost, kancerogenost, reproduktivna i razvojna toksičnost te teratogenost, toksikokinetika i alergenost (Zurlo i sur., 1994; Worth, 2019).

Testovi toksičnosti dijele se na klasične (*in vivo*) i alternativne (*in vitro*) testove (Parasuraman, 2011). Zamjena klasičnih testova na laboratorijskim životinjama s alternativnim testovima (lokalna toksičnost za kožu i oko, osjetljivost kože, genotoksičnost) postignuta je obzirom da metode u kojima se ne koriste životinje u velikoj mjeri pružaju informacije istovjetne onima dobivenim upotrebom klasičnih testova. Međutim, izravna zamjena testova na životinjama neće biti moguća i ne bi imala smisla za složenije krajnje točke, uključujući akutnu

sistemsku toksičnost, toksičnost ponovljenim dozama, kancerogenost te reprodukcijsku i razvojnu toksičnost (Worth, 2019).

2.7.1. Klasični (*in vivo*) testovi toksičnosti

Upotreba životinja u studijama toksičnosti započela je 1920-ih, kad je J. W. Trevan predložio upotrebu LD_{50} testa (engl. *lethal dose*) za određivanje smrtonosne doze pojedinih kemikalija (Parasuraman, 2011). Ispitivanje toksičnosti tradicionalno se provodi na velikom broju životinjskih vrsta, a određuje se doza ispitivane tvari pri kojoj 50% tretiranih životinja umire. U provedbi testova toksičnosti najčešće se koriste glodavci, ali i veće životinje, poput zečeva, pasa i primata. U svrhu zaštite okoliša, s ciljem određivanja učinaka na različitim razinama u ekosustavu, ispitivanja se provode na algama, bakterijama, biljkama, beskralješnjacima i ribama, ali i na insektima, crvima, vodozemcima i pticama. Samo su kralježnjaci zaštićeni zakonodavstvom o korištenju životinja u znanstvene svrhe te je za njihovo uključivanje u toksikološka istraživanja potrebno ishoditi dozvole etičkih povjerenstava (Worth, 2019).

Korištenje rezultata ispitivanja na životinjama za predviđanje utjecaja na zdravlje ljudi uključuje niz pretpostavki i ekstrapolacija koje su i danas predmetom rasprave. U konačnici, upotreba testnih životinja je skupa i dugotrajna, a postavljaju se i brojna etička pitanja (NRC, 2007). Iako se procjena toksičnosti na životinjskim modelima i dalje smatra zlatnim standardom, sve su veći zahtjevi za primjenom alternativnih modela procjene toksičnosti (Gosslau, 2017). Povećani interes i svakodnevni napredak u znanstvenoj zajednici doveli su do razvoja alternativnih metoda (Luck de Araújo i sur., 2014).

2.7.2. Alternativni (*in vitro*) testovi toksičnosti

Da bi se poboljšala znanstvena osnova trenutnih postupaka procjene rizika, potrebno je bolje razumijevanje mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama. Stoga je odgovor na to upotreba *in vitro* modela ispitivanja, koji istraživaču pružaju znatno veću kontrolu nad varijablama, a relativno je jednostavno, jeftino i učinkovito (Jain i sur., 2018). *In vitro* stanična kultura obećavajuća je i trenutno najuspješnija alternativa upotrebi životinja. Izolirane stanice, tkiva i organi mogu se pripremiti i održavati u kulturi metodama koje čuvaju svojstva i karakteristike tih stanica, tkiva i organa (Krishna i sur., 2014).

Začetnici *„3R koncepta“* (engl. *reduction, refinement, replacement*), objavljenog 1959. godine u knjizi *The Principles of Humane Experimental Technique,* su W. M. S. Russell i R. L. Burch (Luck de Araújo i sur., 2014; Tannenbaum i Bennett, 2015). *„3R koncept“* vodeće je načelo za upotrebu životinja u istraživanjima širom svijeta: (i) smanjenje (engl. ***r****eduction*) se odnosi na strategije koje omogućuju istraživačima usporedivu razinu informacija dobivenih od

manjeg broja životinja ili više informacija od istog broja životinja, (ii) poboljšanje (engl. ***r**efinement*) se odnosi na strategije koje ublažavaju ili minimiziraju potencijalnu bol, patnju ili stres i poboljšavaju dobrobit životinja, (iii) zamjena (engl. ***r**eplacement*) se odnosi na upotrebu alternativnih metoda kad god je to moguće (Krishna i sur., 2014). Kao dodatak postojećim *„R"*-ovima, CPCSEA (engl. *The Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals*) dodao je još jedan *„R"* za rehabilitaciju (engl. ***r**ehabilitation*). Četvrti *„R"* jasno odražava moralnu odgovornost istraživača prema životinjama nakon eksperimenata. Troškove rehabilitacije i naknadne njege pokusnih životinja trebalo bi uzeti u obzir pri izradi proračuna za istraživački projekt (Singh i sur., 2018).

In vitro toksikologija proučava toksikološke učinke na modelima poput dijelova tkiva, izoliranih organa, izoliranih primarnih kultura stanica, kulture eksplantata, staničnih linija, pa čak i na subcelularnim frakcijama poput mitohondrija, mikrosoma i membrana (Singh i sur., 2018). Stanice, kulture tkiva i organi koriste se u visoko kontroliranim testovima toksičnosti koji su često jeftiniji od klasičnih testova (Gallagher, 2003).

Tehnika kulture stanica započela je u 20. stoljeću kako bi se proučavalo ponašanje životinjskih stanica u laboratorijskim (*in vitro*) uvjetima. Tehnologija uključuje izolaciju stanica iz prirodnog okoliša te prijenos u *in vitro* okružje u prikladnom mediju za uzgoj (Gupta i sur., 2016). U sustavima stanične kulture cilj je stanice, koje su u tkivima u trodimenzionalnom okruženju, kultivirati *in vitro* u odgovarajućim uvjetima (Uysal i sur., 2017). Kulture stanica izolirane iz svježih tkiva čine primarnu kulturu stanica (Singh i sur., 2018). Primarna kultura može se smatrati takvom dok se uspješno ne subkultivira, kad postaje stanična linija (Ekwall i sur., 1990). Potreba subkultivacije javlja se kad je primarna kultura iskoristile sve hranjive tvari prisutne u mediju za uzgoj stanica i/ili (u slučaju monoslojnih kultura stanica) ukoliko stanice prerastu površinu posude za kultivaciju. Iz vrlo heterogene primarne kulture, koja sadrži mnoge vrste stanica prisutnih u izvornom tkivu, razvija se stanična linija (Freshney, 2011).

Stanične linije osiguravaju „*čistu*" populaciju stanica, što je bitno jer se dobivaju dosljedni uzorci i ponovljivi rezultati. Serijsko pasažiranje može uzrokovati genotipske i fenotipske varijacije pa stanične linije možda adekvatno ne predstavljaju primarne stanice i mogu dati različite rezultate. Drugi problem povezan sa staničnim linijama je onečišćenje drugim staničnim linijama i mikoplazmama (Kaur i Dufour, 2012). Stanične linije dijele se na konačne i kontinuirane stanične linije te linije matičnih stanica (Coecke i sur., 2005). Konačna stanična linija raste kroz ograničen broj staničnih dioba, obično između 20 i 80 udvostručenja stanične populacije prije faze senescencije. Stvarni broj udvostručenja ovisi o razlikama u vrsti, staničnoj liniji te o uvjetima uzgoja (Freshney, 2011). Kontinuirana stanična linija potječe iz primarnih

kultura stanica koje su transformirane spontano ili je transformacija izazvana virusima, kemijskim ili fizičkim agensima (Ekwall i sur., 1990). Prvu kontinuiranu staničnu liniju, tzv. *„L"* staničnu liniju (L929), iz potkožnog mišjeg tkiva uspostavio je W. R. Earle 1948. godine, a u 1950-ima i 60-ima uspostavljene su prve humane stanične linije (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Uvjeti uzgoja staničnih i tkivnih kultura u mnogočemu se razlikuju od onih *in vivo*. Ključni elementi *in vitro* uzgoja uključuju medij, suplemente odgovarajuće uvjete inkubacije (Coecke i sur., 2005). Tijekom razvoja staničnih linija u obzir se uzimaju različiti unutarnji (genetski) i vanjski (okolišni) faktori koji promiču i potiču rast stanica, produžuju održivost kulture i poboljšavaju specifičnu produktivnost (Kelly i sur., 2018). Postoje dva različita načina uzgoja stanica u kulturi – stanice koje se pričvršćuju na površinu posude za uzgoj (adherentne, monoslojne) stanice i stanice koje rastu u suspenziji. Većina stanica kralježnjaka, bilo u obliku primarnih kultura ili staničnih linija, pričvršćuje se za površinu posude za uzgoj. Stanice i stanične linije hematopoetskog podrijetla (najčešće limfociti) većinom rastu slobodno u suspenziji (Verhoeckx i sur., 2015).

Medij za uzgoj najvažnija je komponenta uzgoja jer osigurava potrebne hranjive tvari, faktore rasta i hormone za rast stanica, kao i faktore za regulaciju pH i osmotskog tlaka u kulturi. Tri osnovne skupine medija su bazalni medij (engl. *basal media*) koji se sastoji od ugljikohidrata, aminokiselina, soli, bikarbonata, vitamina i hormona, medij sa smanjenim udjelom seruma (engl. *reduced-serum media*) i medij bez seruma (engl. *serum-free media*) (Uysal i sur., 2017). Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast i razmnožavanje stanica u mediju za uzgoj potrebna je i prisutnost seruma, u količini od 5-20 %. Sadržaj seruma ovisi o tipu stanica, a sadrži faktore rasta, proteine (albumin, transferin, fibronektin, globulini), hormone (hidrokortizon, inzulin, tiroksin, trijodotironin), vitamine, različite hranjive tvari (glukoza, aminokiseline, poliamini), lipide (kolesterol, masne kiseline, fosfolipidi, linolenska kiselina), minerale (kalcij, željezo, kalij, kloridi, selen, natrij, cink, fosfat) i inhibitore pojedinih enzima (npr. proteaza). Serumi koji se koriste u kultivaciji staničnih linija su teleći, fetalni goveđi, konjski i ljudski, a najčešće se koriste teleći (engl. *calf serum*, CS) i fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Coecke i sur., 2005; Freshney, 2011). Neke od komponenata koje se mogu naći u serumu su imunoglobulini, endotoksini i hemoglobin (Coecke i sur., 2005). Serum sadrži i faktore adhezije te ispoljava antitripsinsku aktivnost (Freshney, 2011).

Osim zadovoljenja nutritivnih potreba, uzgoj staničnih linija zahtjeva strogo kontrolirane uvjete i aseptičke tehnike rada koji se osiguravaju primjenom laminara, a kultivacija stanica odvija se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom. Većina stanica sisavca zahtijeva

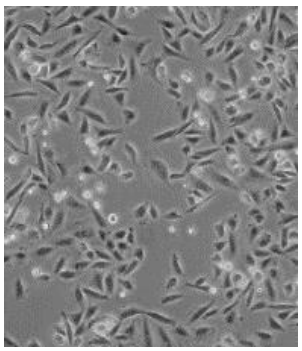
temperaturu uzgoja od 37°C, CO_2 u rasponu od 5 – 10% i relativnu vlažnost od 95% (Jedrzejczak-Silicka, 2017). Iako optimalni pH za stanični rast varira relativno malo između različitih staničnih linija, većina staničnih linija dobro raste pri pH 7,4 (Freshney, 2011).

3. MATERIJALI I METODE
3.1.MATERIJALI
3.1.1. Biološki materijali

U radu su korištene dvije adherentne stanične linije. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO-K1) i stanična linija hepatocelularnog karcinoma (engl. *Murine Hepatoma,* Hepa1-6).

3.1.1.1. CHO-K1 stanična linija

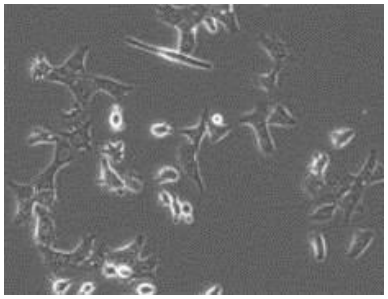
Originalnu CHO staničnu liniju generirao je dr. Theodore T. Puck 1956. godine kad je izolirao spontano imortalizirane fibroblaste iz kulture ovarija kineskog hrčka. CHO-K1 stanična linija (Slika 17) je izvedena iz subklona originalne stanične linije 1957. godine Ova stanična linija uzgaja se u Dulbecco's DMEM/F-12 mediju za uzgoj uz dodatak 5 – 20% FBS-a.



Slika 17. CHO-K1 (ATCC CCL-61) stanična linija (ATCC, 2020b)

3.1.1.2. Hepa1-6 stanična linija

Klon Hepa1-6 (Slika 18) izoliran je iz BW7756 tumora koji je nastao spontano u mišjem soju C57L/J. Ima široku primjenu u *in vitro* istraživanjima, okarakterizirane su zadržavanjem specifičnih svojstava jetre poput aktivnosti specifičnih jetrenih enzima (Darlington i sur., 1980). Uzgaja se u Dulbecco's DMEM mediju za uzgoj uz dodatak 5 - 20% FBS-a.



Slika 18. Hepa1-6 stanična linija (Imanis Life Sciences, 2020)

Stanične linije rastu u monosloju pa se za vrijeme subkultivacije podvrgavaju tretmanu tripsinom kako bi se odvojile od površine na kojoj rastu.

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (minimalni esencijalni medij s 15 mM HEPES-om, $NaHCO_3$ i piridoksinom), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (minimalni esencijalni medij s L-glutaminom, $C_3H_3NaO_3$, $NaHCO_3$ i 4500 mg L^{-1} glukoze), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Fetal Bovine Serum (FBS – fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
0,25 % *Trypsin-EDTA* 1X (tripsin – EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Resveratrol (RSV), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF), Laboratorij za organsku kemiju, PBF, Zagreb, RH
Kurkumin (CRC), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Ferocenski analog kurkumina (CF), Laboratorij za organsku kemiju, PBF, Zagreb, RH
Trypan Blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
Coomassie Brilliant Blue R-250, LKB, Bromma, Švedska
Kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, RH
Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika, Zagreb, RH
Dinatrijev hidrogenfosfat, bezvodni (Na_2HPO_4), Kemika, Zagreb, RH
Natrijev klorid (NaCl), Kemika, Zagreb, RH
Ledena octena kiselina (CH_3COOH), Kemika, Zagreb, RH
Apsolutni etanol (EtOH, C_2H_5OH), Alkaloid, Skoplje
Destilirana voda (dH_2O)
Neutralrot, E. Merck Ag – Darmstadt, Njemačka
DCFDA/H2DCFDA – Cellular ROS Assay Kit (ab113851, kit za detekciju ROS-a), Abcam, Cambridge, UK
Muse® Annexin V & Dead Cell Assay kit, kat. broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F-12	
SASTOJCI	**KONCENTRACIJA (mg L^{-1})**
AMINOKISELINE	
glicin	18,75
L-alanin	4,45
L-arginin hidroklorid	147,50
L-asparagin x H_2O	7,50

L-asparaginska kiselina	6,65
L-cistein hidroklorid x H_2O	17,56
L-cistein x 2HCl	31,29
L-glutaminska kiselina	7,35
L-glutamin	365,00
L-histidin hidroklorid x H_2O	31,48
L-izoleucin	54,47
L-leucin	59,05
L-lizin hidroklorid	91,25
L-metionin	17,24
L-fenilalanin	35,48
L-prolin	17,25
L-serin	26,25
L-treonin	53,45
L-triptofan	9,02
L-tirozin x 2Na x $2H_2O$	55,79
L-valin	25,85
VITAMINI	
biotin	0,0035
kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
folna kiselina	2,65
nikotinamid	2,02
piridoksin hidroklorid	2,00
riboflavin	0,219
tiamin hidroklorid	2,17
vitamin B_{12}	0,68
i-inozitol	12,60
ANORGANSKE SOLI	
$CaCl_2$	116,60
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,0013
$Fe(NO_3)_3$ x $9H_2O$	0,05
$FeSO_4$ x $7H_2O$	0,417
$MgCl_2$ x $6H_2O$	61,00
$MgSO_4$ x $7H_2O$	100,00
KCl	311,80
$NaHCO_3$	1200,00
NaCl	6995,50
Na_2HPO_4 x $7H_2O$	134,00
NaH_2PO_4 x H_2O	62,50

$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,432
OSTALI SASTOJCI	
D-glukoza	3151,00
HEPES	3075,40
hipoksantin x Na	2,39
linolna kiselina	0,042
lipoična kiselina	0,105
fenol crveno	8,10
putrescin x 2HCl	0,081
Na piruvat	55,00
timidin	0,365

Dulbecco's MEM	
SASTOJCI	**KONCENTRACIJA (mg L^{-1})**
AMINOKISELINE	
L-arginin hidroklorid	84,00
L-cistein x 2HCl	62,60
L-glutamin	584,00
glicin	30,00
L-histidin hidroklorid x H_2O	42,00
L-izoleucin	105,00
L-leucin	105,00
L-lizin hidroklorid	146,00
L-metionin	30,00
L-fenilalanin	66,00
L-serin	42,00
L-treonin	95,00
L-triptofan	16,00
L-tirozin x 2Na x $2H_2O$	103,79
L-valin	94,00
VITAMINI	
kolin klorid	4,00
folna kiselina	4,00
myo-inozitol	7,20
nikotinamid	4,00
D-Ca pantotenska kiselina	4,00
piridoksin hidroklorid	4,00
riboflavin	0,40
tiamin hidroklorid	4,00
ANORGANSKE SOLI	
$CaCl_2$	200,00

$Fe(NO_3)_3$ x $9H_2O$	0,10
$MgSO_4$ x $7H_2O$	97,70
KCl	400,00
$NaHCO_3$	1500,00
NaCl	6400,00
NaH_2PO_4 x H_2O	125,00
OSTALI SASTOJCI	
D-glukoza	4500,00
fenol crveno	15,00
Na piruvat	110,00

PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) pufer pH=7,4

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
dH_2O	do 1000 mL

0,4 %-tna otopina *Trypan Blue*

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL

- Profiltrirati

MTT *stock* otopina

MTT	25 mg
PBS pufer	5 mL

- Sterilno profiltrirati

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

Neutral Red	4 g
dH_2O	100 mL

- Sterilno profiltrirati

Radna otopina *Neutral Red*

stock otopina *Neutral Red*	125 µL
medij za uzgoj	100 mL

Otopina za odbojavanje *Neutral Red* boje

apsolutni etanol	50% (v/v)
ledena octena kiselina	1% (v/v)
dH_2O	49% (v/v)

Otopina za fiksiranje stanica (*Kenacid Blue* metoda)

apsolutni etanol	50% (v/v)
ledena octena kiselina	1% (v/v)
dH_2O	49% (v/v)

Kenacid Blue R _stock_ otopina

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,4 g
apsolutni etanol	250 mL
dH_2O	630 mL

radna otopina _Kenacid Blue_ boje

Kenacid Blue R stock otopina	88 mL
ledena octena kiselina	12 mL

Otopina za ispiranje _Kenacid Blue_ boje

apsolutni etanol	10%
ledena octena kiselina	5%
dH_2O	85%

Otopina za desorpciju

kalijev acetat	98,15 g
apsolutni etanol	700 mL
dH_2O	300 mL

Ishodna otopina PCB 77

PCB 77	10 mg
DMSO	3,425 mL

Ishodna otopina PCB 153

PCB 153	10 mg
DMSO	2,77 mL

- Pripremljena je otopina PCB 77/PCB 153 tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija 75 µM

Ishodna otopina resveratrola (RSV)

resveratrol (RSV)	13,6944 mg
DMSO	3 mL

- Pripremljene su otopine resveratrola (RSV) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija 1 – 100 µM

Ishodna otopina ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF)

ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF)	59,4348 mg
DMSO	3 mL

- Pripremljene su otopine ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 1 – 100 µM

Ishodna otopina kurkumina (CRC)

kurkumin (CRC)	22,1028 mg
DMSO	3 mL

- Pripremljene su otopine kurkumina (CRC) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 1 – 100 µM

Ishodna otopina ferocenskog analoga kurkumina (CF)

ferocenski analog kurkumina (CF)	24,2544 mg
DMSO	3 mL

- Pripremljene su otopine ferocenskog analoga kurkumina (CF) tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 1 – 100 µM

3.1.4. Oprema i uređaji

U radu su korišteni:

Inkubator s kontroliranom atmosferom IR 1500, Automatic CO_2, Flow Laboratories, UK
Komora za sterilan rad (laminar) Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, UK
Inverzni mikroskop Motic AE2000 s kamerom Moticam S6, MOTIC Deutschland GmbH, Njemačka
Svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica Assistant, Bright-Line, Njemačka
Spektrofotometar Helios- γ, Thermo Electron Corporation, UK
Spektrofluorimetar Varian, Cary Eclipse, SAD
Analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
Precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
Centrifuga Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
Guava® Muse® Cell Analyzer, Luminex, SAD
Hladnjak za čuvanje stanica na -80°C, New Brunswick Scientific, UK
Vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj i održavanje CHO-K1 i Hepa1-6 staničnih linija

Rad s kulturama stanica zahtijeva aseptičke uvjete, koje osigurava rad u komori za sterilan rad (laminar). Stanične linije pohranjene su u ampulama (CHO-K1 – 5×10^6 stanica mL^{-1} medija za uzgoj; Hepa1-6 – 1×10^6 stanica mL^{-1} medija za uzgoj) u hladnjaku na -80°C u mediju za smrzavanje (za CHO-K1 80% DMEM/F12; Hepa1-6 80% DMEM) uz dodatak 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Uzgoj i održavanje staničnih linija započinje naglim odmrzavanjem ampula na 37°C, nakon čega slijedi resuspenzija u mediju za uzgoj (90% odgovarajućeg medija i 10% FBS-a) u T-25 ili T-75 bocama (površine 25 i 75 cm^2) te se smještaju u inkubator s kontroliranom atmosferom (37°C, 95% zraka i 5% CO_2).

Kako bi se stanicama osigurale potrebne hranjive tvari i mjesto za rast, nakon uspostave logaritamske faze rasta, potrebno je redovito mijenjati medij za uzgoj i precjepljivati stanice. Korištene stanične linije su monoslojne i rastu pričvršćene za podlogu te ih je pri precjepljivanju potrebno odvojiti od površine na kojoj rastu. Prvi korak je ispiranje T-boce od ostatka iskorištenog medija za uzgoj primjenom PBS-a ili proteolitičkog enzima tripsina, potom se na stanice dodaje 1 mL tripsina i stavlja na kratku inkubaciju. Nakon što se stanice odvoje od površine T-boce, resuspendiraju se u novom mediju za uzgoj te se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue* (TB). Dodatkom svježeg medija za uzgoj, stanice se razrjeđuju na koncentraciju 1×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj.

Smrzavanjem stanica u eksponencijalnoj fazi rasta osigurava se mogućnost njihovog korištenja kroz duži vremenski period. Smrzavanje se vrši na način da se stanična suspenzija centrifugira i potom resuspendira u mediju za smrzavanje u odgovarajućoj koncentraciji. U ampule za smrzavanje stavlja se po 1 mL stanične suspenzije i postupnim snižavanjem temperature od 1°C/min smrzavaju na temperaturu od -80°C.

3.2.2. Metode za određivanje vijabilnosti i proliferacije stanica

3.2.2.1. Određivanje proliferacije stanica metodom Neutral Red (NR)

Neutral Red boja ($C_{15}H_{17}ClN_4$) je slaba kationska boja koja neionskom pasivnom difuzijom prodire kroz staničnu membranu i akumulira se intracelularno u lizosomima vijabilnih stanica, gdje se elektrostatskim hidrofobnim vezama veže za anionske i/ili fosfatne grupe lizosomalnog matriksa. Promjenom stanične površine ili umiranjem stanice, sposobnost zadržavanja boje se smanjuje (Repetto i sur., 2008; Jain i sur., 2018). Ova kemosenzibilna metoda za određivanje stanične vijabilnosti (Jain i sur., 2018) razvijena je 1985. godine od strane Borenfreuda i Puernera kao alternativni test za utvrđivanje toksičnosti potencijalnih ksenobiotika (Borenfreud i Puerner, 1985). Metoda je jednostavna i točna te daje reproducibilne rezultate. Metoda započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica *multiwell* ploča te ispiranjem stanica s 1 mL sterilnog PBS pufera (uklanjanje ostataka medija za uzgoj koji može utjecati na rezultate mjerenja). Potom se u svaku jažicu dodaje 1 mL radne otopine *Neutral Red* boje i stavlja 3 sata na inkubaciju pri 37°C u sterilnim uvjetima. Nakon inkubacije iz jažica *multiwell* ploča uklanja se otopina boje te se stanice ispiru s 1 mL PBS pufera. Na isprane stanice dodaju se 2 mL otopine za odbojavanje te se ploče stavljaju na tresilicu u trajanju od 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.2.2. Određivanje proliferacije stanica metodom Kenacid Blue (KB)

Coomassie Brilliant Blue R-250 boja ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) prolazi kroz staničnu membranu i veže se na stanične proteine. *Kenacid Blue* metodom određuju se ukupni stanični proteini mjerenjem obojenja stanica bojom *Coomassie Brilliant Blue R-250.* Metodu je 1976. godine opisao Bradford kao alternativni test za praćenje potencijalnih toksikanata u ispitivanju toksičnosti (Bradford, 1976). Količina boje koja se veže na stanične proteine određuje stupanj citotoksičnosti uzrokovane ispitivanim agensom (Putnam i sur., 2002). Metoda je točna i jednostavna te daje reproducibilne rezultate. Metoda započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica *multiwell* ploča te ispiranjem stanica dva puta s 1 mL PBS pufera (uklanjanje ostataka

medija za uzgoj koji može utjecati na rezultate mjerenja). Nakon ispiranja stanica, dodaje se 1 mL otopine za fiksiranje kako bi se stanice fiksirale za dno jažice tijekom 20 minuta na tresilici pri nižim brzinama. Nakon uklanjanja otopine za fiksiranje, u jažice se dodaje 1 mL radne otopine *Kenacid Blue* boje pripremljene neposredno prije eksperimenta. Bojanje se provodi 20 minuta na tresilici. Nakon bojanja, stanice se ispiru dva puta s po 1 mL otopine za ispiranje i opet stavljaju na tresilicu. Nakon 20 minuta, uklanja se otopina za ispiranje i u jažice se dodaje po 2 mL otopine za desorpciju i ploče se ostave 20 minuta na tresilici. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.2.3. Određivanje proliferacije stanica metodom MTT

Tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid, $C_{18}H_{16}BrN_5S$) je u vodi topljiva sol žute boje (Patravale i sur., 2012). MTT endocitozom ulazi u žive, metabolički aktivne stanice gdje se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza, prvenstveno sukcinat dehidrogenaze, reducira u ljubičaste kristale formazana koji nisu topljivi u vodi (Kuete i sur., 2017; Rai i sur., 2018). Za otapanje kristala formazana koristi se organsko otapalo (najčešće DMSO) (Jain i sur., 2018). Tetrazolijev prsten se cijepa u aktivnom mitohondriju. Stoga, kad stanica umre, gubi sposobnost pretvorbe MTT-a u formazan, pa je nastalo obojenje koristan alat u detekciji broja živih stanica (Mosmann, 1983; Riss i sur., 2013). Metoda započinje sterilnim dodavanjem ishodne otopine MTT-a u jažice *multiwell* ploče u kojima je nacijepljena stanična kultura (na 1 mL stanične suspenzije dodaje se 100 µL ishodne otopine MTT-a). Ploče se potom stavljaju na inkubaciju pri 37°C u sterilnim uvjetima. Nakon 3 sata inkubacije iz jažica *multiwell* ploča uklanja se medij kako bi u jažicama ostali formirani kristali formazana. Nastali kristali otapaju se dodatkom DMSO-a (volumen istovjetan volumenu u kojem su stanice bile nacijepljene u jažice). Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.2.4. Određivanje proliferacije stanica metodom Trypan Blue (TB)

Prvi puta sintetizirana 1904. godine (Paul Ehrlich), *Trypan Blue* boja ($C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$) je molekula koja prolazi samo kroz oštećenu staničnu membranu. *Trypan Blue* metodom stanična vijabilnost određuje se indirektno detekcijom integriteta stanične membrane. Ulaskom u stanice, boja se veže na intracelularne proteine mrtvih stanica te se pod svjetlosnim mikroskopom one uočavaju kao plave, dok su žive stanice neobojane (Piccinini i sur., 2017). Uzorak (20 µL) uzima se iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica te mu se dodaje 20 µL 0,4%-tne otopine *Trypan Blue* boje. Takav uzorak resuspendiramo i 20 µL nanosimo na Fuchs-

Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica. Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je na 16 kvadrata, a broje se stanice unutar četiri središnja kvadrata i to na način da se u svakom kvadratu uz stanice unutar kvadrata broje i stanice da desnom i donjem rubu. Površina komorice iznosi 0,0625 mm^2, a dubina 0,2 mm. Za određivanje ukupnoga broja živih stanica u uzorku koristi se formula: srednja vrijednost broja izbrojanih stanica × 2 × 5 × 10^3 [stanica mL^{-1}]

3.2.3. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 i Hepa1-6 stanica

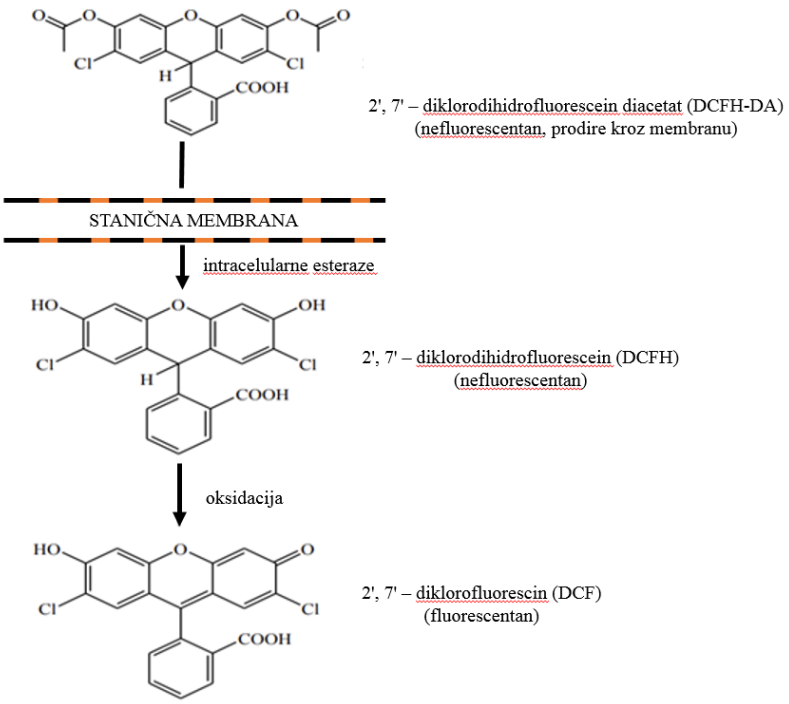
U svaku od 6 jažica na *multiwell* ploči nacijepljeno je po 2 mL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj, te Hepa1-6 stanica u DMEM uz dodatak 10 % FBS-a u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Tretman stanica s 10 µL otopine RSV-a ili CRC-a, kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 35; 50; 75 i 100 µM spoja, uslijedio je 24 sata nakon nacjepljivanja. Kontrolni uzorak su stanice (CHO-K1, Hepa1-6) tretirane s 10 µL DMSO-a kako bi se u mediju za uzgoj postigla koncentracija od 10 µL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj. Vijabilnost stanica prati se svaka 24 sata metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB* kroz 72 sata. Izračunom IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti te usporedbom dinamike rasta tretiranih stanica i kontrolnog uzorka, donose se zaključci o utjecaju odabranih polifenolnih spojeva na CHO-K1 i Hepa1-6 staničnu liniju.

3.2.4. Određivanje učinka ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 i Hepa1-6 stanica

U svaku od 6 jažica na *multiwell* ploči nacijepljeno je po 2 mL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj, te Hepa1-6 stanica u DMEM uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji 5×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Tretman stanica s 10 µL otopine RF-a ili CF-a kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 35; 50; 75 i 100 µM spoja, uslijedio je 24 sata nakon nacjepljivanja. Kontrolni uzorak su stanice (CHO-K1, Hepa1-6) tretirane s 10 µL DMSO-a kako bi se u mediju za uzgoj postigla koncentracija od 10 µL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj. Vijabilnost stanica prati se 48 sati nakon tretmana metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*. Izračunom IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti te usporedbom dinamike rasta tretiranih stanica i kontrolnog uzorka, donose se zaključci o utjecaju odabranih ferocenskog analoga polifenolnih spojeva na CHO-K1 i Hepa1-6 staničnu liniju.

3.2.5. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama

Brojne metode se koriste za procjenu oksidirajućeg okoliša unutar stanice. Jedna od najčešće korištenih metoda je DCFH-DA metoda (Shaaban, 2011). Mjerenje ROS-a provelo se upotrebom *DCFDA/H2DCFDA – Cellular ROS Assay Kit*-a u kojemu se kao reagens koristi DCFH-DA (2', 7' – diklorodihidrofluorescein diacetat), fluorogena boja koja mjeri hidroksilne, peroksilne i druge ROS unutar stanice. Test se temelji na difuziji DCFH-DA u stanicu, gdje se deacetilira staničnim esterazama u nefluorescentni spoj, kojeg oksidiraju prisutni ROS spojevi u intenzivno fluorescentni DCF (2', 7' – diklorofluorescin) (Slika 19) (Banella i sur., 2019).



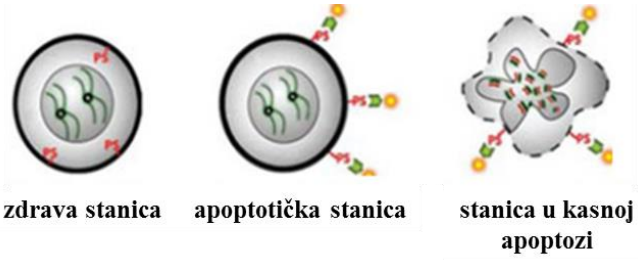
Slika 19. Formiranje fluorescentnog spoja DCF (prema Shaaban, 2011)

Na *multiwell* ploču tamnog dna s 96 jažica nacijepi se po 100 µL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 stanica uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji $2{,}5\times10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 24 sata stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice dodaje se 100 µL DCFH-DA u koncentraciji od 25 µM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama polifenola (RSV ili CRC) ili otopinama ferocenskog analoga polifenolnog spoja (RF ili CF) u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5; 20; 50 i 100 µM. Potom se provodi inkubacija od 3 sata u inkubatoru pri 37°C nakon koje se na spektrofluorimetru izmjeri intenzitet fluorescencije pri $\lambda_{ex/em}$ = 485/535 nm. Kontrolni uzorak su stanice tretirane istim

volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol, a kao pozitivna kontrola koristi se 50 μM TBHP (*tert*-butil hidroperoksid).

3.2.6. Analiza stanične smrti nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom, kurkuminom, ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola ili ferocenskim analogom kurkumina

Dobro utvrđena metoda za određivanje apoptoze je kvantifikacija vezanja aneksina V na fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*, PS) (Lee i Lee, 2012). Aneksin V je Ca^{2+}-ovisan fosfolipid-vezujući protein i ima visoki afinitet za PS, membransku komponentu koja je normalno lokalizirana na unutarnjoj strani stanične membrane (Luminex Corporation, 2020). Međutim, kod stanica u ranoj apoptozi PS se premješta na vanjski sloj membrane te se aneksin V veže na njega označavajući tako stanice u ranoj apoptozi (Slika 20) (Oh i sur., 2016).



Slika 20. Kombinirana upotreba Aneksina V i 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) omogućava razlikovanje živih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (prema Luminex Corporation, 2020)

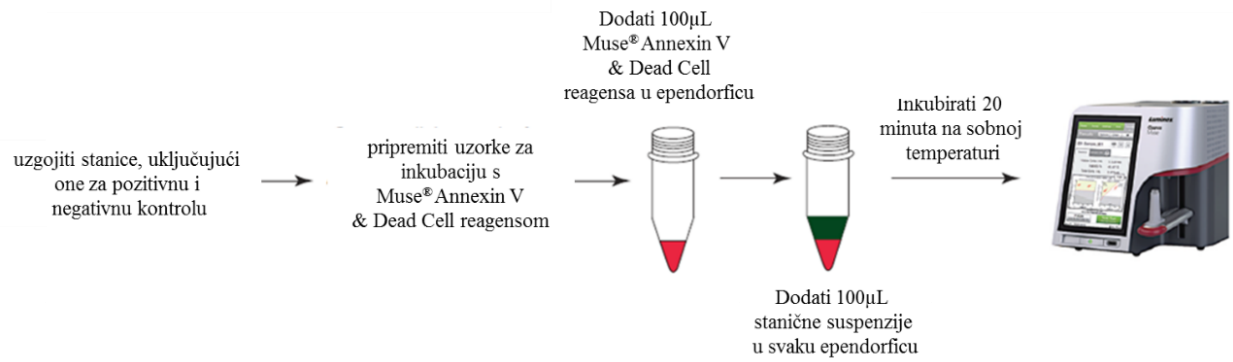
7- AAD je fluorescentna boja koja se izlučuje iz živih stanica s netaknutim membranama, ali prodire u mrtve ili oštećene stanice i veže se za dvolančanu DNA s visokim afinitetom interkalacije između G-C parova baza. Često se koristi kao alternativa propidijevom jodidu za razlikovanje i isključivanje mrtvih stanica u analizama protočnim citometrom (Stemcell Technologies, 2020). Budući da prodire kroz membranu koja je izgubila integritet i veže se za DNA, ova boja omogućuje identifikaciju tri odvojene populacije stanica - mrtvih, apoptotskih i živih (Anthony i sur., 1998; Oh i sur., 2016).

3.2.6.1. Priprema stanica za analizu MUSE® protočnim citometrom

Multiwell ploča sa 6 jažica nacijepi se s po 4 mL stanične suspenzije (CHO-K1 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj, uz dodatak 10% FBS-a). Nakon inkubacije od 24 sata, stanice se tretiraju s 20 μL otopine polifenolnog spoja (RSV ili CRC) ili ferocenskog analoga polifenolnog spoja (RF ili CF), kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 μM spoja. Kontrolni uzorak su stanice tretirane s 20 μL DMSO-a kako bi se u mediju za uzgoj postigla koncentracija od 10 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj. Nakon 6 odnosno 48 sati inkubacije s

odabranim spojem, metodom protočne citometrije određuje se udio živih, nekrotičnih i apoptotskih stanica u populaciji.

Iz jažica *multiwell* ploče ukloni se medij za uzgoj te se na stanice dodaje 500 µL tripsina i takve ploče vraćaju se u inkubator na kratku inkubaciju kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon što se stanice odvoje od podloge, u jažice se vraća 500 µL uklonjenog medija za uzgoj. Uzorak za analizu protočnim citometrom dobiva se miješanjem 100 µL dobivene stanične suspenzije sa 100 µL *MUSE® Annexin V & Dead Cell* reagensa. Slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla u trajanju od 20 minuta. Stavljanjem uzorka u uređaj, na ekranu se očitavaju podaci o broju živih, mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (Slika 21).



Slika 21. Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (prema Luminex Corporation, 2020)

3.2.7. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima kongenerima u CHO-K1 stanicama

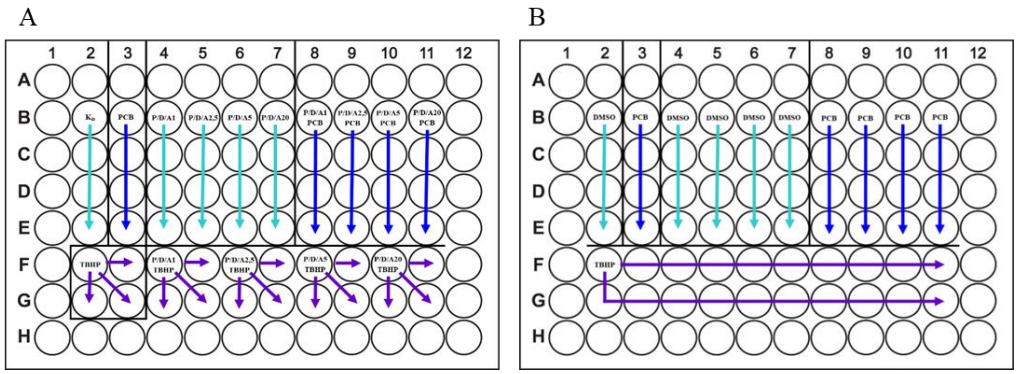
U svaku od 6 jažica na *multiwell* ploči nacijepljeno je po 2 mL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj uz dodatak 10% FBS-a. Tretman stanica s 10 µL otopine polifenola (RSV ili CRC) ili otopine ferocenskog analoga polifenolnog spoja (RF ili CF), tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 2,5; 10 i 20 µM (RSV), 1; 2,5; 5; 10 i 20 µM (CRC), 2,5; 5; 10; 20; 35; 50; 75 i 100 µM (RF), te 1; 2,5; 5; 10 i 20 µM (CF), uslijedio je 1 sat nakon nacjepljivanja. Nakon 24 sata predinkubacije s odabranim spojem, uslijedio je tretman s 20 µL odabranog PCB kongenera (PCB 77 ili PCB 153) u koncentraciji od 75 µM (Shema 1). Kontrolni uzorak su stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol, tj. ferocenski analog polifenolnog spoja te stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen PCB kongener. Tako tretirane stanice vraćene su na dodatnu 24-satnu inkubaciju. Vijabilnost stanica prati se 24 sata nakon tretmana PCB kongenerom, tj. 48 sati nakon predinkubacije polifenolom, tj. ferocenskim analogom metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*.

	DMSO	POLIFENOL/ANALOG**	PCB 77*	PCB 153*
kontrolni uzorci	+			
kontrolni uzorci (PCB 77/PCB 153)	+		+	+
uzorci predinkubirani polifenolom/ferocenskim analogom, a potom PCB 77		+	+	
uzorci predinkubirani polifenolom/ferocenskim analogom, a potom PCB 153		+		+

Shema 1. Praćenje učinka odabranih polifenolnih spojeva i ferocenskih analoga pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na vijabilnost CHO-K1 stanične linije (*otopine PCB 77/PCB 153 pripremljene u DMSO-u; po jažici dodano 20 µL pri čemu je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija 75 µM PCB 77/PCB 153; **otopine polifenola, tj. ferocenskog analoga polifenolnog spoja pripremljene u DMSO-u; po jažici dodano 10 µL pri čemu je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija RSV2,5 – 20 µM, CRC1 – 20 µM, RF2,5 – 100 µM, CF1 – 20 µM)

3.2.8. Određivanje učinka resveratrola i kurkumina te ferocenskog triacilnog derivata resveratrola i ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih PCB kongenerima

Na *multiwell* ploču tamnog dna s 96 jažica nacijepi se po 100 µL stanične suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji $2{,}5\times10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj u DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a i polifenola, tj. ferocenskog analoga polifenolnog spoja tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1; 2,5; 5 i 20 µM odabranog spoja. Nakon 24 sata stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice dodaje se 100 µL DCFH-DA u koncentraciji od 25 µM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama PCB kongenera tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75 µM odabranog PCB kongenera (Shema 2). Potom se provodi inkubacija od 3 sata u inkubatoru pri 37°C nakon koje se na spektrofluorimetru izmjeri intenzitet fluorescencije pri $\lambda_{ex/em}$ = 485/535 nm. Kontrolni uzorak su stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol, tj. ferocenski analog polifenolnog spoja te stanice tretirane samo PCB kongenerom, kao pozitivna kontrola koristi se 50 µM TBHP.



Shema 2. Praćenje učinka odabranog polifenola/ferocenskog analoga polifenolnog spoja na razinu ROS-a u CHO-K1 staničnoj liniji pri tretmanu odabranim PCB kongenerima

A – 1. dan:

K_D – stanice u mediju za uzgoj + DMSO (5 μL mL^{-1})

PCB – stanice u mediju za uzgoj + DMSO (5 μL mL^{-1})

TBHP – stanice u mediju za uzgoj

P/A1 – P/A20 – stanice u mediju za uzgoj + odgovarajuća koncentracija polifenola/ferocenskog analoga polifenolnog spoja (1; 2,5; 5; 20 μM – 5 μL mL^{-1})

P/A1/PCB – P/A20/PCB – stanice u mediju za uzgoj + odgovarajuća koncentracija polifenola/ferocenskog analoga polifenolnog spoja (1; 2,5; 5; 20 μM – μL mL^{-1})

P/A1/TBHP – P/A20/TBHP – stanice u mediju za uzgoj + odgovarajuća koncentracija polifenola/ferocenskog analoga polifenolnog spoja (1; 2,5; 5; 20 μM – μL mL^{-1})

B – 2. dan:

DMSO – medij za uzgoj + DMSO (10 μL mL^{-1})

PCB – medij za uzgoj + 75 μM PCB (77 ili 153) (10 μL mL^{-1})

TBHP – 50 μM

3.2.9. Analiza stanične smrti CHO-K1 stanica tretiranih PCB kongenerima uz predinkubaciju s resveratrolom, kurkuminom, ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola ili ferocenskim analogom kurkumina

3.2.9.1. Priprema stanica za analizu MUSE® protočnim citometrom

Multiwell ploča sa 6 jažica nacijepi se s po 4 mL stanične suspenzije (CHO-K1 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj uz dodatak 10% FBS-a). Nakon inkubacije od 1 sata, stanice se tretiraju s 20 μL otopine polifenola, tj. ferocenskog analoga polifenolnog spoja, kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 μM spoja. Nakon 24 sata predinkubacije odabranim polifenolom, tj. ferocenskim analogom polifenolnog spoja, uslijedio je tretman s 20 μL odabranog PCB kongenera (PCB 77 ili PCB 153) u koncentraciji od 75 μM (Shema 1). Kontrolni uzorak su stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol, tj. ferocenski analog polifenolnog spoja te stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen PCB kongener (Shema 1). Nakon 48 sati inkubacije s odabranim PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153), metodom protočne citometrije određuje se udio živih, apoptotskih i nekrotičnih stanica u populaciji.

Postupak uzimanja uzorka i provođenja analize opisan je u poglavlju *3.2.5.1.*

4.3.STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (x) uzoraka u skupini:

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

s pripadajućim standardnim pogreškama S_x:

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

izračunate iz pojedinačne vrijednosti uzoraka (x_i) i ukupnog broja uzoraka (N) u skupini.

Statistička analiza provedena je Studentovim *t*-testom, a t vrijednost izračunata je prema izrazu:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2_{\bar{x}_1} + S^2_{\bar{x}_2}}} \qquad [3]$$

Statistički značajnim su smatrane razlike između skupina za koje je stupanj vrijednosti (p) bio manji od 0,05 ($p<0,05$).

Studentov *t*-test proveden je samo na skupinama s više od 2 uzorka, gdje je značajno odstupanje određivano u odnosu na vrijednosti kontrole uz dodatak otapala.

4. REZULTATI

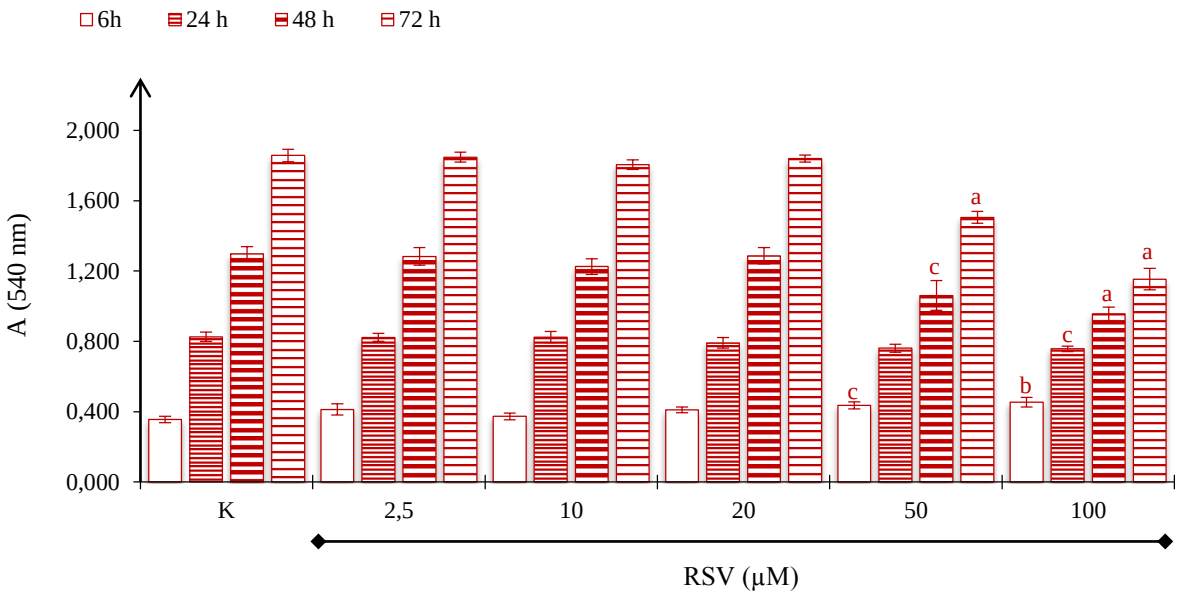
4.1. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA

U svrhu selekcije biološki aktivnih tvari sa zaštitnim učincima na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10 µL otopine RSV-a ili CRC-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 2,5 – 100 µM (RSV) te 1 – 100 µM (CRC). Uz učinak odabranih polifenola na vijabilnost stanica, prati se i vijabilnost stanica u kontrolnim uzorcima kojima se dodaje 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. Učinci odabranih koncentracija RSV-a i CRC-a na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica praćeni su upotrebom četiri *in vitro* metode: *NR*, *KB*, *MTT* te *TB* tijekom 72 sata. Svakom od metoda utvrđene su koncentracije RSV-a i CRC-a pri kojima dolazi do 20, 50 i 80%-tne inhibicije stanične vijabilnosti (IC_{20}, IC_{50}, IC_{80}).

4.1.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 2,5 – 100 µM RSV-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je upotrebom *NR* metode 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 22 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Na Slici 22 vidljivo je da su 6 sati nakon tretmana sve ispitane koncentracije RSV-a dovele do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti, dok je nakon 48 i 72 sata kod koncentracija ≥ 50 µM uočen statistički značajan pad vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak (pri 50 µM nakon 48h ($p<0,05$) i 72h ($p<0,001$), pri 100 µM nakon 48h ($p<0,001$) i 72h ($p<0,001$)). Nakon 6 sati tretmana statistički značajan porast u staničnoj vijabilnosti uočava se pri najvećim ispitanim koncentracijama RSV-a od 50 ($p<0,05$) i 100 µM ($p<0,025$) za 22,47%, odnosno 27,53% u odnosu na kontrolu.

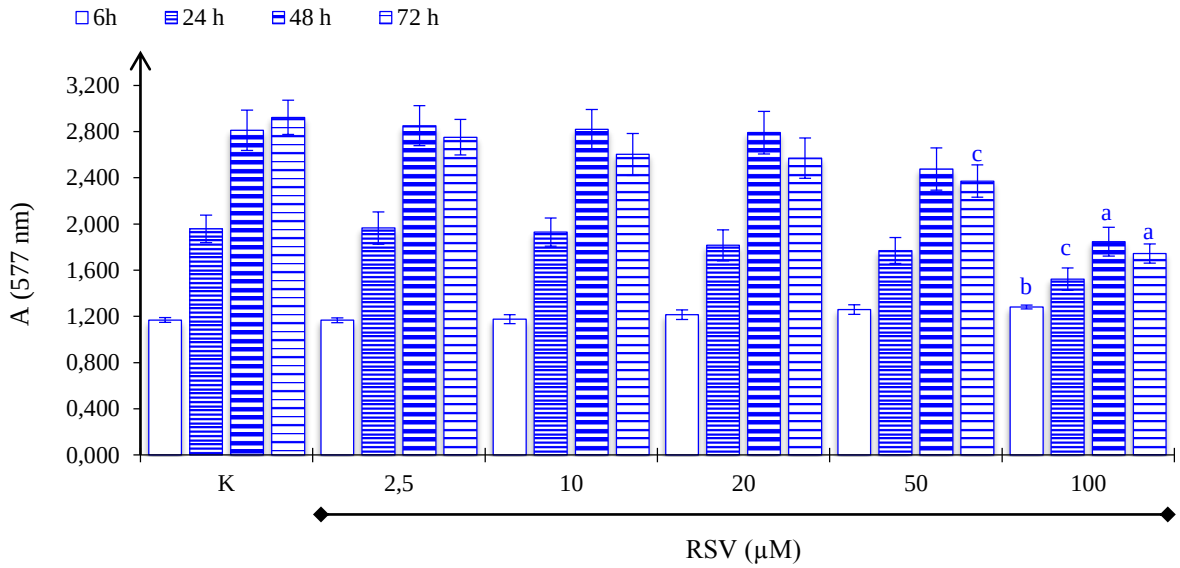


Slika 22. Učinak resveratrola (RSV2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,05$, $^{b}p<0,025$, $^{a}p<0,001$.

4.1.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 2,5 – 100 μM RSV-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *KB* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 23 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (3 – 12 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 23 vidljivo je da nakon 6 sati ispitane koncentracije RSV-a od 10 – 50 μM nisu utjecale na vijabilnost stanica (osim blagog, no statistički značajnog porasta pri 100 μM), dok je nakon 24, 48 i 72 sata uočljiv trend pada u vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak, a koji je izraženiji pri višim dozama. Do statistički značajnog ($p<0,01$) porasta stanične vijabilnosti dolazi pri najvećoj ispitanoj koncentraciji RSV-a od 100 μM 6 sati nakon tretmana za 9,70% u odnosu na kontrolni uzorak, dok do statistički značajnog pada stanične vijabilnosti dolazi pri koncentraciji RSV-a od 50 μM nakon 72 sata ($p<0,025$) te 100 μM nakon 24 ($p<0,025$), 48 ($p<0,001$) i 72 sata ($p<0,001$).

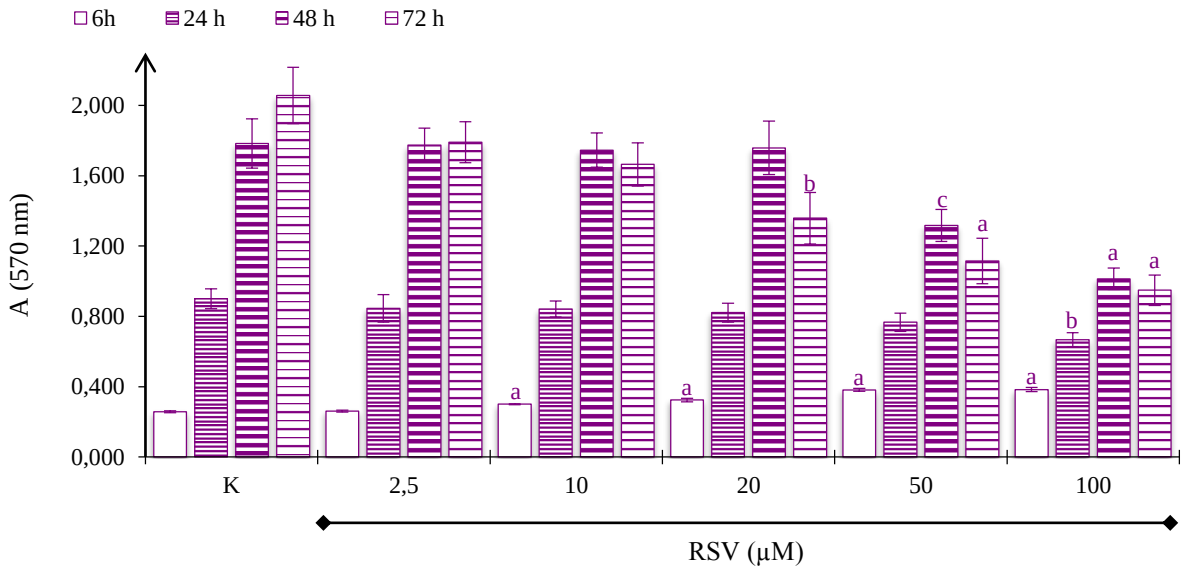


Slika 23. Učinak resveratrola (RSV2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$.

4.1.3. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 2,5 – 100 μM RSV-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 24 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (5 – 8 mjerenja po uzorku).

Iz prikaza na Slici 24 vidljivo je da su 6 sati nakon tretmana sve ispitane koncentracije RSV-a dovele do porasta u staničnoj vijabilnosti, dok se nakon 24, 48 i 72 sata uočava trend pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak. Do statistički značajnog ($p<0,001$) porasta dolazi pri koncentracijama RSV-a od 10 – 100 μM 6 sati nakon tretmana za 17,00 – 49,42% u odnosu na kontrolu, dok do statistički značajnog pada stanične vijabilnosti dolazi pri koncentraciji RSV-a od 20 μM nakon 72 sata ($p<0,01$), 50 μM nakon 48 ($p<0,025$) i 72 sata ($p<0,001$) te 100 μM nakon 24 ($p<0,01$), 48 ($p<0,001$) i 72 sata ($p<0,001$).

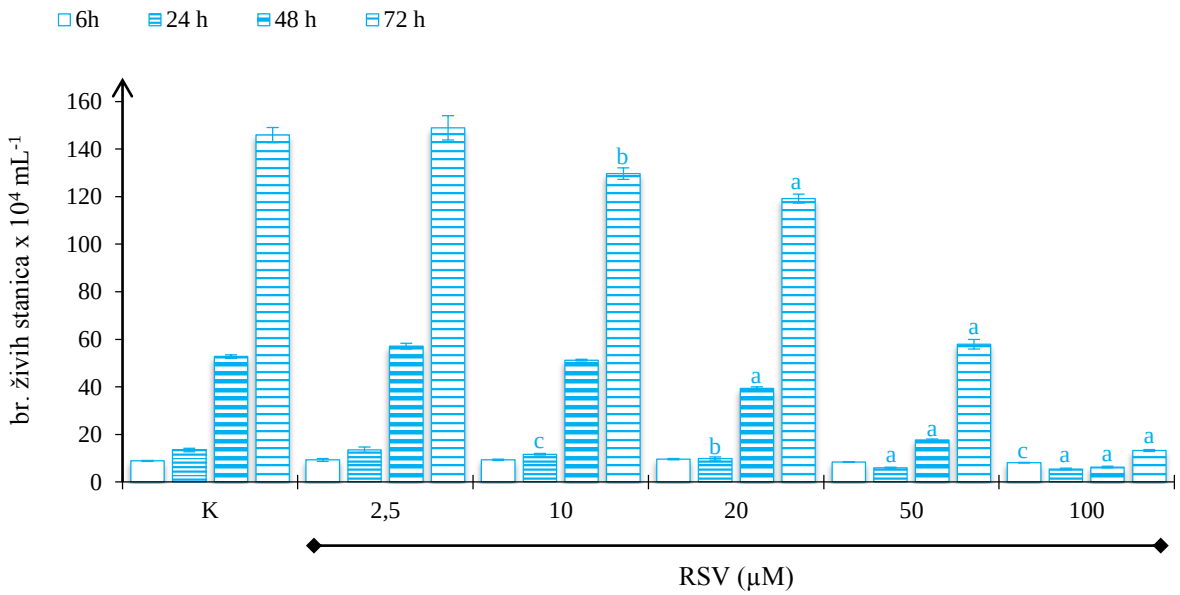


Slika 24. Učinak resveratrola (RSV2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$.

4.1.4. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 2,5 – 100 μM RSV-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je metodom *TB* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 25 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (5 – 13 mjerenja po uzorku).

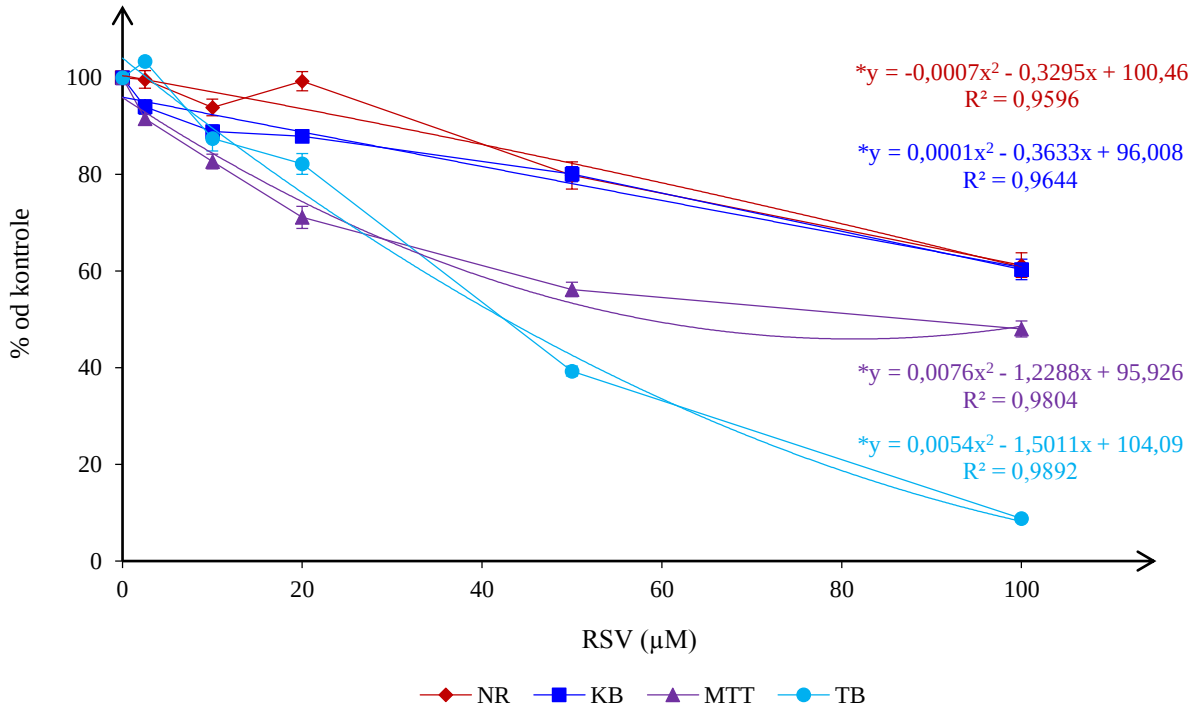
Iz slike 25 vidljivo je da 6 sati nakon tretmana stanica nižim koncentracijama RSV-a (2,5 – 20 μM) ne dolazi do promjena u staničnoj vijabilnosti. Međutim, pri višim koncentracijama (50 i 100 μM) vidljiv je blagi pad u staničnoj vijabilnosti s tim da je pri 100 μM taj pad statistički značajan ($p<0,05$). U odnosu na kontrolni uzorak, 24 sata nakon tretmana, koncentracije RSV-a od 10 – 100 μM dovele su do pada vijabilnosti CHO-K1 stanica, a učinak je izraženiji nakon 48 i 72 sata. Do statistički značajnog pada stanične vijabilnosti dolazi pri koncentracijama RSV-a od 20 μM (nakon 24h $p<0,005$, nakon 48h $p<0,001$), 50 μM (nakon 24, 48 i 72h $p<0,001$) i 100 μM (nakon 24, 48 i 72h $p<0,001$), dok se statistički značajan ($p<0,001$) pad stanične vijabilnosti uočava i pri koncentraciji od 10 μM nakon 24 ($p<0,05$) i 72 sata ($p<0,005$).



Slika 25. Učinak resveratrola (RSV2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,05$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.1.5. IC vrijednosti za resveratrol na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue*

Iz prikaza ovisnosti preživljenja CHO-K1 stanica o koncentraciji RSV-a na Slici 26 vidljivo je da se postotak vijabilnih stanica 72 sata nakon tretmana smanjuje s porastom koncentracije RSV-a te da je postotak preživljenja stanica obrnuto proporcionalan koncentraciji RSV-a, što je potvrđeno svim primijenjenim metodama praćenja stanične vijabilnosti i proliferacije. Vijabilnost stanica tretiranih RSV-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 72 sata, a određena metodom *NR* iznosi 61,22%, *KB* 60,35%, *MTT* 48,01%, dok je vijabilnost stanica određena metodom *TB* svega 8,81% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.



Slika 26. Vijabilnost CHO-K1 stanica 72 sata nakon tretmana 2,5 – 100 µM resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) praćeno metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (*jednadžbe interpoliranih polinomnih krivulja s pripadajućim R^2 vrijednostima nakon određenog perioda inkubacije).

Iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (*trendline*) koje najmanje odstupaju od izmjerenih podataka izračunate su pripadajuće IC vrijednosti (nakon 72 sata). Odabir interpolirane krivulje temeljio se na vrijednosti pripadajućeg koeficijenta determinacije (R^2), čija vrijednost se nalazi u intervalu $0 \leq R^2 \leq 1$ (što je R^2 bliži 1, model je reprezentativniji). IC vrijednosti za RSV pri preživljavanju 20, 50 i 80% CHO-K1 stanica određene su primjenom metoda *NR*, *KB*, *MTT* i *TB* iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (Slika 34) i prikazane u Tablici 2. IC_{50} vrijednost za RSV nakon 72 sata tretmana određene metodom *NR* iznosi 121,68 µM, *KB* 131,00 µM, *MTT* 58,65 µM i *TB* 42,55 µM.

Tablica 2. Koncentracije resveratrola (µM) koje inhibiraju vijabilnost CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue* nakon 72 sata.

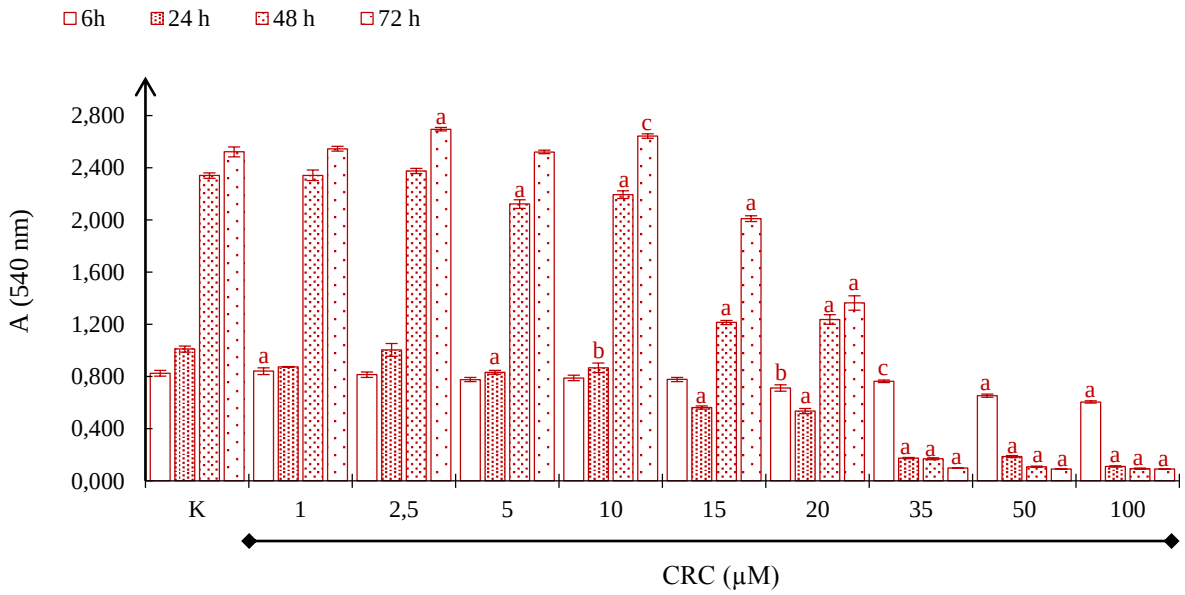
RSV (µM)	*NR*	*KB*	*MTT*	*TB*
IC_{20}	55,54	44,61	14,21	17,10
IC_{50}	121,68*	131,00*	58,65	42,55
IC_{80}	177,36*	222,89*	**	77,79

*vrijednost određena iz interpolirane polinomne krivulje viša od eksperimentalno primijenjene najviše koncentracije RSV-a; **vrijednost nije bilo moguće odrediti iz interpolirane polinomne krivulje

4.1.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *NR* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 27 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (4 – 12 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 27 vidljivo je da su koncentracije CRC-a ≥ 20 μM već nakon 6 sati dovele do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon 24 sata, sve ispitane koncentracije, izuzev 2,5 μM, također dovode do pada u staničnoj vijabilnosti. Nakon 48 sati, koncentracije CRC-a od 5 – 100 μM dovode do statistički značajnog ($p<0,001$) i izraženog pada stanične vijabilnosti. Statistički značajno poboljšanje stanične vijabilnosti uočeno je nakon 72 sata pri nižim koncentracijama CRC-a od 2,5 μM ($p<0,001$) i 10 μM ($p<0,025$), dok pri koncentracijama 15 – 100 μM dolazi do statistički značajnog ($p<0,001$) pada stanične vijabilnosti.



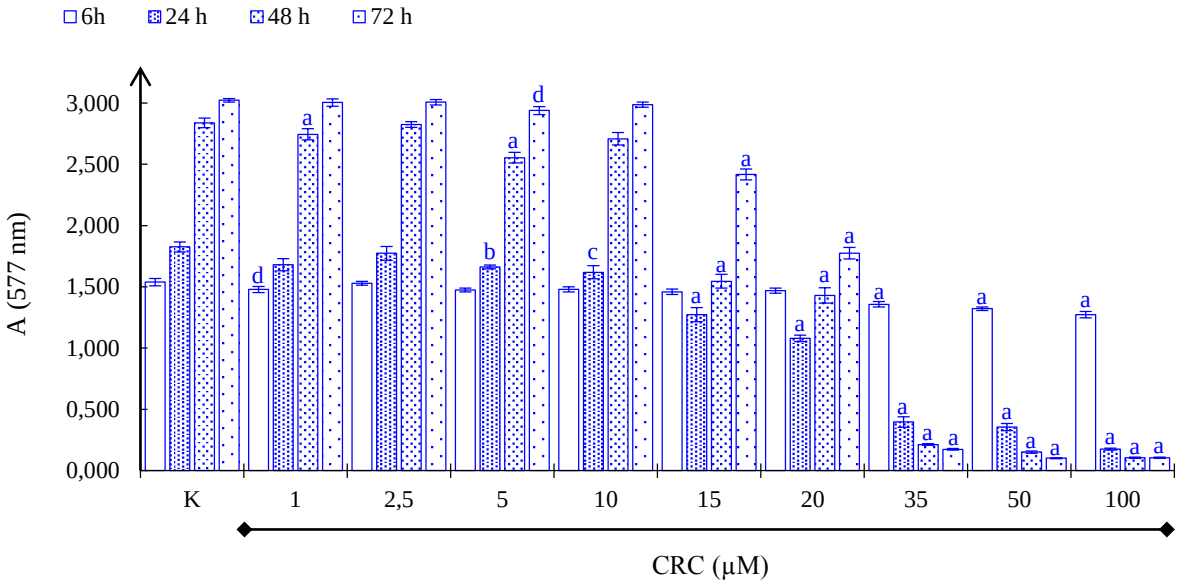
Slika 27. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.1.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je primjenom *KB* metode 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem.

Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 28 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (3 – 12 mjerenja po uzorku).

Na Slici 28 vidljivo je da sve ispitane koncentracije CRC-a nakon 6 sati dovode do smanjenja stanične vijabilnosti u rasponu od 0,60 – 17,27% u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu je statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vidljivo pri najvećim ispitanim koncentracijama (35, 50 i 100 μM). Nakon 24 sata, sve ispitane koncentracije (1 – 100 μM) dovode do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak, izuzev 2,5 μM. Nakon 48 sati tretmana, sve koncentracije CRC-a dovode do pada stanične vijabilnosti, pri čemu taj pad nije statistički značajan kod koncentracija 2,5 i 10 μM, dok se pri ostalim koncentracijama uočava statistički značajna promjena ($p<0,001$). Tijekom dulje inkubacije stanica s CRC-om (72h) i dalje se uočava inhibitorni učinak, pri čemu je vijabilnost stanica značajno reducirana pri 5 μM ($p<0,05$) te 15 – 100 μM ($p<0,001$).

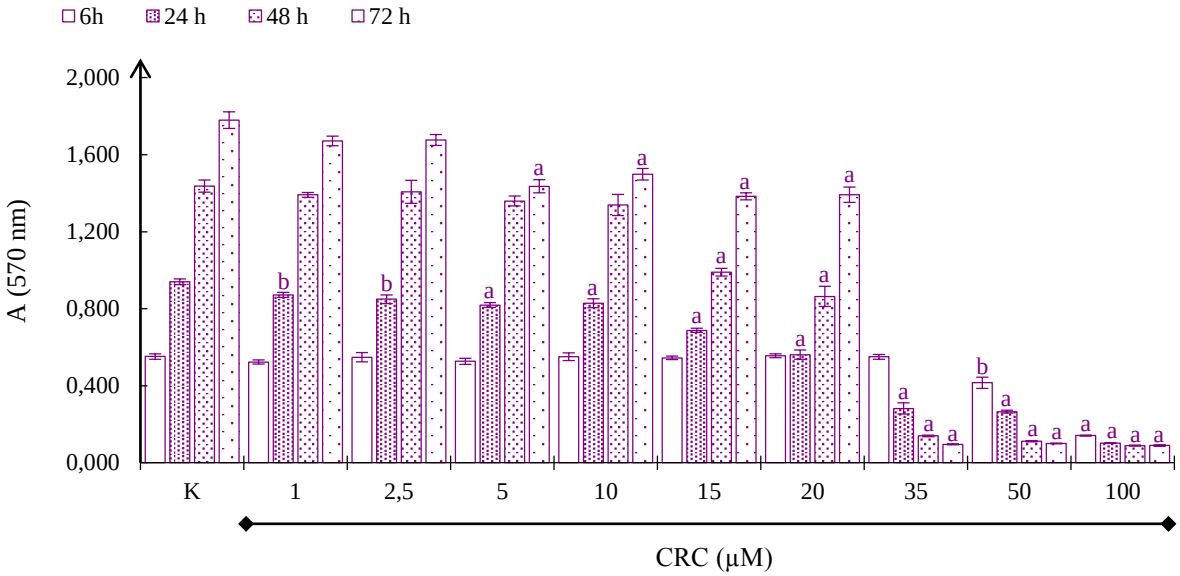


Slika 28. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CRC-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.1.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 29 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (3 – 12 mjerenja po uzorku).

Iz slike 29 vidljivo je da su koncentracije od 50 μM ($p<0,005$) i 100 μM ($p<0,001$) CRC-a već nakon 6 sati dovele do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak te je pri koncentraciji od 100 μM udio preživjelih stanica svega 25,54% u odnosu na kontrolni uzorak. Također, vidljivo je da su sve ispitane koncentracije CRC-a nakon 24 sata dovele do statistički značajnog ($p<0,005$ – $p<0,001$) pada u staničnoj vijabilnosti. Manja vijabilnost stanica uočava se i nakon 48 sati, pri čemu je određen statistički značajan ($p<0,001$) pad u staničnoj vijabilnosti i to pri koncentracijama od 15 – 100 μM. Nakon 72 sata značajan inhibitorni učinak određen je pri 5 – 100 μM CRC-u ($p<0,001$).



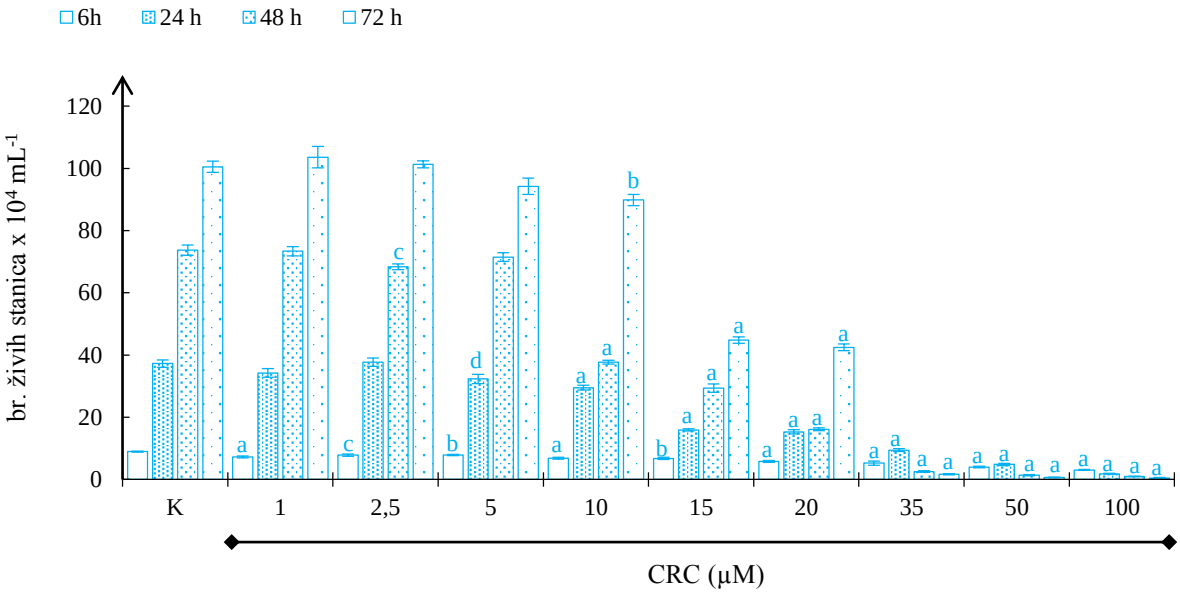
Slika 29. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.1.9. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *TB* 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 30 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Na Slici 30 vidljivo je da su sve ispitane koncentracije CRC-a već nakon 6 sati dovele do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak ($p<0,025$ – $p<0,001$). Nakon 24 sata statistički značajan ($p<0,05$) pad uočljiv je pri koncentraciji od 5 μM, dok je nakon 48 sati do statistički značajnog ($p<0,025$) pada došlo već pri koncentraciji od 2,5

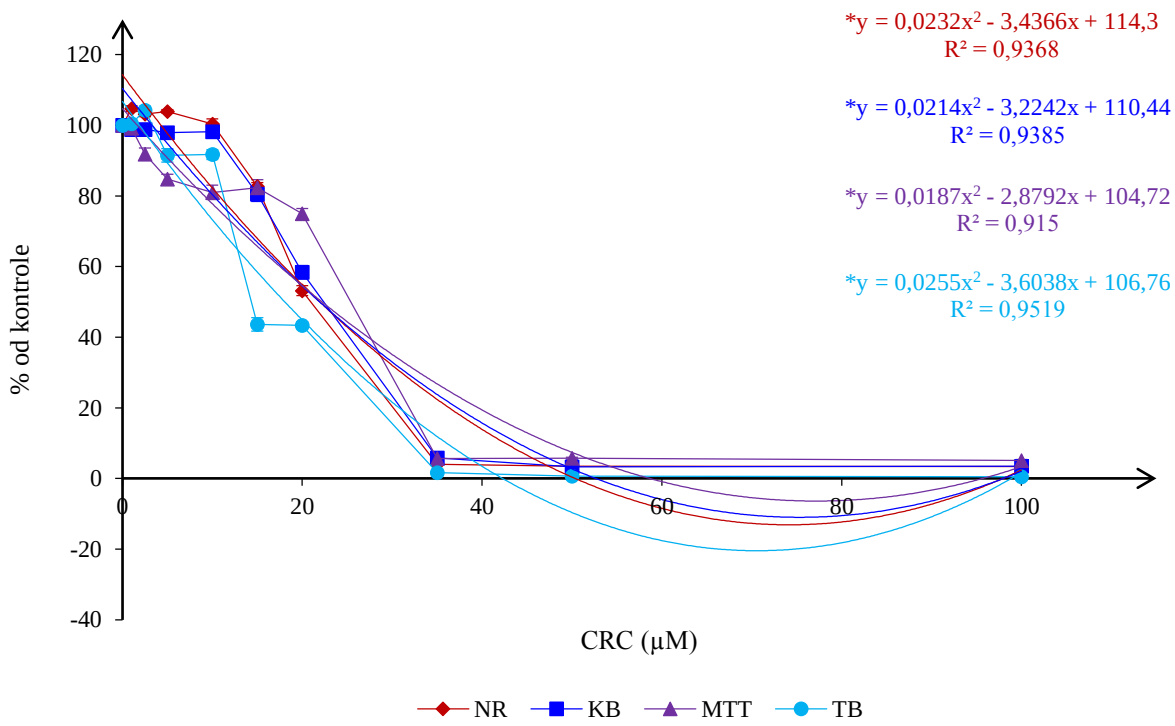
μM. Koncentracije CRC-a ≥ 10 μM dovele su do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u sva četiri promatrana vremena u odnosu na kontrolni uzorak ($p<0,005 – p<0,001$).



Slika 30. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.1.10. IC vrijednosti za kurkumin na CHO-K1 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue*

Iz prikaza ovisnosti preživljavanja CHO-K1 stanica o koncentraciji CRC-a na Slici 31 vidljivo je da se postotak vijabilnih stanica 72 sata nakon tretmana smanjuje s porastom koncentracije CRC-a te da je postotak preživljavanja stanica obrnuto proporcionalan koncentraciji CRC-a. Vijabilnost stanica tretiranih CRC-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 72 sata, a određena metodom *NR* iznosi svega 3,43%, *KB* 3,47%, *MTT* 5,14%, dok vijabilnost stanica određena metodom *TB* iznosi minimalnih 0,52% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.



Slika 31. Vijabilnost CHO-K1 stanica nakon tretmana 1 – 100 µM kurkuminom u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) u trajanju od 72 sata praćeno metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (*jednadžbe interpoliranih polinomnih krivulja s pripadajućim R^2 vrijednostima nakon određenog perioda inkubacije).

IC vrijednosti za CRC pri preživljenju 20, 50 i 80% CHO-K1 stanica određene su iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (Slika 31) i prikazane u Tablici 3. IC_{50} vrijednost za CRC nakon 72 sata tretmana određene metodom *NR* iznosi 21,97 µM, *KB* 21,94 µM, *MTT* 22,21 µM i *TB* 18,06 µM.

Tablica 3. Koncentracije kurkumina (µM) koje inhibiraju vijabilnost CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80% određene metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue* nakon 72 sata.

CRC (µM)	*NR*	*KB*	*MTT*	*TB*
IC_{20}	10,76	10,12	9,13	7,86
IC_{50}	21,97	21,94	22,21	18,06
IC_{80}	36,37	37,27	39,62	30,78

4.2. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU Hepa1-6 STANICA

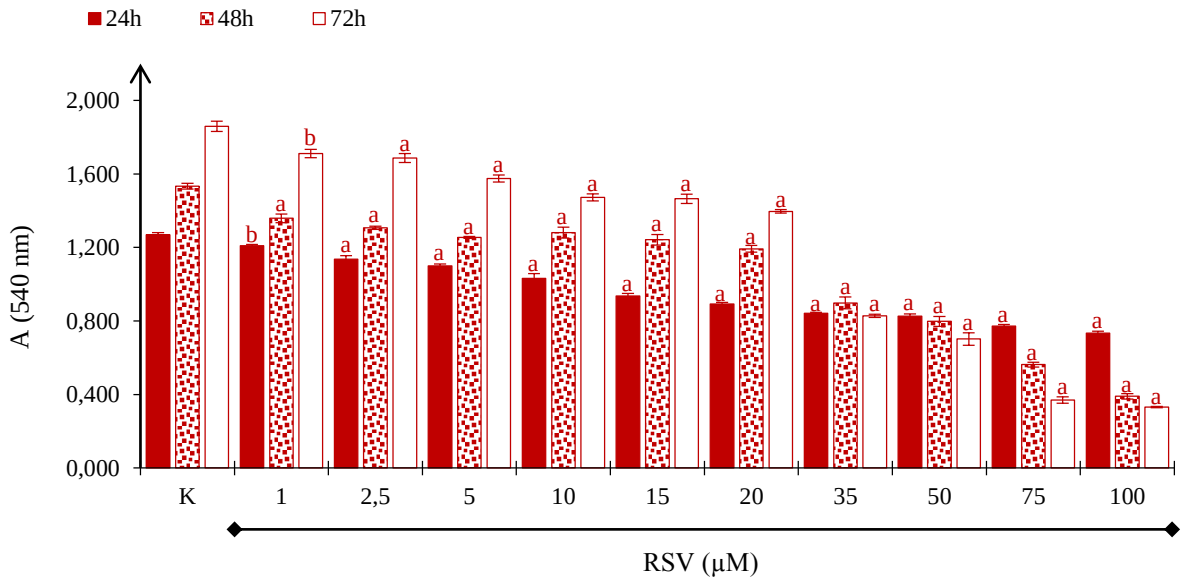
U svrhu usporedbe učinaka odabranih polifenola (RSV i CRC) na normalnim i kanceroznim stanicama, uz CHO-K1 stanice odabrane su kancerozne stanice jetre miša Hepa1-6, koje zadržavaju specifična svojstva jetre te je u njima prisutna aktivnost specifičnih jetrenih enzima.

Hepa1-6 stanice nacijepljene su u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $5x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10 µL otopine RSV-a ili CRC-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1 – 100 µM za oba polifenolna spoja. Uz učinak odabranih polifenola na vijabilnost stanica, prati se i vijabilnost stanica u kontrolnim uzorcima kojima se dodaje 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. Učinci odabranih koncentracija RSV-a i CRC-a na proliferaciju i vijabilnost Hepa1-6 stanica praćeni su upotrebom četiri *in vitro* metode: *NR*, *KB*, *MTT* te *TB* tijekom 72 sata. Svakom od metoda utvrđene su koncentracije RSV-a i CRC-a pri kojima dolazi do 20, 50 i 80%-tne inhibicije stanične vijabilnosti (IC_{20}, IC_{50}, IC_{80}).

4.2.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 µM RSV-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je upotrebom *NR* metode 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 32 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Na Slici 32 vidljivo je da 24, 48 i 72 sata nakon tretmana pri svim ispitanim koncentracijama RSV-a dolazi do statistički značajnog ($p<0,005$ – $p<0,001$) pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak. Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (100 µM) nakon 24 sata je 57,86%, nakon 48 sati 25,47%, a nakon 72 sata svega 17,82%.

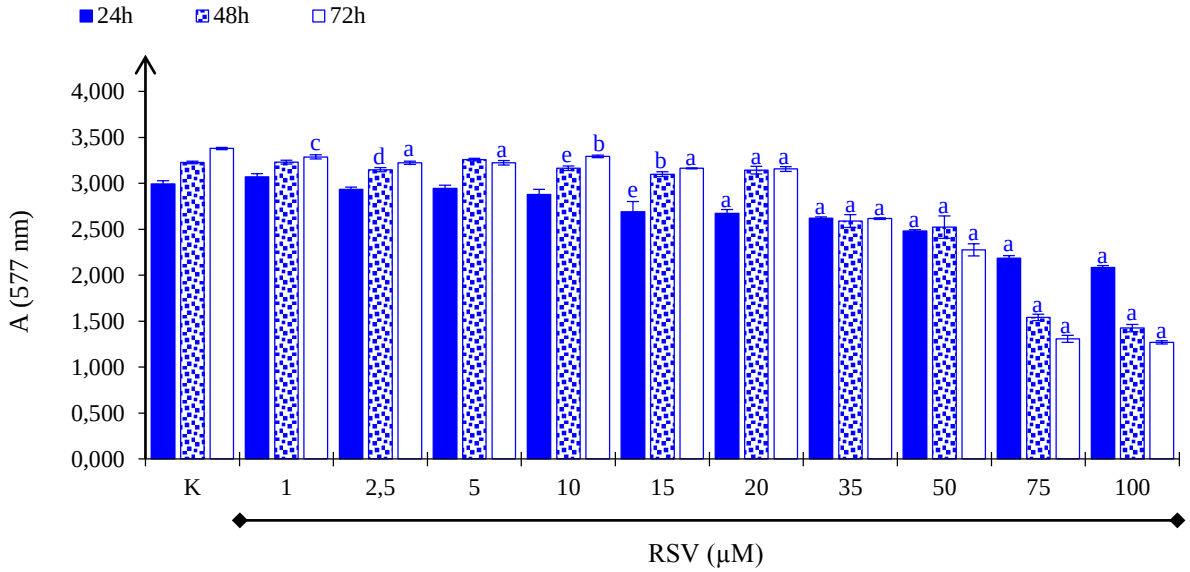


Slika 32. Učinak resveratrola (RSV1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM RSV-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *KB* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 33 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 33 vidljivo je da 24 i 48 sati nakon tretmana pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (1 μM) dolazi do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti, dok je pri ostalim primijenjenim koncentracijama 24, 48 i 72 sata nakon tretmana vidljiv pad u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak. Statistički značajan pad u staničnoj vijabilnosti uočava se 24 sata nakon tretmana ($p<0,05$ pri 15 μM, $p<0,001$ pri 20 – 100 μM), 48 sati nakon tretmana ($p<0,025$ pri 2,5 μM, $p<0,05$ pri 10 μM, $p<0,005$ pri 15 μM, $p<0,001$ pri 20 – 100 μM), 72 sata nakon tretmana ($p<0,01$ pri 1 μM, $p<0,005$ pri 10 μM, $p<0,001$ pri 2,5 i 5 μM, te pri 15 – 100 μM). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (100 μM) nakon 24 sata je 69,63%, nakon 48 sati 44,15%, a nakon 72 sata 37,56%.

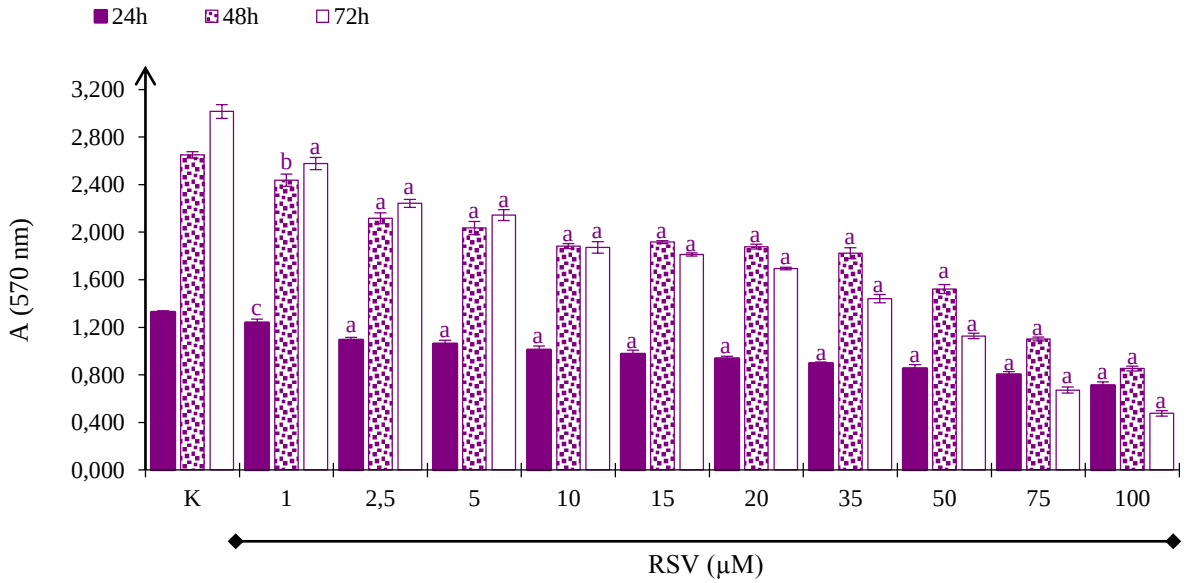


Slika 33. Učinak resveratrola (RSV1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{e}p<0,05$, $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.3. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM RSV-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 34 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Iz prikaza na Slici 34 vidljivo je da do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti dolazi pri svim primijenjenim koncentracijama RSV-a u sva tri promatrana vremena. Statistički značajan pad u staničnoj vijabilnosti uočava se 24 sata nakon tretmana ($p<0,025$ pri 1 μM, $p<0,001$ pri 2,5 – 100 μM), 48 sati nakon tretmana ($p<0,005$ pri 1 μM, $p<0,001$ pri 2,5 – 100 μM) i 72 sata nakon tretmana ($p<0,001$ pri 1 – 100 μM). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (100 μM) nakon 24 sata je 53,62%, nakon 48 sati 32,21%, a nakon 72 sata 15,82%.

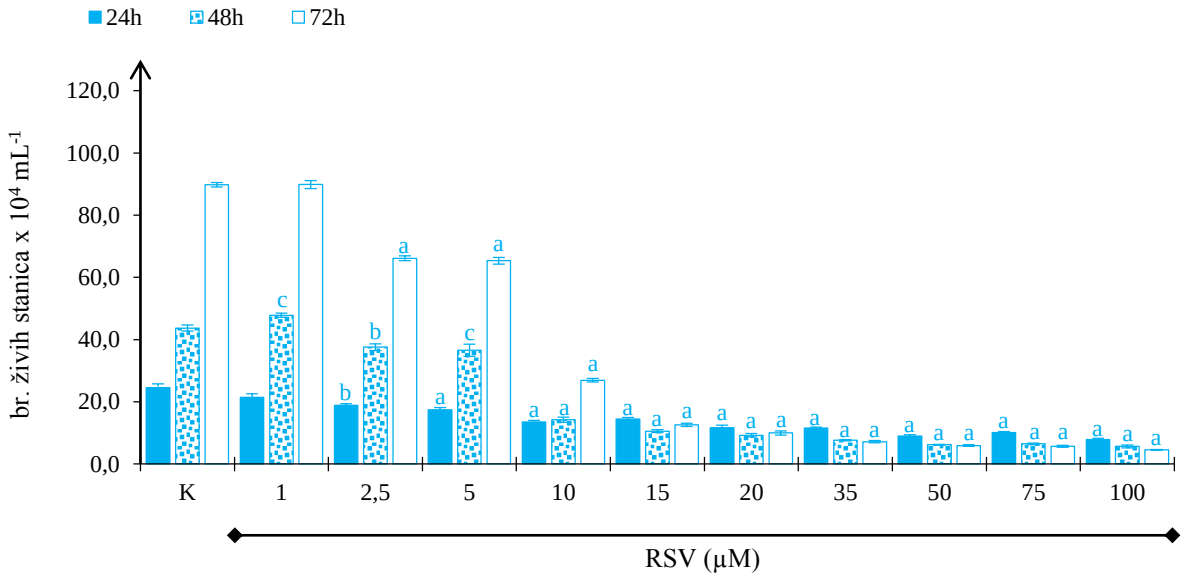


Slika 34. Učinak resveratrola (RSV1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.4. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM RSV-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je metodom *TB* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 35 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

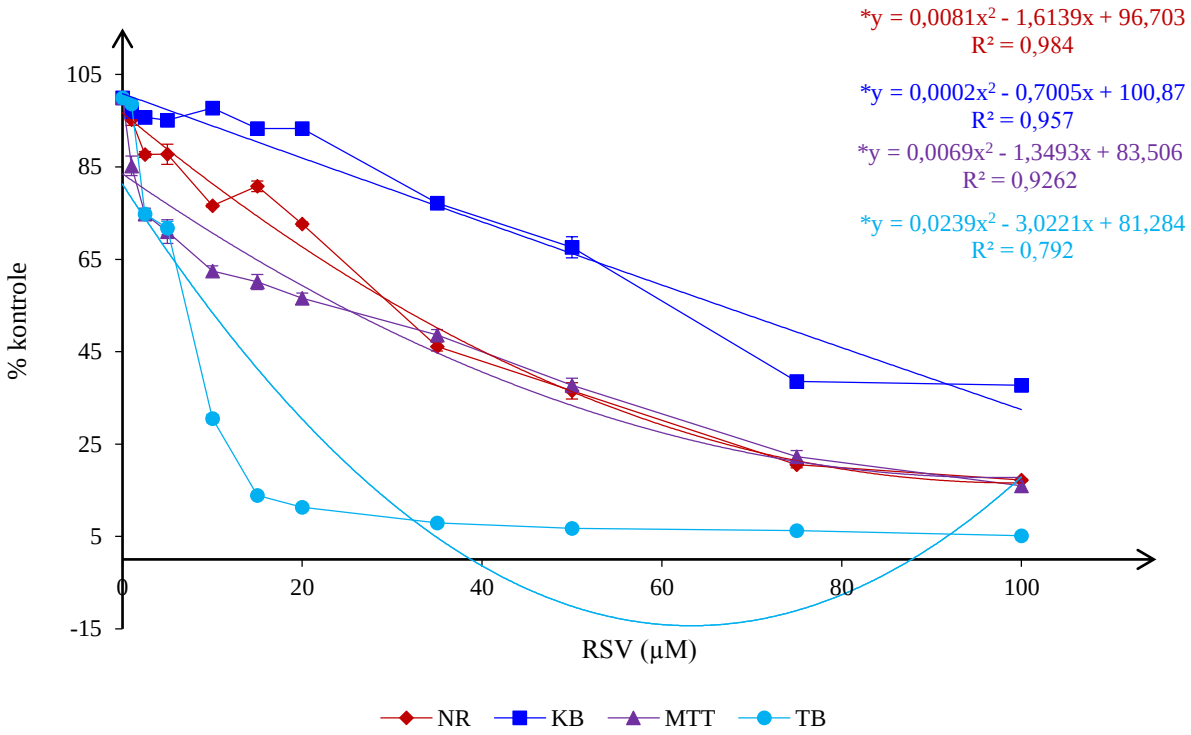
Iz Slike 35 vidljivo je da pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (1 μM) dolazi do statistički značajnog ($p<0,01$) porasta u staničnoj vijabilnosti nakon 48 sati za 9,41%, dok je pri ostalim primijenjenim koncentracijama RSV-a 24, 48 i 72 sata nakon tretmana uočljiv pad vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Statistički značajan pad u staničnoj vijabilnosti uočava se 24 sata nakon tretmana ($p<0,005$ pri 2,5 μM, $p<0,001$ pri 5 – 100 μM), 48 sati nakon tretmana ($p<0,01$ pri 1 i 5 μM, $p<0,005$ pri 2,5 μM, $p<0,001$ pri 5 – 100 μM) i 72 sata nakon tretmana ($p<0,001$ pri 2,5 – 100 μM). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (100 μM) nakon 24 sata je 31,81%, nakon 48 sati 13,01% te nakon 72 sata svega 5,08%.



Slika 35. Učinak resveratrola (RSV2,5 – 100 µM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 100 µM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.5. IC vrijednosti za resveratrol na Hepa1-6 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue*

Iz prikaza ovisnosti preživljavanja Hepa1-6 stanica o koncentraciji RSV-a na Slici 36 vidljivo je da se postotak vijabilnih stanica 72 sata nakon tretmana smanjuje s porastom koncentracije RSV-a te da je postotak preživljenja stanica obrnuto proporcionalan koncentraciji RSV-a, što je potvrđeno svim primijenjenim metodama praćenja stanične vijabilnosti. Vijabilnost stanica tretiranih RSV-om najveće koncentracije (100 µM) u trajanju od 72 sata, a određena metodom *NR* iznosi 17,21%, *KB* 37,69%, *MTT* 15,94%, dok je vijabilnost stanica određena metodom *TB* svega 5,17% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.



Slika 36. Vijabilnost Hepa1-6 stanica 72 sata nakon tretmana 1 – 100 µM resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) praćeno metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (*jednadžbe interpoliranih polinomnih krivulja s pripadajućim R^2 vrijednostima nakon određenog perioda inkubacije).

IC vrijednosti za RSV pri preživljavanju 20, 50 i 80% Hepa1-6 stanica određene su primjenom metoda *NR*, *KB*, *MTT* i *TB* iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (Slika 36) i prikazane u Tablici 4. IC_{50} vrijednost za RSV nakon 72 sata tretmana određene metodom *NR* iznosi 35,13 µM, *KB* 74,19 µM, *MTT* 29,19 µM i *TB* 10,44 µM.

Tablica 4. Koncentracije resveratrola (µM) koje inhibiraju vijabilnost Hepa1-6 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue* nakon 72 sata.

RSV (µM)	*NR*	*KB*	*MTT*	*TB*
IC_{20}	10,95	30,05	2,63	0,43
IC_{50}	35,13	74,19	29,19	10,44
IC_{80}	78,29	119,53*	78,90	20,62

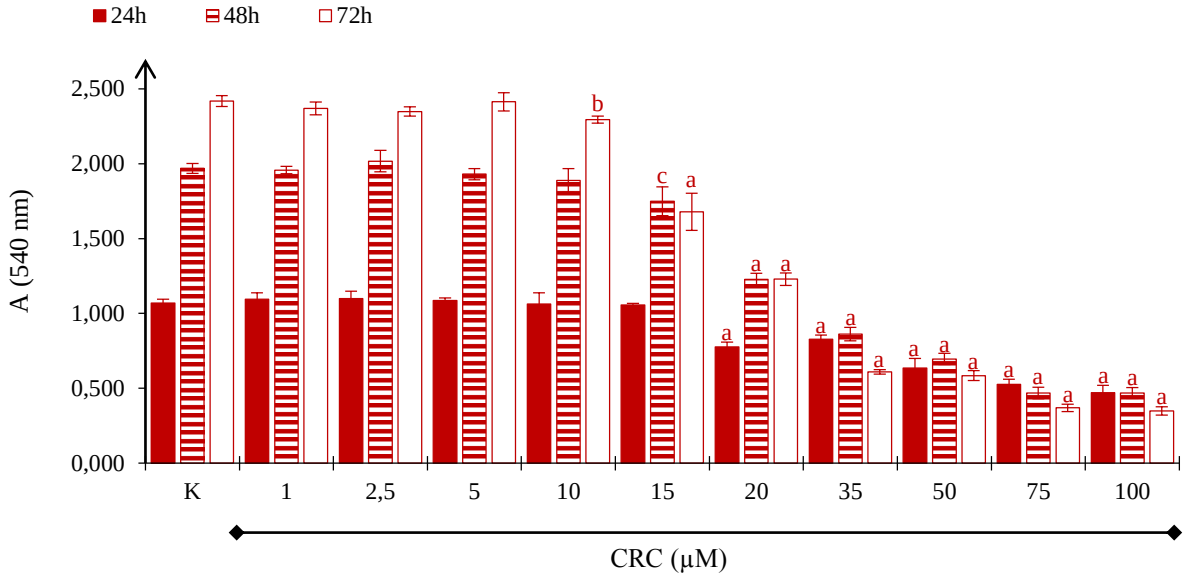
*vrijednost određena iz interpolirane polinomne krivulje viša od eksperimentalno primijenjene najviše koncentracije RSV-a

4.2.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 µM CRC-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *NR* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički

obrađeni i prikazani na Slici 37 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (3 – 12 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 37 vidljivo je da su koncentracije RSV-a ≤ 5 μM dovele do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti 24 i 48 sati nakon tretmana, dok pri ostalim primijenjenim koncentracijama dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti. Do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak nakon 24 sata dolazi pri CRC-a ≥ 20 μM ($p<0,001$), nakon 48 sati pri CRC-a ≥ 15 μM ($p<0,05$ pri 15 μM, $p<0,001$ pri 20 – 100 μM) te nakon 72 sata pri CRC-a ≥ 10 μM ($p<0,025$ pri 10 μM, $p<0,001$ pri 15 – 100 μM). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji CRC-a (100 μM) nakon 24 sata je 44,08%, nakon 48 sati 23,80% te nakon 72 sata 14,43%.



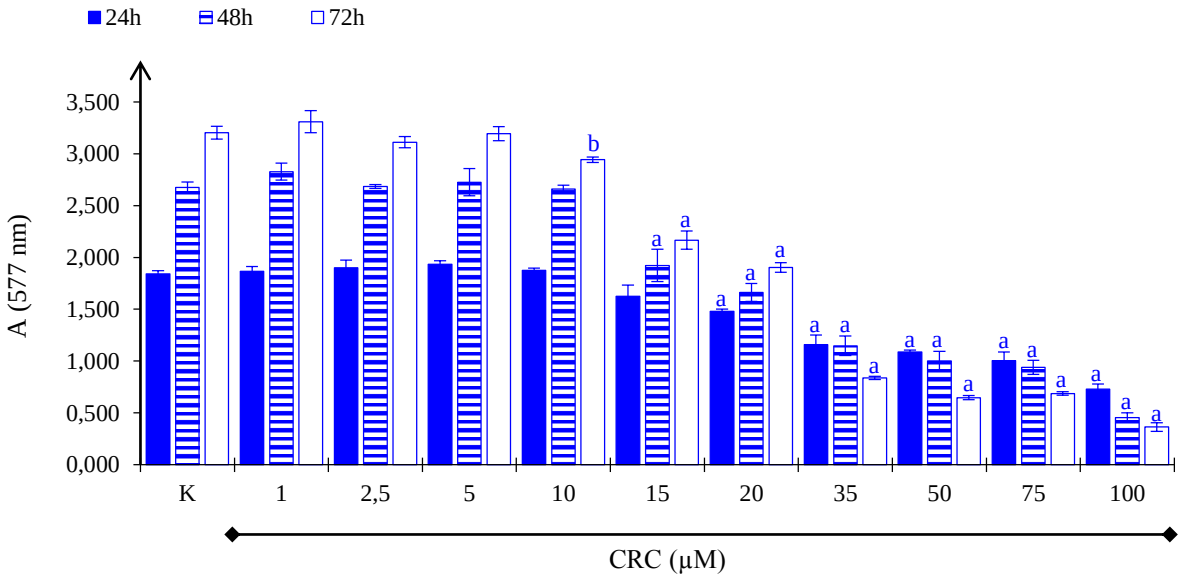
Slika 37. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,05$, $^{b}p<0,025$, $^{a}p<0,001$.

4.2.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je primjenom *KB* metode 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 38 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (4 – 12 mjerenja po uzorku).

Na Slici 38 vidljivo je da su koncentracije CRC-a 1 – 10 μM dovele do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti 24 sata nakon tretmana, dok se pri ostalim koncentracijama uočava pad u

staničnoj vijabilnosti, koji je pri koncentracijama CRC-a ≥ 20 μM statistički značajan ($p<0,001$). Nakon 48 sati do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti dolazi pri koncentracijama CRC-a 1 – 5 μM, dok se pri ostalim koncentracijama uočava pad u staničnoj vijabilnosti (CRC-a ≥ 15 μM – $p<0,001$). Do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti 72 sata nakon tretmana došlo je pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji CRC-a od 1 μM, dok pri ostalim primijenjenim koncentracijama dolazi do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti ($p<0,005$ pri 10 μM, $p<0,001$ pri 15 – 100 μM). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji CRC-a (100 μM) nakon 24 sata je 39,62%, nakon 48 sati 17,03% te nakon 72 sata 11,36%.



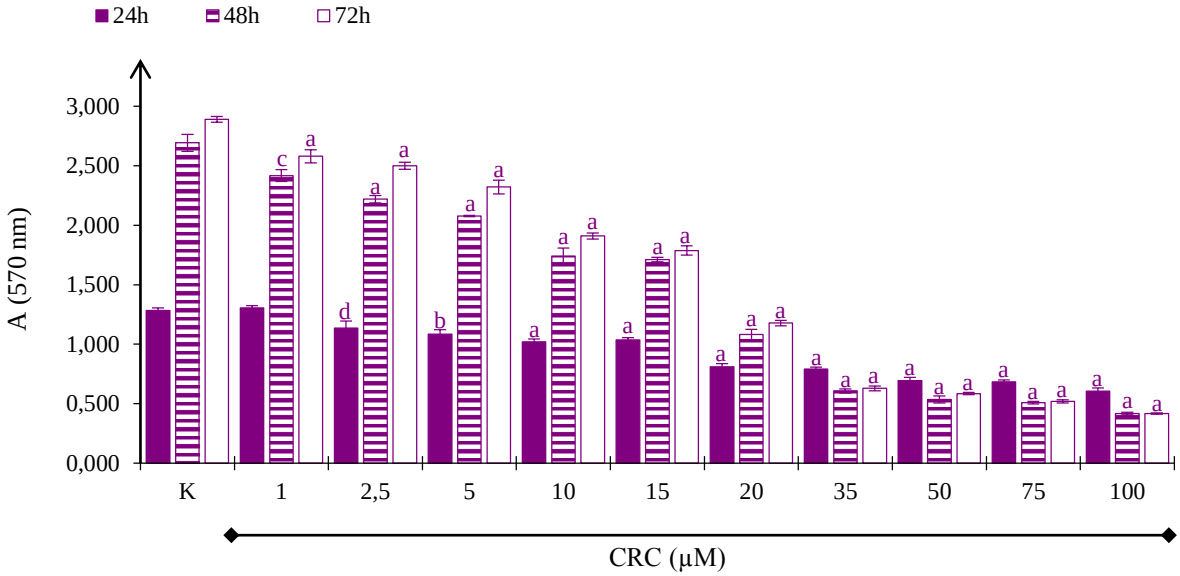
Slika 38. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 39 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Iz slike 39 vidljivo je da do pada u staničnoj vijabilnosti dolazi već 24 sata nakon tretmana pri koncentracijama ≥ 2,5 μM CRC-a. Nakon 24 sata do blagog porasta u staničnoj vijabilnosti dolazi pri koncentraciji CRC-a od 1 μM, dok se pri ostalim koncentracijama uočava pad u staničnoj vijabilnosti, koji je statistički značajan pri koncentracijama CRC-a od 2,5 μM

(p<0,05), 5 μM (p<0,005) te 10 – 100 μM (p<0,001). Nakon 48 sati do statistički značajnog pada dolazi pri svim primijenjenim koncentracijama CRC-a i to pri 1 μM (p<0,01) te ≥ 2,5 μM (p<0,001). Isto se uočava i nakon 72 sata sa statističkim značajem od p<0,001 pri svim ispitnim koncentracijama. Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji CRC-a (100 μM) nakon 24 sata je 47,16%, nakon 48 sati 15,47% te nakon 72 sata 14,40%.

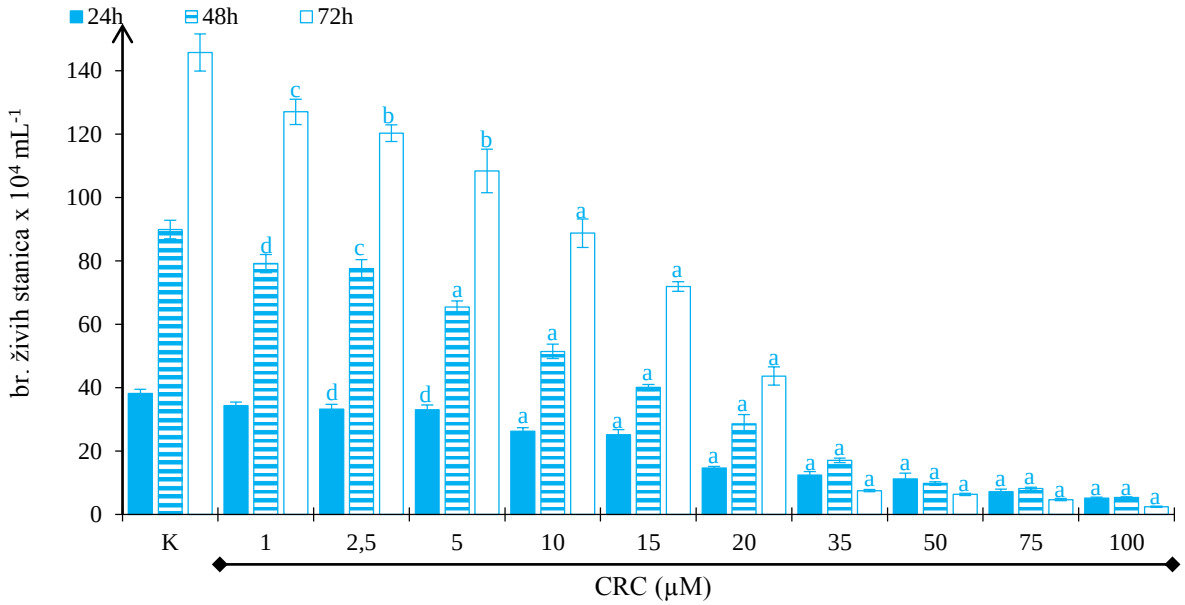


Slika 39. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.9. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM CRC-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *TB* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana stanica ovim polifenolnim spojem. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 40 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

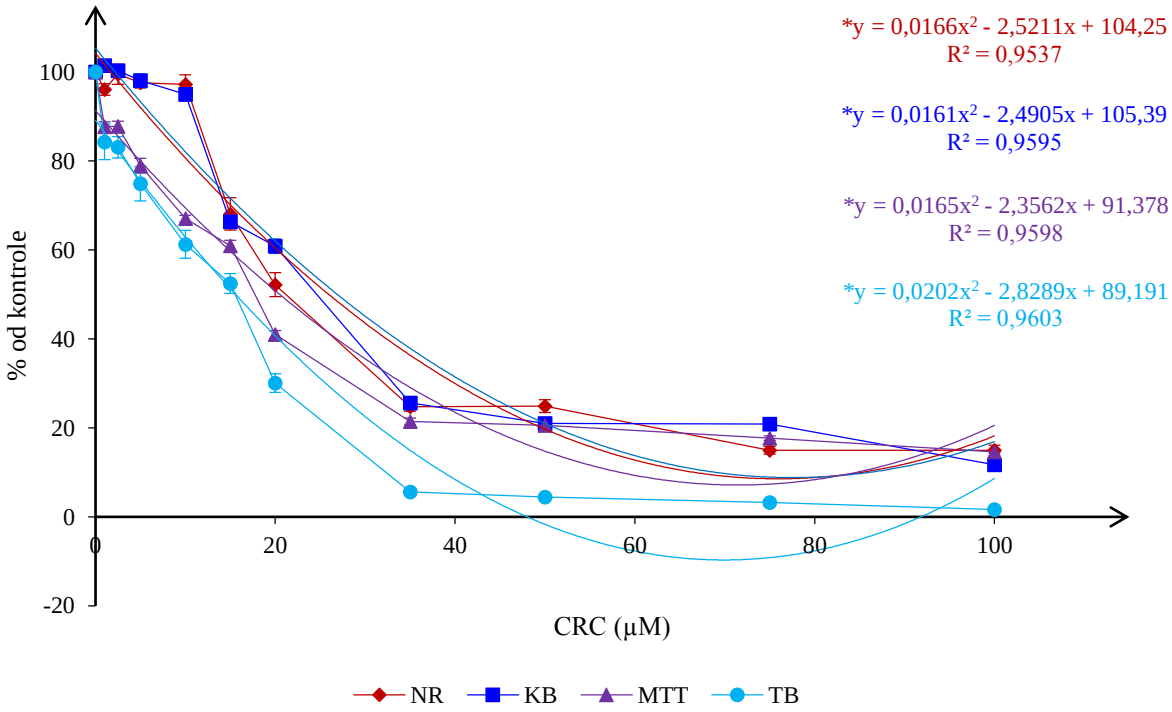
Na Slici 40 vidljivo je da su ispitane koncentracije CRC-a ≥ 2,5 μM dovele su do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u sva tri promatrana vremena u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon 24 sata pri koncentracijama od 2,5 i 5 μM (p<0,05), a pri koncentracijama ≥ 10 μM (p<0,001). Nakon 48 sati pri koncentracijama od 1 μM (p<0,05), 2,5 μM (p<0,025), ≥ 5 μM (p<0,001). Nakon 72 sata pri koncentracijama od 1 μM (p<0,025), 2,5 i 5 μM (p<0,005) te pri koncentracijama ≥ 10 μM (p<0,001). Udio stanica pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji CRC-a (100 μM) nakon 24 sata je 13,41%, nakon 48 sati 5,93% te nakon 72 sata svega 1,66%.



Slika 40. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 24, 48 i 72 sata nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

4.2.10. IC vrijednosti za kurkumin na Hepa1-6 staničnoj liniji određene metodama *Neutral Red, Kenacid Blue, MTT* i *Trypan Blue*

Iz prikaza ovisnosti preživljavanja Hepa1-6 stanica o koncentraciji CRC-a na Slici 41 vidljivo je da se postotak vijabilnih stanica 72 sata nakon tretmana smanjuje s porastom koncentracije CRC-a te da je postotak preživljavanja stanica obrnuto proporcionalan koncentraciji CRC-a. Vijabilnost stanica tretiranih CRC-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 72 sata, a određena metodom *NR* iznosi 14,93%, *KB* 11,73%, *MTT* 14,62%, dok vijabilnost stanica određena metodom *TB* iznosi minimalnih 1,67% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.



Slika 41. Vijabilnost Hepa1-6 stanica nakon tretmana 1 – 100 μM kurkuminom u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) u trajanju od 72 sata praćeno metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (*jednadžbe interpoliranih polinomnih krivulja s pripadajućim R^2 vrijednostima nakon određenog perioda inkubacije).

IC vrijednosti za CRC pri preživljavanju 20, 50 i 80% Hepa1-6 stanica određene su iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja (Slika 41) i prikazane u Tablici 5. IC_{50} vrijednost za CRC nakon 72 sata tretmana određene metodom *NR* iznosi 25,95 μM, *KB* 26,93 μM, *MTT* 20,51 μM i *TB* 15,59 μM.

Tablica 5. Koncentracije kurkumina (μM) koje inhibiraju vijabilnost Hepa1-6 stanica za 20, 50 i 80% određene metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue* nakon 72 sata.

CRC (μM)	*NR*	*KB*	*MTT*	*TB*
IC_{20}	10,32	10,97	5,00	3,33
IC_{50}	25,95	26,93	20,51	15,59
IC_{80}	49,65	51,30	43,62	31,58

4.3. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA FORMIRANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA

U svrhu određivanja učinaka RSV-a i CRC-a na intracelularnu razinu ROS-a, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 96-*well* ploče tamnog dna u koncentraciji od $2,5x10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=100 μL). Nakon 24 sata, stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice

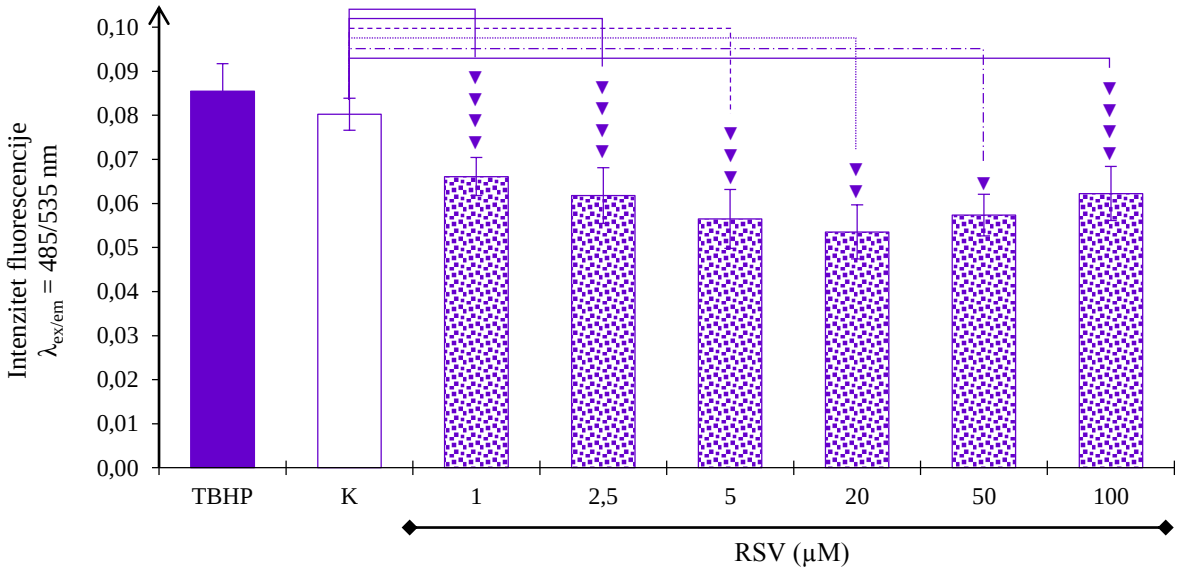
dodaje se 100 µL DCFH-DA u koncentraciji od 25 µM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama polifenola u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1 – 100 µM odabranog polifenola. Uz učinak odabranih polifenola na intracelularnu razinu ROS-a, prati se i intracelularna razina ROS-a u kontrolnim uzorcima – netretirane stanice (K_i), stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol (K), a kao pozitivna kontrola koristi se 50 µM TBHP.

Učinak 1 – 100 µM RSV-a/CRC-a na intracelularnu razinu ROS-a u staničnoj liniji CHO-K1 praćen je DCFH-DA metodom, koja uključuje mjerenje intenziteta fluorescencije DCF-a 3 sata nakon inkubacije s ovim potencijalnim anti/prooksidansima.

Rezultati su prikazani na Slikama 42 i 43 kao ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji primijenjenih koncentracija RSV-a/CRC-a. Učinak svake od koncentracija određen je iz 4 – 14 mjerenja.

4.3.1. Učinak resveratrola na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama

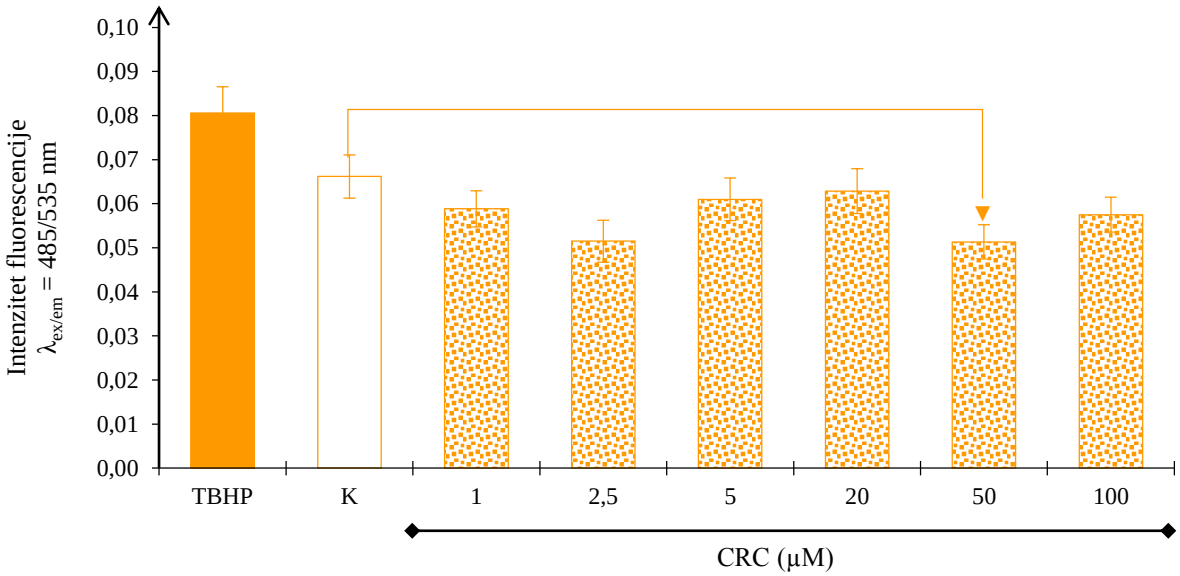
Iz prikaza učinka RSV-a (1 – 100 µM) na stvaranje ROS-a u CHO-K1 stanicama na Slici 42, vidljivo je da RSV u svim ispitanim koncentracijama uzrokuje statistički značajan ($p<0,025$ – $p<0,001$) pad razine ROS-a za 17,50 – 32,50% u odnosu na kontrolni uzorak (K).



Slika 42. Učinak resveratrola (RSV1 – 100 µM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška. TBHP – stanice tretirane 50 µM *tert*-butil hidroperoksidom; K – stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 1 – 100 µM. Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼▼p<0,025, ▼▼▼p<0,01, ▼▼p<0,005, ▼p<0,001.

4.3.2. Učinak kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama

Iz prikaza učinka CRC-a (1 – 100 μM) na stvaranje ROS-a u CHO-K1 stanicama na Slici 43, vidljivo je da u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K), CRC u svim ispitanim koncentracijama uzrokuje pad razine ROS-a za 4,55 – 22,73%, s tim da je taj pad statistički značajan samo pri koncentraciji od 50 μM ($p<0,05$).



Slika 43. Učinak kurkumina (CRC1 – 100 μM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška. TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼$p<0,05$.

4.4. STANIČNA SMRT NAKON TRETMANA CHO-K1 STANICA RESVERATROLOM ILI KURKUMINOM

U svrhu utvrđivanja tipa stanične smrti (apoptoza/nekroza) nakon tretmana CHO-K1 stanica RSV-om ili CRC-om stanice su nacijepljene u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL) te nakon 24 sata tretirane s 10 μL otopine RSV/CRC u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 5 – 100 μM RSV/CRC. Uz učinak odabranih polifenola na tip stanične smrti, prati se i rast stanica u kontroli kojima se dodaje 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. 6 i 48 sati nakon tretmana odabranim polifenolom, primjenom *MUSE*® protočnog citometra provodi se kvantitativna analiza živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i mrtvih (nekrotičnih) stanica.

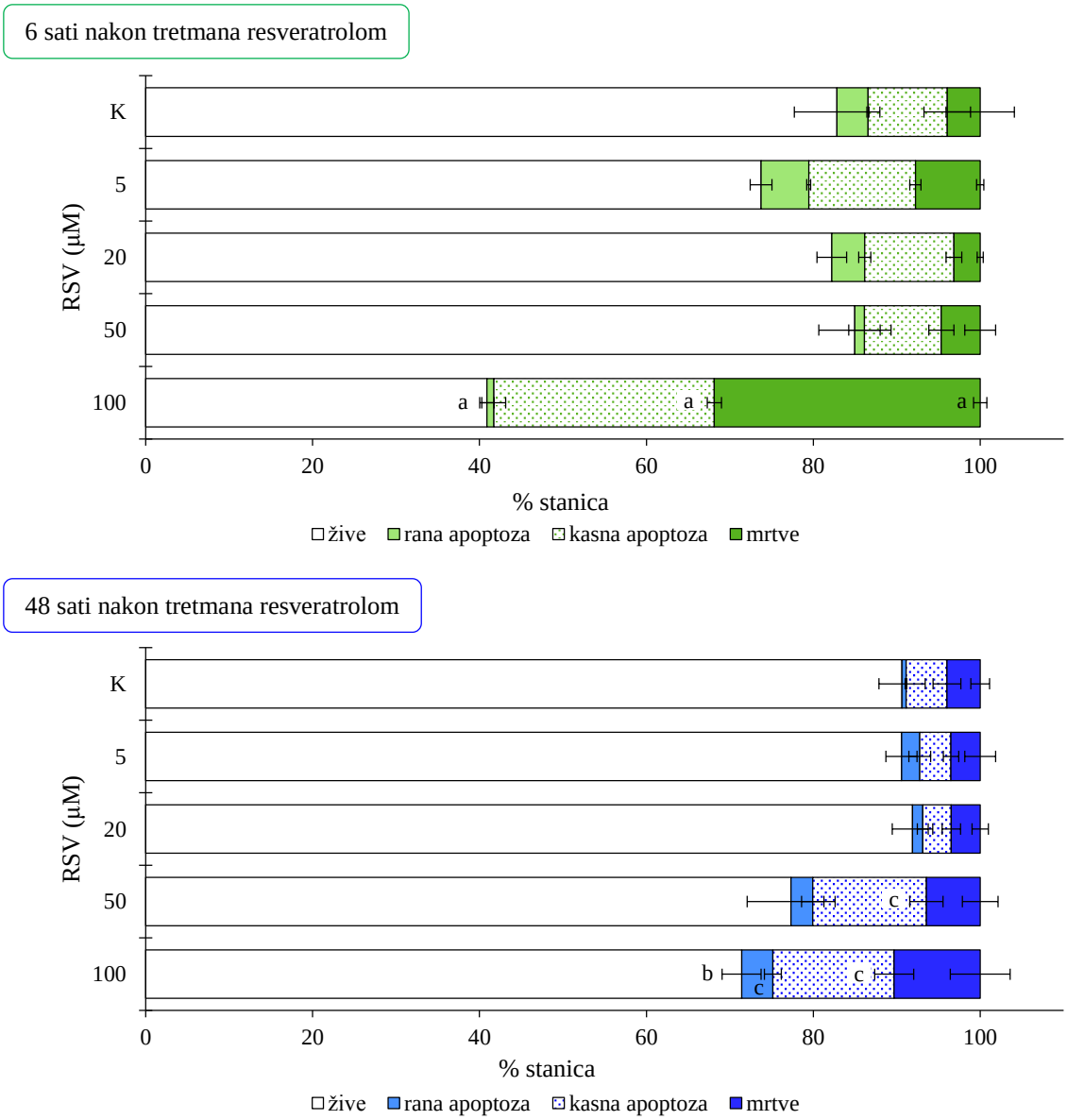
Rezultati dobiveni primjenom *MUSE*® protočnog citometra prikazani su u obliku *dot-plot* dijagrama na kojima je subpopulacija živih stanica prikazana u donjem lijevom kvadrantu (7-

AAD (-)/aneksin V (-)), u donjem desnom kvadrantu prikazane su stanice koje čine populaciju stanica u ranoj apoptozi (7-AAD (-)/aneksin V (+)), gornji desni kvadrant prikazuje stanice u kasnoj apoptozi (7-AAD (+)/aneksin V (+)), dok se u gornjem lijevom kvadrantu nalazi subpopulacija mrtvih stanica (7-AAD (+)/aneksin V (-)).

Rezultati analize CHO-K1 stanične smrti nakon tretmana stanica RSV/CRC prikazani su kao udio živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica (slike 44 i 46) te kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami sa četiri različite populacije CHO-K1 stanica (Slike 45 i 47, 48 i 49) dobivenih primjenom metode protočne citometrije 6 i 48 sati nakon tretmana RSV-om/CRC-om. Učinak različitih koncentracija odabranog polifenola određen je iz 3 – 15 mjerenja po koncentraciji.

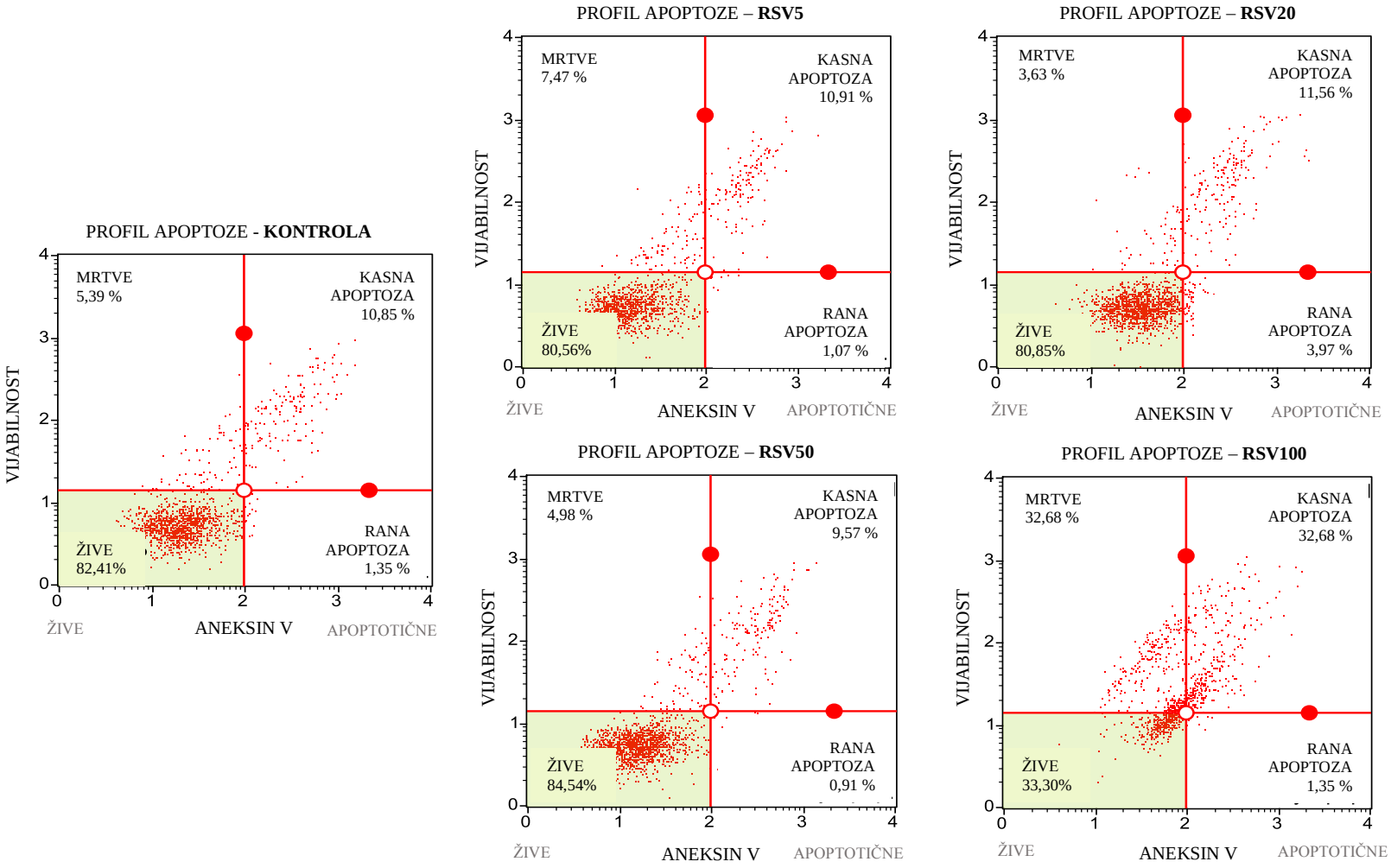
4.4.1. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom

Na Slici 44 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon tretmana RSV-om (5 – 100 μM) te je iz slike vidljivo kako s povećanjem koncentracije RSV-a, nakon oba vremena tretmana (6 i 48 sati), dolazi do smanjenja postotka živih stanica. Nakon 6 sati tretmana, povećanjem koncentracije RSV-a postotak živih stanica se smanjuje sa 73,75% pri tretmanu s 5 μM na 40,89% pri tretmanu sa 100 μM ($p<0,001$), dok udio apoptotskih (rana i kasna apoptoza) raste s 18,49% na 27,25% ($p<0,001$), a udio mrtvih sa 7,76% na 31,86% ($p<0,001$). Daljnjim vremenom inkubacije (48 sati) uočava se isti trend. Postotak živih stanica s 90,57% pri tretmanu RSV-om koncentracije 5 μM pada na 71,41% pri koncentraciji od 100 μM ($p<0,01$), udio ukupno apoptotskih raste s 5,93% na 18,29%, a udio mrtvih s 3,50% na 10,31% ($p<0,05$). Također, uočava se da je, ukupno gledajući, postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi veći u odnosu na one u nekrozi. Na Slici 44 uočava se i značajan pad u postotku živih stanica pri porastu koncentracije RSV-a, naročito pri koncentraciji od 100 μM nakon 6 sati tretmana. Učinak nakon 6 sati tretmana je izraženiji u odnosu dulji period inkubacije (48h). Analizirajući udjele subpopulacija stanica nakon 48 sati tretmana, vidljivo je da je trend porasta udjela apoptotskih stanica u populaciji veći od trenda porasta udjela nekrotičnih stanica i da je ovisan o dozi RSV-a.

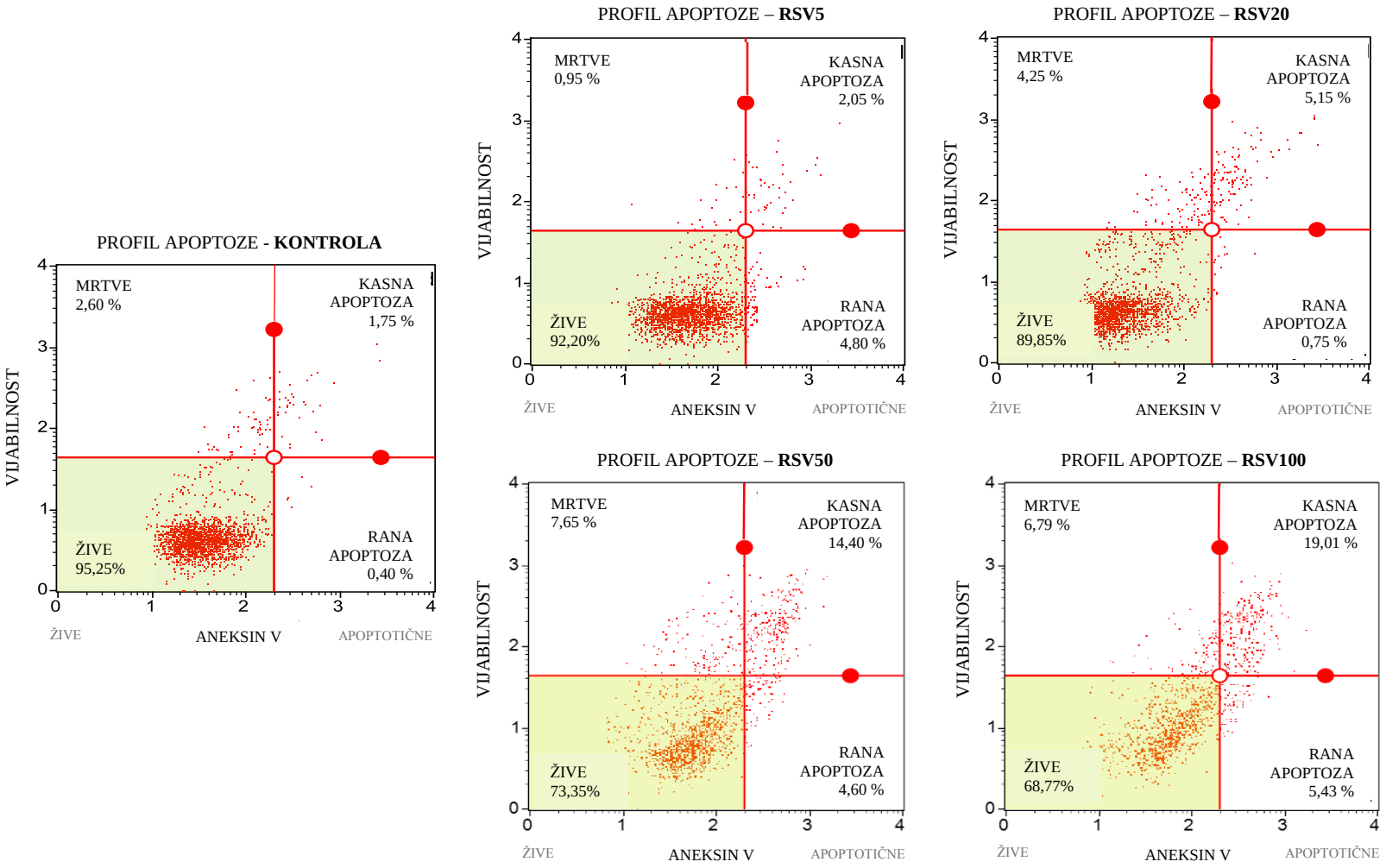


Slika 44. Učinak resveratrola (RSV5 – 100 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 6 i 48 sati nakon tretmana CHO-K1 stanica određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{c}p<0,05$, $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$.

Na Slici 45 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami 6 sati nakon tretmana stanica RSV-om, dok su na Slici 46 prikazani *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana.



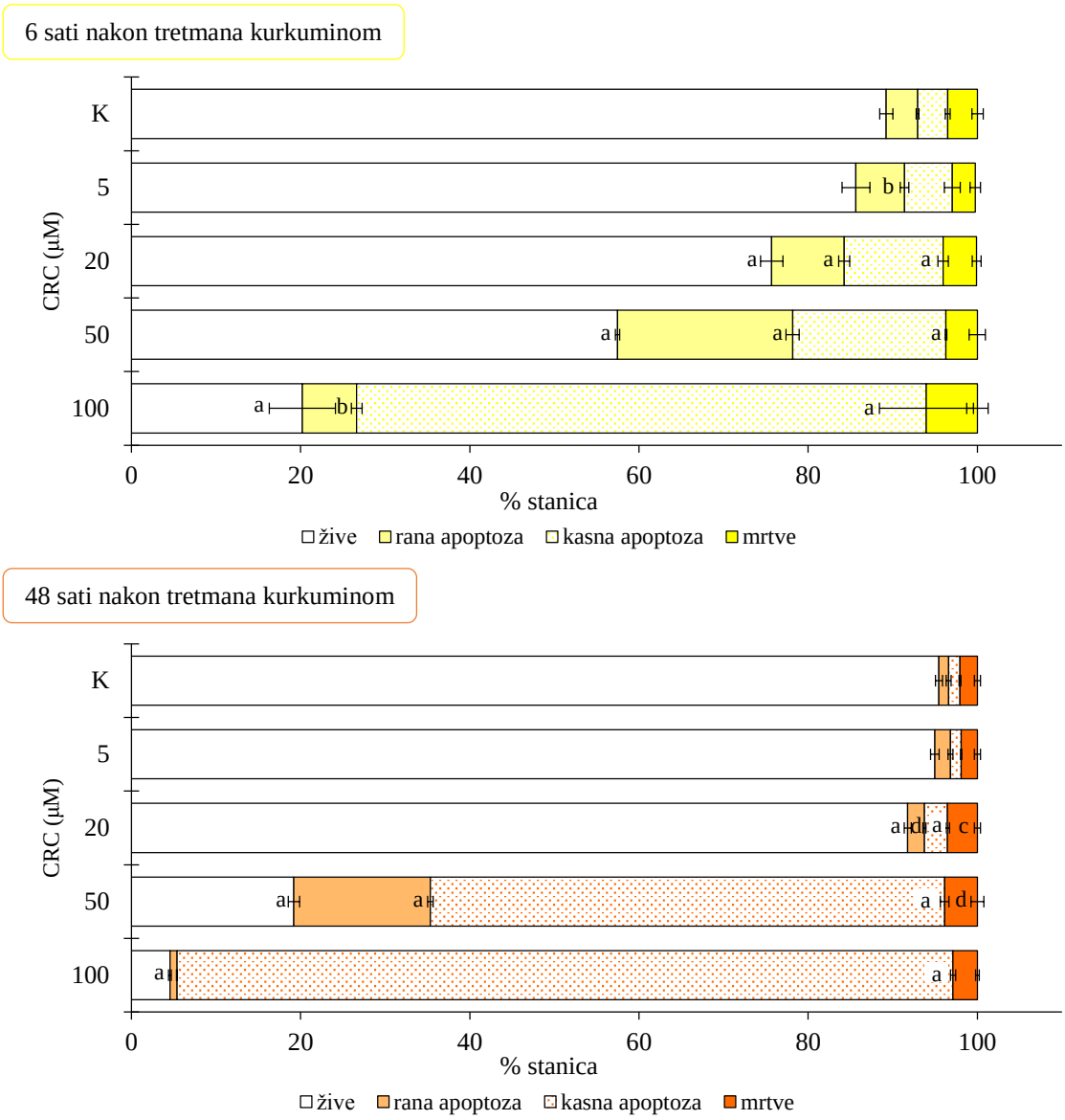
Slika 45. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 6 sati tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; RSV5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 5 – 100 μM).



Slika 46. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 48 sati tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; RSV5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom u koncentracijama od 5 – 100 μM).

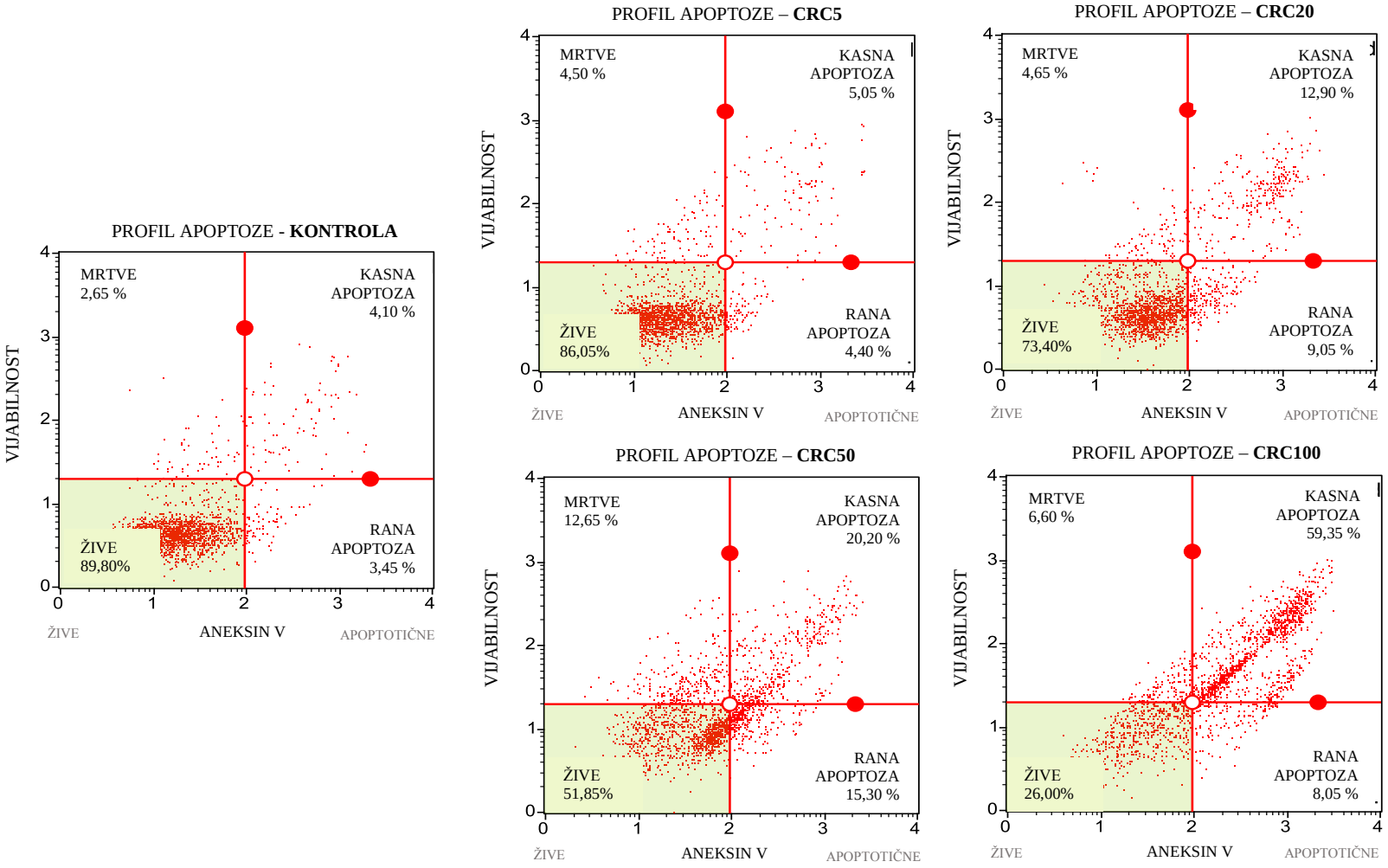
4.4.2. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica kurkuminom

Na Slici 47 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon tretmana CRC-om (5 – 100 μM) te je iz slike vidljivo kako s povećanjem koncentracije CRC-a, nakon oba vremena tretmana (6 i 48 sati), dolazi do smanjenja postotka živih stanica. Nakon 6 sati tretmana, povećanjem koncentracije CRC-a postotak živih stanica se smanjuje s 85,64% pri tretmanu s 5 μM na 20,21% pri tretmanu sa 100 μM ($p<0,001$), dok udio apoptotskih (rana i kasna apoptoza) raste s 11,41% na 73,77% ($p<0,005$ – rana apoptoza, $p<0,001$ – kasna apoptoza), a udio mrtvih s 2,71% na 6,03%. Tijekom duljeg vremena inkubacije (48h) uočava se isti trend. Postotak živih stanica s 94,96% pri tretmanu s CRC-om koncentracije 5 μM pada na svega 4,55% pri koncentraciji od 100 μM ($p<0,001$), udio ukupno apoptotskih raste s 3,11% na 92,57% ($p<0,001$), a udio mrtvih s 1,93% na 2,88%. Isto tako, uočava se da je ukupno gledajući, postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi značajno veći u odnosu na one u nekrozi. Analizirajući udjele subpopulacija stanica, vidljivo je da je trend porasta udjela apoptotskih stanica u populaciji veći od trenda porasta udjela nekrotičnih stanica i da je ovisan o dozi CRC-a.

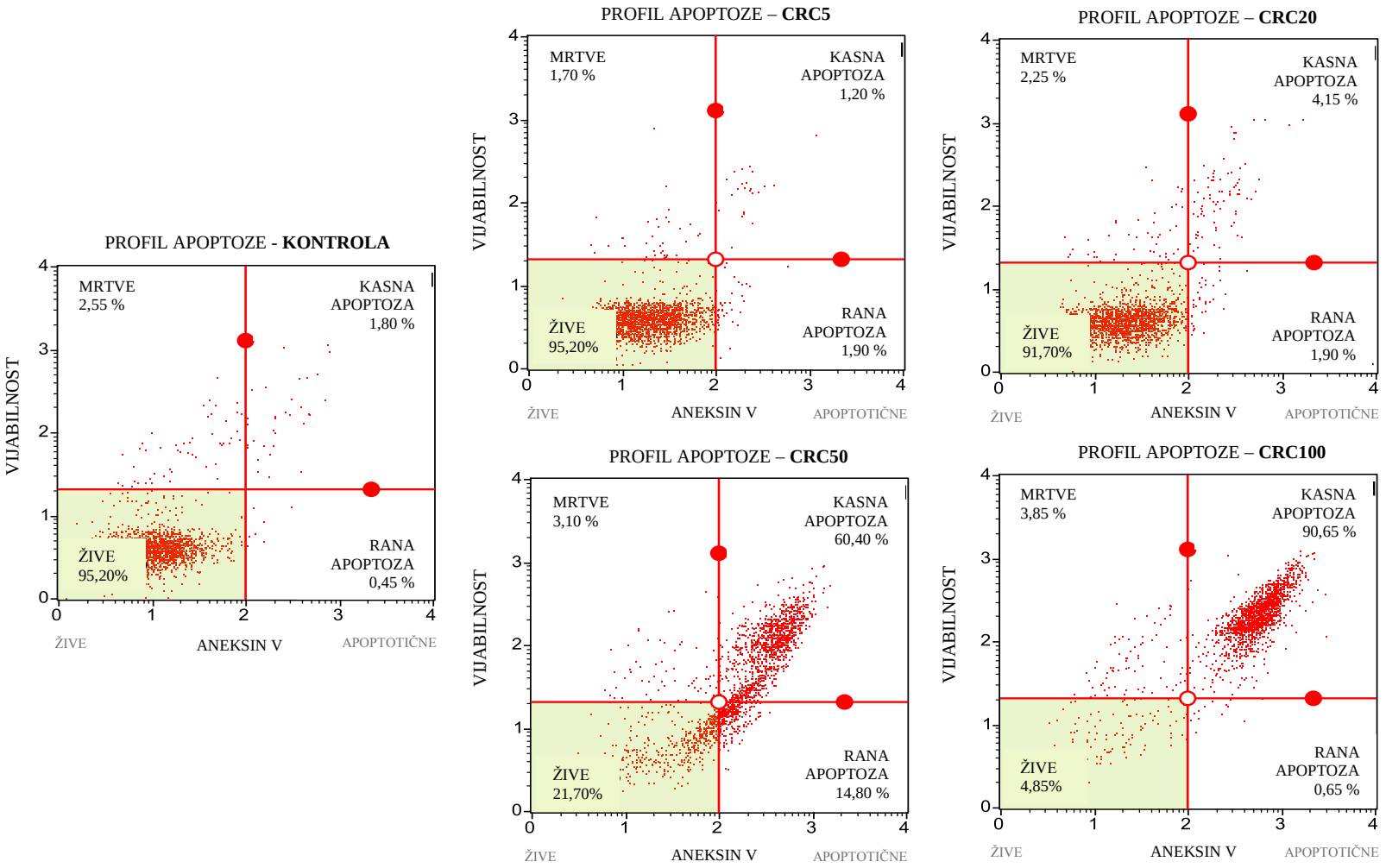


Slika 47. Učinak kurkumina (CRC5 – 100 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 6 i 48 sati nakon tretmana CHO-K1 stanica određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

Na Slici 48 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami 6 sati nakon tretmana stanica CRC-om, dok su na Slici 49 prikazani *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana.



Slika 48. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 6 sati tretmana CHO-K1 stanica kurkuminom dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 5 – 100 μM).



Slika 49. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 48 sati tretmana CHO-K1 stanica kurkuminom dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; CRC5 – 100 – stanice tretirane kurkuminom u koncentracijama od 5 – 100 μM).

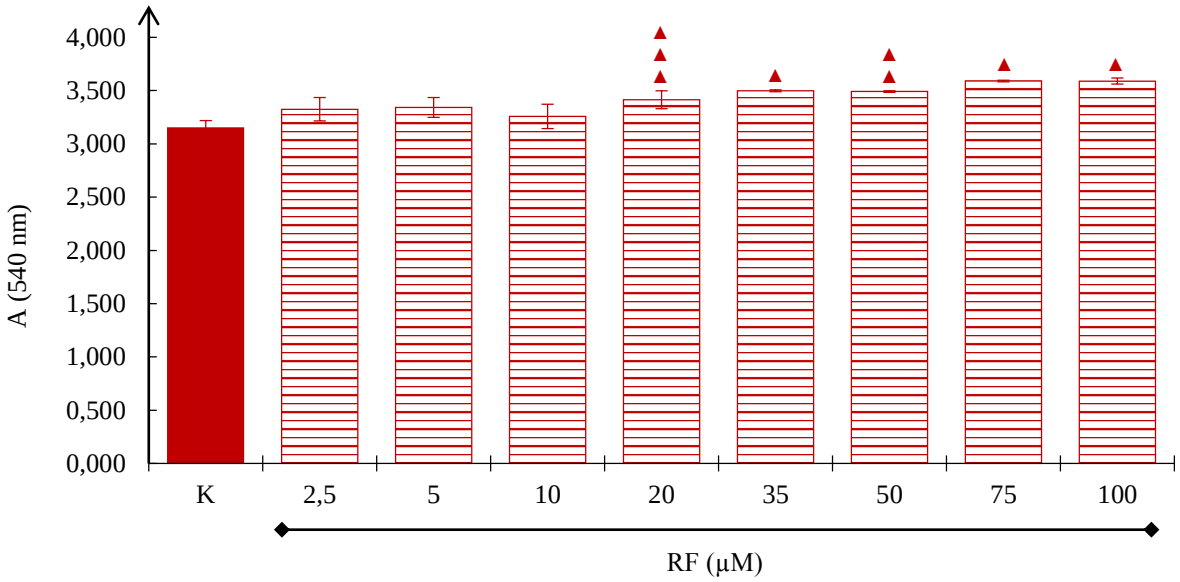
4.5. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU CHO-K1 STANICA

S ciljem utvrđivanja učinaka novosintetiziranog ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF) i ferocenskog analoga kurkumina (u kojemu je benzilidenska skupina zamijenjena ferocenom; CF) na proliferaciju i vijabilnost stanica, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice *6-well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10 µL otopine RF-a ili CF-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 2,5 – 100 µM za RF te 1 – 100 µM za CF. Uz učinak odabranog ferocenskog derivata/analoga polifenola na rast stanica, prati se i rast stanica u kontroli kojima se dodaje 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. Učinci odabranih koncentracija RF-a/CF-a na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica praćeni su upotrebom četiri *in vitro* metode: *NR*, *KB*, *MTT* te *TB* 48 sati nakon inkubacije.

4.5.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 2,5 – 100 µM RF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *NR* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 50 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (3 – 6 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 50 vidljivo je da su sve ispitane koncentracije RF-a dovele do blagoga porasta (3,44 – 13,97%) u vijabilnosti i proliferaciji CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Do statistički značajnog porasta u staničnoj vijabilnosti došlo je pri većim ispitanim koncentracijama RF-a od 20 µM ($p<0,05$), 35 µM ($p<0,001$), 50 µM ($p<0,005$), 75 µM ($p<0,001$) i 100 µM ($p<0,001$).



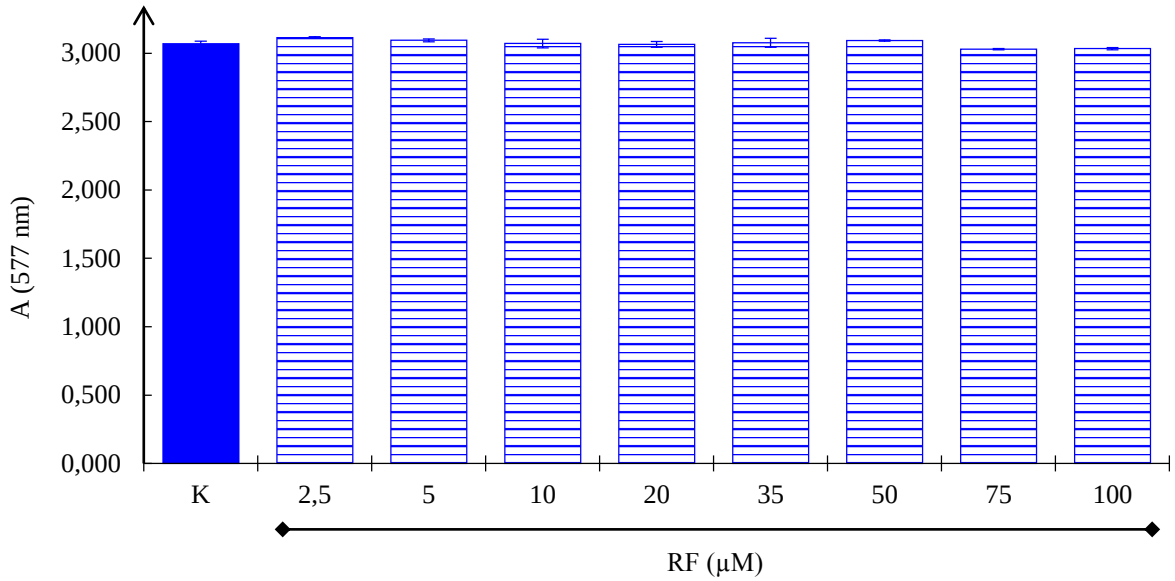
Slika 50. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▲▲▲p<0,05, ▲▲p<0,005, ▲p<0,001.

Iz Slike 50 također je vidljivo povećanje vrijednosti apsorbancije ovisno o dozi RF-a. Postotak stanica tretiranih RF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati je za 13,97% veći u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.

4.5.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 2,5 – 100 μM RF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *KB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 51 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (3 – 5 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 51 vidljivo je da ispitane koncentracije RF-a ne uzrokuju statistički značajne promjene u vijabilnosti i proliferaciji CHO-K1 stanica (očitane vrijednosti apsorbancije približno su jednake) u odnosu na kontrolni uzorak.

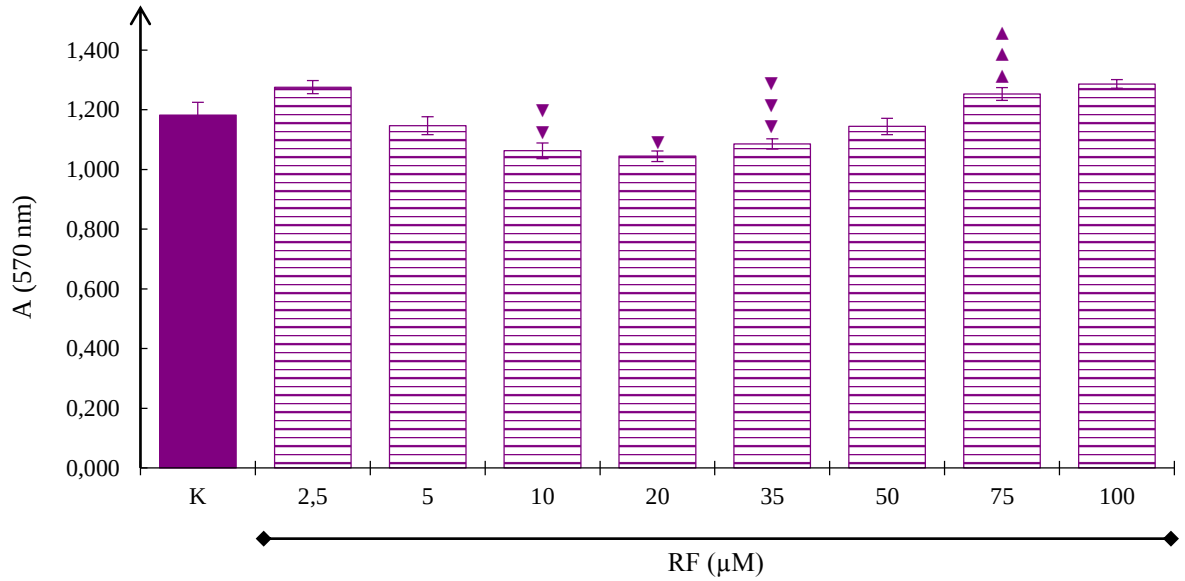


Slika 51. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM).

4.5.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 2,5 – 100 μM RF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 52 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (6 – 19 mjerenja po uzorku).

Na Slici 52 vidljivo je da koncentracije RF-a 10 – 35 μM dovode do pada stanične vijabilnosti ($p<0,05$ – $p<0,001$) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj), dok je pri višim dozama uočen statistički značajan ($p<0,05$) porast proliferacije i vijabilnosti CHO-K1 stanica.

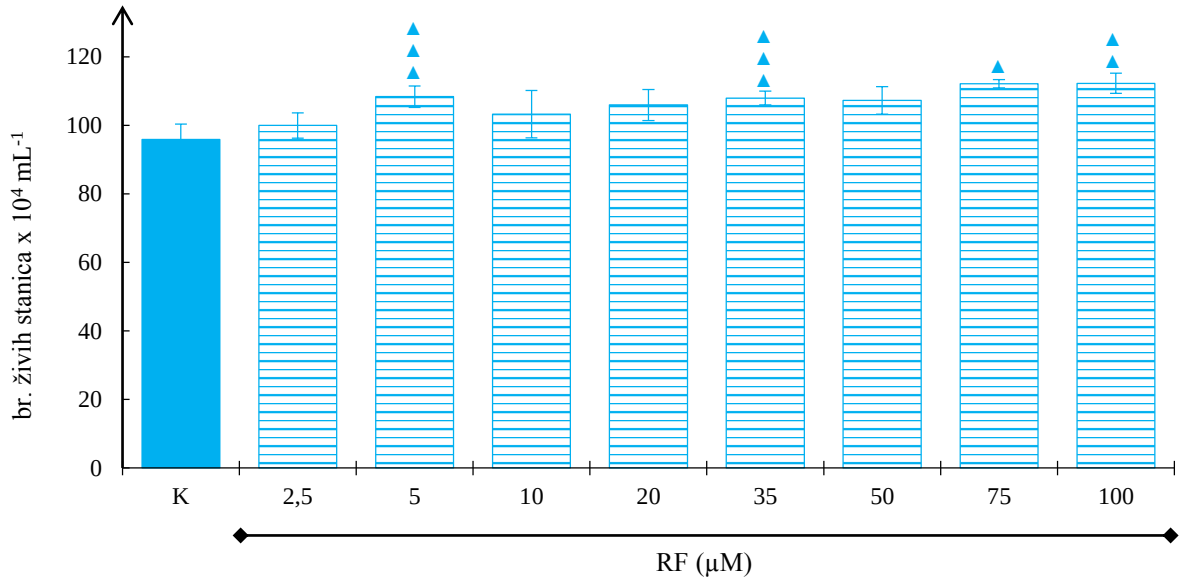


Slika 52. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼/▲▲▲ $p<0,05$, ▼▼ $p<0,025$, ▼ $p<0,001$.

4.5.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 2,5 – 100 μM RF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *TB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 53 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (4 – 9 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 53 vidljivo je da su sve ispitane koncentracije RF-a dovele do porasta (4,27 – 17,12%) u staničnoj vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj), pri čemu je taj porast statistički značajan pri koncentracijama od 5 μM ($p<0,05$), 35 μM ($p<0,05$), 75 μM ($p<0,01$) i 100 μM ($p<0,025$).



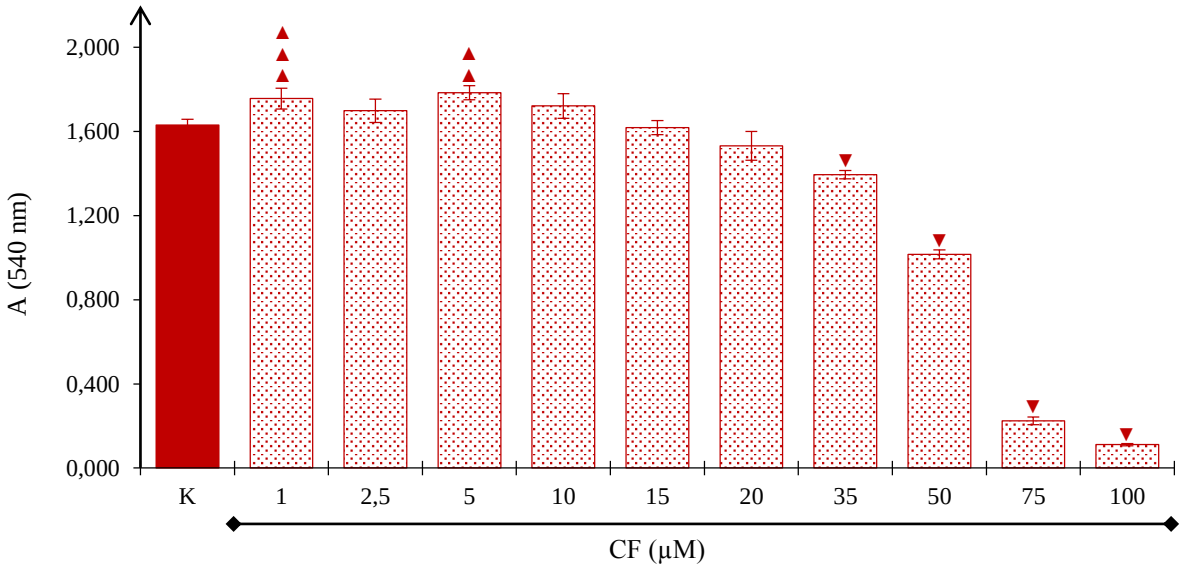
Slika 53. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▲▲▲p<0,05, ▲▲p<0,025, ▲p<0,01.

Iz Slike 53 također je vidljivo povećanje broja živih stanica ovisno o koncentraciji RF-a. Vijabilnost stanica tretiranih RF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati veća je za 17,12% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku.

4.5.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *NR* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 54 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (4 – 11 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 54 vidljivo je da nakon 48 sati tretmana, do statistički značajnog porasta u staničnoj vijabilnosti dolazi pri koncentracijama CF-a od 1 μM ($p<0,05$) i 5 μM ($p<0,005$) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Međutim, pri koncentracijama CF-a ≥15 μM dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti pri čemu je taj pad statistički značajan ($p<0,001$) kod koncentracija od 35 – 100 μM.



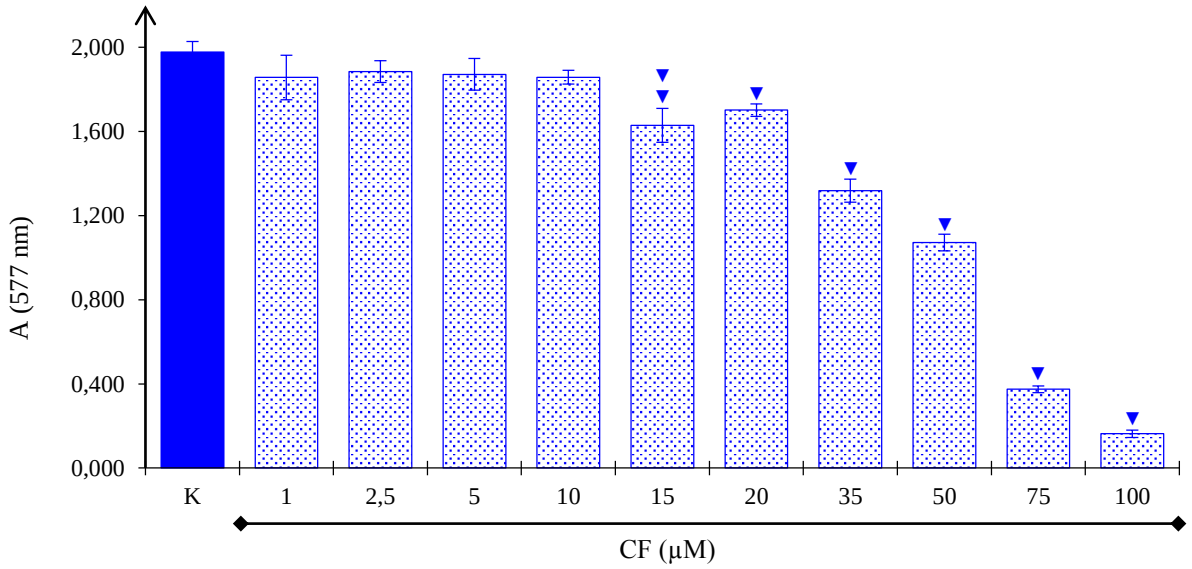
Slika 54. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▲▲▲p<0,05, ▲▲p<0,005, ▼p<0,001.

Vidljivo smanjenje vrijednosti apsorbancije prikazano na Slici 54 upućuje na to da je preživljenje stanica obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi svega 6,83% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.5.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *KB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 55 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (4 – 11 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 55 vidljivo je da 48 sati nakon tretmana, CF u koncentracijama od 1 – 10 μM ne uzrokuje značajne promjene u vijabilnosti CHO-K1 stanica (očitane vrijednosti apsorbancija približno su jednake) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Međutim, pri koncentracijama od 15 – 100 μM uočava se izražen i statistički značajan (p<0,005 – p<0,001) pad u staničnoj vijabilnosti.



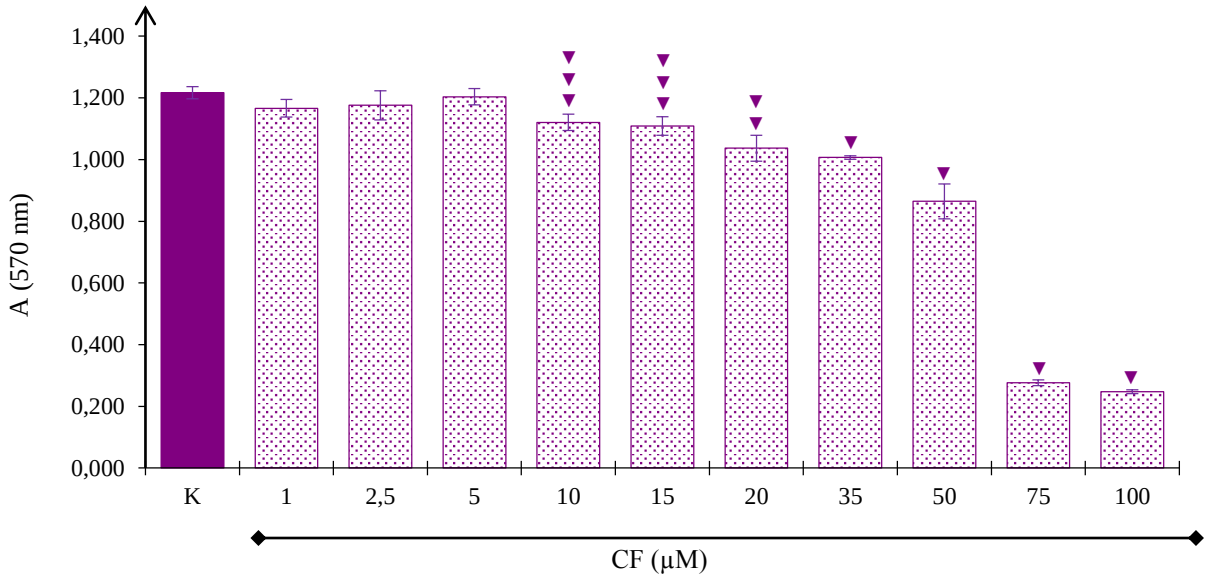
Slika 55. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼$p<0,005$, ▼$p<0,001$.

Iz Slike 55 vidljivo je smanjenje vrijednosti apsorbancije, koje je obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi svega 8,23% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.5.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 56 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (5 – 12 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 56 vidljivo je da nakon 48 sati sve ispitane koncentracije CF-a dovode do pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj), pri čemu je taj pad statistički značajan pri koncentracijama ≥ 10 μM ($p<0,01$ – $p<0,001$).



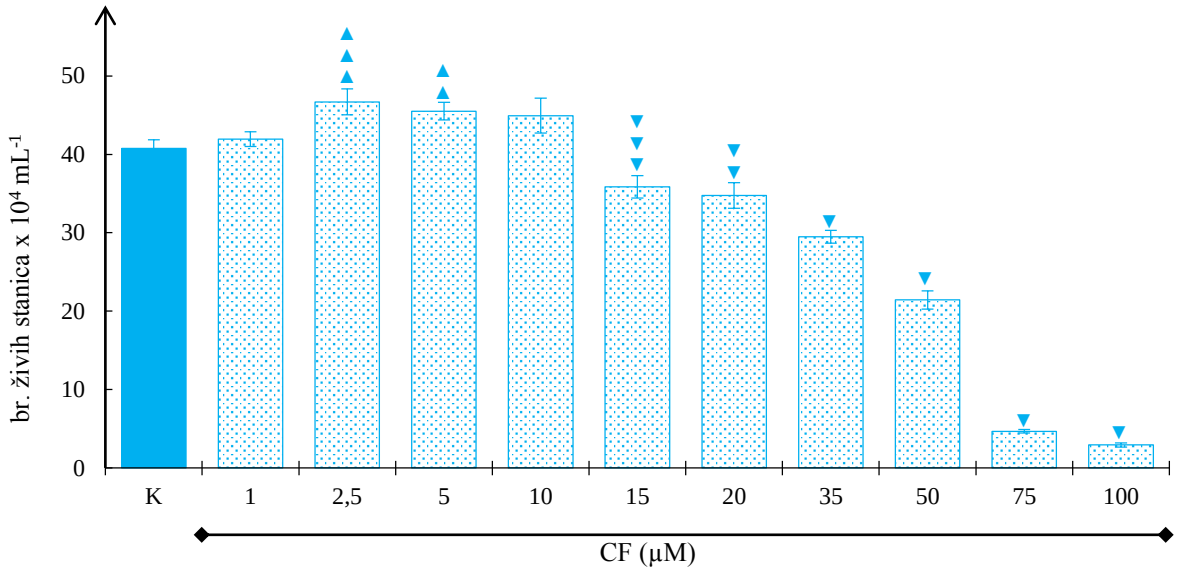
Slika 56. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼p<0,01, ▼▼p<0,005, ▼p<0,001.

Na Slici 56 vidljivo je smanjenje vrijednosti apsorbancije ovisno o koncentraciji CF-a, što je potvrđeno i metodama *NR* i *KB*. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi 20,34% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.5.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica praćen je pomoću metode *TB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 57 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (4 – 11 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 57 vidljivo je da su koncentracije CF-a od 1 – 10 μM nakon 48 sati dovele do porasta u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak za 2,86 – 14,51%, pri čemu je porast statistički značajan pri 2,5 μM (p<0,025) i 5 μM (p<0,01). Međutim, do statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti CHO-K1 stanica, dolazi pri koncentracijama ≥ 15 μM (p<0,025 – p<0,001).



Slika 57. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼/▲▲▲p<0,025, ▼▼/▲▲p<0,01, ▼p<0,001.

Iz Slike 57 vidljivo je smanjenje broja živih stanica ovisno o primijenjenoj koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi svega 7,20% u odnosu na vijabilnost stanica u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

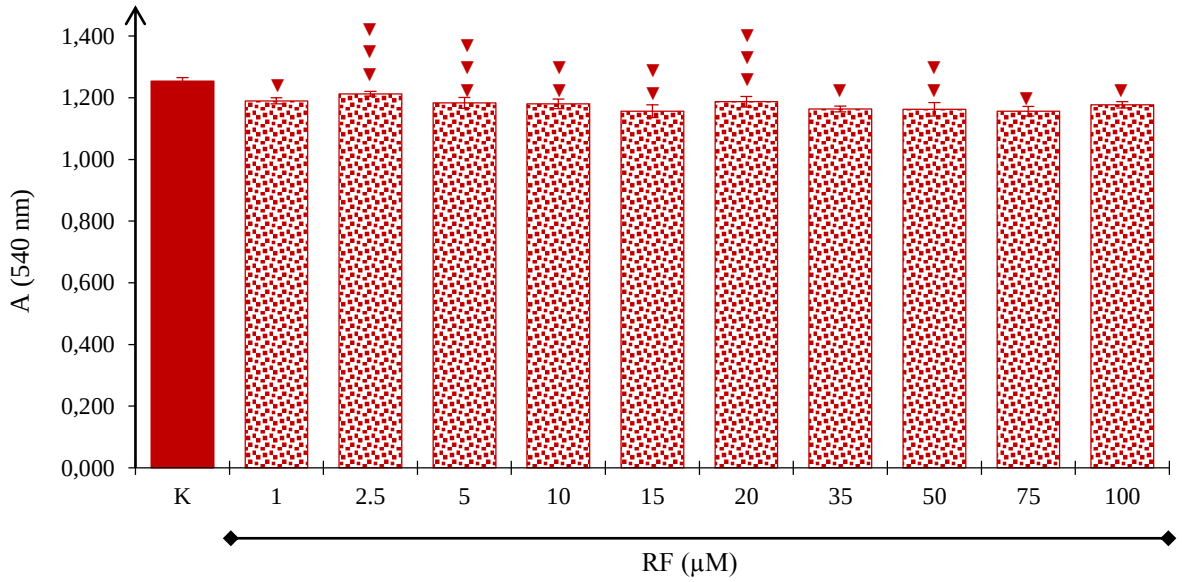
4.6. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU Hepa1-6 STANICA

S ciljem utvrđivanja učinaka RF-a i CF-a na proliferaciju i vijabilnost Hepa1-6 stanica te u svrhu selekcije i usporedbe učinaka odabranih biološki aktivnih tvari na normalnim i kanceroznim stanicama, Hepa1-6 stanice nacijepljene su u jažice *6-well* ploča u koncentraciji od $5x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10 μL otopine RF-a/CF-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1 – 100 μM RF/CF. Uz učinak RF-a/CF-a na rast stanica, prati se i rast stanica u kontroli kojima se dodaje 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. Učinci odabranih koncentracija RF-a/CF-a na proliferaciju i vijabilnost Hepa1-6 stanica praćeni su upotrebom četiri *in vitro* metode: *NR*, *KB*, *MTT* te *TB* 48 sati nakon inkubacije.

4.6.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 μM RF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *NR* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 58 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (4 – 10 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 58 vidljivo je da su sve ispitane koncentracije RF-a dovele do blagog (3,32 – 7,80%), ali statistički značajnog pada stanične vijabilnosti Hepa1-6 stanica u odnosu na kontrolni uzorak ($p<0,01$ pri 2,5, 5 i 20 μM, $p<0,005$ pri 10, 15 i 50 μM te $p<0,001$ pri 1, 35, 75 i 100 μM).

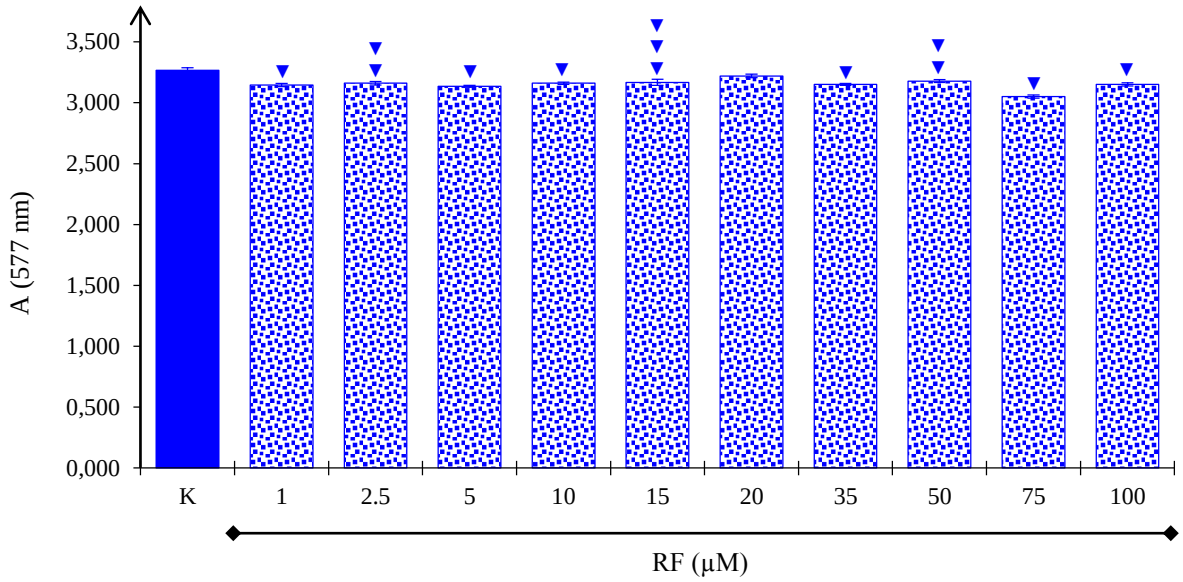


Slika 58. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼$p<0,01$, ▼▼$p<0,005$, ▼$p<0,001$.

4.6.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM RF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *KB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 59 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (5 – 10 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 59 vidljivo je da pri svim ispitanim koncentracijama RF-a (izuzev 20 μM) dolazi do blagoga (1,41 – 6,59%), ali statistički značajnog pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak ($p<0,025$ pri 15 μM, $p<0,005$ pri 2,5 i 50 μM te $p<0,001$ pri 1, 5, 10, 35, 75 i 100 μM).

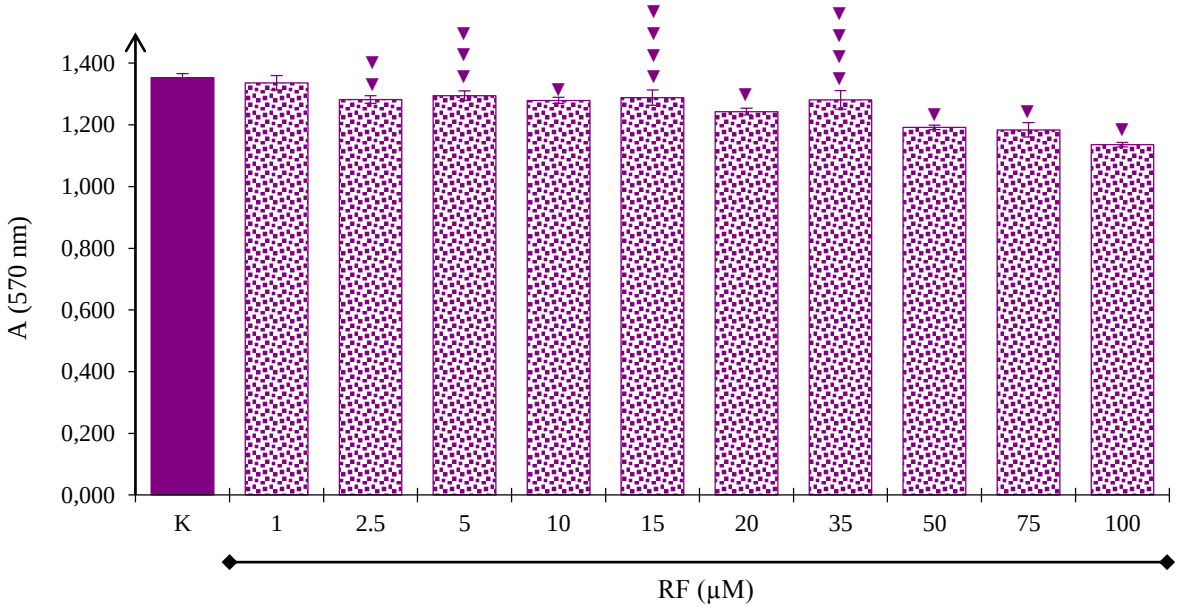


Slika 59. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼p<0,025, ▼▼p<0,005, ▼p<0,001.

4.6.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM RF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 60 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (5 – 10 mjerenja po uzorku).

Na Slici 60 vidljivo je da pri svim ispitanim koncentracijama RF-a dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti (1,19 – 16,05%) u odnosu na kontrolni uzorak. Pad je pri koncentracijama od 2,5 – 100 μM statistički značajan ($p<0,05$ pri 15 i 35 μM, $p<0,025$ pri 5 μM, $p<0,005$ pri 2,5 μM te $p<0,001$ pri 10, 20, 50, 75 i 100 μM).

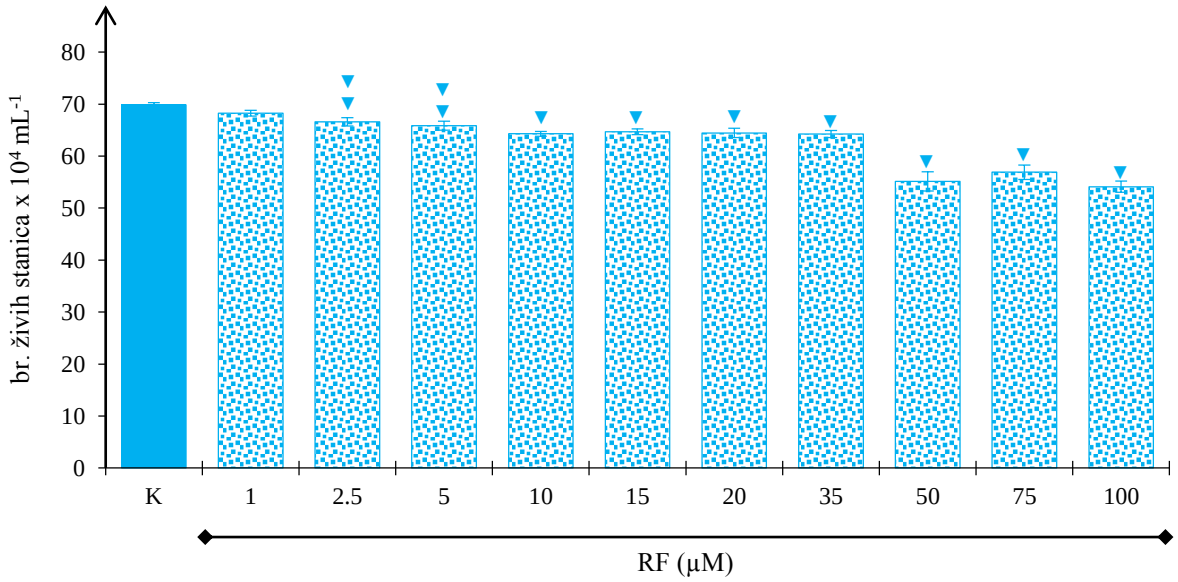


Slika 60. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼▼p<0,05, ▼▼▼p<0,025, ▼▼p<0,005, ▼p<0,001.

4.6.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM RF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *TB* 48 sati nakon tretmana. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 61 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (5 – 10 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 61 vidljivo je da pri svim ispitanim koncentracijama RF-a dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti (2,26 – 22,52%) u odnosu na kontrolni uzorak. Pad je pri koncentracijama od 2,5 – 100 μM statistički značajan ($p<0,005$ pri 2,5 i 5 μM te $p<0,001$ pri 10 – 100 μM).

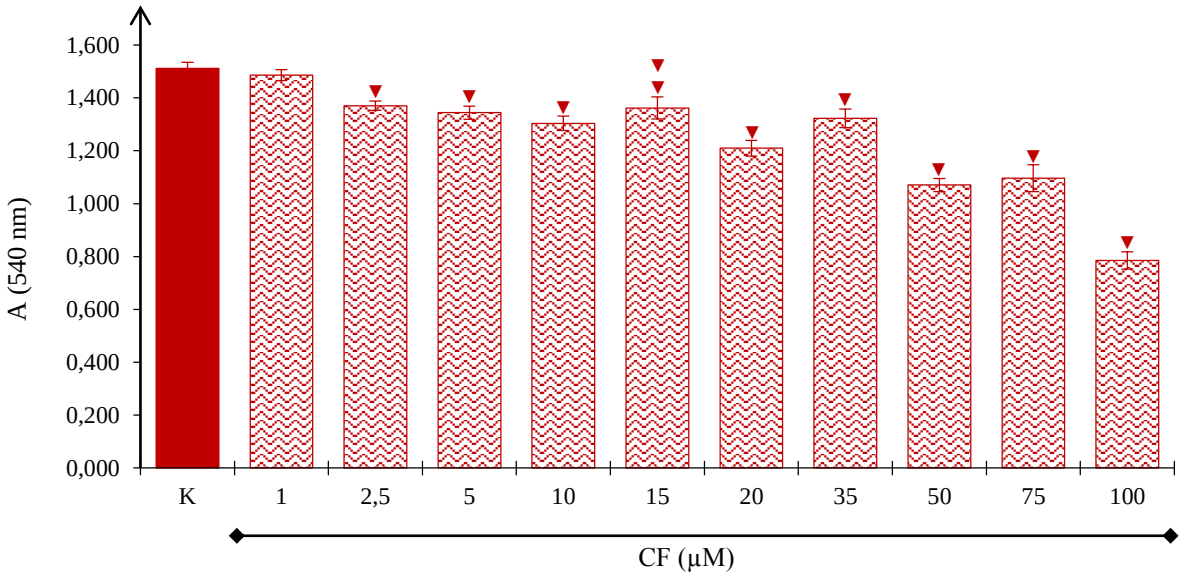


Slika 61. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼p<0,005, ▼p<0,001.

4.6.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Neutral Red*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *NR* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 62 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (5 – 15 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 62 vidljivo je da pri svim ispitanim koncentracijama CF-a dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti (1,71 – 48,07%) u odnosu na kontrolni uzorak. Pad je pri koncentracijama od 2,5 – 100 μM statistički značajan (p<0,01 pri 15 μM, p<0,001 pri 2,5 – 10 μM te 20 – 100 μM).



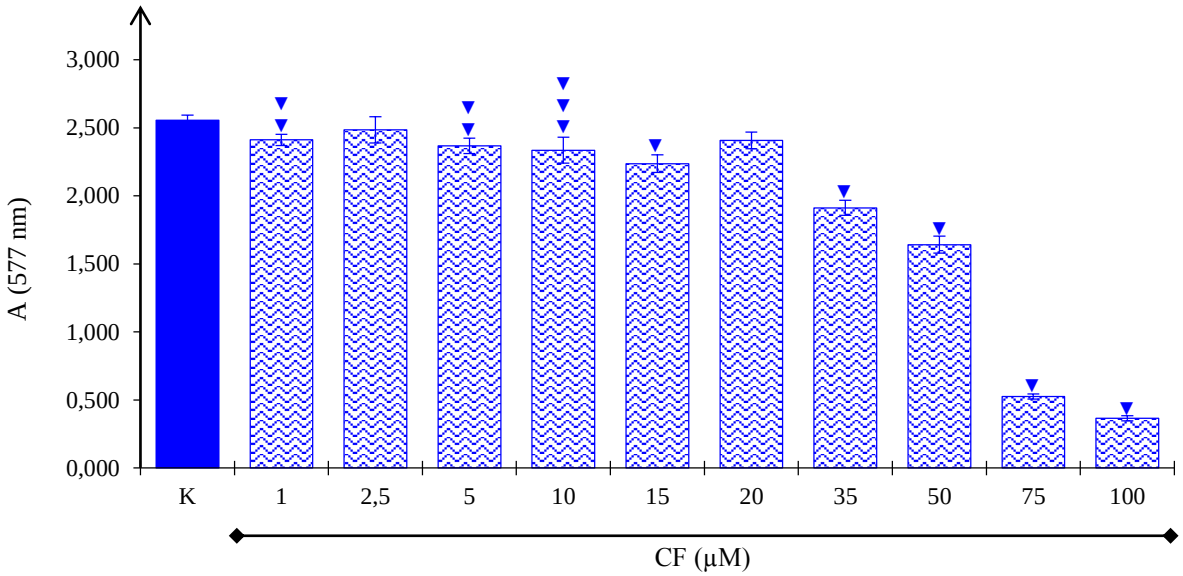
Slika 62. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼$p<0,01$, ▼$p<0,001$.

Vidljivo smanjenje vrijednosti apsorbancije s vremenom inkubacije prikazano na Slici 62 upućuje na to da je preživljenje stanica obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi 51,93% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.6.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *KB* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 63 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška (6 – 15 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 63 vidljivo je da 48 sati nakon tretmana, CF u svim primijenjenim koncentracijama (1 – 100 μM) uzrokuje promjene u vijabilnosti Hepa1-6 stanica u odnosu na kontrolni uzorak na način da dovodi do pada stanične vijabilnosti (2,72 – 85,69%). Statistički značaj ne uočava se samo pri koncentracijama CF-a od 2,5 i 20 μM, dok je pri koncentracijama od 1, 5 – 15 μM te 35 – 100 μM statistički značajan ($p<0,05$ pri 10 μM, $p<0,025$ pri 1 i 5 μM te $p<0,001$ pri 15, 35 – 100 μM).



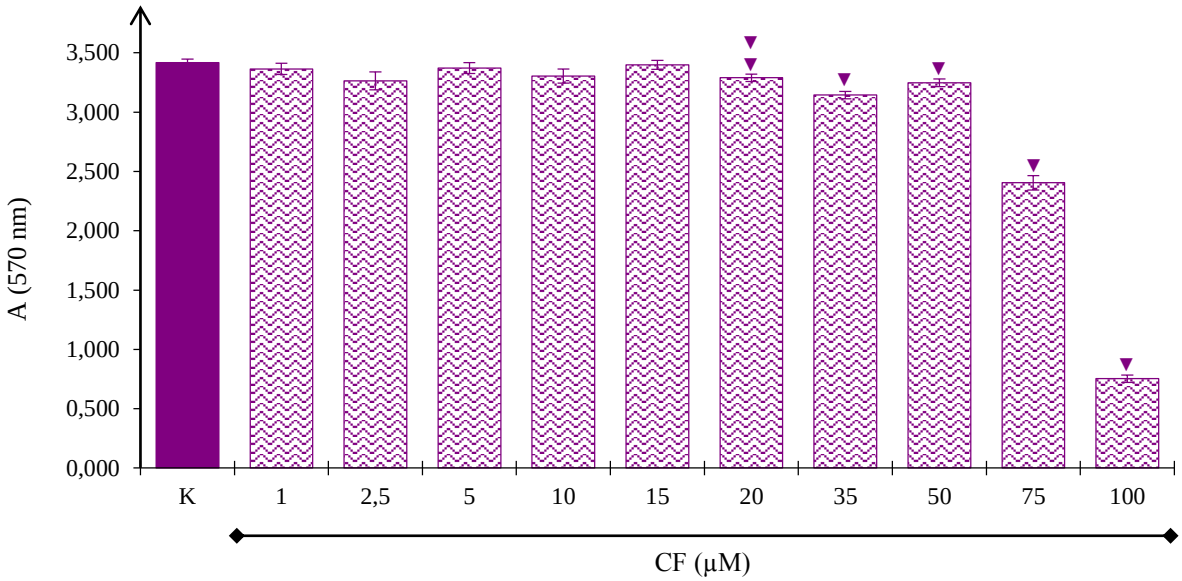
Slika 63. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 577 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼p<0,05, ▼▼p<0,025, ▼p<0,001.

Iz Slike 63 vidljivo smanjenje vrijednosti apsorbancije s vremenom inkubacije upućuje na to da je preživljenje stanica obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi svega 14,31% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.6.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *MTT*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *MTT* 48 sati nakon tretmana, a rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 64 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška (6 – 16 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 64 vidljivo je da nakon 48 sati sve ispitane koncentracije CF-a dovode do pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak (0,52 – 77,96%), pri čemu je taj pad statistički značajan pri koncentracijama od 20 μM (p<0,01) te 35 – 100 μM (p<0,001).



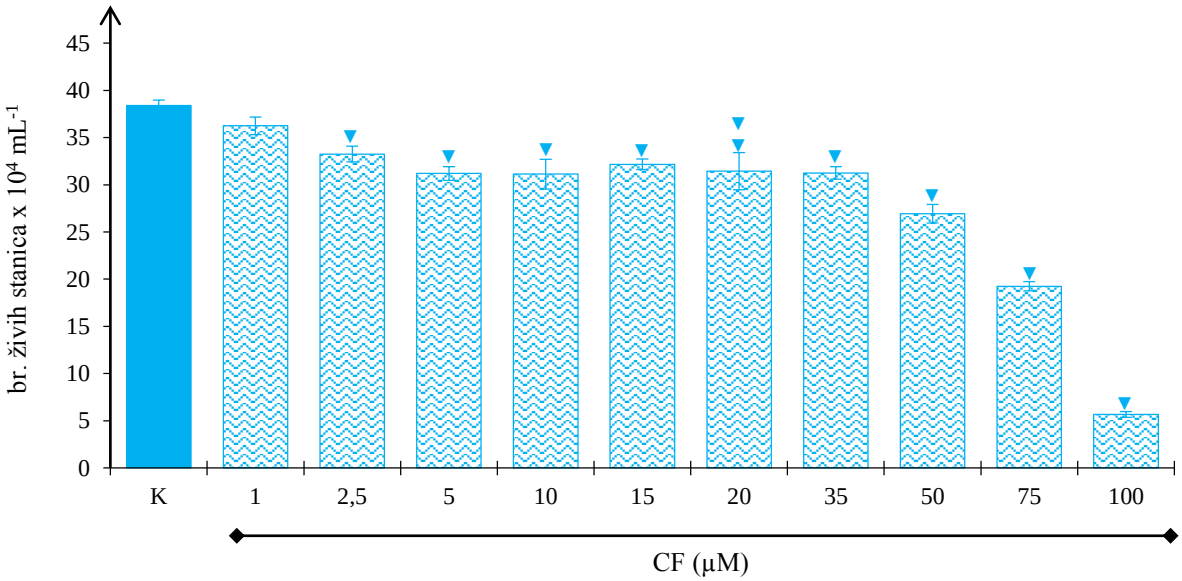
Slika 64. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 570 nm ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼p<0,01, ▼p<0,001.

Na Slici 64 vidljivo je smanjenje vrijednosti apsorbancije s vremenom inkubacije, što upućuje na to da je preživljenje stanica obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi 22,04% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.6.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica određen metodom *Trypan Blue*

Učinak 1 – 100 μM CF-a na proliferaciju Hepa1-6 stanica praćen je pomoću metode *TB* 48 sati nakon tretmana. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 65 kao srednja vrijednost broja živih stanica ± standardna pogreška (3 – 8 mjerenja po uzorku).

Iz Slike 65 vidljivo je da nakon 48 sati sve ispitane koncentracije CF-a dovode do pada u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak (5,61 – 85,25%), pri čemu je taj pad statistički značajan pri koncentracijama od 20 μM (p<0,01), 2,5 – 15 μM te 35 – 100 μM (p<0,001).



Slika 65. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na vijabilnost Hepa1-6 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica x 10^4 mL^{-1} medija za uzgoj ± standardna pogreška u odnosu na kontrolni uzorak (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼p<0,01, ▼p<0,001.

Iz Slike 65 vidljivo smanjenje broja živih stanica s vremenom inkubacije upućuje na to da je preživljenje stanica obrnuto proporcionalno koncentraciji CF-a. Vijabilnost stanica tretiranih CF-om najveće koncentracije (100 μM) u trajanju od 48 sati iznosi svega 14,75% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

4.7. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA FORMIRANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA

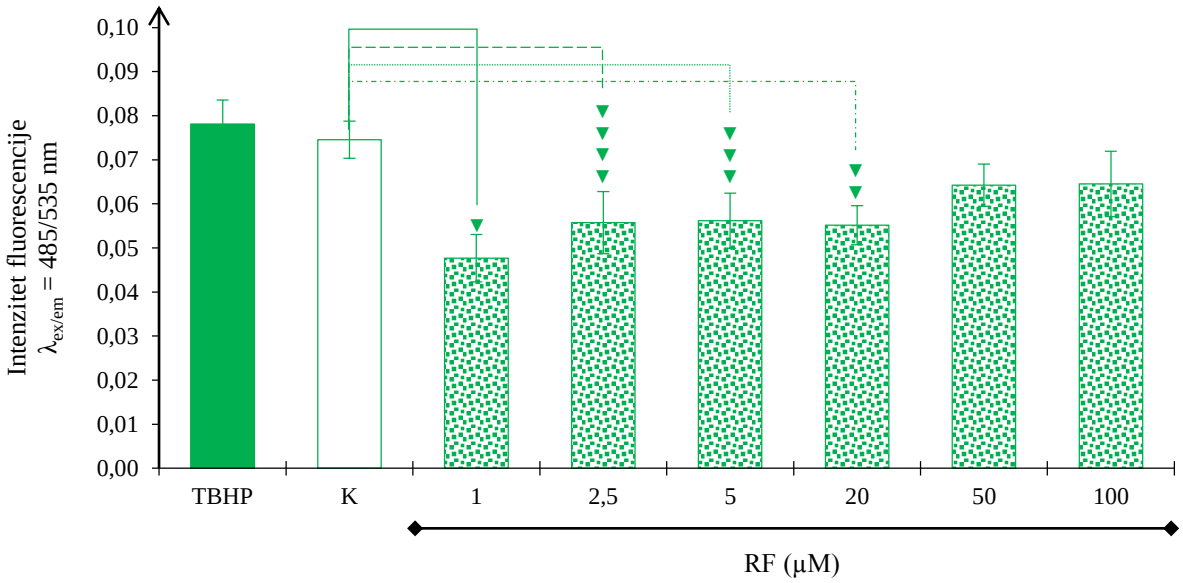
U svrhu određivanja učinaka RF-a i CF-a na intracelularnu razinu ROS-a, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 96-*well* ploče tamnog dna u koncentraciji od 2,5x10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=100 μL). Nakon 24 sata, stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice dodaje se 100 μL DCFH-DA u koncentraciji od 25 μM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje s puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama RF-a/CF-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1 – 100 μM. Uz učinak RF-a/CF-a na intracelularnu razinu ROS-a, prati se i intracelularna razina ROS-a u kontrolnim uzorcima – netretirane stanice (K_i), stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojemu je otopljen ispitivani spoj (K), a kao pozitivna kontrola koristi se 50 μM TBHP (*tert*-butil hidroperoksid).

Učinak 1 – 100 μM RF-a/CF-a na intracelularnu razinu ROS-a u staničnoj liniji CHO-K1 praćen je primjenom DCFH-DA metode, koja uključuje mjerenje intenziteta fluorescencije DCF-a 3 sata nakon inkubacije s ovim potencijalnim anti/prooksidansima.

Rezultati su prikazani na Slikama 66 i 67 kao ovisnost intenziteta fluorescencije o primijenjenim koncentracijama RF-a/CF-a. Učinak svake od koncentracija RF-a/CF-a određen je iz 6 – 15 mjerenja.

4.7.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama

Iz prikaza učinka RF-a (1 – 100 μM) na stvaranje ROS-a u CHO-K1 stanicama na Slici 66, vidljivo je da RF u svim ispitanim koncentracijama uzrokuje pad razine ROS-a, a statistički značajan pad uočava se pri koncentracijama 1 μM ($p<0,001$), 2,5 μM ($p<0,05$), 5 μM ($p<0,025$) i 20 μM ($p<0,005$) za 13,40 – 36,05% u odnosu na kontrolu (K – stanice tretirane DMSO-om).

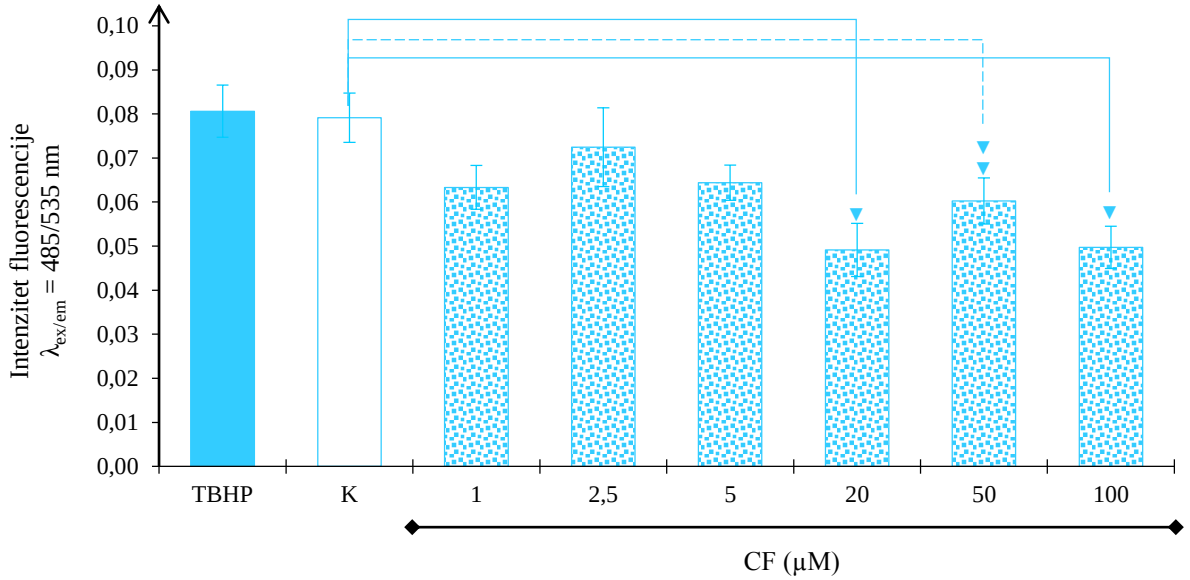


Slika 66. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF1 – 100 μM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška. TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼▼▼$p<0,05$, ▼▼▼$p<0,025$, ▼▼$p<0,005$, ▼$p<0,001$.

4.7.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama

Iz prikaza učinka CF-a (1 – 100 μM) na stvaranje ROS-a u CHO-K1 stanicama na Slici 67, vidljivo je da u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K), pri svim ispitanim koncentracijama

CF-a dolazi do pada razine ROS-a za 8,48 – 37,91%, a statistički značajan pad uočava se pri koncentracijama 20 μM ($p<0,005$), 50 μM ($p<0,05$) i 100 μM ($p<0,005$).



Slika 67. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF1 – 100 μM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u CHO-K1 stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška. TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL-1 medija za uzgoj; 1 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): ▼▼$p<0,05$, ▼$p<0,005$.

4.8. STANIČNA SMRT NAKON TRETMANA CHO-K1 STANICA FEROCENSKIM TRIACILNIM DERIVATOM RESVERATROLA ILI FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA

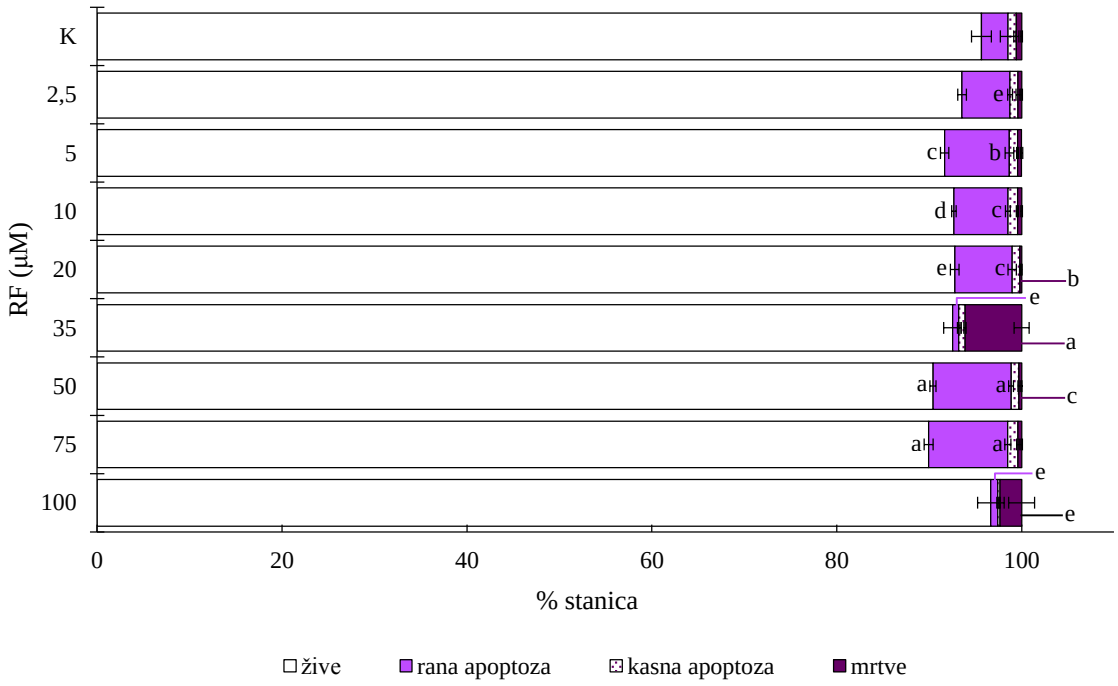
S svrhu utvrđivanja utjecaja novosintetiziranog RF-a/CF-a na tip stanične smrti (apoptoza/nekroza) te u svrhu utvrđivanja udjela stanica u određenoj subpopulaciji stanica (žive i zdrave stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtve stanice), CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10 μL otopine RF-a/CF-a u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 2,5 – 100 μM (RF) te 5 – 100 μM (CF). Uz učinak RF-a/CF-a na tip stanične smrti, prati se i rast stanica u kontroli kojima se dodaje 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj. 48 sati nakon tretmana odabranim ispitivanim spojem, primjenom *MUSE*® protočnog citometra provodi se kvantitativna analiza živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i mrtvih (nekrotičnih) stanica.

Rezultati analize CHO-K1 stanične smrti nakon tretmana stanica RF-om/CF-om prikazani su kao udio živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica (Slike 68 i 70) te kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami sa četiri različite populacije CHO-K1 stanica (Slike 69 i

71) dobivenih primjenom metode protočne citometrije 48 sati nakon tretmana RF-om/CF-om. Učinak različitih koncentracija ispitanih spojeva određen je iz 4 – 8 mjerenja po koncentraciji.

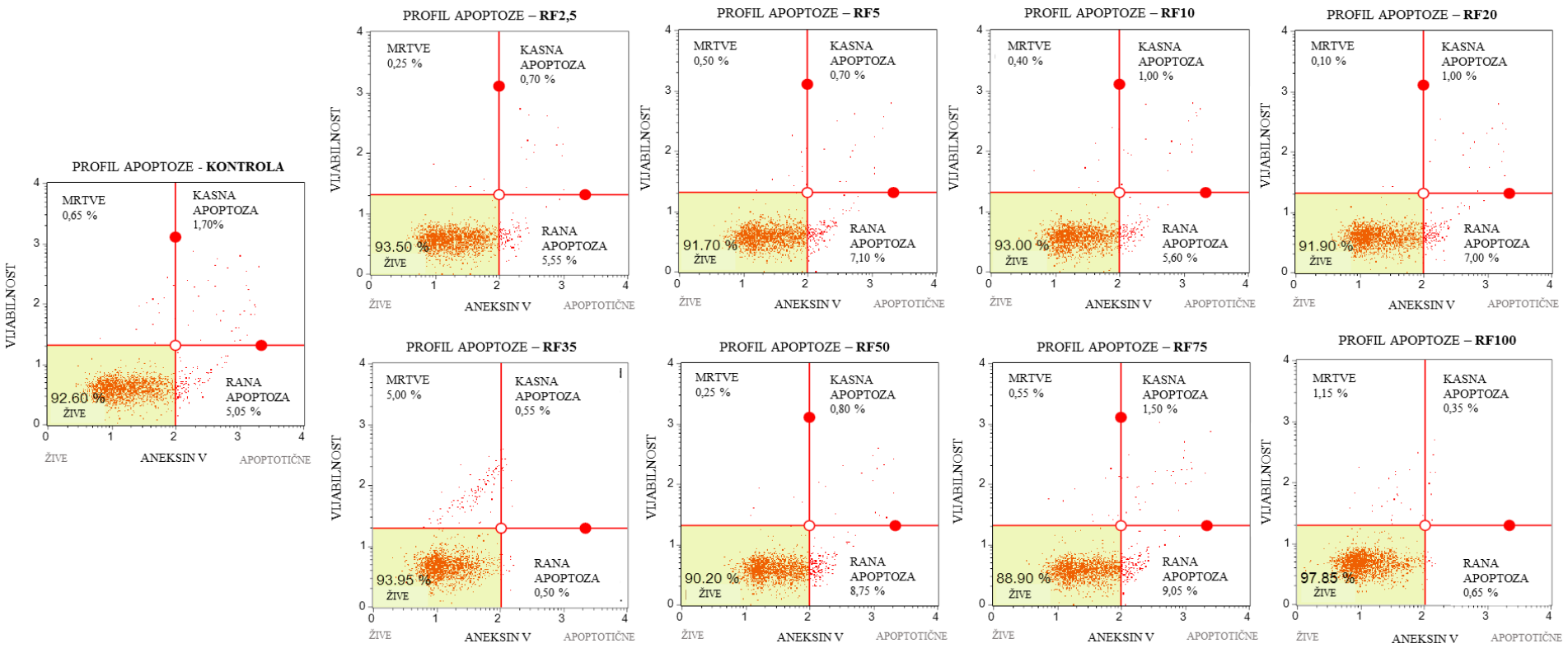
4.8.1. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola

Na Slici 68 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon tretmana RF-om (2,5 – 100 μM) te je iz slike vidljivo kako s povećanjem koncentracije RF-a dolazi do neznatnih promjena u postotku živih stanica u odnosu na kontrolu (1,02 – 5,70%). Udio ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji RF-a, pa je tako pri 5 μM taj udio 7,43% ($p<0,005$ – rana apoptoza), pri 35 μM 1,35% ($p<0,05$ – rana apoptoza), pri 50 μM 9,30% ($p<0,001$ – rana apoptoza), dok je pri 100 μM svega 0,98% ($p<0,05$ – rana i kasna apoptoza). Udio mrtvih stanica ostaje nizak pri svim ispitanim koncentracijama RF-a, izuzev koncentracija 35 μM gdje iznosi nešto većih 6,13% ($p<0,001$) i 100 μM s 2,35%.



Slika 68. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na udio živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 48 sati nakon tretmana CHO-K1 stanica određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{e}p<0,05$, $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$.

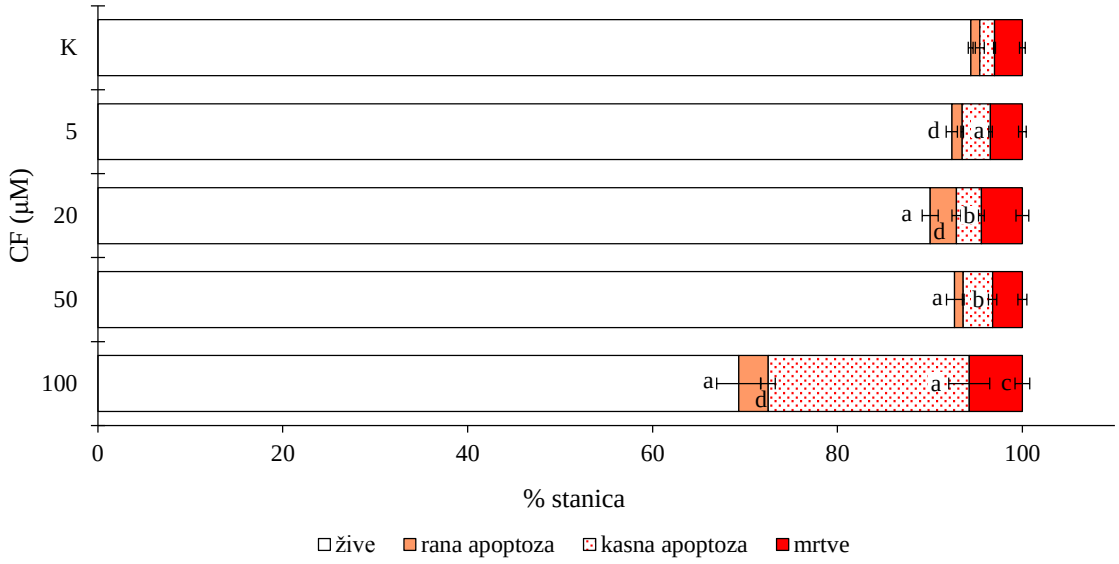
Na Slici 69 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana stanica RF-om.



Slika 69. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 48 sati tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF) dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; RF2,5 – 100 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM).

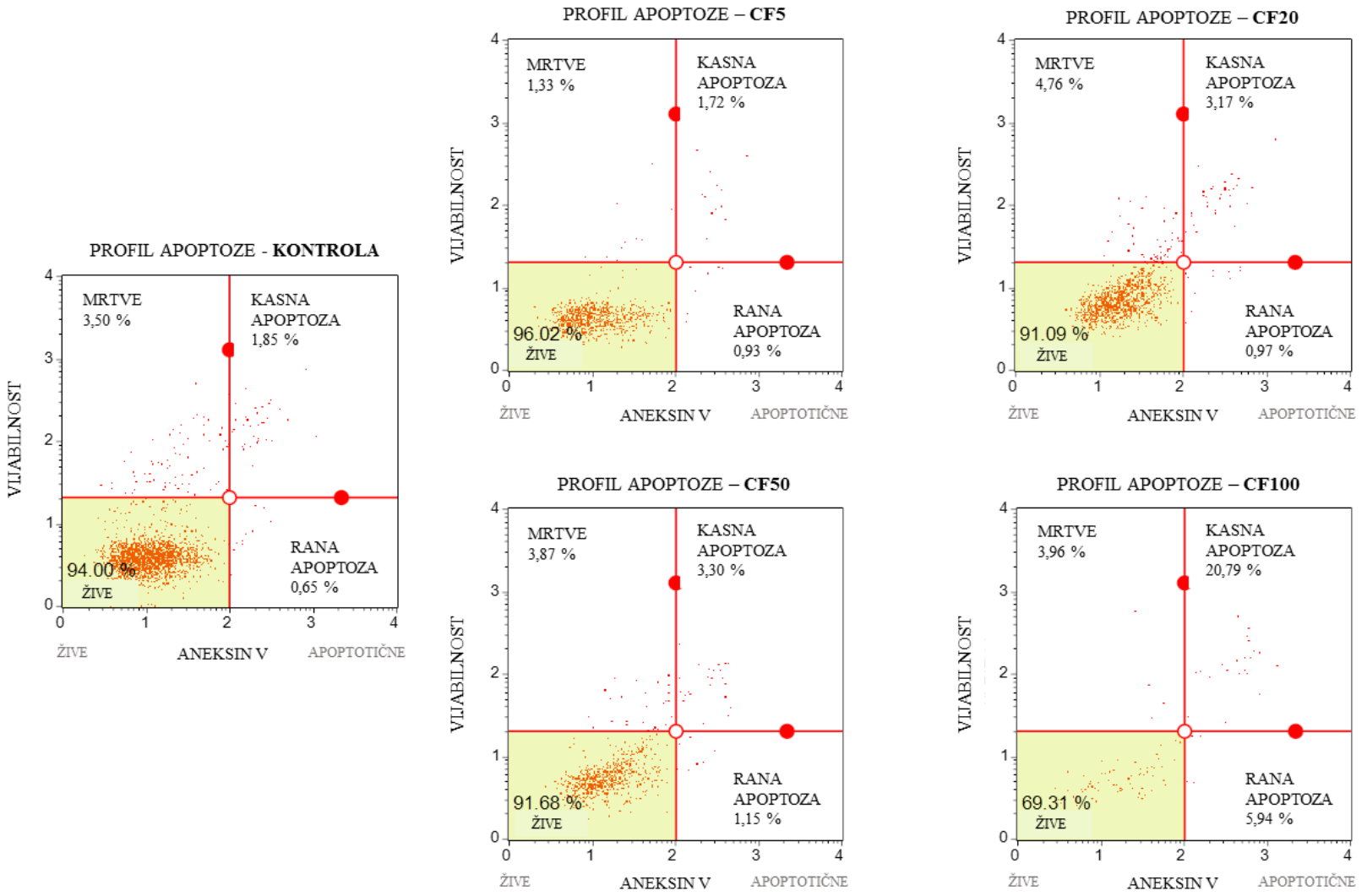
4.8.2. Stanična smrt nakon tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim analogom kurkumina

Na prikazu različitih subpopulacija (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon tretmana CF-om (5 – 100 μM) na Slici 70, vidljivo je da s povećanjem upotrebljene koncentracije dolazi do smanjenja postotka živih stanica. 48 sati nakon tretmana, povećanjem koncentracije CF-a postotak živih stanica se smanjuje s 94,41% u kontrolnom uzorku (K) na 92,37% pri tretmanu s 5 μM ($p<0,025$), 90,04% pri 20 μM ($p<0,001$), 92,67% pri 50 μM, dok pri tretmanu sa 100 μM ($p<0,001$) udio živih stanica pada na 69,32%. Udio ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) raste s 2,58% u kontrolnom uzorku (K) na 4,19 pri tretmanu s 5 μM ($p<0,001$ – kasna apoptoza), 5,53% pri tretmanu s 20 μM ($p<0,05$ – rana apoptoza, $p<0,01$ – kasna apoptoza), 4,12% pri tretmanu s 50 μM ($p<0,01$ – kasna apoptoza) te na 24,93% pri tretmanu sa 100 μM ($p<0,05$ – rana apoptoza, $p<0,001$ – kasna apoptoza). Udio mrtvih (nekrotičnih) stanica ostaje nizak pri svim ispitanim koncentracijama (3,44 – 5,75%). Analizirajući udjele subpopulacija stanica, vidljivo je da je trend porasta udjela apoptotskih stanica u populaciji veći od trenda porasta udjela nekrotičnih stanica i da je ovisan o dozi CF-a.



Slika 70. Učinak ferocenskog analoga kurkumina (CF5 – 100 μM) na udio živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 48 sati nakon tretmana CHO-K1 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na K (Student *t*-test): $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$.

Na Slici 71 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana stanica CF-om.



Slika 71. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami nakon 48 sati tretmana CHO-K1 stanica ferocenskim analogom kurkumina (CF) obiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 5 µL mL^{-1} medija za uzgoj; CF5 – 100 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 5 – 100 µM).

4.9. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA

U svrhu utvrđivanja mogućih zaštitnih učinaka RSV-a/CRC-a na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice *6-well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Sat vremena nakon nacjepljivanja, stanice su tretirane s 10 µL otopine RSV-a/CRC-a u DMSO-u tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5; 10 i 20 µM za RSV te 1; 2,5; 5; 10 i 20 µM za CRC. Nakon 24 sata inkubacije s odabranim polifenolom, stanice su tretirane s 20 µL otopine PCB-a 77, odnosno PCB-a 153 u DMSO-u tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75 µM.

Mogući zaštitni učinci odabranih polifenola na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima praćeni su 24 sata nakon tretmana stanica PCB-ima primjenom odabranih *in vitro* metoda: *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*.

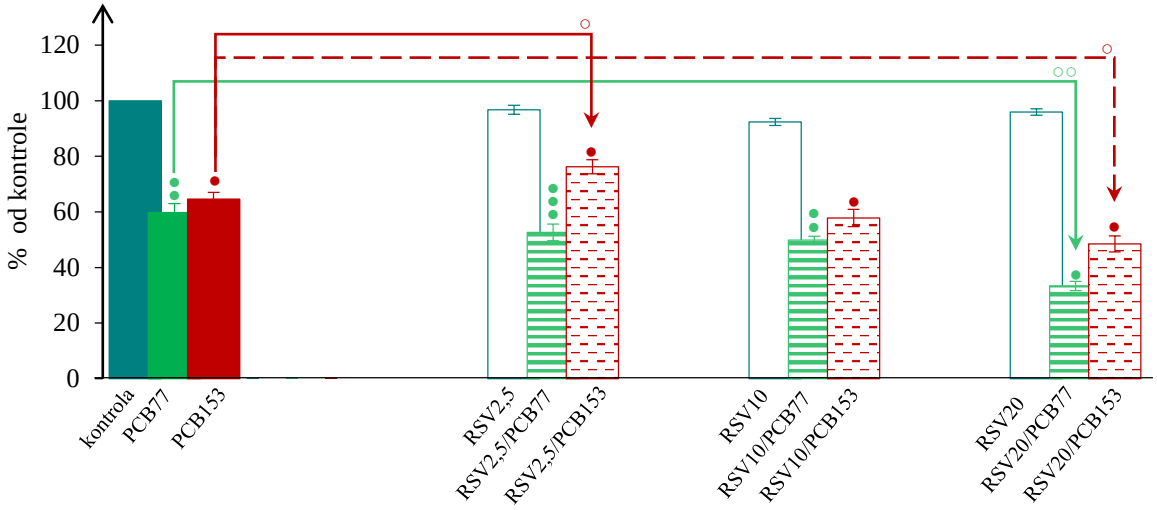
Istovremeno je praćen i rast stanica u kontroli kojima se dodaje otapalo korišteno za otapanje polifenola (5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) i za otapanje PCB kongenera (10 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) te rast stanica kojima se dodaje samo 75 µM PCB kongener bez predinkubacije s polifenolnim spojem (10 µL PCB kongenera mL^{-1} medija za uzgoj).

4.9.1. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*

U svrhu praćenja učinka RSV-a na citotoksičnost induciranu odabranim PCB kongenerima, CHO-K1 stanice najprije su predinkubirane s RSV-om (2,5 – 20 µM), a 24 sata kasnije tretirane PCB-em 77 ili PCB-em 153 u koncentraciji od 75 µM. Stanična vijabilnost određena je metodom *NR* 24 sata nakon tretmana PCB kongenerima. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 72 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 5 – 16 mjerenja po uzorku.

PCB 77 (75 µM) uzrokovao je statistički značajno ($p<0,01$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica za 40,19%, dok je 75 µM PCB 153 uzrokovao statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti od 35,44% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 72). Pri tretmanu stanica planarnim PCB kongenerom (PCB 77), RSV nije pokazao zaštitni učinak na staničnu vijabilnost. Inhibitorni učinak izraženiji je i statistički značajan ($p<0,01$) nakon predinkubacije stanica s 20 µM RSV-om i tretiranih PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Kod ostalih koncentracija RSV-a nije primijećen značajan utjecaj na vijabilnost stanica predinkubiranih s RSV-om, a potom tretiranih PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo tim kongenerom. Blagi zaštitni učinak na vijabilnost

stanica tretiranih neplanarnim kongenerom (PCB 153), a predinkubiranih s RSV-om, u odnosu na stanice kojima RSV nije dodan, uočava se pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a od 2,5 μM i to za 11,65% ($p<0,001$). Međutim, statistički značajan ($p<0,001$) inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju uočen je pri tretmanu stanica PCB-em 153 koje su predinkubirane s 20 μM RSV u odnosu na stanice koje su tretirane samo PCB-em 153 i to za 16,09%.



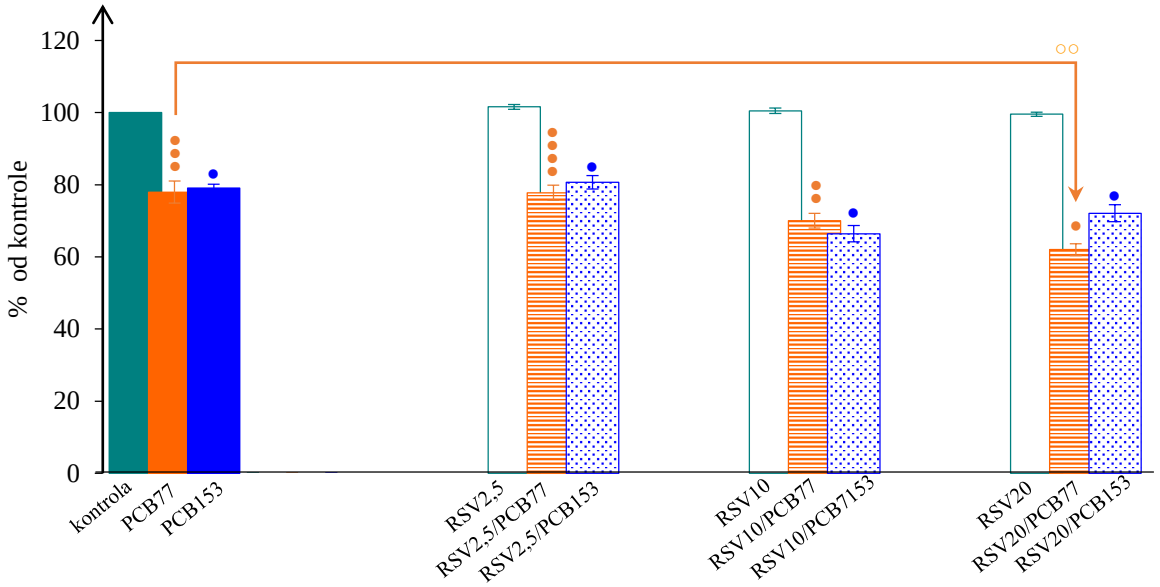
Slika 72. Učinak predinkubacije s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – •••$p<0,025$, ••$p<0,01$, •/•$p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – ○○$p<0,01$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – ○$p<0,001$.

4.9.2. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak predinkubacije s 2,5 – 20 μM RSV-om na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 praćen je pomoću metode *KB*. Stanična vijabilnost određena je 24 sata nakon tretmana odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 73 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 5 – 18 mjerenja po uzorku.

Na Slici 73 vidljivo je da oba PCB kongenera uzrokuju statistički značajno (PCB 77 – $p<0,01$, PCB 153 – $p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica od 22,05% (PCB 77) te 20,97% (PCB 153) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Inhibitorni učinak PCB-a 77 na vijabilnost stanica predinkubiranih ss RSV-

om u dozi od 20 μM izraženiji je i statistički značajan ($p<0,001$) u odnosu na vijabilnost stanica tretiranih samo PCB-em 77 (bez predinkubacije s RSV-om). Blagi zaštitni učinak RSV-a na vijabilnost stanica tretiranih neplanarnim kongenerom (PCB 153) uočava se pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a od 2,5 μM, dok se neznatan inhibitorni učinak uočava pri koncentracijama RSV-a od 10 μM (12,63%) i 20 μM (6,94%).



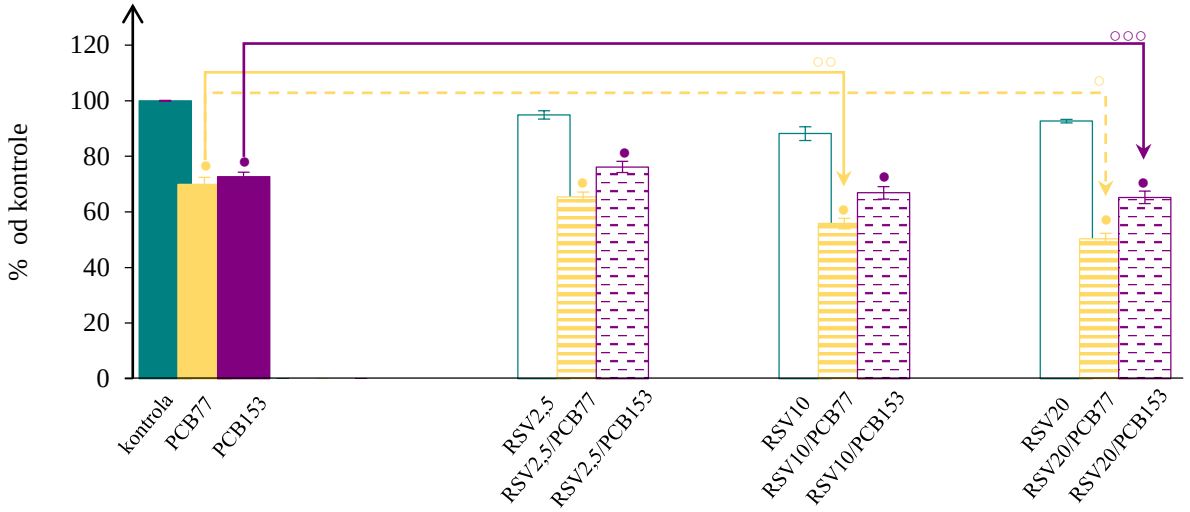
Slika 73. Učinak predinkubacije s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s RSV-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s RSV-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ••••$p<0,05$, •••$p<0,01$, ••$p<0,005$, •/•$p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – ○○$p<0,005$.

4.9.3. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*

Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s 2,5 – 20 μM RSV-om na citotoksičnost induciranu odabranim 75 μM PCB kongenerima (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *MTT* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 74 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 5 – 10 mjerenja po uzorku.

Na Slici 74 vidljivo je da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica od 30,25% (PCB 77) te 27,33% (PCB 153) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Pri tretmanu stanica planarnim PCB-em 77, RSV ne pokazuje zaštitni učinak na staničnu vijabilnost, štoviše,

inhibitorni učinak je izraženiji i statistički značajan pri 10 μM ($p<0,005$) i 20 μM ($p<0,001$) RSV-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Blagi zaštitni učinak na vijabilnost stanica tretiranih neplanarnim PCB-em (PCB 153) RSV je pokazao u koncentraciji 2,5 μM, dok je inhibitorni učinak (RSV/PCB153 *vs.* PCB153) uočljiv pri koncentracijama RSV-a od 10 μM i 20 μM ($p<0,025$).



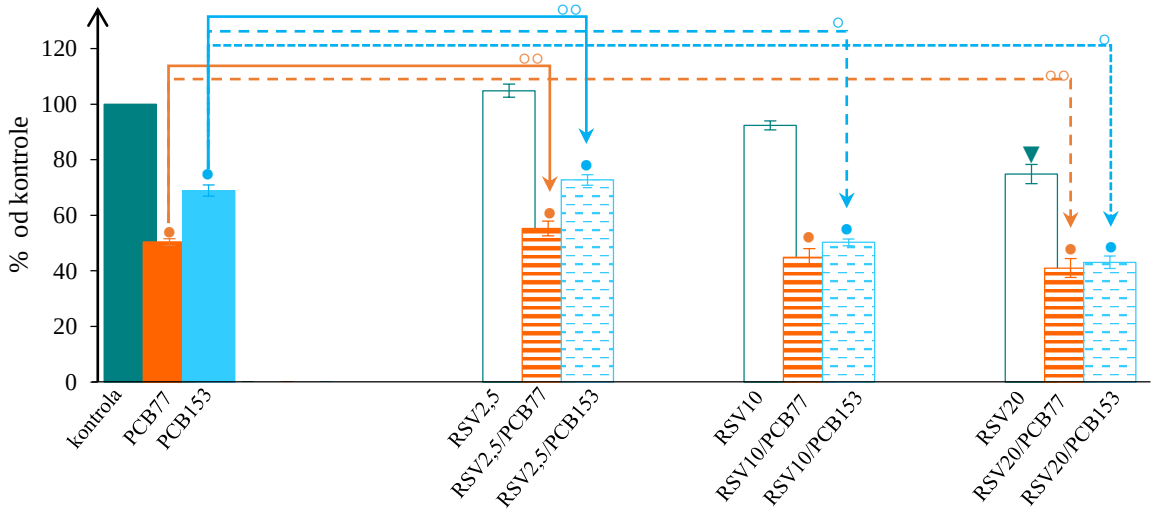
Slika 74. Učinak predinkubacije s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – $^{\bullet/\bullet}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{\circ\circ}p<0,005$, $^{\circ}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{\circ\circ\circ}p<0,025$.

4.9.4. Učinak resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*

Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s 2,5 – 20 μM RSV-om na citotoksičnost induciranu odabranim 75 μM PCB kongenerima (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *TB* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 75 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 11 mjerenja po uzorku.

Na Slici 75 vidljivo je da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica – PCB 77 za 49,62%, a PCB 153 za 31,13% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Pri tretmanu stanica planarnim PCB-em 77, blagi i statistički značajan ($p<0,05$) zaštitni učinak na staničnu

vijabilnost uočava se pri 2,5 μM RSV, dok se pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (20 μM) primjećuje statistički značajan ($p<0,05$) inhibitorni učinak u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Također, nakon tretmana stanica neplanarnim PCB-em 153 uočava se blagi i statistički značajan ($p<0,05$) zaštitni učinak pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji RSV-a (2,5 μM). Međutim, statistički značajan ($p<0,001$) inhibitorni učinak na staničnu vijabilnost (RSV/PCB153 *vs.* PCB153) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, uočava se pri koncentracijama RSV-a od 10 μM (18,61%) i 20 μM (25,80%).

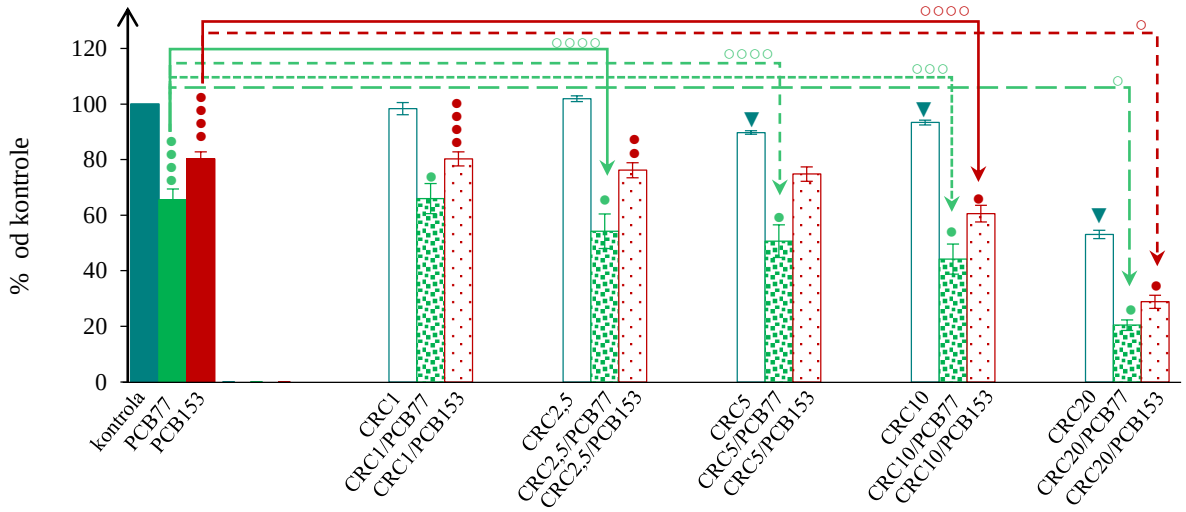


Slika 75. Učinak predinkubacije s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▼/•/•$p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – °°$p<0,05$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – °°$p<0,05$; °$p<0,001$.

4.9.5. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*

U svrhu praćenja učinka CRC-a na citotoksičnost induciranu odabranim PCB kongenerima, CHO-K1 stanice prvo su predinkubirane s 1 – 20 μM CRC-om**,** a 24 sata kasnije tretirane 75 μM PCB-em 77 ili 153. Stanična vijabilnost određena je metodom *NR* 24 sata nakon tretmana stanica određenim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 76 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 12 mjerenja po uzorku.

Metodom *NR* utvrđeno je da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,05$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica od 34,47% (PCB 77) te 19,72% (PCB 153) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 76). CRC nije pokazao zaštitan učinak na staničnu vijabilnost pri tretmanu stanica PCB kongenerima. Štoviše, inhibitorni učinak (CRC/PCB77 *vs.* PCB77) je izraženiji i statistički značajan pri 2,5 μM ($p<0,05$), 5 μM ($p<0,05$), 10 μM ($p<0,025$) i 20 μM ($p<0,001$) CRC-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 za 11,28 – 45,09%. Inhibitorni učinak vidljiv je i nakon tretmana stanica neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153) s tim da je statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica određeno pri najvišim primijenjenim koncentracijama CRC-a od 10 μM ($p<0,05$) za 19,77% i 20 μM ($p<0,001$) za 51,45% u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.



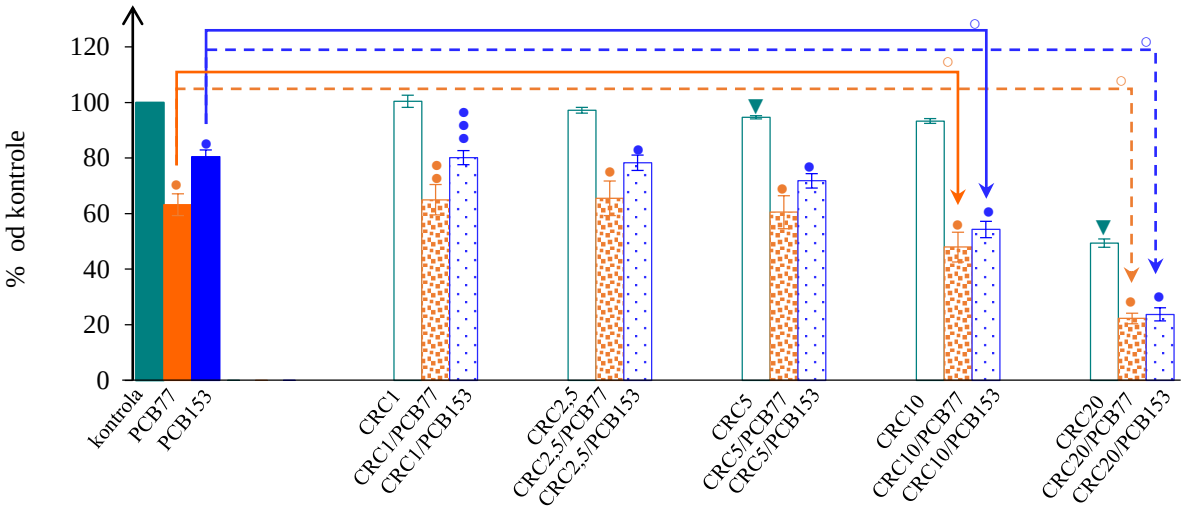
Slika 76. Učinak predinkubacije s kurkuminom (CRC1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CRC1/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CRC1/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – $^{\bullet\bullet\bullet\bullet}$/$^{\bullet\bullet\bullet\bullet}$$p<0,05$, $^{\bullet\bullet}p<0,005$, $^{\blacktriangledown}$/$^{\bullet}$/$^{\bullet}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{\circ\circ\circ\circ}p<0,05$, $^{\circ\circ\circ}p<0,025$, $^{\circ}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{\circ\circ\circ\circ}p<0,05$, $^{\circ}p<0,001$.

4.9.6. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*

Učinak predinkubacije s 1 – 20 μM CRC-om na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih odabranim 75 μM PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *KB* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i

prikazani na Slici 77 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 5 – 18 mjerenja po uzorku.

Metodom *KB* utvrđeno je da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica od 36,80% (PCB 77) te 19,56% (PCB 153) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 77). Predinkubacija stanica s CRC-om (10 i 20 μM), koje su potom tretirane PCB-em 77 rezultirala je statistički značajnim ($p<0,001$) inhibitornim učinkom na staničnu vijabilnost i proliferaciju u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Pri tretmanu stanica neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153), zaštitni učinak CRC-a nije uočen. Štoviše, inhibitorni učinak (CRC/PCB153 *vs.* PCB153) je vidljiv pri svim primijenjenim koncentracijama CRC-a (0,27 – 56,71%) te je statistički značajan ($p<0,001$) pri najvišim primijenjenim koncentracijama od 10 i 20 μM CRC u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.



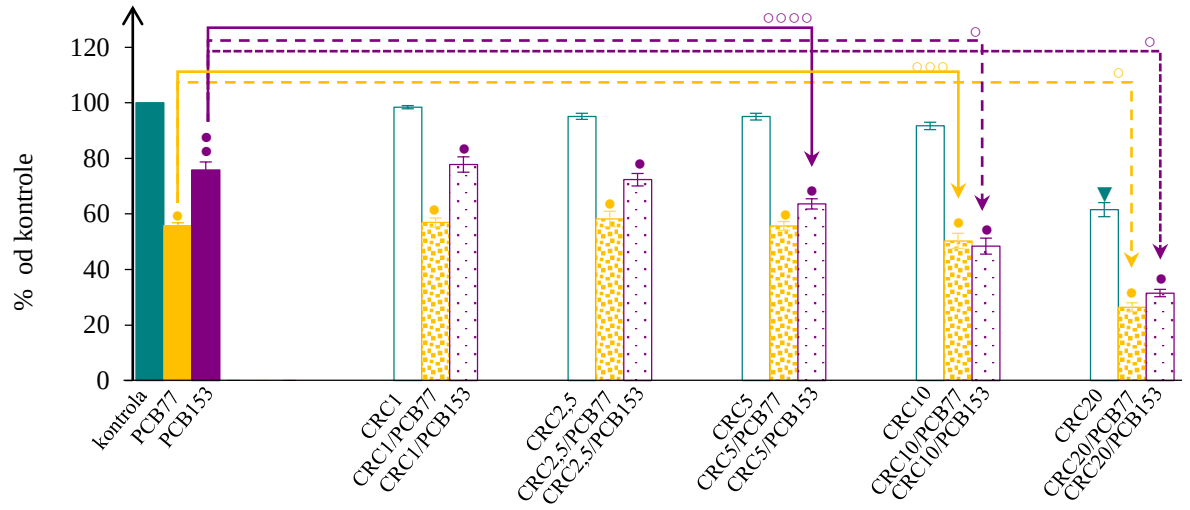
Slika 77. Učinak predinkubacije s kurkuminom (CRC1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CRC1/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CRC1/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – •••$p<0,025$, ••$p<0,005$, ▼/•/•$p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – °$p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – °$p<0,001$.

4.9.7. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*

U svrhu praćenja učinka CRC-a na citotoksičnost induciranu odabranim 75 μM PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153), CHO-K1 stanice predinkubirane su s 1 – 20 μM CRC-om.

Učinak je praćen pomoću metode *MTT* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 78 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 12 mjerenja po uzorku.

Utvrđeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica nakon tretmana 75 μM PCB kongenerima – 44,17% nakon tretmana PCB-em 77 ($p<0,001$), te 24,14% nakon tretmana PCB-em 153 ($p<0,005$) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 78). U dozama do 10 μM CRC nije značajno utjecao na vijabilnost stanica tretiranih PCB-em 77, dok je inhibitorni učinak (CRC/PCB77 *vs.* PCB77) na proliferaciju stanica izraženiji i statistički značajan pri višim primijenjenim koncentracijama CRC-a od 10 μM ($p<0,025$) i 20 μM ($p<0,001$), u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Pri tretmanu stanica neplanarnim PCB-em (PCB 153), također je vidljiv sinergistički antiproliferativni učinak CRC-a (3,53 – 44,37%) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, s time da je taj učinak statistički značajan pri 5 μM ($p<0,05$), 10 μM ($p<0,001$) i 20 μM ($p<0,001$) CRC-a.

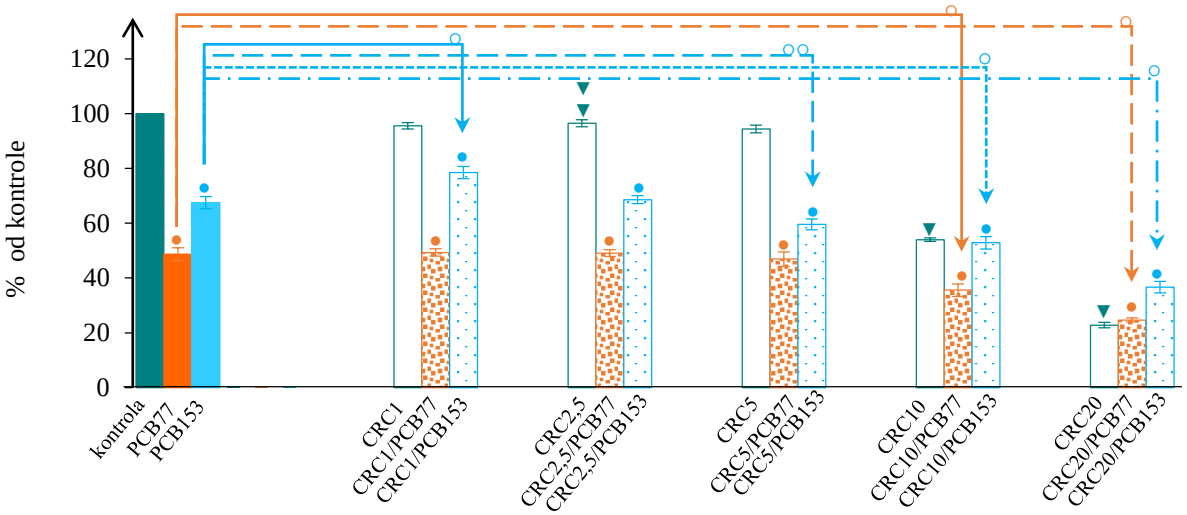


Slika 78. Učinak predinkubacije s kurkuminom (CRC1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CRC1/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CRC1/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – $^{\bullet\bullet}p<0,005$, $^{\blacktriangledown/\bullet/\bullet}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{\circ\circ\circ}p<0,025$, $^{\circ}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{\circ\circ\circ\circ}p<0,05$, $^{\circ}p<0,001$.

4.9.8. Učinak kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*

Na CHO-K1 stanicama praćen je učinak predinkubacije s 1 – 20 μM CRC-om na citotoksičnost induciranu odabranim 75 μM PCB kongenerima (PCB 77 ili PCB 153). Stanična vijabilnost određena je metodom *TB* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 79 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 6 – 11 mjerenja po uzorku.

Metodom *TB* utvrđeno je statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica nakon tretmana 75 μM PCB kongenerima – 51,32% nakon tretmana PCB-em 77, te 32,51% nakon tretmana PCB-em 153 u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 79). Kod stanica predinkubiranih s CRC-om (10 i 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 77 uočena je statistički niža vijabilnost ($p<0,001$) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Zaštitni učinak CRC-a na citotoksičnost induciranu PCB-em 153 uočava se pri najnižim primijenjenim koncentracijama CRC-a (1 i 2,5 μM) te je taj učinak statistički značajan ($p<0,001$; CRC/PCB153 *vs.* PCB153) pri 1 μM CRC. Izraženiji i statistički značajan inhibitorni učinak na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 153, uočava se pri ostalim primijenjenim koncentracijma CRC-a – 5 μM ($p<0,025$), 10 μM ($p<0,001$) i 20 μM ($p<0,001$) CRC-a, u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.



Slika 79. Učinak predinkubacije s kurkuminom (CRC1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili 153 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CRC1/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CRC-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CRC1/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CRC-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▼▼p<0,025, ▼/•/•p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – ◦p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – ◦◦p<0,025, ◦p<0,001.

4.10. UČINAK RESVERATROLA I KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

U svrhu određivanja učinaka RSV-a/CRC-a na intracelularnu razinu ROS-a nakon tretmana stanica PCB-ima, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 96-*well* ploče tamnog dna u koncentraciji od $2,5x10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=100 μL) u koji je dodan RSV/CRC tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 1 – 20 μM odabranog polifenola. Nakon 24 sata stanice se ispiru pripremljenim puferom, a u isprane jažice dodaje se 100 μL DCFH-DA u finalnoj koncentraciji od 25 μM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje s puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama PCB kongenera tako da se u mediju za uzgoj postigne 75 μM koncentracija PCB-a 77 ili PCB-a 153. Uz učinak odabranih polifenola na intracelularnu razinu ROS-a, prati se i razina ROS-a u kontrolnim uzorcima – stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u kojem je otopljen polifenol i/ili PCB (kontrola), stanice tretirane samo PCB kongenerom (PCB), a kao pozitivna kontrola koristi se 50 μM TBHP.

Učinak 1 – 20 μM RSV-a/CRC-a na intracelularnu razinu ROS-a nakon tretmana stanica PCB kongenerom, u staničnoj liniji CHO-K1 praćen je DCFH-DA metodom.

Rezultati su prikazani na Slikama 80 i 81 kao ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji primijenjenih koncentracija RSV-a/CRC-a. Učinak svake od koncentracija određen je iz 4 – 18 mjerenja.

4.10.1. Učinak resveratrola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima

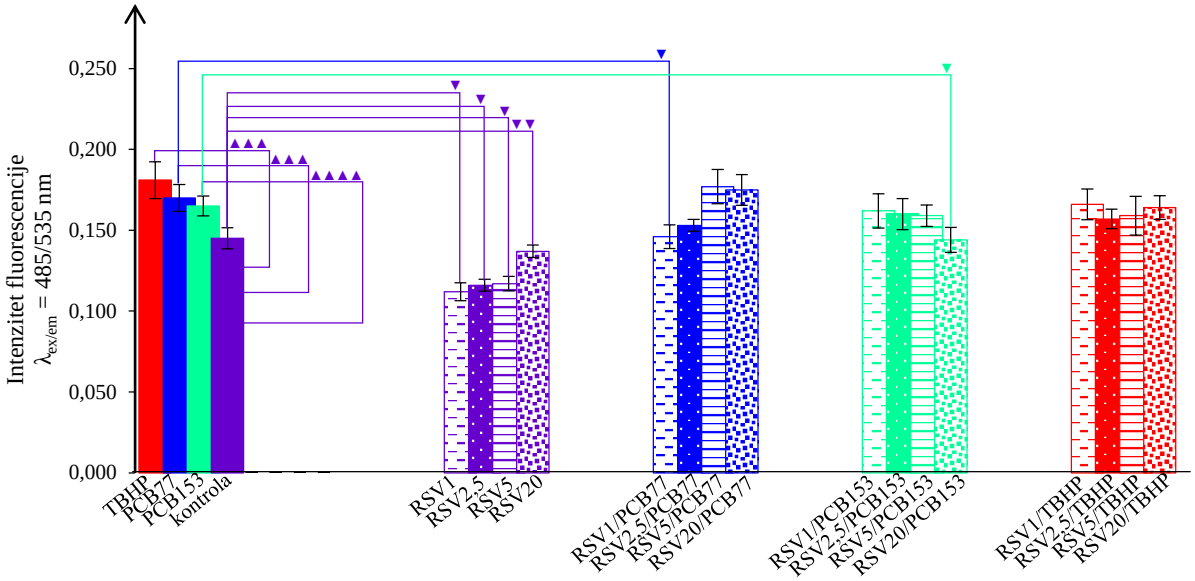
Na Slici 80 prikazani su rezultati učinka RSV-a na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama nakon tretmana PCB-em 77 ili PCB-em 153. Iz slike je vidljivo da dolazi do statistički značajnog povećanja razine ROS-a nakon tretmana stanica PCB-em 77 za 17,56% ($p<0,025$) i PCB-em 153 za 14,10% ($p<0,05$) u odnosu na stanice u kontroli. Dodatak TBHP-a rezultirao je statistički značajnim povišenjem razine ROS-a za 19,81% ($p<0,025$).

RSV u koncentraciji 1 – 20 μM uzrokovao je statistički značajan pad razine ROS-a ($p<0,005$ – $p<0,001$) u odnosu na kontrolu.

Kod stanica predinkubiranih s RSV-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 77, pri nižim ispitanim koncentracijama RSV-a (1 i 2,5 μM) uočena je niža razina ROS-a za 10,28 – 14,55% u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77, pri čemu je to smanjenje statistički značajno ($p<0,05$) pri 1 μM. Međutim, pri višim primijenjenim koncentracijama RSV-a (5 i 20 μM) nije uočena razlika u razinama ROS-a između uzoraka predinkubiranih s RSV-om i tretiranih PCB-em 77 u odnosu na one koji nisu bili predinkubirani s RSV-om.

Kod stanica predinkubiranih s RSV-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 ne dolazi do značajne promjene u razini ROS-a, osim pri najvišoj ispitanoj koncentraciji RSV-a od 20 μM, gdje je razina ROS-a statistički značajno ($p<0,05$) niža (za 12,76%) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.

Kod stanica predinkubiranih s RSV-om, a potom tretiranih 50 μM TBHP-om, dolazi do smanjenja razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo TBHP-om za 8,02 – 13,00%, pri čemu taj pad nije statistički značajan.



Slika 80. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s resveratrolom (RSV1 – 20 μM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nakon tretmana 75 μM PCB 77/PCB 153. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška (TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; RSV1 – RSV20 – stanice tretirane s resveratrolom u koncentracijama od 1 – 20 μM; RSV1/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RSV1/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153; RSV1/TBHP – RSV20/TBHP – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲▲▲p<0,05, ▲▲▲p<0,025, ▼▼p<0,005, ▼p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ▼p<0,05; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ▼p<0,05.

4.10.2. Učinak kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima

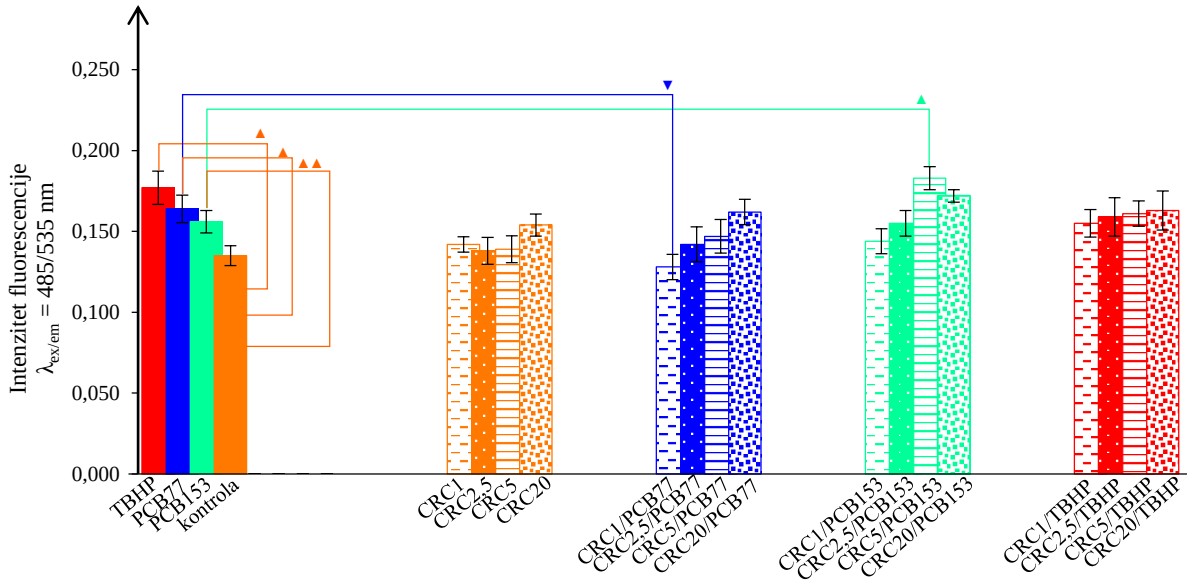
Na Slici 81 vidljivo je da pri tretmanu CHO-K1 stanica PCB-em 77 ili PCB-em 153 dolazi do statistički značajnog povećanja razine ROS-a za 21,24% – PCB 77 ($p<0,025$), za 15,50% – PCB 153 ($p<0,05$) u odnosu na stanice u kontroli. Dodatak TBHP-a rezultirao je statistički značajnim povišenjem razine ROS-a za 23,36% ($p<0,025$).

Kod stanica predinkubiranih s CRC-om (1 – 20 μM) nisu uočene promjene u razini ROS-a u odnosu na kontrolu.

Kod stanica predinkubiranih s CRC-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 77, pri najnižoj ispitanoj koncentraciji CRC-a (1 μM) zamijećeno je statističko značajno ($p<0,025$) smanjenje stvaranja ROS-a za 21,80% u odnosu na stanice tretirane samo tim PCB kongenerom.

Pri tretmanu stanica PCB-em 153, CRC nije pokazao zaštitni antioksidacijski učinak. Do statistički značajnog porasta ($p<0,025$) u razini ROS-a (prooksidacijski učinak) došlo je u stanica tretiranih PCB-em 153, a koje su bile predinkubirane s CRC-om u dozi 5 μM u odnosu na one kojima CRC nije dodan.

Kod stanica predinkubiranih s CRC-om, a potom tretiranih 50 μM TBHP-om, dolazi do smanjenja razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo TBHP-om za 7,82 – 12,48%, pri čemu taj pad nije statistički značajan.



Slika 81. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s kurkuminom (CRC1 – 20 μM) na formiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nakon tretmana 75 μM PCB 77/PCB 153. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška (TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; CRC1 – CRC20 – stanice tretirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM; CRC1/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CRC1/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153; CRC1/TBHP – CRC20/TBHP – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲$p<0,05$, ▲$p<0,025$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ▼$p<0,025$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ▲$p<0,025$.

4.11. STANIČNA SMRT CHO-K1 STANICA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA UZ PREDINKUBACIJU S RESVERATROLOM ILI KURKUMINOM

U svrhu utvrđivanja tipa stanične smrti (apoptoza/nekroza) CHO-K1 stanice su nacijepljene u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Sat vremena nakon nacjepljivanja, stanice su tretirane s 10 μL otopine RSV-a/CRC-a u DMSO-u

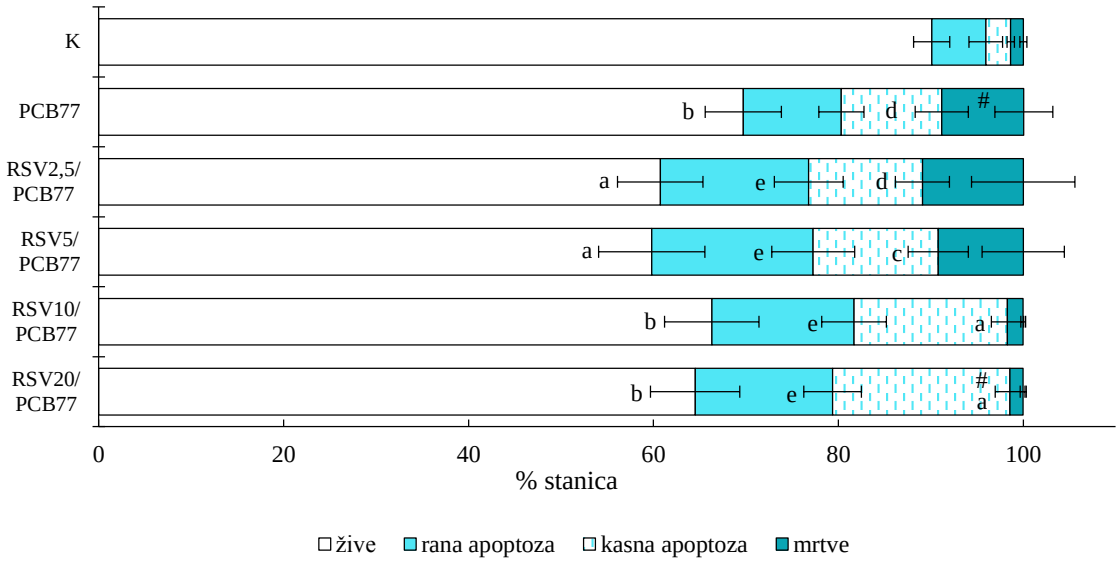
tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5 – 20 μM RSV-a/CRC-a. Nakon 24 sata inkubacije s odabranim polifenolom, stanice su tretirane s 20 μL otopine PCB-a 77, odnosno PCB-a 153 u DMSO-u tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75 μM. 24 sata nakon tretmana odabranim kongenerom, primjenom *MUSE*® protočnog citometra provodi se kvantitativna analiza živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i mrtvih (nekrotičnih) stanica.

Analiza stanične smrti provedena je i u kontrolnim uzorcima – stanice tretirane otapalom korištenim za polifenole/PCB kongenere (15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Također, analiza je provedena i u CHO-K1 stanicama tretiranih odabranim PCB kongenerom, a bez predinkubacije s polifenolnim spojevima (10 μL PCB kongenera mL^{-1} medija za uzgoj).

Rezultati analize CHO-K1 stanične smrti nakon tretmana stanica PCB-ima uz predinkubaciju s RSV-om/CRC-om prikazani su kao udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica (Slike 82 i 84, 86 i 88) te kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami (Slike 83 i 85, 87 i 89) dobiveni primjenom protočne citometrije. Učinak različitih koncentracija RSV-a/CRC-a na citotoksičnost induciranu 75 μM PCB-em 77/153 određen je iz 3 – 6 mjerenja po koncentraciji.

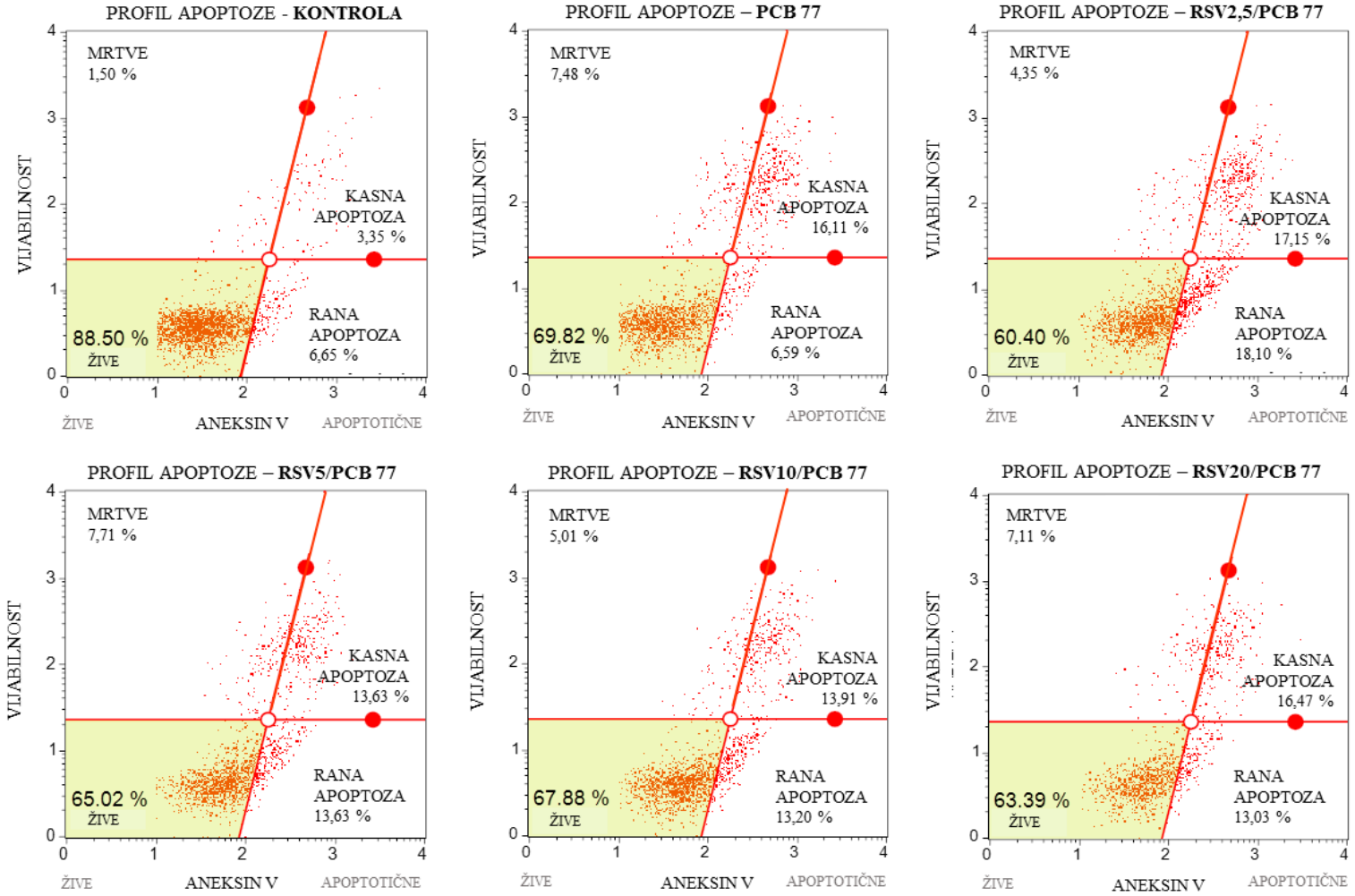
4.11.1. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s resveratrolom

Na Slici 82 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s RSV-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM planarnim PCB kongenerom (PCB 77). Iz slike je vidljivo kako tretman stanica PCB-em 77 dovodi do statistički značajnog ($p<0,005$) pada u postotku živih stanica od 20,38% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku. S povećanjem koncentracije RSV-a postotak živih stanica se smanjuje u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 za 3,40 – 9,92%. Primijećeno je da s povećanjem koncentracije RSV-a u stanicama tretiranih PCB-em 77, postotak ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) raste s 6,89 – 12,59% u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77), dok se udio nekrotičnih stanica smanjuje. Statistički značajan ($p<0,05$) porast udjela stanica u kasnoj apoptozi uočen je u stanica tretiranih PCB-em 77 uz predinkubaciju s 20 μM RSV-om u odnosu na stanice koje nisu predinkubirane s RSV-om.



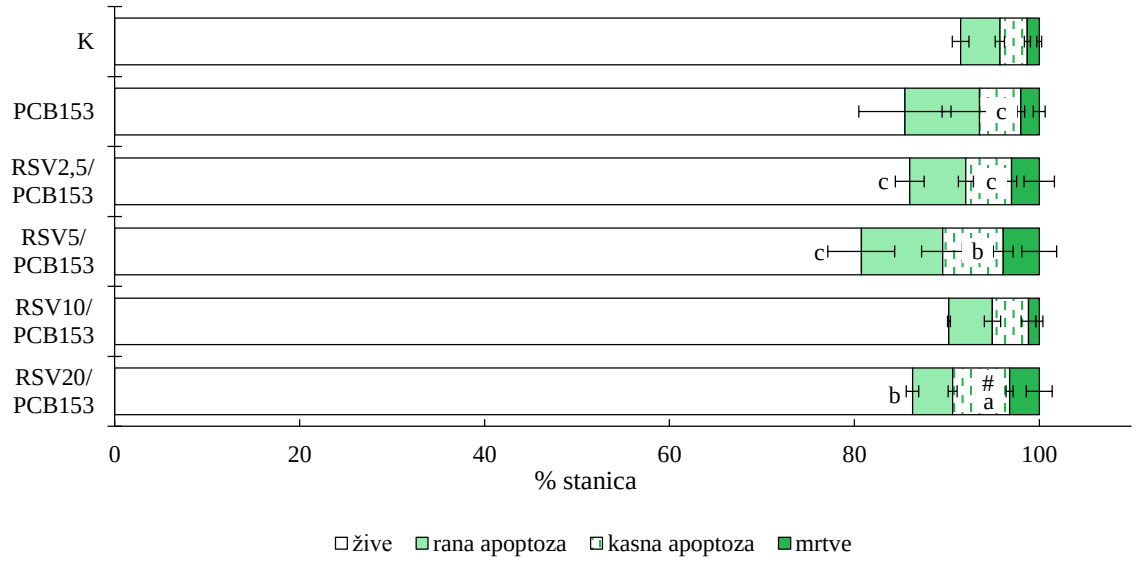
Slika 82. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica, 24 sata nakon tretmana PCB-em 77 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{e}p<0,05$, $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{\#}p<0,05$.

Na Slici 83 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 77, te stanica preinkubiranih s RSV-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 77.



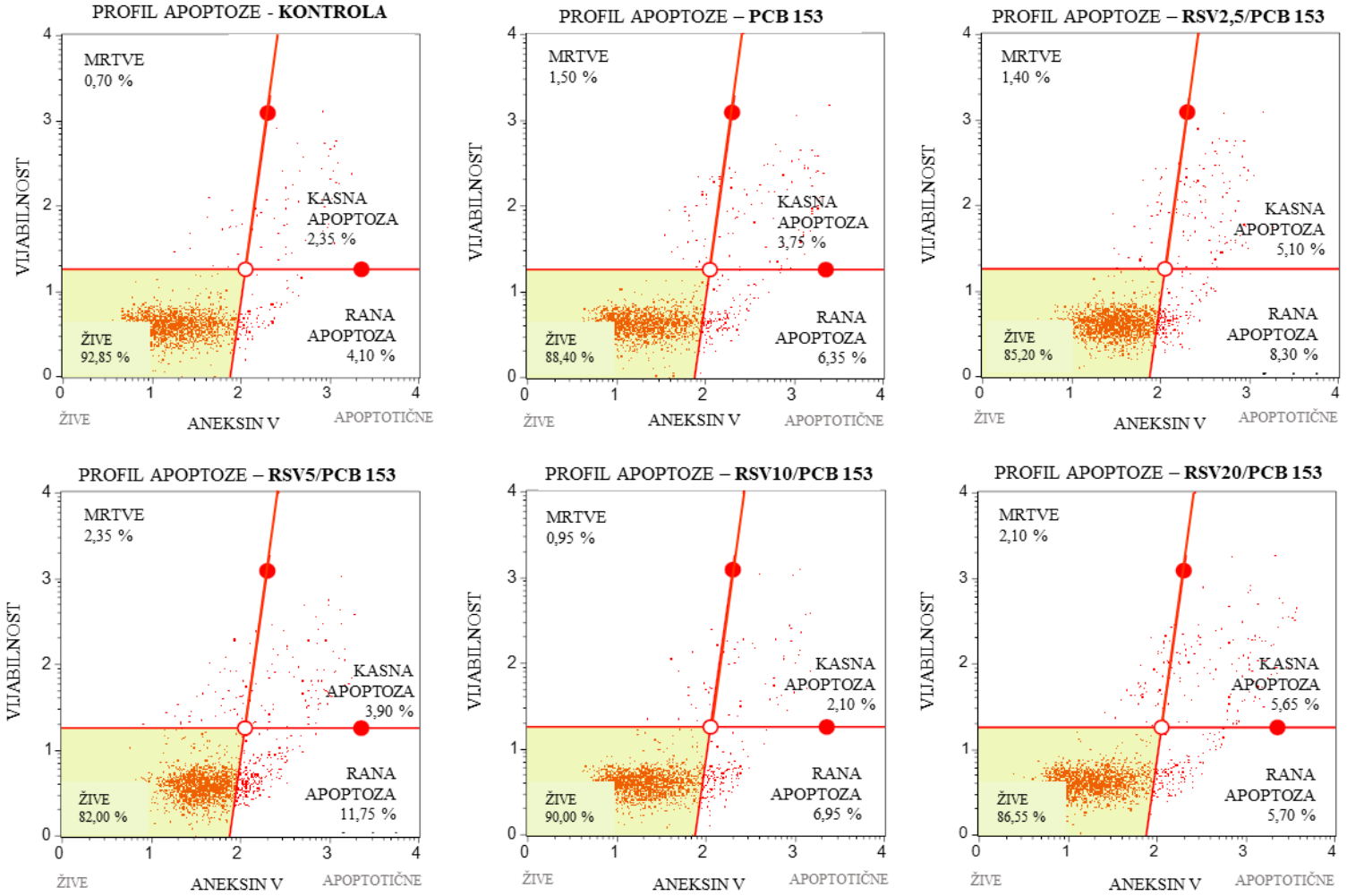
Slika 83. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM resveratrolom te potom tretiranih 75 μM PCB-em 77 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 15 μL mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; RSV2,5/PCB 77 – RSV20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77).

Na Slici 84 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s RSV-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153). Iz slike je vidljivo kako tretman stanica samo PCB-em 153 dovodi do pada u postotku živih stanica od 6,02% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku. Predinkubacija s RSV-om, stanica koje su tretirane PCB-em 153 nije značajno utjecala na udio živih stanica u populaciji u odnosu na one stanice koje nisu predinkubirane s RSV-om. Povećanjem koncentracije RSV-a udio stanica u apoptozi (rana i kasna apoptoza) neznatno se mijenja (1,52 – 3,91%) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153. Međutim, vidljivo je statistički značajno ($p<0,025$) povećanje udjela stanica u kasnoj apoptozi pri koncentraciji RSV-a od 20 μM i nakon tretmana PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153. Udio mrtvih stanica (nakon tretmana kulture PCB-em 153) neznatno se mijenja bez obzira na to jesu li stanice bile predinkubirane ili ne s RSV-om.



Slika 84. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s resveratrolom (RSV2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica, 24 sata nakon tretmana PCB-em 153 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{c}p<0,05$, $^{b}p<0,025$, $^{a}p<0,005$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{\#}p<0,025$.

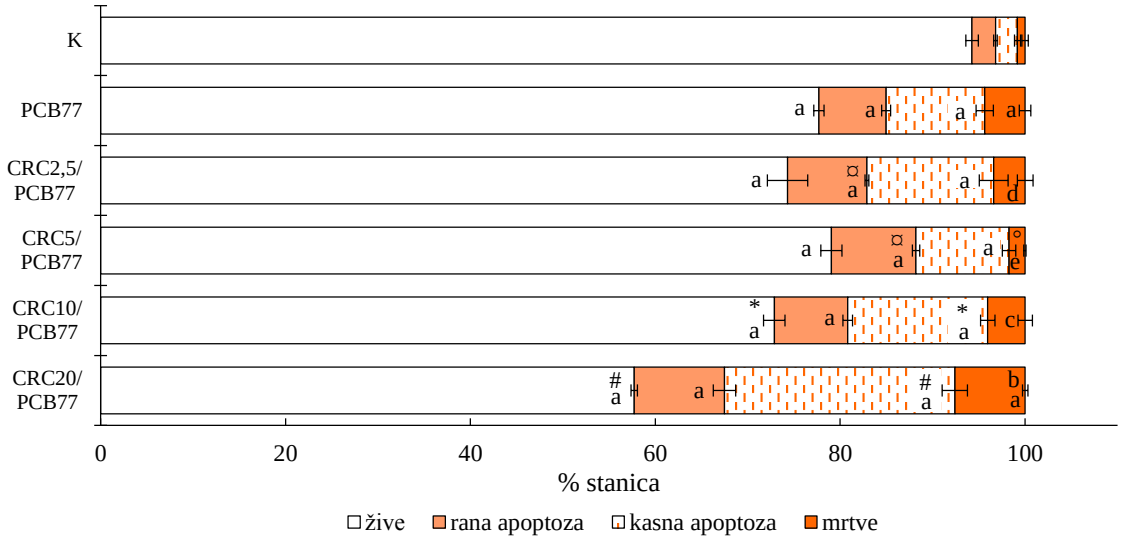
Na Slici 85 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 153, te stanica preinkubiranih s RSV-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 153.



Slika 85. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM resveratrolom te potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 15 μL mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; RSV2,5/PCB 153 – RSV20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153).

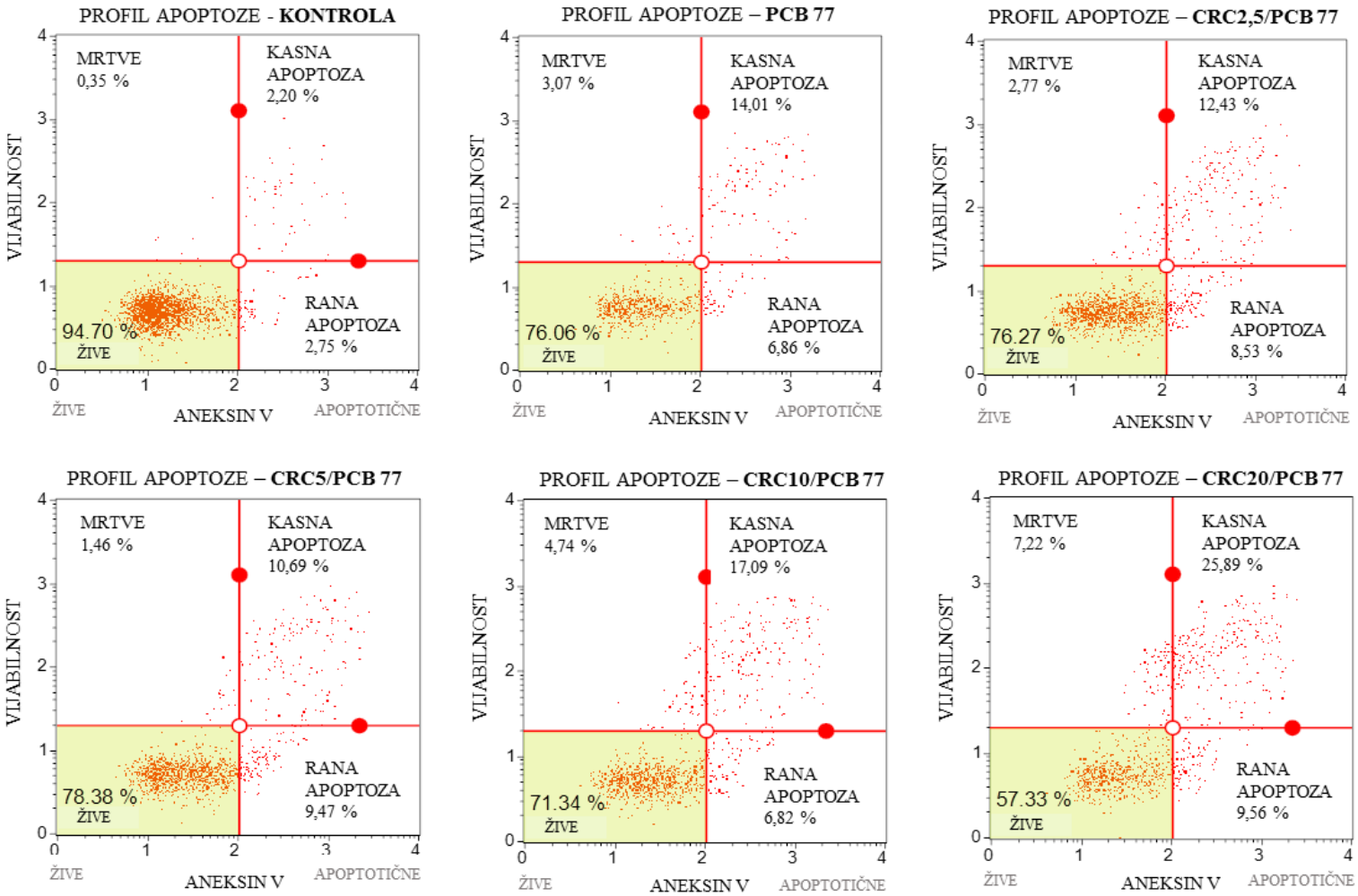
4.11.2. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s kurkuminom

Na Slici 86 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s CRC-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM planarnim PCB kongenerom (PCB 77). Iz slike je vidljivo kako tretman stanica PCB-em 77 dovodi do statistički značajnog ($p<0,001$) pada u postotku živih stanica od 16,56% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (K). Predinkubacija stanica s CRC-om (u dozama 10 i 20 μM), koje su zatim tretirane PCB-em 77 dovela je do dodatnog, statistički značajnog ($p<0,01$ – $p<0,001$) pada udjela vijabilnih/živih stanica u populaciji u odnosu na one stanice bez predinkubacije s CRC-om. Povećanjem koncentracije CRC-a postotak ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) raste za 1,28 – 16,75% u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77, a statistički značajan porast uočava se pri sljedećim dozama CRC-a: 2,5 i 5 μM ($p<0,05$; porast udjela stanica u ranoj apoptozi) te 10 i 20 μM ($p<0,01$ – $p<0,001$; porast udjela stanica u kasnoj apoptozi). U populaciji stanica koje su predinkubirane s CRC-om u najvišoj dozi (20 μM), a potom tretirane PCB-em 77, uočen je i porast udjela nekrotičnih stanica ($p<0,005$) u odnosu na one bez predinkubacije s CRC-om. Iz sveukupnih rezultata učinka CRC-a na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77, vidljivo je da CRC nije postigao zaštitni učinak, već je dodatno, sinergistički s PCB-em, djelovao primarno proapoptotički.



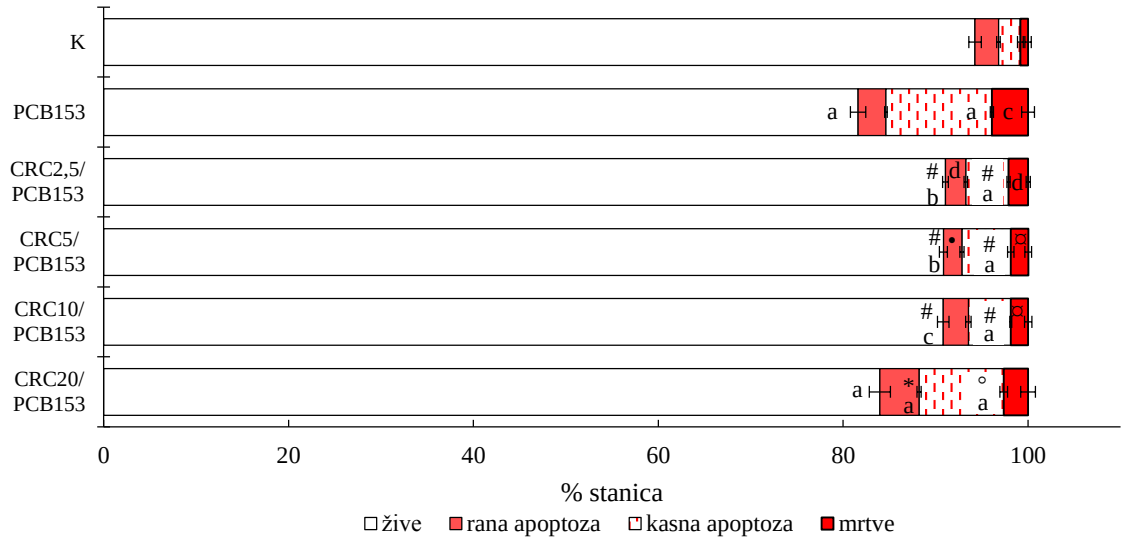
Slika 86. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s kurkuminom (CRC2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica, 24 sata nakon tretmana PCB-em 77 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; CRC2,5/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{e}p<0,05$, $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{¤}p<0,05$, $^{*}p<0,01$, $^{°}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

Na Slici 87 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 77, te stanica predinkubiranih s CRC-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 77.



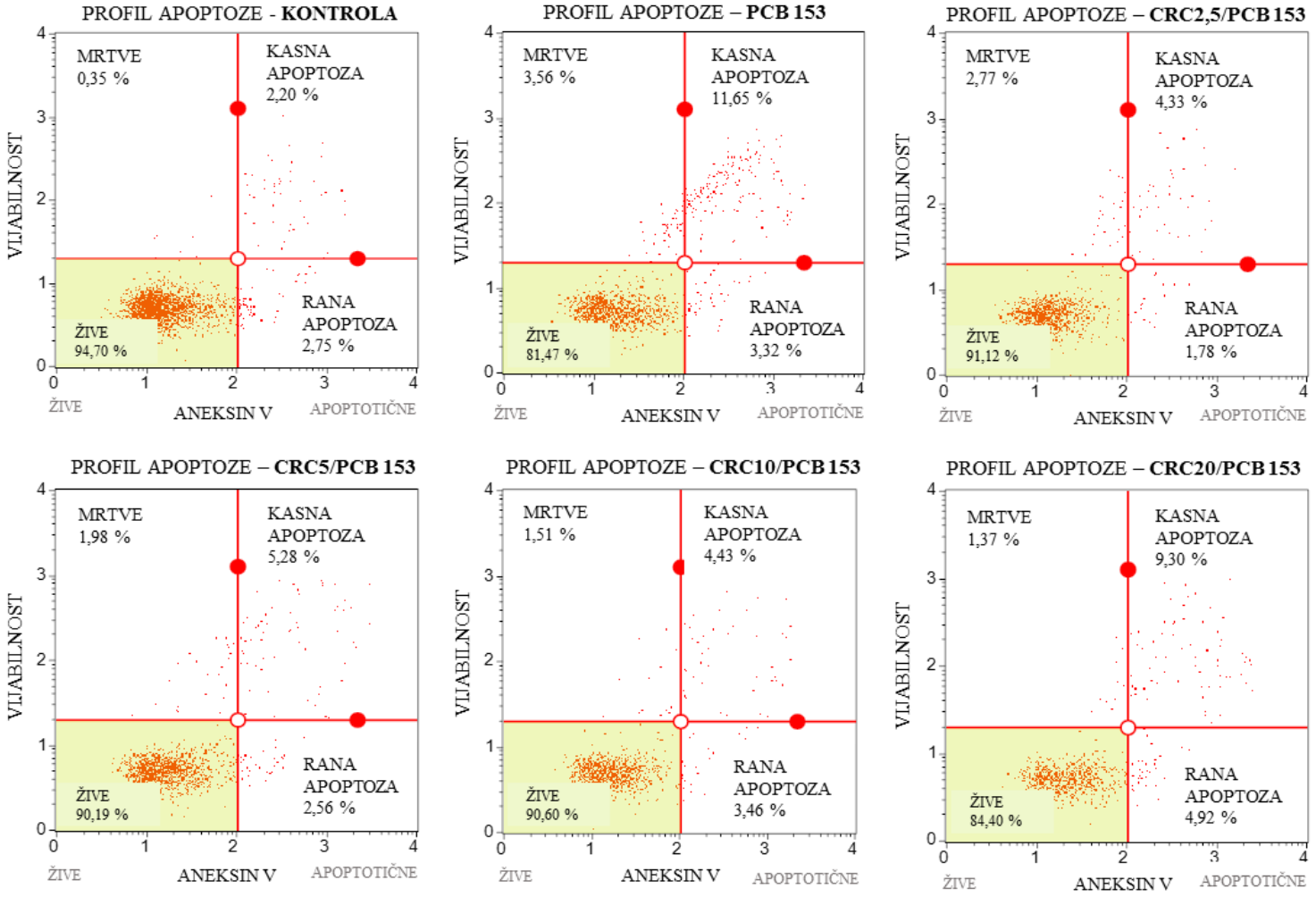
Slika 87. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM kurkuminom te potom tretiranih 75 μM PCB-em 77 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 15 μL mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; CRC2,5/PCB 77 – CRC20/PCB 77 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77).

Na Slici 88 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s CRC-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153). Iz slike je vidljivo kako tretman stanica PCB-em 153 dovodi do statistički značajnog ($p<0,001$) pada u postotku živih stanica za 12,65% u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (K). Predinkubacija stanica s CRC-om (2,5 – 20 μM), koje su zatim tretirane PCB-em 153 dovela je do statistički značajnog ($p<0,001$) porasta udjela vijabilnih/živih stanica u populaciji (za 2,35 – 9,46%) u odnosu na one stanice bez predinkubacije s CRC-om, pri čemu su niže doze CRC-a pokazale izraženiji zaštitni učinak. U odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, CRC je doveo do smanjenja udjela ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) za 1,06 – 7,65%, a statistički značajan pad uočava se pri sljedećim dozama CRC-a: 2,5 i 5 μM ($p<0,025$ – smanjeni udio stanica u ranoj apoptozi, $p<0,001$ – smanjen udio stanica u kasnoj apoptozi), 10 μM ($p<0,001$ – smanjen udio stanica u kasnoj apoptozi) i 20 μM ($p<0,01$ – smanjen udio stanica u ranoj apoptozi, $p<0,005$ – smanjen udio stanica u kasnoj apoptozi). Predinkubacija CHO-K1 stanica s CRC-om (≤ 20 μM) djelovala je zaštitno na citotoksičnost induciranu neplanarnim konegenerom PCB-a – PCB 153.



Slika 88. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s kurkuminom (CRC2,5 – 20 μM) na udjel živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica, 24 sata nakon tretmana PCB-em 153 određen metodom protočne citometrije (K – kontrola s DMSO-om, 15 μL mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153, CRC2,5/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{¤}p<0,05$, $^{•}p<0,025$, $^{*}p<0,01$, $^{°}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

Na Slici 89 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 153, te stanica predinkubiranih s CRC-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 153.



Slika 89. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM kurkuminom te potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane DMSO-om, 15 μL mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; CRC2,5/PCB 153 – CRC20/PCB 153 – stanice predinkubirane s kurkuminom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153).

4.12. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA CITOTOKSIČNOST INDUCIRANU POLIKLORIRANIM BIFENILIMA U CHO-K1 STANICAMA

U svrhu utvrđivanja mogućih zaštitnih učinaka novosintetiziranog RF-a i CF-a na citotoksičnost induciranu PCB-ima, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Sat vremena nakon nacjepljivanja, stanice su tretirane s 10 µL otopine RF-a/CF-a u DMSO-u tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije 2,5 – 100 µM (RF) te 1 – 20 µM (CF). Nakon 24 sata inkubacije s odabranim ispitivanim spojem, stanice su tretirane s 20 µL otopine PCB-a 77, odnosno PCB-a 153 u DMSO-u tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75 µM.

Mogući zaštitni učinci RF-a/CF-a na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima praćeni su 24 sata nakon tretmana stanica PCB-ima primjenom odabranih *in vitro* metoda: *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*.

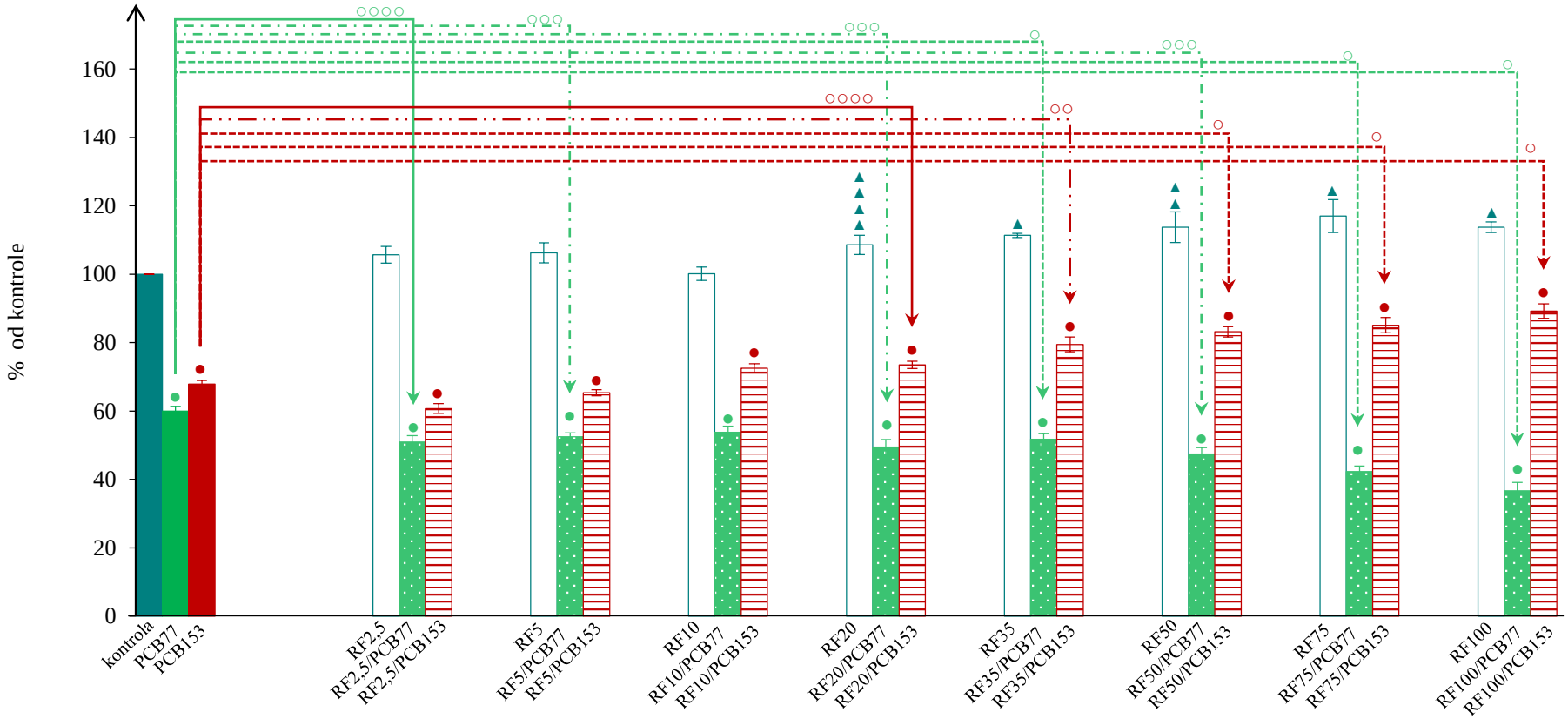
Istovremeno je praćen i rast stanica u kontroli kojima se dodaje otapalo korišteno za otapanje RF-a/CF-a (5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) i za otapanje PCB kongenera (10 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) te rast stanica kojima se dodaje samo 75 µM PCB kongener bez predinkubacije (10 µL PCB kongenera mL^{-1} medija za uzgoj).

4.12.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*

Učinak predinkubacije s 2,5 – 100 µM RF-om na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih 75 µM PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *NR* 24 sata nakon tretmana odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 90 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 19 mjerenja po uzorku.

Oba PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica – 40,05% (PCB 77) te 32,10% (PCB 153) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 90). Pri tretmanu stanica planarnim kongenerom (PCB 77), RF nije pokazao zaštitni učinak na staničnu vijabilnost. Štoviše, inhibitorni učinak (RF/PCB 77 *vs.* PCB 77) je vidljiv pri svim primijenjenim koncentracijama RF-a (6,13 – 23,27%) te je statistički značajan pri 2,5 µM ($p<0,05$), 5 µM, 20 µM, 50 µM ($p<0,01$) te 35 µM, 75 µM, 100 µM ($p<0,001$) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Različit učinak RF-a je pokazao pri tretmanu stanica neplanarnim kongenerom (PCB 153), pri

čemu je uočen zaštitni učinak na vijabilnost pri koncentracijama 10 – 100 μM. Statistički značajan učinak RF/PCB 153 *vs.* PCB 153 određen je pri koncentracijama od 20 μM – 100 μM ($p<0,05$ – $p<0,001$).

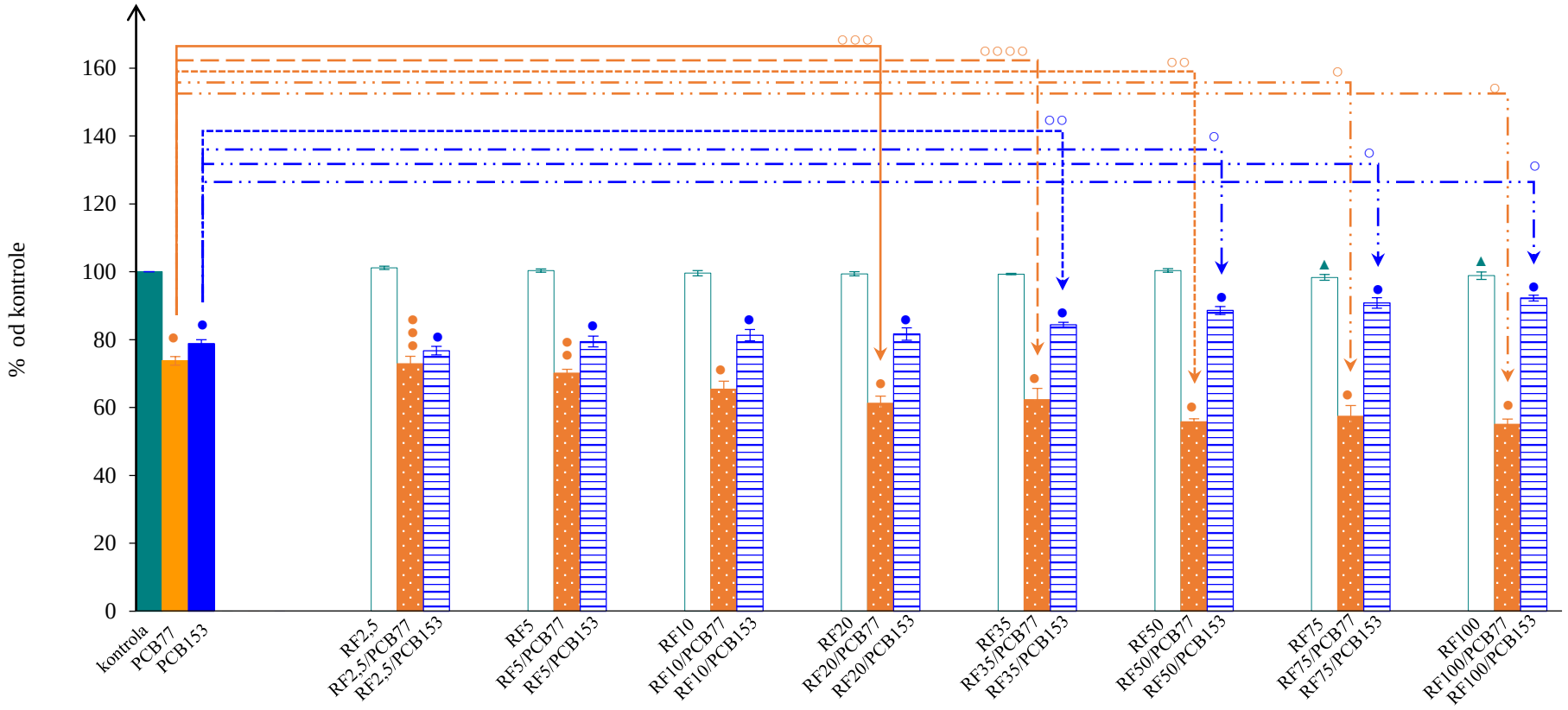


Slika 90. Učinak predinkubacije s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RF2,5/PCB 77 – RF100/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲▲▲p<0,05, ▲▲p<0,005, ▲/●/•p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ○○○○p<0,05, ○○○p<0,01, ○p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ○○○○p<0,05 PCB, ○○p<0,005, ○p<0,001.

4.12.2. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*

U svrhu praćenja učinka RF-a na citotoksičnost induciranu odabranim PCB kongenerima, CHO-K1 stanice prvo su inkubirane s RF-om (2,5 – 100 μM), a 24 sata kasnije tretirane odabranim PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153). Stanična vijabilnost određena je metodom *KB* 24 sata nakon tretmana PCB kongenerima. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 91 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 5 – 19 mjerenja po uzorku.

Na Slici 91 vidi se da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje broja živih stanica – PCB 77 za 26,25%, a PCB 153 za 21,19% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Pri tretmanu stanica planarnim PCB-em 77, RF nije iskazao zaštitni učinak na staničnu vijabilnost, već je pri svim ispitanim koncentracijama (2,5 – 100 μM) vidljiv izraženiji inhibitorni učinak (RF/PCB 77 *vs.* PCB 77) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77, a statistički je značajan pri koncentracijama od 20 μM ($p<0,025$), 35 μM ($p<0,05$), 50 μM ($p<0,005$) te 75 i 100 μM ($p<0,001$). Suprotno učinku RF-a pri tretmanu stanica PCB-em 77, prilikom tretmana neplanarnim PCB-em 153, RF iskazuje blagi zaštitni učinak na vijabilnost stanica pri koncentracijama od 5 – 100 μM, a statistički značajan učinak određen je pri koncentracijama 35 μM – 100 μM ($p<0,005$ – $p<0,001$) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.

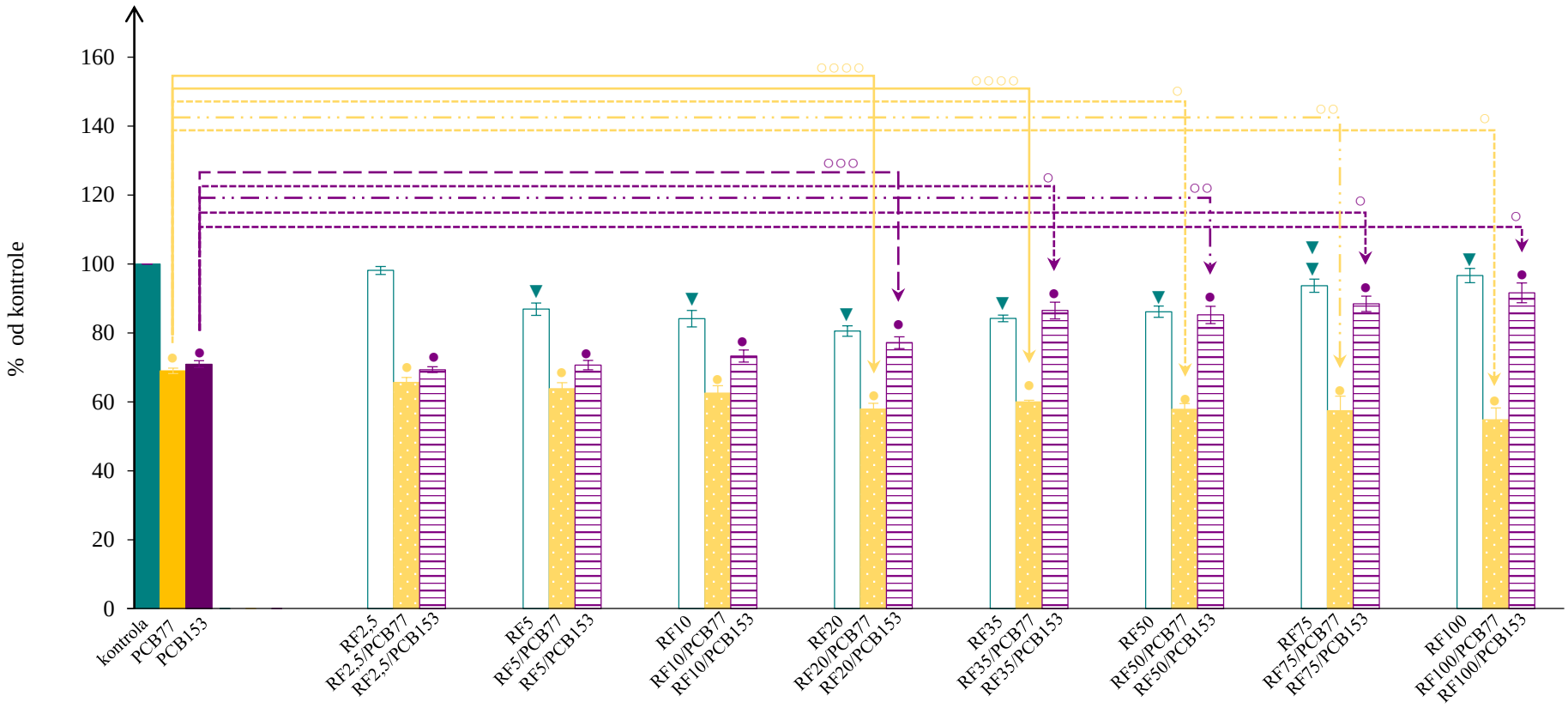


Slika 91. Učinak predinkubacije s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RF2,5/PCB 77 – RF100/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – •••p<0,025, ••p<0,005, ▲/•/•p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ○○○○p<0,05, ○○○p<0,025 ○○p<0,005, ○p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ○○p<0,005, ○p<0,001.

4.12.3. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*

Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s 2,5 – 100 μM RF-om na citotoksičnost induciranu 75 μM PCB kongenerima (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *MTT* 24 sata nakon tretmana stanica određenim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 92 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 15 mjerenja po uzorku.

Na Slici 92 vidi se da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica – PCB 77 od 31,00% te PCB 153 od 29,05% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Inkubacija stanica s RF-om koje su potom tretirane planarnim PCB kongenerom (PCB 77) nije pokazala zaštitni učinak na staničnu vijabilnost te je pri svim ispitanim koncentracijama RF-a (2,5 – 100 μM) vidljiv inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Statistički značajna (RF/PCB 77 *vs.* PCB 77) inhibicija stanične proliferacije CHO-K1 stanica uočena je pri koncentracijama RF-a od 20 i 35 μM ($p<0,05$) te 50 μM ($p<0,001$), 75 μM ($p<0,005$) i 100 μM ($p<0,001$). Metodom *MTT* utvrđen je zaštitni učinak RF-a na citotoksičnost induciranu neplanarnim kongenerom PCB 153 što je u suglasju s prethodno prezentiranim rezultatima metoda *NR* i *KB*. Predinkubacija stanica s RF-om koje su zatim tretirane PCB-em 153 zaštitno je djelovala na vijabilnost pri koncentracijama RF-a 10 – 100 μM (porast u vijabilnosti za 2,39 – 20,70%) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, a statistički značajan (RF/PCB 153 *vs.* PCB 153) učinak određen je pri koncentracijama RF-a od 20 μM ($p<0,025$), 35 μM ($p<0,001$), 50 μM ($p<0,005$) te 75 i 100 μM ($p<0,001$).

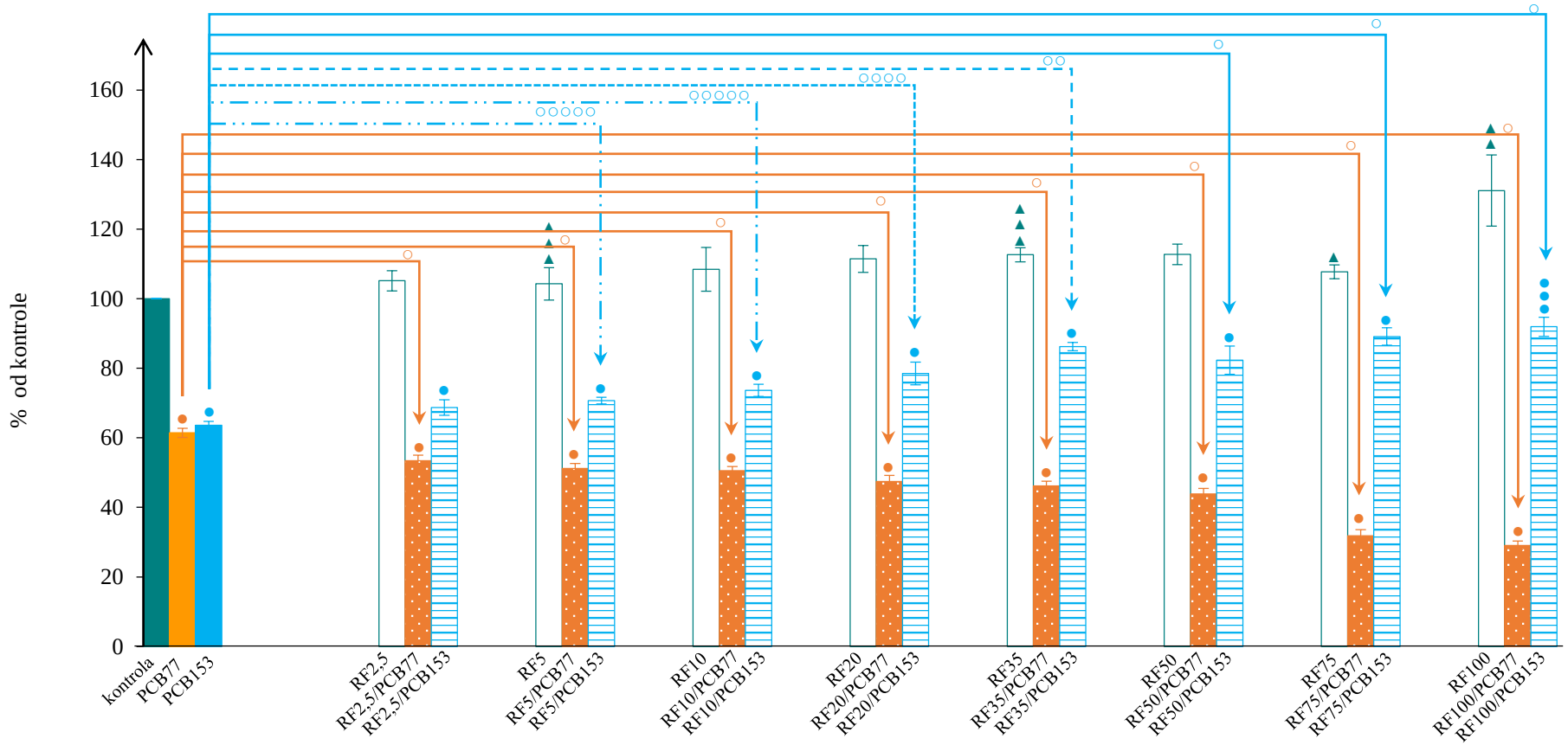


Slika 92. Učinak predinkubacije s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RF2,5/PCB 77 – RF100/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▼▼p<0,025; ▼/•/•p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – °°°°p<0,05, °°p<0,005, °p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – °°°p<0,025, °°p<0,005, °p<0,001.

4.12.4. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*

U svrhu praćenja učinka RF-a na citotoksičnost PCB-ima, CHO-K1 stanice predinkubirane su s 2,5 – 100 μM RF-om te nakon 24h tretirane 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153. Učinak je praćen pomoću metode *TB* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati (određeni iz 3 – 12 mjerenja po uzorku) su statistički obrađeni i prikazani na Slici 93 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om).

Utvrđeno je da oba 75 μM PCB kongenera uzrokuju statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica – PCB 77 za 38,56%, a PCB 153 od 36,40% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 93). Pri tretmanu stanica planarnim PCB-em (PCB 77), RF nije iskazao zaštitni učinak na staničnu vijabilnost, već je inhibitorni učinak (RF/PCB 77 *vs.* PCB 77) izraženiji i statistički značajan ($p<0,001$) pri svim ispitanim koncentracijama RF-a (2,5 – 100 μM) te iznosi 8,01 – 32,38% u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77. Suprotno planarnom kongeneru, određen je zaštitni učinak RF (na staničnu vijabilnost) pri tretmanu stanica neplanarnim PCB-em 153. Porast u vijabilnosti za 5,10 – 28,34% uočen je pri svim ispitanim koncentracijama RF-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, a statistički je značajan (RF/PCB 153 *vs.* PCB 153) pri 5 μM i 10 μM ($p<0,05$), 20 μM ($p<0,025$), 35 μM ($p<0,005$) te 50 – 100 μM ($p<0,001$).

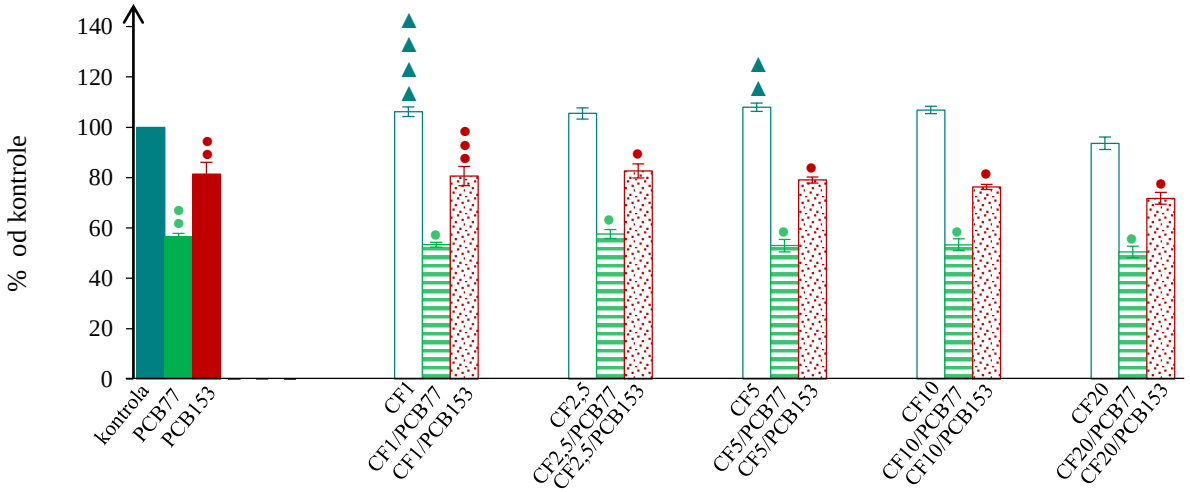


Slika 93. Učinak predinkubacije s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 100 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; RF2,5/PCB 77 – RF100/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲▲p<0,05; ▲▲p<0,025; ▲/●●●p<0,01; ●/●p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ○p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ○○○○○p<0,05, ○○○○p<0,025, ○○p<0,005, ○p<0,001.

4.12.5. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*

Učinak predinkubacije s 1 – 20 μM CF-om na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153) praćen je pomoću metode *NR* 24 sata nakon tretmana stanica PCB kongenerom. Rezultati (određeni iz 4 – 17 mjerenja po uzorku) su statistički obrađeni i prikazani na Slici 94 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om).

Oba PCB kongenera uzrokovala su statistički značajno ($p<0,005$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) – PCB 77 za 43,49%, a PCB 153 za 18,59% (Slika 94). CF u svim ispitanim koncentracijama nije iskazao zaštitni učinak na vijabilnost stanica tretiranih PCB kongenerima.



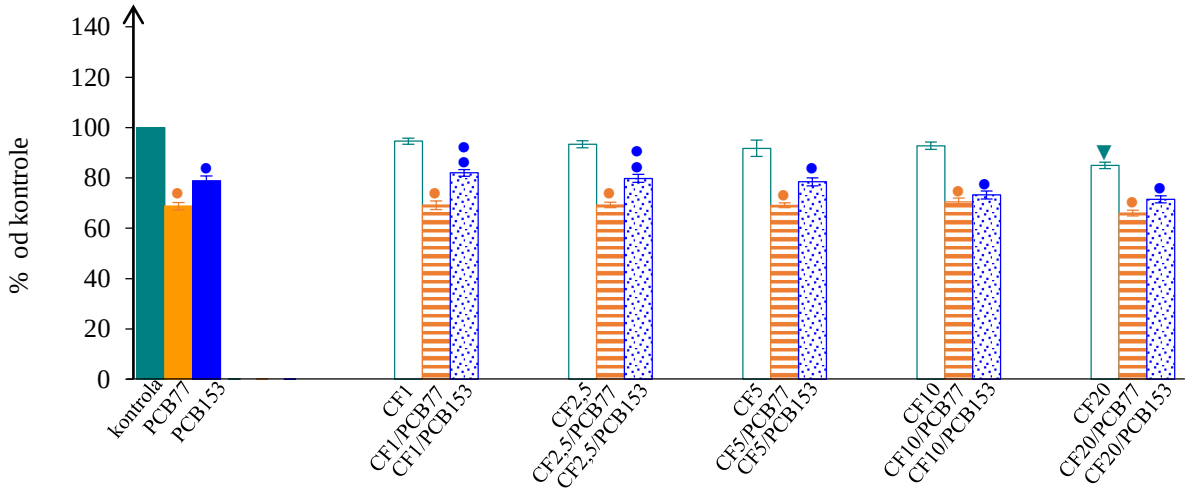
Slika 94. Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲▲▲$p<0,05$, •••$p<0,01$, ▲▲/••/••$p<0,005$, •/•$p<0,001$.

4.12.6. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*

U svrhu praćenja učinka CF-a na citotoksičnost induciranu PCB-ima, CHO-K1 stanice su prvo predinkubirane s CF-om (1 – 20 μM), a 24 sata kasnije tretirane 75 μM PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153). Stanična vijabilnost određena je metodom *KB* 24 sata nakon tretmana PCB kongenerima. Rezultati (određeni iz 8 – 17 mjerena po uzorku) su statistički obrađeni i

prikazani na Slici 95 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om).

Metodom *KB* utvrđeno je da oba 75 μM PCB kongenera (PCB 77 i PCB 153) dovode do statistički značajnog ($p<0,001$) smanjenja vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) – PCB 77 za 31,17%, PCB 153 za 21,08% (Slika 95). CF u ispitanim koncentracijama nije značajno utjecao na staničnu proliferaciju – vijabilnost stanica predinkubiranih s CF-om, a zatim tretiranih PCB kongenerom nije se značajno promijenila u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em.



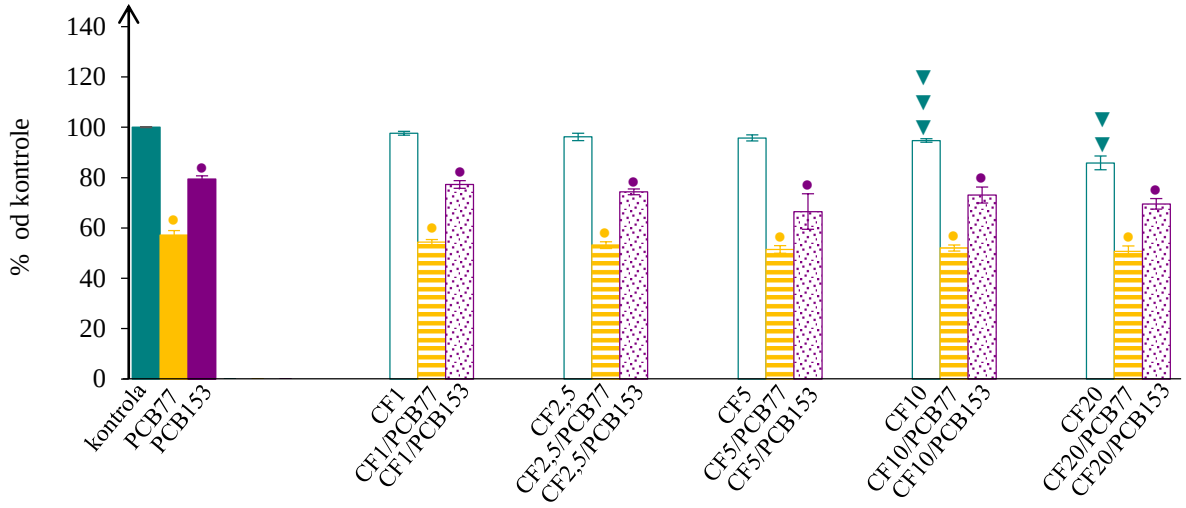
Slika 95. Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ••$p<0,005$, ▼/•/•$p<0,001$.

4.12.7. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*

U svrhu praćenja učinka CF-a na citotoksičnost induciranu PCB-ima, CHO-K1 stanice prvo su inkubirane s CF-om (1 – 20 μM), a 24 sata kasnije tretirane odabranim PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153) u koncentraciji 75 μM. Stanična vijabilnost određena je metodom *MTT* 24 sata nakon tretmana stanica određenim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 96 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 3 – 12 mjerenja po uzorku.

Primjenom metode *MTT* utvrđeno je da do statistički značajnog ($p<0,001$) smanjenja vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a

mL^{-1} medija za uzgoj) dolazi nakon tretmana s oba 75 μM PCB kongenera – 42,87% nakon tretmana PCB-em 77 te 20,63% nakon tretmana PCB-em 153 (Slika 96). Metodom *MTT*, kao i metodama *NR* i *KB*, određeno je da CF u ispitanim koncentracijama nije značajno utjecao na staničnu proliferaciju – vijabilnost stanica preinkubiranih s CF-om (1 – 20 μM), a zatim tretiranih PCB kongenerom nije se značajno promijenila u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em.



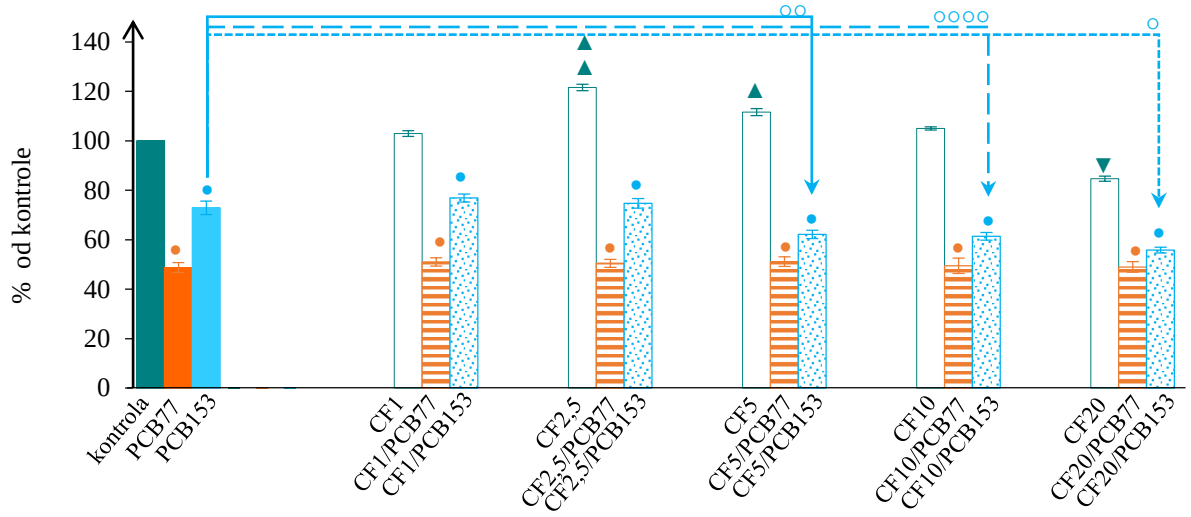
Slika 96. Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *MTT*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▼▼▼p<0,01, ▼▼p<0,005, •/•p<0,001.

4.12.8. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*

Učinak predinkubacije s 1 – 20 μM CF-om na proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 praćen je pomoću metode *TB* 24 sata nakon tretmana stanica odabranim PCB kongenerom. Rezultati su statistički obrađeni i prikazani na Slici 97 kao postotak preživljenja stanica u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane DMSO-om). Provedeno je 4 – 11 mjerenja po uzorku.

Planarni (PCB 77) i neplanarni (PCB 153) kongeneri uzrokovali su statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica od 51,25%, odnosno 27,10% u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj) (Slika 97). CF u ispitanim koncentracijama nije značajno utjecao na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 77

(što je uočeno svim metodama), dok se inhibitorni učinak CF-a na staničnu vijabilnost (CF/PCB 153 *vs.* PCB 153) uočava pri koncentracijama CF-a 5 – 20 μM, u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153.



Slika 97. Učinak predinkubacije s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20 μM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em 153 određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka preživjelih stanica ± standardna pogreška (kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲p<0,025, ▲/▼p<0,01, •/•p<0,001; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ○○○○p<0,05, ○○p<0,01, ○p<0,001.

4.13. UČINAK FEROCENSKOG TRIACILNOG DERIVATA RESVERATROLA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA RAZINU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U CHO-K1 STANICAMA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA

U svrhu određivanja učinaka novosintetiziranog RF-a i CF-a na razinu ROS-a nakon tretmana stanica PCB-ima, CHO-K1 stanice nacijepljene su u jažice 96-*well* ploče tamnog dna u koncentraciji od $2,5x10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=100 μL) u koji je dodan RF/CF tako da se postignu koncentracije od 1 – 20 μM. Nakon 24 sata stanice se ispiru puferom, a u isprane jažice dodaje se 100 μL DCFH-DA u koncentraciji od 25 μM. Inkubacija traje 45 minuta u inkubatoru pri 37°C. Slijedi ispiranje s puferom koji sadrži 1% FBS-a i tretman pripremljenim otopinama PCB kongenera tako da se u mediju za uzgoj postigne 75 μM koncentracija PCB-a 77 ili PCB-a 153. Uz učinak RF-a/CF-a na intracelularnu razinu ROS-a, prati se i razina ROS-a u kontrolnim uzorcima – stanice tretirane istim volumenom DMSO-a u

kojem je otopljen RF/CF i/ili PCB (kontrola), stanice tretirane samo PCB kongenerom (PCB 77 ili PCB 153), a kao pozitivna kontrola koristi se 50 μM TBHP.

Učinak 1 – 20 μM RF-a/CF-a na intracelularnu razinu ROS-a nakon tretmana stanica PCB kongenerom, u staničnoj liniji CHO-K1 praćen je DCFH-DA metodom.

Rezultati su prikazani na Slikama 98 i 99 kao ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji primijenjenih koncentracija RF-a/CF-a. Učinak svake od koncentracija određen je iz 4 – 18 mjerenja.

4.13.1. Učinak ferocenskog triacilnog derivata resveratrola na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima

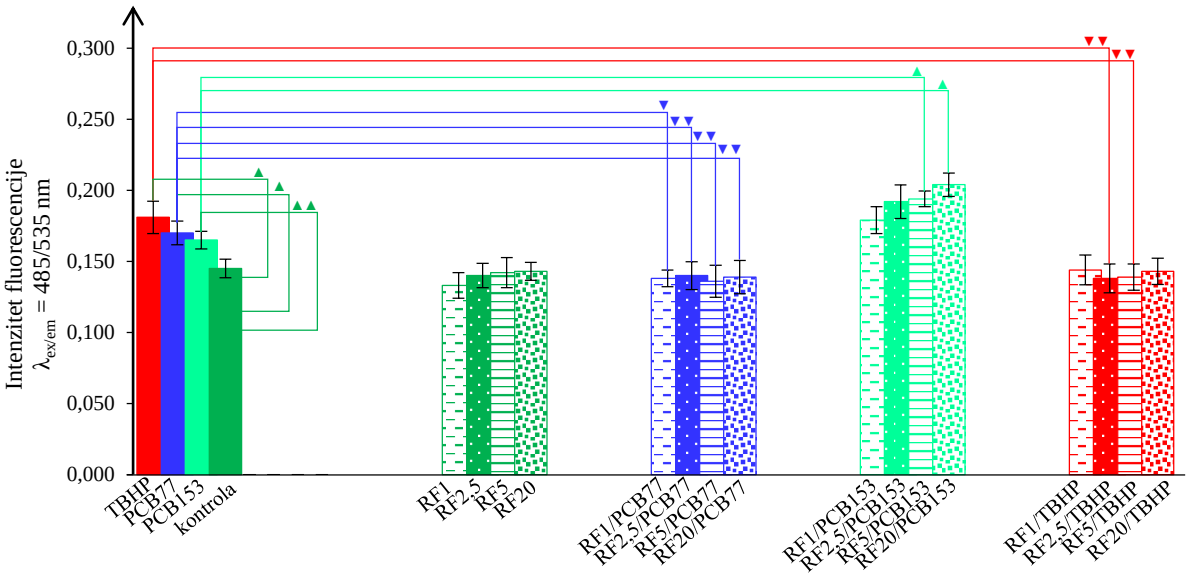
Na Slici 98 prikazani su rezultati učinka RF-a na razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama nakon tretmana PCB-em 77 ili PCB-em 153. Iz slike je vidljivo da dolazi do statistički značajnog povećanja razine ROS-a nakon tretmana stanica PCB-em 77 za 17,56% ($p<0,025$) i PCB-em 153 za 14,10% ($p<0,05$) u odnosu na stanice u kontroli. Dodatak TBHP-a rezultirao je statistički značajnim povišenjem razine ROS-a za 19,81% ($p<0,025$).

RF je u svim primijenjenim koncentracijama (1 – 20 μM) uzrokovao pad razine ROS-a u odnosu na kontrolu.

Kod stanica predinkubiranih s RF-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 77, pri svim ispitanim koncentracijama RF-a (1 – 20 μM) uočena je statistički značajna ($p<0,05$ – $p<0,01$) niža razina ROS-a za 17,65 – 19,97% u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77.

Kod stanica predinkubiranih s RF-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 153, do porasta u nastanku ROS-a dolazi s porastom primijenjene koncentracije RF-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 za 7,50 – 21,27%, pri čemu je taj porast statistički značajan pri 5 i 20 μM ($p<0,005$).

Kod stanica predinkubiranih s RF-om, a potom tretiranih 50 μM TBHP-om, dolazi do smanjenja razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo TBHP-om za 20,44 – 23,76%, pri čemu je taj pad statistički značajan ($p<0,05$) pri koncentracijama RF-a od 2,5 i 5 μM.



Slika 98. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF1 – 20 μM) na razinu reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nakon tretmana 75 μM polikloriranim bifenilima (PCB 77/PCB 153). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška (TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; RF1 – RF20 – stanice tretirane RF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM; RF1/PCB 77 – RF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; RF1/PCB 153 – RF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153; RF1/TBHP – RF20/TBHP – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲p<0,05, ▲p<0,025; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ▼▼p<0,05, ▼p<0,01; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ▲p<0,005; u odnosu na stanice tretirane TBHP-om – ▼▼p<0,05.

4.13.2. Učinak ferocenskog analoga kurkumina na razinu reaktivnih kisikovih vrsta u CHO-K1 stanicama tretiranih polikloriranim bifenilima

Na Slici 99 vidljivo je da pri tretmanu CHO-K1 stanica PCB-em 77 ili PCB-em 153 dolazi do statistički značajnog povećanja razine ROS-a za 16,28% – PCB 77 (p<0,025), te za 11,88% – PCB 153 (p<0,05) u odnosu na stanice u kontroli. Dodatak TBHP-a rezultirao je statistički značajnim povišenjem razine ROS-a za 23,36% (p<0,025).

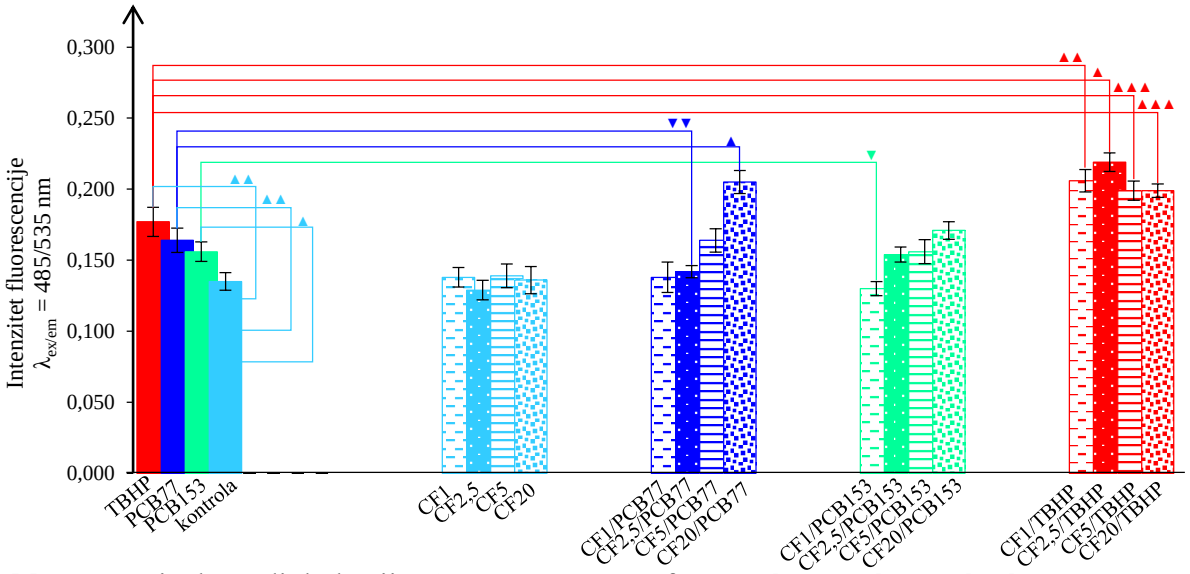
Razina ROS-a kod stanica predinkubiranih s CF-om (1 – 20 μM) nije se značajno promijenila u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj).

Kod stanica predinkubiranih s CF-om, a potom tretiranih 75 μM PCB-em 77, s porastom koncentracije CF-a dolazi do porasta u razini ROS-a (prooksidacijski učinak) u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77, dok je pri niskim koncentracijama CF-a uočen pad u razini ROS-a (antioksidacijski učinak). Tako je pri nižim ispitanim koncentracijama CF-a (1 i 2,5 μM)

u stanicama tretiranih PCB-em 77, zamijećeno smanjenje stvaranja ROS-a za 13,78 – 16,03% u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77, pri čemu je taj pad bio statistički značajan ($p<0,05$) pri dozi CF-a od 2,5 μM.

U stanica predinkubiranih s CF-om, a zatim tretiranih PCB-em 153 uočen je pad razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, pri čemu je statistički značajno ($p<0,01$) niža razina ROS-a određena za CF u dozi 1 μM. Pri višim primijenjenim koncentracijama (5 i 20 μM) uočava se blagi porast u razini ROS-a.

Kod stanica predinkubiranih s CF-om, a potom tretiranih 50 μM TBHP-om, dolazi do porasta razine ROS-a u odnosu na stanice tretirane samo TBHP-om za 12,52 – 23,75%, a statistički značajna promjena uočena je pri svim primijenjenim koncentracijama CF-a: 1 μM ($p<0,01$), 2,5 μM ($p<0,001$), 5 μM ($p<0,025$) i 20 μM ($p<0,025$).



Slika 99. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim analogom kurkumina (CF1 – 20 μM) na razinu reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nakon tretmana 75 μM polikloriranim bifenilima (PCB 77/PCB 153). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em}$=485/535 nm) ± standardna pogreška (TBHP – stanice tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom; PCB 77/PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB 77/PCB 153; kontrola – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; CF1 – CF20 – stanice tretirane CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM; CF1/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 77; CF1/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB 153; CF1/TBHP – CF20/TBHP – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 1 – 20 μM, a potom tretirane 50 μM *tert*-butil hidroperoksidom). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (kontrola) – ▲▲$p<0,05$, ▲$p<0,025$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 – ▼▼$p<0,05$, ▲$p<0,005$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 – ▼$p<0,05$; u odnosu na stanice tretirane TBHP-om – ▲▲▲$p<0,025$, ▲▲$p<0,01$, ▲$p<0,001$.

4.14. STANIČNA SMRT CHO-K1 STANICA TRETIRANIH POLIKLORIRANIM BIFENILIMA UZ PREDINKUBACIJU S FEROCENSKIM TRIACILNIM DERIVATOM RESVERATROLA ILI FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA

U svrhu utvrđivanja tipa stanične smrti (apoptoza/nekroza) CHO-K1 stanice su nacijepljene u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj (V=2 mL). Sat vremena nakon nacjepljivanja, stanice su tretirane s 10 μL otopine RF-a/CF-a u DMSO-u tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5 – 100 μM (RF) te 2,5 – 20 μM (CF). 24 sata nakon inkubacije s RF-om/CF-om, stanice su tretirane s 20 μL otopine PCB-a 77, odnosno PCB-a 153 u DMSO-u tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 75 μM. 24 sata nakon tretmana odabranim kongenerom, primjenom *MUSE*® protočnog citometra provodi se kvantitativna analiza živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i mrtvih (nekrotičnih) stanica.

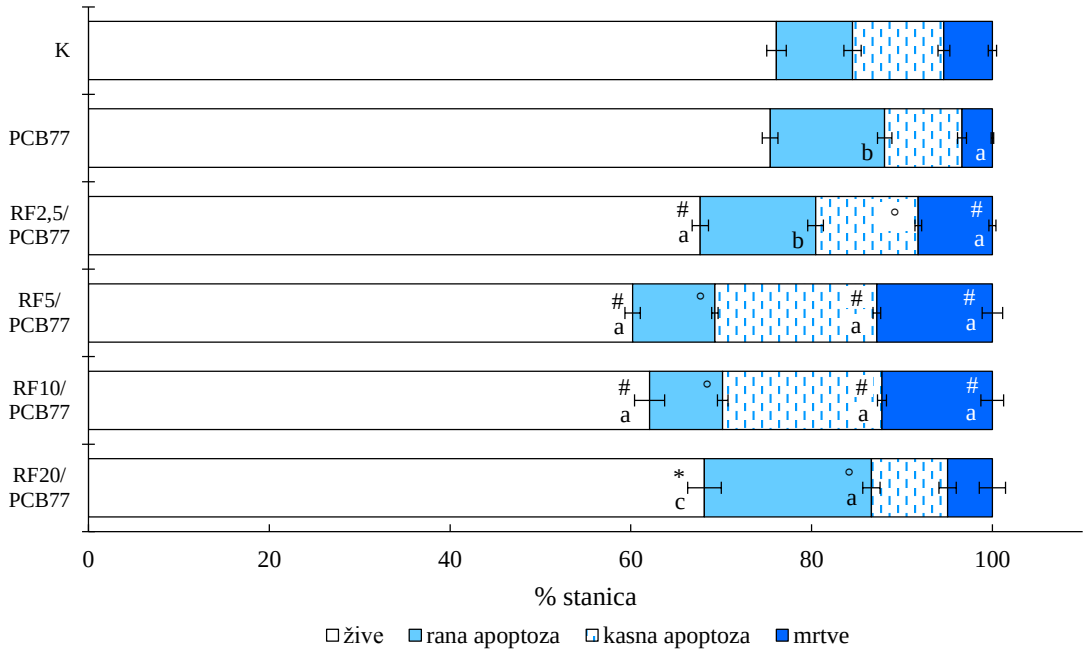
Analiza stanične smrti provedena je i u kontrolnim uzorcima – stanice tretirane otapalom korištenim za RF/CF te PCB kongenere (15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Također, analiza je provedena i u CHO-K1 stanicama tretiranih odabranim PCB kongenerom, a bez predinkubacije s RF-om/CF-om (10 μL PCB kongenera mL^{-1} medija za uzgoj).

Rezultati analize stanične smrti PCB-em tretiranih CHO-K1 stanica s ili bez predinkubacije s RF-om/CF-om prikazani su kao udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica (Slika 100 i 102, 104 i 106) te kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami (Slika 101 i 103, 105 i 107) dobiveni primjenom protočne citometrije. Učinak različitih koncentracija RF-a/CF-a na citotoksičnost induciranu 75 μM PCB-em 77 ili PCB-em153 određen je iz 2 – 7 mjerenja po koncentraciji.

4.14.1. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola

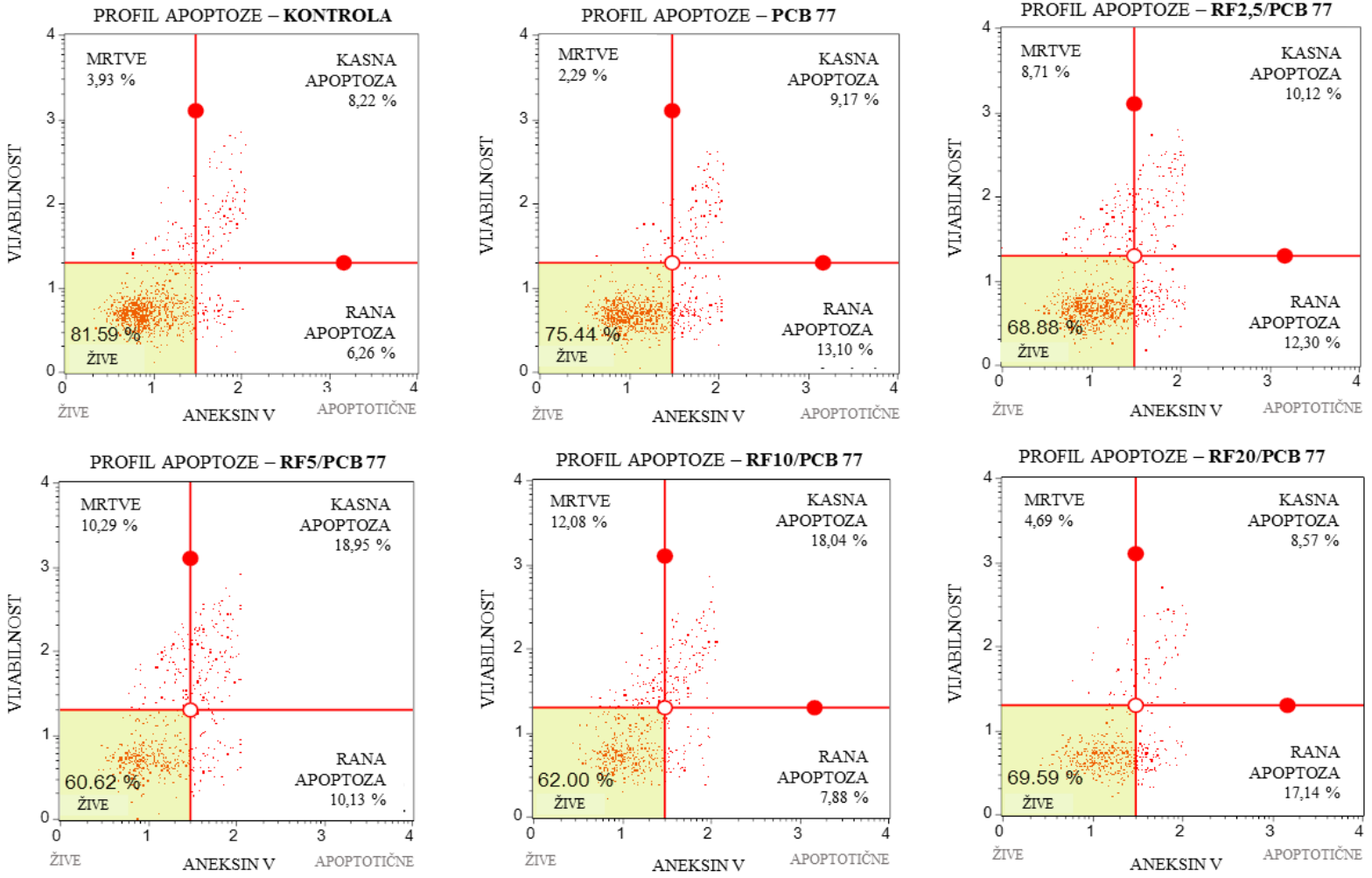
Na Slici 100 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s RF-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM planarnim PCB kongenerom (PCB 77). Smanjeni udio živih stanica (RF/PCB 77 vs. PCB 77) je vidljiv pri svim primijenjenim koncentracijama RF-a kao i porast ukupno apoptotskih i nekrotičnih stanica. Do statistički značajnog ($p<0,005$ – $p<0,001$) porasta udjela stanica u apoptozi (kasna apoptoza) dolazi u stanica predinkubiranih s RF-om (u dozama 2,5 – 10 μM), a zatim tretiranih PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 te se udio mrtvih stanica pri svakoj primijenjenoj koncentraciji RF-a, također povećao i to statistički značajno pri

2,5 μM – 10 μM ($p<0,001$). Stanice predinkubirane s RF-om te potom tretirane PCB-em 77 dominantno odumiru apoptotskim putem.



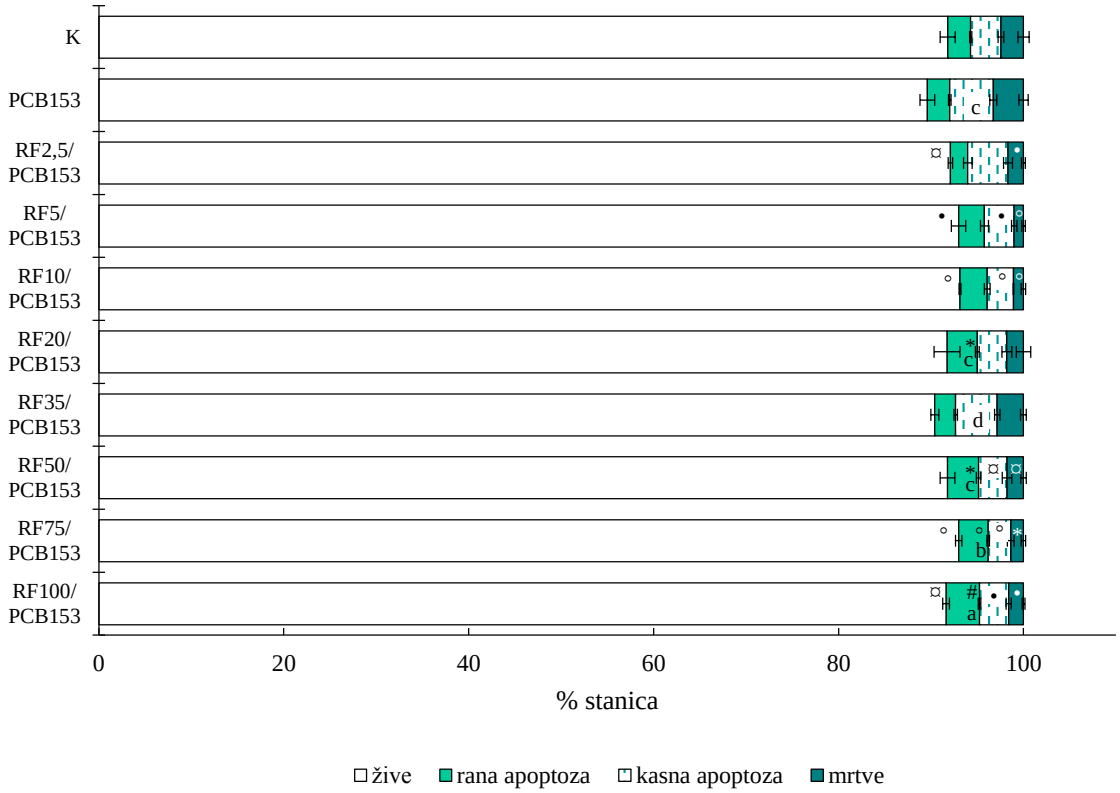
Slika 100. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 24 sata nakon tretmana PCB-em 77 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; RF2,5/PCB 77 – RF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{*}p<0,01$, $^{\circ}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

Na Slici 101 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 77, te stanica predinkubiranih s RF-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 77.



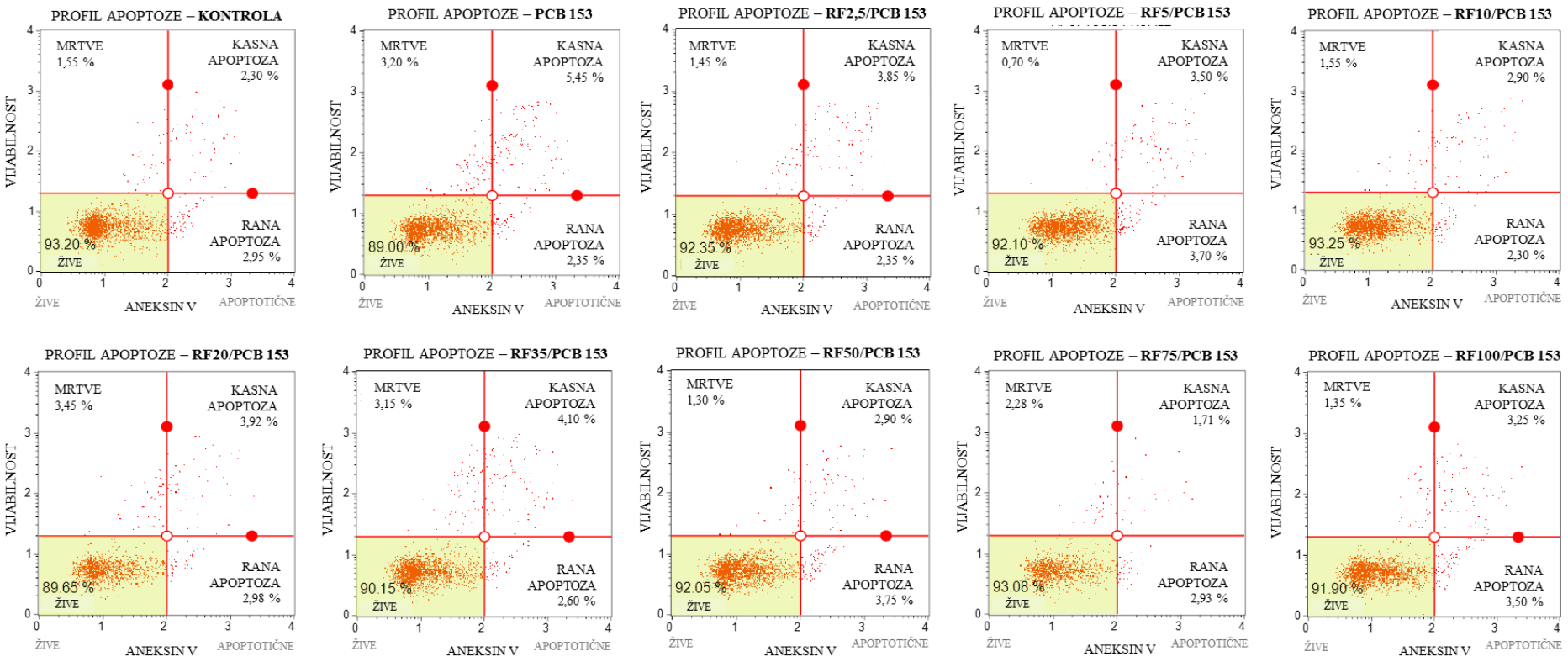
Slika 101. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 20 μM) te potom tretiranih 75 μM PCB-em 77 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; RF2,5/PCB 77 – RF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77).

Na Slici 102 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s RF-om (2,5 – 100 μM) te tretmana 75 μM neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153). Iz slike je vidljivo kako tretman stanica PCB-em 153 dovodi blagog pada u udjelu živih stanica u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku. Predinkubacija s RF-om dovodi do zaštitnog učinka na vijabilnost u stanica tretiranih PCB-em 153, pri čemu je vidljivo blago, ali značajno povećanje udjela živih stanica predinkubiranih s RF-om (RF/PCB 153 *vs.* PCB 153) u odnosu na stanice koje njime nisu bile predinkubirane (statistički značajan porast udjela vijabilnih stanica određen je pri koncentracijama RF-a od 2,5 μM ($p<0,05$), 5 μM ($p<0,025$), 10 μM ($p<0,005$), 75 μM ($p<0,005$) i 100 μM ($p<0,05$)). U odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153, u stanica predinkubiranih s RF-om te potom tretiranih PCB-em 153 također se uočava smanjenje udjela mrtvih stanica u apoptozi s tim da je to smanjenje statistički značajno pri koncentracijama RF-a od 5 μM ($p<0,025$ – smanjenje stanica u kasnoj apoptozi), 10 μM ($p<0,005$ – smanjenje stanica u kasnoj apoptozi), 20 μM ($p<0,01$ – smanjenje stanica u ranoj apoptozi), 50 μM ($p<0,05$ – smanjenje stanica u kasnoj apoptozi, $p<0,01$ – smanjenje stanica u ranoj apoptozi), 75 μM ($p<0,005$ – smanjenje stanica u ranoj i kasnoj apoptozi) i 100 μM ($p<0,025$ – smanjenje stanica u kasnoj apoptozi, $p<0,001$ – smanjenje stanica u ranoj apoptozi). Udio mrtvih stanica u populaciji koja je predinkubirana s RF-om i tretirana PCB-em 153 je niži u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 – smanjeni udio mrtvih stanica u populaciji određen je pri koncentracijama RF-a od 2,5 μM ($p<0,025$), 5 i 10 μM ($p<0,005$), 50 μM ($p<0,05$), 75 μM ($p<0,01$) i 100 μM ($p<0,025$).



Slika 102. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 24 sata nakon tretmana PCB-em 153 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{d}p<0,05$, $^{c}p<0,025$, $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{¤}p<0,05$, $^{•}p<0,025$, $^{*}p<0,01$, $^{°}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

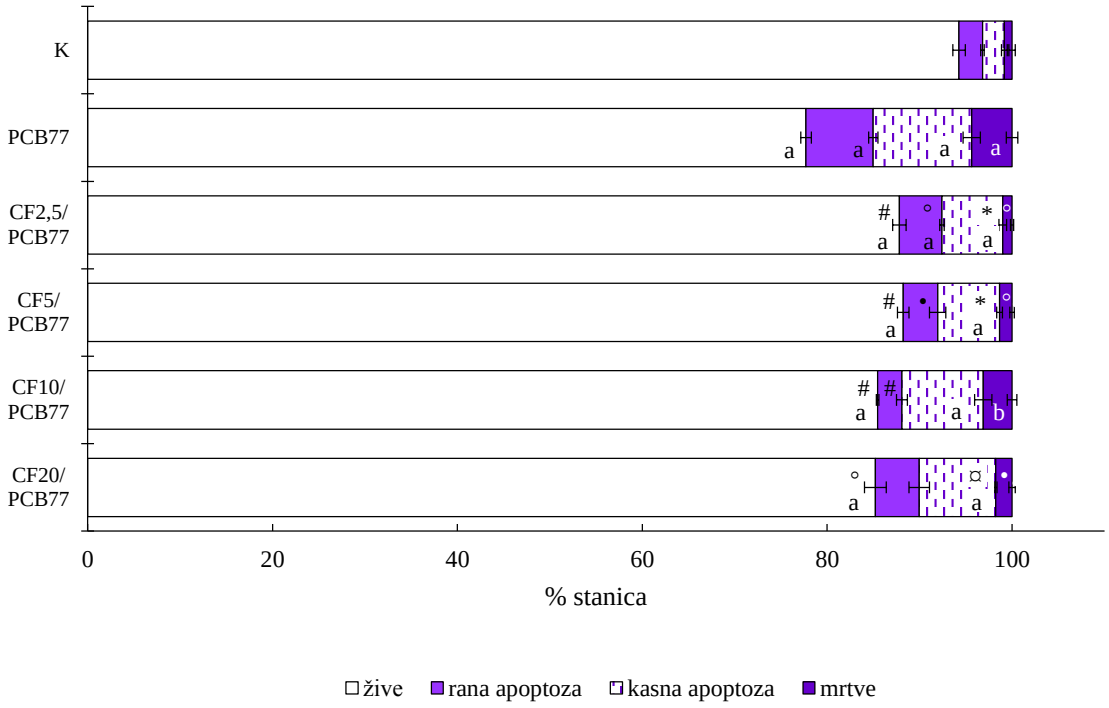
Na Slici 103 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 153, te stanica predinkubiranih s RF-om (2,5 – 100 μM), a potom tretiranih PCB-em 153.



Slika 103. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 100 μM ferocenskim triacilnim derivatom resveratrola (RF2,5 – 20 μM) te potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; RF2,5/PCB 153 – RF100/PCB 153 – stanice predinkubirane s RF-om u koncentracijama od 2,5 – 100 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153).

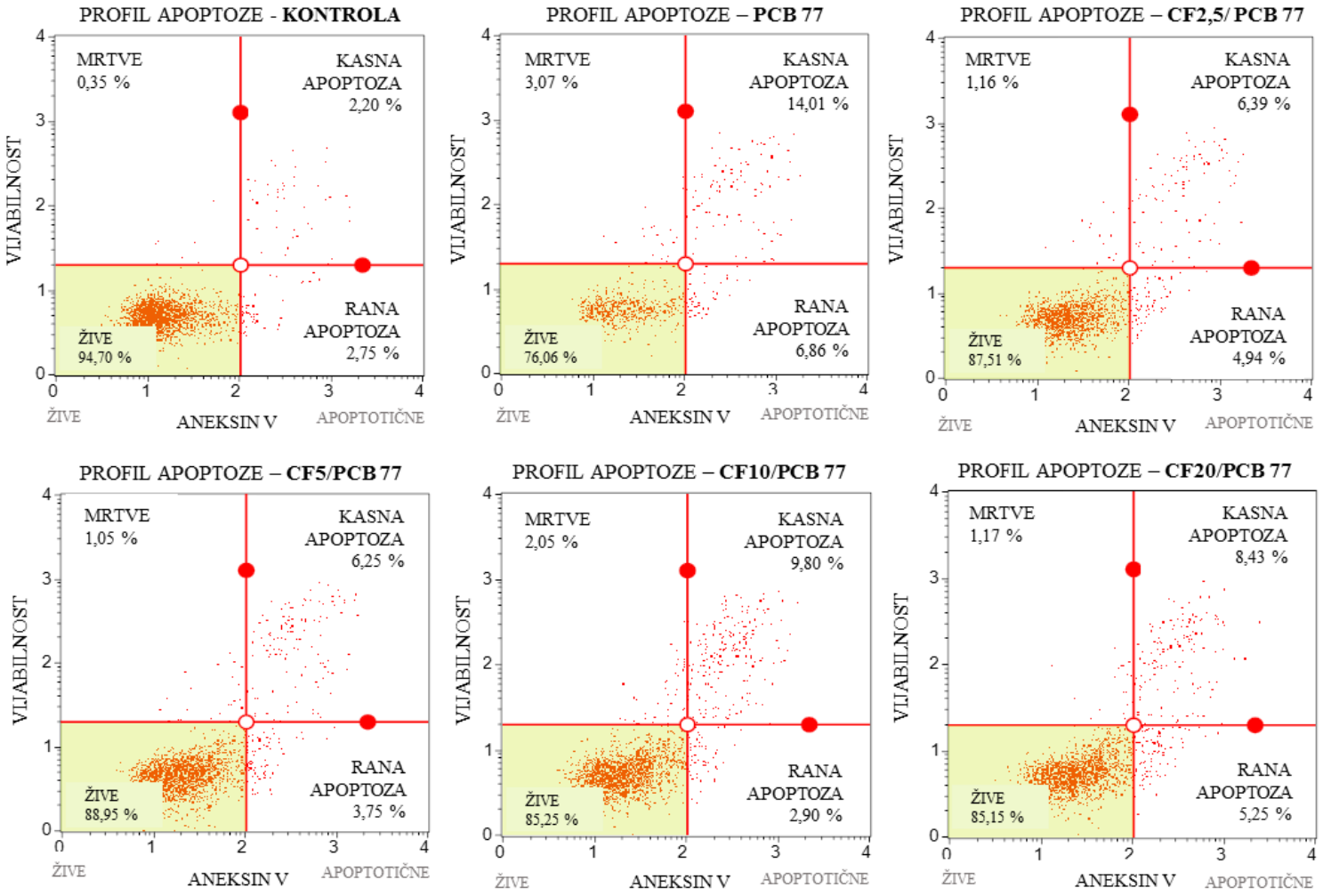
4.14.2. Stanična smrt CHO-K1 stanica tretiranih polikloriranim bifenilima (PCB 77 ili PCB 153) uz predinkubaciju s ferocenskim analogom kurkumina

Na Slici 104 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s CF-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM planarnim PCB kongenerom (PCB 77). Iz slike je vidljivo kako u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku do statistički značajnog ($p<0,001$) pada u udjelu živih stanica dolazi nakon tretmana stanica PCB-em 77 za 16,56%. U odnosu na stanice tretirane PCB-em 77, do statistički značajnog povećanja u udjelu živih stanica (CF/PCB 77 *vs.* PCB 77) dolazi pri koncentracijama CF-a od 2,5 – 10 μM ($p<0,001$) te 20 μM ($p<0,005$), dok se udio ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) smanjuje te je statistički značajno niži udio apoptotskih stanica vidljiv pri svim primijenjenim koncentracijama CF-a ($p<0,05$ – $p<0,001$). U odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 77 udio mrtvih stanica se smanjuje u onih stanica koje su predinkubirane s CF-om i potom tretirane PCB-em 77, što sveukupno upućuje na zaštitne učinke CF-a tijekom tretmana stanica planarnim PCB-ima.



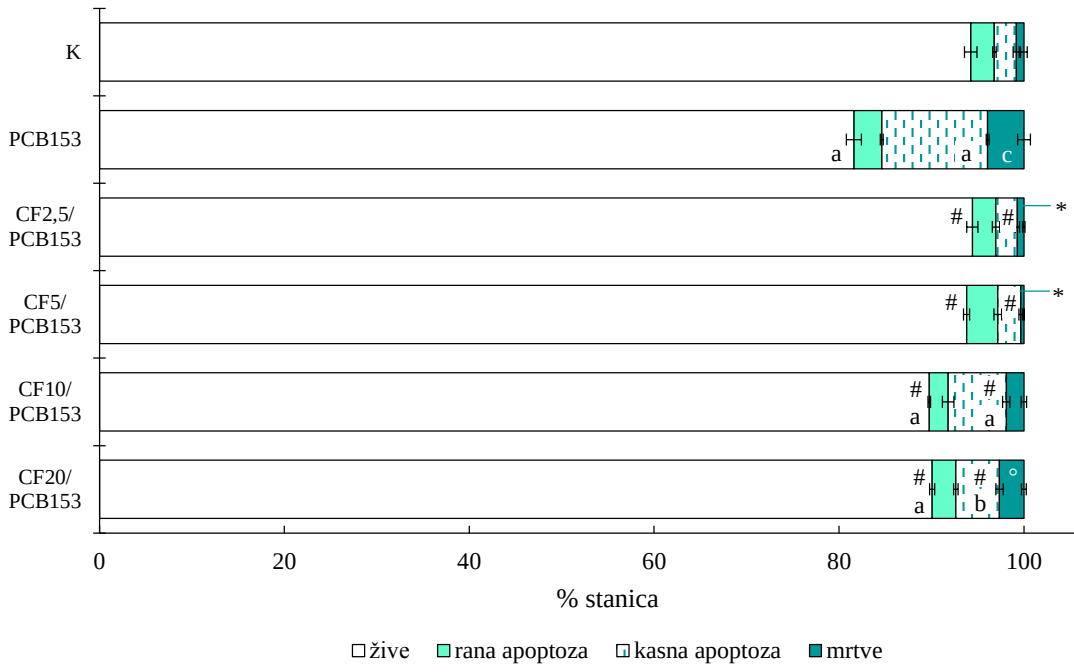
Slika 104. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim analogom kurkumina (CF2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 24 sata nakon tretmana PCB-em 77 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; CF2,5/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{b}p<0,01$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 77 (PCB 77) – $^{¤}p<0,05$, $^{•}p<0,025$, $^{*}p<0,01$, $^{°}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

Na Slici 105 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 77, te stanica predinkubiranih s CF-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 77.



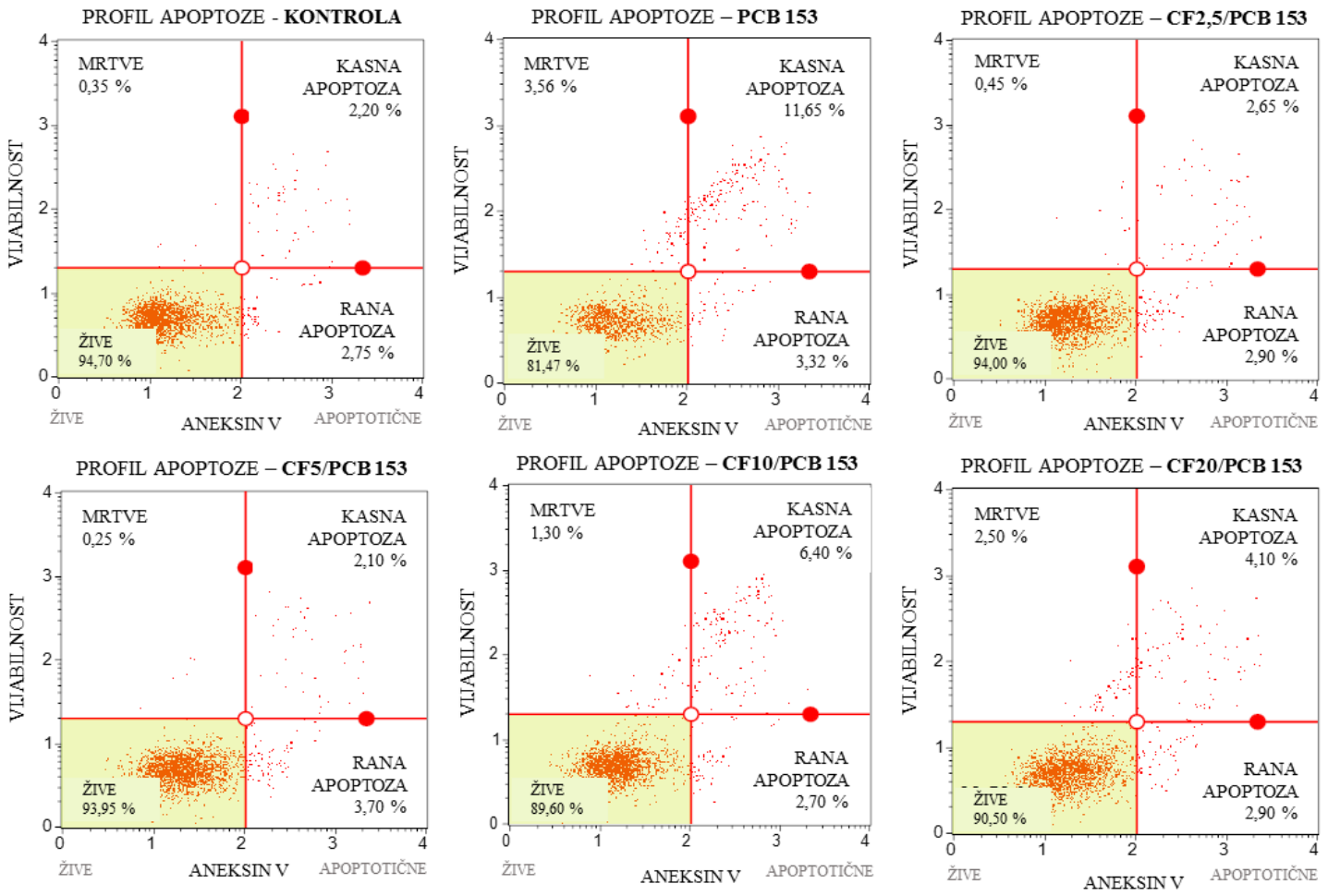
Slika 105. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM ferocenskim analogom kurkumin (CF2,5 – 20 μM) a te potom tretiranih 75 μM PCB-em 77 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 77 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 77; CF2,5/PCB 77 – CF20/PCB 77 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 77).

Na Slici 106 prikazan je udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) nakon predinkubacije s CF-om (2,5 – 20 μM) te tretmana 75 μM neplanarnim PCB kongenerom (PCB 153). Iz slike je vidljivo kako, u odnosu na stanice u kontrolnom uzorku (K), do statistički značajnog ($p<0,001$) pada udjela živih stanica dolazi nakon tretman stanica PCB-em 153 za 12,65%. Pri koncentracijama CF-a od 2,5 – 20 μM postotak živih stanica statistički značajno ($p<0,001$) raste (CF/PCB 153 *vs.* PCB 153) u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 za 8,16 – 12,82%. Udio ukupno apoptotskih stanica (rana i kasna apoptoza) statistički značajno raste kod stanica tretiranih PCB-em 153 za 9,56% ($p<0,001$) u odnosu na kontrolu. Statistički značajno ($p<0,001$) smanjen udio ukupno apoptotskih stanica uočen je u stanica predinkubiranih s CF-om i potom tretiranih PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 pri svim primijenjenim koncentracijama CF-a. U odnosu na stanice tretirane samo PCB-em 153 udio mrtvih stanica se smanjuje u onih stanica koje su predinkubirane s CF-om i potom tretirane PCB-em 153, što (kao i kod planarnog PCB-a) ukazuje na zaštitni učinak CF-a pri citotoksičnim učincima induciranih neplanarnim kongenerima.



Slika 106. Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s ferocenskim analogom kurkumina (CF2,5 – 20 μM) na udio živih, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica 24 sata nakon tretmana PCB-em 153 određen metodom protočne citometrije (K – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153, CF2,5/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153). Statistički značajna razlika (Student *t*-test): u odnosu na stanice tretirane DMSO-om (K) – $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$; u odnosu na stanice tretirane PCB-em 153 (PCB 153) – $^{*}p<0,01$, $^{\circ}p<0,005$, $^{\#}p<0,001$.

Na Slici 107 izdvojeni su reprezentativni *dot-plot* dijagrami stanica u kontrolnim uzorcima, stanica tretiranih PCB-em 153, te stanica predinkubiranih s CF-om (2,5 – 20 μM), a potom tretiranih PCB-em 153.



Slika 107. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami CHO-K1 stanica predinkubiranih s 2,5 – 20 μM ferocenskim analogom kurkumina (CF,5 – 20 μM) te potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 dobiveni metodom protočne citometrije (KONTROLA – stanice tretirane s 15 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj; PCB 153 – stanice tretirane 75 μM PCB-em 153; CF2,5/PCB 153 – CF20/PCB 153 – stanice predinkubirane s CF-om u koncentracijama od 2,5 – 20 μM, a potom tretirane 75 μM PCB-em 153).

5. RASPRAVA

Mnogobrojne biološki aktivne tvari bitne su za zdravlje ljudi zbog njihovih potencijalnih blagotvornih učinaka, poput smanjenja čimbenika rizika od kardiovaskularnih bolesti, te antioksidacijskih, antimutagenih, antikancerogenih, antialergenih, protuupalnih i antimikrobnih djelovanja. Koriste se u različitim industrijama, poput farmaceutske, prehrambene i kemijske. Međutim, zbog niske bioraspoloživosti, posebna pažnja pridaje se poboljšanju stabilnosti ovih spojeva (Khezerlou i Jafari, 2020). Biološki aktivne tvari su sekundarni metaboliti koji se u malim količinama nalaze u raznim biljkama. To su uglavnom hidrofobni i slabo topljivi spojevi, a dijele se u nekoliko grupa: (1) terpeni i terpenoidi (približno 25 000 vrsta), (2) alkaloidi (oko 12 000 vrsta) i (3) fenolni spojevi (oko 8 000 vrsta) (Khezerlou i Jafari, 2020).

Izraz *„polifenol“* nedosljedno se koristi i često podrazumijeva molekule s više od jedne hidroksilne skupine (-OH) na aromatskom prstenu. Međutim, može se koristiti i za složene molekule koje imaju 12 – 16 -OH skupina vezanih na pet do sedam aromatskih prstena (Cheynier i Halbwirth, 2017). Klasificiraju se u flavonoide i neflavonoide ili ih se može podijeliti u podskupine ovisno o broju fenolnih jedinica u njihovoj molekularnoj strukturi, supstituiranim skupinama i/ili vrsti kemijskih veza između fenolnih jedinica (Singla i sur., 2019).

U relativno malu skupinu neflavonoida ubrajaju se stilbeni, derivati 1,2-difeniletena. U stilbenima, *m*-položaji u prstenu A obično su supstituirani s dvije -OH skupine, dok se različiti položaji u prstenu B mogu zamijeniti s -OH i -OCH_3 skupinama (**Slika 2**). S druge strane, stilbeni postoje i u izomernim oblicima (*cis* i *trans* konfiguracije), kao i u slobodnim i glikoziliranim oblicima (Singla i sur., 2019). Stilbeni imaju jedinstvenu sposobnost kontrole i moduliranja ključnih unutarstaničnih procesa – rasta i diferencijacije, proizvodnje ROS-a, indukcije enzima, razvoja upale, apoptoze i prijenosa signala, funkcioniranja ionskih kanala i neurotransmitera te transkripcije gena (Teplova i sur., 2018). Glavni predstavnici stilbena su resveratrol, pterostilben, pinozilvin, raponticin koji se koriste u suvremenoj farmaceutskoj industriji i medicini. Pokazuju antioksidacijska, antitumorska, protuupalna, antibakterijska, antivirusna i antimalarijska svojstva te inhibiraju različite patološke procese. Stilbeni pokazuju protektivna svojstva nakon neurotoksičnih učinaka izazvanih glutamatom i nakon oštećenja mozga pri cerebralnoj ishemiji, a otkrivena su i njihova hepatoprotektivna svojstva (Teplova i sur., 2018). Eksperimentalne studije pokazale su da resveratrol djeluje antioksidacijski, protuupalno i imunomodulacijski. U budućnosti

bi trebalo procijeniti mogućnosti primjene resveratrola te je potrebno daljnje pojašnjenje temeljnih mehanizama njegova djelovanja. Potrebno je više kliničkih ispitivanja u cilju potvrde njegove učinkovitosti te kako bi se detektirali mogući štetni učinci, a posebnu pozornost treba posvetiti i odnosu doze i učinka (Meng i sur., 2020).

U skupinu kurkuminoida ubrajaju se kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin i ciklokurkumin (Strimpakos i Sharma, 2008), a najviše istražen spoj je kurkumin (Cione i sur., 2020). To je nepolarni bis-α,β-nezasićeni β-diketon koji je odgovoran za žutu boju kurkume (*Curcuma longa*), a postoji u različitim tautomernim oblicima (Strimpakos i Sharma, 2008). U strukturi kurkumina (**Slika 4**), oba aromatska prstena sadrže po jednu -OH i -OCH_3 skupinu (Cione i sur., 2020). Kurkumin posjeduje niz potencijalno terapeutskih svojstava, poput protuupalnih, antioksidacijskih, antineoplastičnih, pro- i antiapoptotskih, antiangiogenih, citotoksičnih, imunomodulacijskih i antimikrobnih djelovanja. Složenost pleiotropnog djelovanja kurkumina može objasniti njegovu učinkovitost u borbi protiv bolesti poput karcinoma, koje su višefaktorske prirode i obično uključuju stanične ili molekularne nedostatke na više razina. Ciljna mjesta djelovanja kurkumina su stanični procesi koji uključuju ekspresiju gena, transkripcijske faktore, faktore rasta i njihove receptore, nuklearne čimbenike, hormone i hormonske receptore (Strimpakos i Sharma, 2008).

Učinci polifenola ovise o njihovoj bioraspoloživosti, na što utječu stabilnost, stvaranje kompleksa s drugim komponentama, interakcija s hranom, apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta te metabolizam u jetri i metabolizam putem crijevnih bakterija. Istraživanja su pokazala kako veliki broj polifenola prolazi kroz značajne biotransformacije te pokazuju nisku bioraspoloživost. Procijenjeno je da se manje od 5% polifenolnog spoja apsorbira i u nepromijenjenom obliku dolazi do plazme (Xiao i Högger, 2015). Brojni analozi resveratrola razlikuju se od izvorne molekule u pogledu broja, položaja ili vrste funkcijskih skupina (Tian i Liu, 2019). Slaba bioraspoloživost kurkuminoida posljedica je njihove slabe apsorpcije i distribucije, brzog metabolizma i brzog izlučivanja. Obećavajući pristupi za poboljšanje bioraspoloživosti kurkumina uključuju upotrebu liposoma, micela, nanočestica, fosfolipidnih kompleksa i derivata kurkuminoida i strukturnih analoga (Rodrigues i sur., 2015).

Razvoj prirodnih proizvoda oslanja se na medicinsku kemiju organskih spojeva, ali i na istraživanja koja se provode i u području bioorganometalne kemije. Ova disciplina istražuje

biološke funkcije organometalnih spojeva. Derivatizacija biološki važnih molekula poput lijekova ili prirodnih proizvoda s organometalnim spojevima daleko je najpopularnija i najučinkovitija metoda za dobivanje novih medicinski obećavajućih organometalnih spojeva (Kowalski, 2018). Istraživanja pokazuju da se, pažljivim dizajnom liganda, organometalni spojevi mogu razviti u visoko aktivne i specifične lijekove. Uloga metala u bioaktivnim organometalnim spojevima nije ograničena samo na čisto strukturnu. Redoks aktivni centri prijelaznih metala u organometalnim spojevima mogu se iskoristiti za kontrolu njihovog djelovanja u biološkim sustavima, s obzirom na to da je redoks stanje stanica uravnoteženo i da su odstupanja povezana s različitim bolestima (Schatzschneider i Metzler-Nolte, 2006).

Otkriće ferocena 1951. godine i rasvjetljavanje njegove strukture vjerojatno je polazište za suvremenu organometalnu kemiju (van Staveren i Metzler-Nolte, 2004). Ferocen je prototip metalocena – organometalnog spoja kojeg karakterizira molekularna struktura nalik *„sendviču“* (Kowalski, 2018). Metaloceni pokazuju široki raspon biološke aktivnosti. Među njima je ferocen privukao posebnu pozornost, budući da je neutralna, kemijski stabilna i netoksična molekula. Mnogi ferocenski spojevi pokazuju zanimljivo citotoksično, antitumorsko, antimalarijsko, antifungalno djelovanje (Fouda i sur., 2007). Ferocifenoli se izdvajaju zahvaljujući naprednim biološkim studijama u tom području, kao i zbog raznolikosti njihovih mehanizama djelovanja (Wang i sur., 2017). Organometalni pristup uspješno je primijenjen na bioaktivne spojeve poput flavona, aminokiselina, halkona, elagitanina, ciklodekstrina i kurkumina (Pedotti i sur., 2016). Kurkumin može spriječiti upalne, neurodegenerativne, kardiovaskularne, plućne, metaboličke, autoimune i neoplastične bolesti. Kao rezultat toga, sinteza spojeva povezanih s kurkuminom procjena njihove bioaktivnosti privlače veliku pozornost. Uvođenje ferocenske skupine u prirodne spojeve može biti odgovarajući pristup za povećanje antioksidacijskog potencijala (Li i Liu, 2011).

Recentne znanstvene studije istražuju učinke polifenola i njihovih konjugata kao mogućih zaštitnih tvari pri toksičnim učincima različitih ksenobiotika poput POPs spojeva. Više od 90 država je u svibnju 2001. godine usvojilo Stockholmsku konvenciju o POPs, potpisalo ugovor i preuzelo zadatak rješavanja tihe prijetnje koju predstavlja tzv. „*dirty dozen“*. To uključuje osam organoklornih pesticida (aldrin, klordan, diklordifeniltrikloretan (DDT), dieldrin, endrin, heptaklor, mireks i toksafen), dvije skupine industrijskih kemikalija (heksaklorobenzeni (HCB) i PCB) i dvije skupine industrijskih nusproizvoda (dioksini i furani) (Miodovnik, 2018).

PCB, skupina su od 209 aromatskih kongenera koji se razlikuju po stupnju i mjestu kloriranja, te su najčešće proučavani organski zagađivači. Prvi puta su proizvedeni 1929. godine u SAD-u, a zabranjeni su u većini zemalja do 1980. godine. Tijekom tog razdoblja PCB su imali široku primjenu u industriji (dielektrična tekućina u transformatorima i električnim kondenzatorima), zbog svojih dobrih električnih izolacijskih svojstava i visoke toplinske stabilnosti. Kao rezultat njihove postojanosti i lipofilnosti, PCB se nakupljaju u biološkom tkivu i koncentriraju na uzastopno višim razinama hranidbenog lanca. Trenutačno, nakon što su više od 3 desetljeća zabranjeni, PCB su još uvijek sveprisutni u okolišu, ljudskom tkivu, krvi i mlijeku (Guo i sur., 2020).

Položaj i broj atoma klora daju različita kemijska i biološka svojstva PCB-ima te su PCB podijeljeni u dvije različite kategorije. Jedna se kategorija smatra „*dioksinu sličnim*“ zbog sličnosti u strukturi i toksičnosti s TCDD-om. Karakteristika ove skupine je odsutnost atoma klora u *ortho*-položajima, što omogućuje PCB-ima postizanje planarne konfiguracije. Druga kategorija su kongeneri koji nisu slični dioksinu, a to su oni kongeneri koji imaju jedan ili više atoma klora prisutnih u *ortho*-položajima što uzrokuje rotaciju benzenskih prstena i gubitak planarne konfiguracije (Liu i sur., 2020). Kategoriziranje PCB-a kao kancerogenih tvari od strane IARC-a bio je važan pokretač za njihovo prepoznavanje kao spojeva opasnih po zdravlje i njihovu zabranu proizvodnje (Hens i Hens, 2018).

Epidemiološke studije otkrile su da je izloženost PCB-ima usko povezana s razvojem kardiovaskularnih bolesti, bolestima jetre, hormonskim poremećajima, negativnim učincima na imunološki i neurološki sustav te genotoksičnošću (Liu i sur., 2020). Studije na životinjama su potvrdile da PCB mogu prijeći krv-testis barijeru, mijenjajući endokrinu homeostazu i negativno utječući na funkciju testisa. Studije o izloženosti muškaraca PCB-ima ukazale su na sniženu razinu testosterona u serumu te na smanjenje broja i pokretljivost spermija. Potvrđeno je da izloženost PCB-ima može negativno utjecati i na ženski reproduktivni sustav. Izloženost ženki miševa *Aroclor*-u 1254 značajno je smanjila broj folikula, ometala razvoj jajnih stanica i povećala stopu apoptoze folikularnih stanica (He i sur., 2021).

Izloženost PCB-ima uzrokuje oksidacijski stres posredovan povećanim unutarstaničnim razinama ROS-a poput superoksidnog radikala i vodikovog peroksida (Zhu i sur., 2009). Slobodni radikali su visoko reaktivni te obično posjeduju jedan ili više nesparenih elektrona. ROS uključuju

brojne djelomično reducirane metabolite kisika kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikali (·OH) i superoksidni anion radikali ($\cdot O_2^-$). ROS se stvaraju unutar stanica kao nusprodukt normalnog metabolizma i kao drugi glasnici u različitim putevima prijenosa signala. ROS se također stvaraju posredovanjem vanjskih izvora kao što je ionizirajuće zračenje ili nastaju tijekom izlaganja stanica nekim okolišnim čimbenicima (Upadhyay i Dixit, 2015). Utvrđeno je da su ROS heterogeni spojevi i da mogu imati koristan ili štetan učinak ovisno o koncentracijama u kojima su prisutni na staničnoj razini. U niskim razinama, ROS je potreban za aktivaciju mnogobrojnih signalnih puteva, kao i za induciranje stanične proliferacije. Međutim, prekomjerna proizvodnja ROS-a ili izlaganje stanica ROS-u tijekom duljeg razdoblja, može uzrokovati nepovratna oštećenja DNA, proteina i lipida. Stoga su se razvili brojni urođeni obrambeni sustavi za detoksikaciju ili sprječavanje štetnog učinka ROS-a. To uključuje neenzimske molekule (npr. GSH, vitamine A, C i E te flavonoide), kao i indukciju detoksikacijskih/antioksidacijskih enzima (npr. SOD, CAT, GPx i HO-1), koji su uključeni u uklanjanje ili inaktivaciju ROS-a na staničnoj razini (Upadhyay i Dixit, 2015). Neravnoteža između stvaranja ROS-a i obrambenog mehanizma ili neodgovarajuća prisutnost antioksidacijskih molekula rezultira stanjem poznatim kao oksidacijski stres. Rastući dokazi ukazuju na to da je kronično i akutno prekomjerno formiranje ROS-a u patofiziološkim uvjetima ključno u razvoju kardiovaskularnih bolesti ili preranog napredovanja ateroskleroze, razvoju karcinoma, plućne fibroze i neurodegenerativnih poremećaja (Upadhyay i Dixit, 2015).

Polifenoli sudjeluju u zaštiti stanica od raznih upalnih procesa, kardiovaskularnih patologija, patologija povezanih s pretilošću, dijabetesa, neuroloških poremećaja, većine karcinoma te bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija koje su multirezistentne na većinu antibiotika (Teplova i sur., 2018). Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva pripisuje se sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, doniranja atoma vodika, elektrona ili kelatnih metalnih kationa. Molekularne strukture, osobito broj i položaji -OH skupina, te supstitucija na aromatskim prstenima, daje fenolnim spojevima sposobnost inaktivacije slobodnih radikala. Atomi vodika susjednih -OH skupina (*o*-difenol), smješteni na različitim položajima prstena A, B i C polifenola, zatim dvostruke veze benzenskog prstena kao i dvostruke veze karbonilne skupine (C=O), osiguravaju ovim spojevima visoko antioksidacijsko djelovanje (Minatel i sur., 2017). Ovisno o koncentraciji i prirodi polifenola ti spojevi, mogu djelovati i prooksidacijski. Prooksidacijska svojstva nekih polifenola mogu biti temelj njihovih citotoksičnih učinaka (Teplova i sur., 2018).

Oksidacijski stres ima važnu ulogu u toksičnom djelovanju PCB-a. Planarni PCB imaju visoki afinitet prema AhR-u, a induciranje CYP1A1 smatra se izvorom oksidacijskog stresa. Osim toga, PCB stvaraju ROS tijekom svog metaboličkog puta. Također, ometaju enzime i signalne puteve povezane s antioksidacijskom obranom, što dovodi do sekundarnog oksidacijskog stresa. U skladu s time su i rezultati istraživanja Murati i sur. (2017), koje je pokazalo da i planarni (PCB 77) i neplanarni (PCB 153) kongeneri uzrokuju indukciju oksidacijskog stresa. Istraživanja su pokazala da PCB 153 i smjese *Aroclor* 1254 i 1242 povećavaju razinu ROS-a za 1,5 – 1,8 puta u odnosu na kontrolne uzorke. Planarni PCB (PCB 77 i PCB 126) induciraju ROS i uzrokuju oksidaciju lipida u endotelnim stanicama. Za usporedbu, neplanarni PCB 153, nije pokazao ili je imao mali potencijal za indukciju oksidacijskog stresa (Liu i sur., 2020).

Ispitivanja toksičnosti na laboratorijskim životinjama provode se u svrhu procjene kemikalija (lijekovi, aditivi u hrani, industrijske i poljoprivredne kemikalije) na mogućnost izazivanja karcinoma, porođajnih oštećenja i drugih štetnih zdravstvenih učinaka. Podaci ispitivanja toksičnosti služe kao važan dio osnove za javno zdravstvo i regulatorne odluke koje se odnose na toksične kemikalije. Napretkom u biologiji i biotehnologiji sve je više mogućnosti za proučavanje učinaka kemikalija upotrebom stanica, staničnih komponenti i tkiva, a ne laboratorijskih životinja (NRC, 2007). Postoje brojne metode koje se rutinski koriste za preliminarni *in vitro* probir spojeva i analizu staničnih odgovora. Odabir odgovarajućeg biološkog testa citotoksičnosti ključan je za procjenu negativnih učinaka ksenobiotika te može biti potrebno provesti nekoliko metoda u isto vrijeme kako bi se dobio sveobuhvatan profil toksičnosti (Solenski i Larramendy, 2021). Glavni ciljevi ispitivanja toksičnosti su identifikacija opasnosti i kvantitativna procjena odnosa doza-odgovor (DelRaso, 1993). *In vitro* metode citotoksičnosti su poželjne metode za određivanje toksičnosti, osobito u usporedbi s *in vivo* metodama. To je povezano s mogućnošću smanjenja troškova, skraćivanja trajanja istraživanja i zaobilaženja etičkih pitanja svojstvenih ispitivanjima na životinjama (Jabłońska-Trypuć, 2021).

Postoje mnogobrojne *in vitro* metodama određene krajnje točke (engl. *endpoint*) za procjenu toksičnosti (Hsieh i sur., 2017). Tako se u istraživanjima koriste metode s različitim krajnjim točkama poput vijabilnosti stanica, funkcije i kontrole staničnog ciklusa, integriteta stanične membrane, sinteze DNA, metaboličkih promjena i apoptoze, između ostalih, kao pokazatelja koji potencijalno mogu pomoći u određivanju staničnih oštećenja (Solenski i Larramendy, 2021).

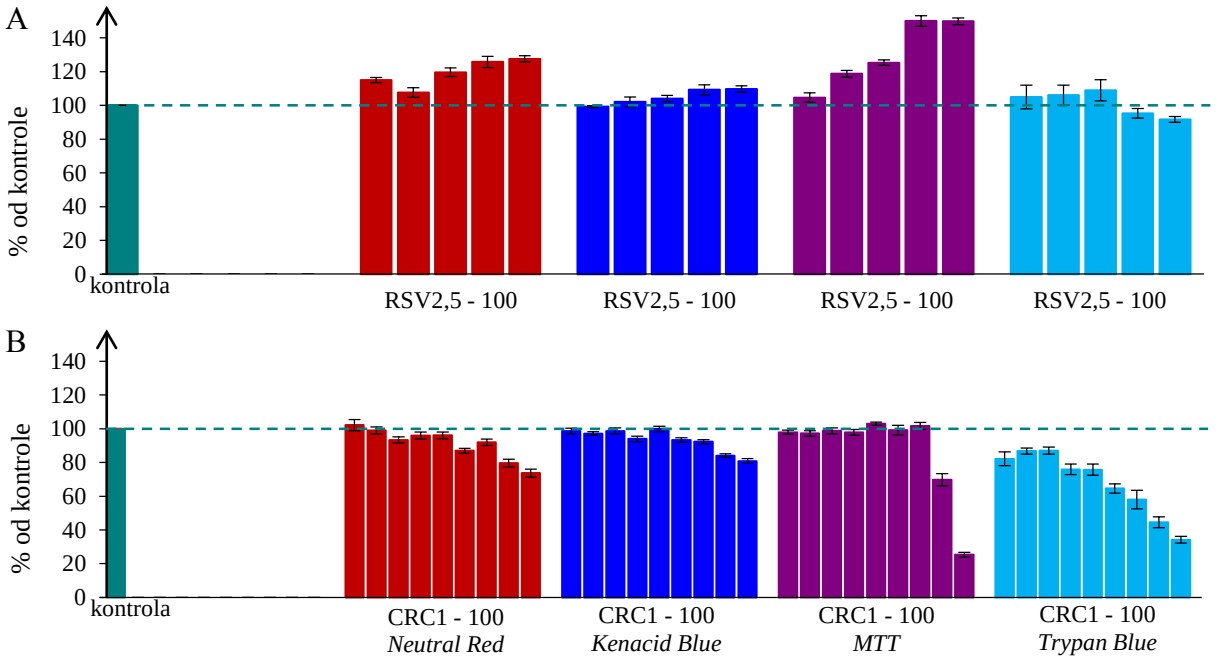
Smatra se da citotoksičnost ima važnu ulogu u brojnim patološkim procesima, uključujući kancerogenezu i upalu. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro* može biti važno u procjeni toksičnosti novih proizvoda u ranim fazama razvoja (Putnam i sur., 2002). Svaka *in vitro* metoda ima prednosti i nedostatke u pogledu svoje specifičnosti i osjetljivosti. Stoga, ovisno o studiji i krajnjoj točki, treba odabrati odgovarajući biološki test (Solenski i Larramendy, 2021).

U ovom doktorskom radu kako bi se dobile informacije o mogućim zaštitnim učincima odabranih polifenola (RSV i CRC) te ferocenskih analoga polifenola (RF i CF) na citotoksičnost induciranu odabranim PCB kongenerima (PCB 77 i PCB 153), provedene su validirane metode komplementarnih krajnjih točaka za procjenu vijabilnosti i proliferacije stanica. Korištene su: *NR* metoda – temelji se na sposobnosti živih stanica da unesu i vežu slabu kationsku *neutral red* boju, koja u stanice prodire neionskom difuzijom pri fiziološkom pH te se akumulira u lizosomima (Ates i sur., 2017), *KB* metoda – određuje sadržaj ukupnih staničnih proteina mjerenjem intenziteta obojenja stanica *Coomassie Brilliant Blue R-250* bojom koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se na stanične proteine (Solenski i Larramendy, 2021), *MTT* metoda – biološki test dizajniran za procjenu citotoksičnosti mjerenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima poput sukcinat dehidrogenaza (Solenski i Larramendy, 2021), *TB* metoda – određuje udio vijabilnih stanica u staničnoj kulturi, temelji se na ulasku plave boje samo unutar mrtvih stanica (Strober, 2019).

Vijabilnost i proliferacija CHO-K1 stanica tretiranih 2,5 – 100 µM RSV-om i 1 – 100 µM CRC-om određena je 6, 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, a 48 sati nakon tretmana 2,5 – 100 µM RF-om i 1 – 100 µM CF-om upotrebom četiri *in vitro* metode – *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*. Za svaku upotrijebljenu metodu određena je inhibicija stanične vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 5 µL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Rezultati su prikazani na **Slikama 22 – 25** (RSV), **27 – 30** (CRC), **50 – 53** (RF), **54 – 57** (CF) kao ovisnost stanične vijabilnosti o primijenjenoj koncentraciji.

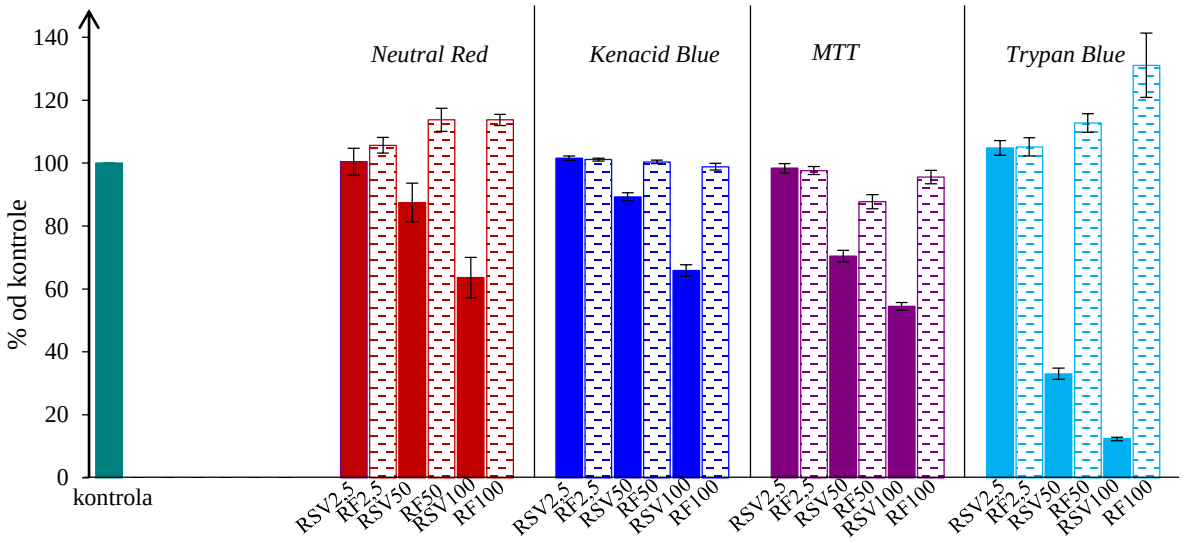
Rezultati ispitivanja učinka RSV-a i CRC-a pokazuju o dozi ovisno djelovanje sa svim primijenjenim metodama, međutim uočene su razlike u osjetljivosti metoda. Primjenom *NR*, *KB* i *MTT* metoda utvrđeno je da s porastom koncentracije RSV-a 6 sati nakon tretmana dolazi do vrlo blagog porasta u staničnoj vijabilnosti (**Slike 22 – 24**). Međutim, upotrebom metode *TB* (**Slika 25**) uočava se smanjenje stanične vijabilnosti već 6 sati nakon izlaganja višim koncentracijama RSV-a (50 i 100 µM). Za razliku od RSV-a, CRC je već 6 sati nakon tretmana pri svim provedenim

metodama (**Slike 27 – 30**) uzrokovao smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica, što je u skladu s recentnim istraživanjima. Tako su Cianfruglia i sur. (2019) uočili snažnu inhibiciju proliferacije HDF (engl. *human dermal fibroblast*) stanica 24 sata nakon izlaganja CRC-u u koncentracijama od 10 i 20 μM. Usporedba učinka RSV-a i CRC-a 6 sati nakon tretmana na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica primjenom sve 4 metode prikazana je na **Slici 108**.



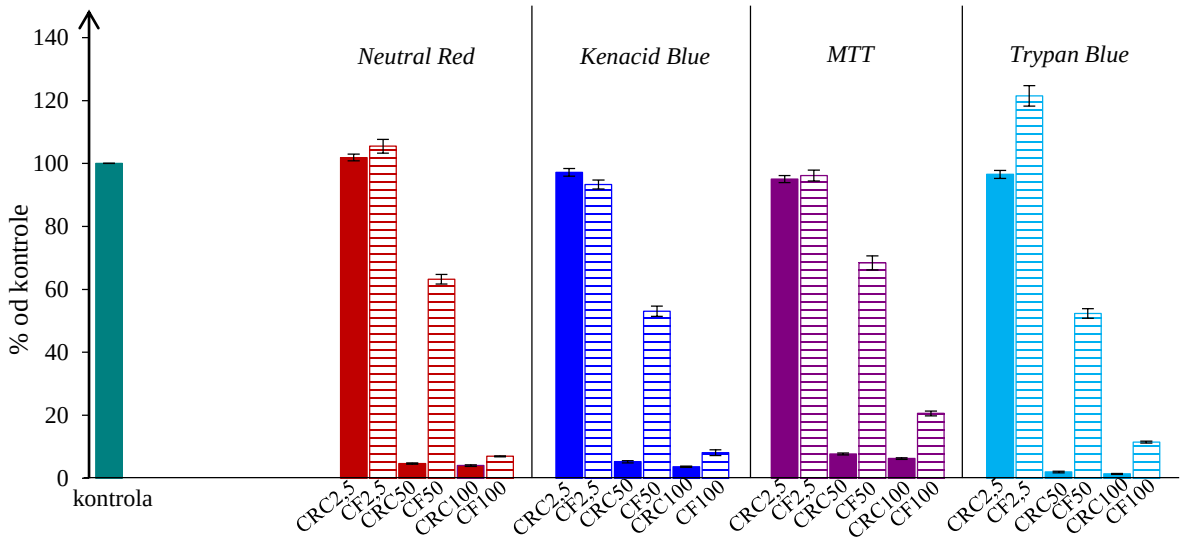
Slika 108. Učinak 2,5 – 100 μM resveratrola (RSV) (A) i 1 – 100 μM kurkumina (CRC) (B) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 6 sati nakon tretmana određen metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*.

Usporedba učinka 2,5 – 100 μM RSV-a i 2,5 – 100 μM RF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana primjenom 4 metode prikazana je na **Slici 109**. RSV i RF pokazali su različitu biološku aktivnost – RSV je djelovao inhibitorno na rast stanica, dok RF pri istim dozama nije ispoljio antiproliferacijski učinak, već je u pojedinim koncentracijama djelovao stimulatorno. Kao najosjetljivija metoda određivanja aktivnosti RSV-a pokazala se metoda *TB* (statistički značajan pad u staničnoj vijabilnosti u odnosu na kontrolu uočen je 24 sata nakon tretmana s 10 μM RSV) (**Slika 25**).



Slika 109. Usporedba učinaka resveratrola (RSV) i ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF) (2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*.

Usporedba učinka 2,5 – 100 μM CRC-a i 2,5 – 100 μM CF-a na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana primjenom 4 metode prikazana je na **Slici 110**. CRC i CF pokazali su o dozi ovisan inhibitoran učinak na staničnu vijabilnost. Izraženiji učinak uočen je za CRC (**Slika 110**), a kao najosjetljivija metoda pokazala se *TB* (statistički značajano smanjenje stanične vijabilnosti uočava se već 6 sati nakon tretmana pri koncentraciji 1 μM) (**Slika 30**). Pri nižim koncentracijama (1 – 10 μM) CRC je pokazao inhibitorni učinak na vijabilnost stanica, dok je CF djelovao blago stimulatorno (najuočljivije primjenom metoda *NR* – **Slike 27** i **54** i *TB* – **Slike 30** i **57**). Međutim, pri koncentracijama 15 – 100 μM uočava se o dozi ovisno citotoksično djelovanje na vijabilnost CHO-K1 stanica kod svih primijenjenih metoda nakon tretmana i CRC-om i CF-om (**Slike 27 – 30**, **54 – 57**). Iako oba spoja djeluju citotoksično pri koncentracijama ≥ 15 μM, učinak CF-a je blaži u odnosu na učinak CRC-a.



Slika 110. Usporedba učinaka kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) (2,5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana određen metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, *MTT* i *Trypan Blue*.

Za polifenole RSV i CRC izračunate su IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti (nakon 72 sata inkubacije), koje predstavljaju koncentracije ispitanih spojeva pri kojima je došlo do 20, 50 i 80%-tne inhibicije vijabilnosti CHO-K1 stanica (**Tablice 2** i **3**). Usporedbom IC vrijednosti za RSV i CRC uočena je značajno izraženija citotoksičnost CRC-a, što je utvrđeno svim primijenjenim *in vitro* metodama. IC_{50} vrijednosti za RSV određene metodama *NR* i *KB* približno su jednake, ali i značajno više od onih dobivenih metodama *MTT* i *TB*. Morfološkom analizom kulture CHO-K1 stanica tretiranih RSV-om uočen je znatno manji broj stanica koje su bile veće i s više u lizosome inkorporirane boje *neutral red*, u odnosu na netretirane stanice, što je posljedično rezultiralo znatno višom IC_{50} vrijednošću dobivenu metodom *NR* u odnosu na *TB*. IC_{50} vrijednosti za CRC (**Tablica 3**) približno su iste neovisno o primijenjenoj metodi. Nakon 48 sati inkubacije određene su IC vrijednosti i za polifenole (RSV i CRC) i za njihove novosintetizirane analoge s ferocenom (RF i CF) što je prikazano u **Tablici 6**. Iz tablice je vidljivo da su IC vrijednosti za polifenole RSV i CRC niže u odnosu na one dobivene za njihove analoge RF i CF. Usporedbom intracelularnih učinaka sva četiri ispitana bioaktivna spoja, uočeno je da RF nema citotoksično djelovanje, već su detektirani stimulatorni učinci na proliferaciju stanica metodama *NR* (**Slika 50**) i *TB* (**Slika 53**).

Tablica 6. IC vrijednosti za resveratrol (RSV) i ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF) te kurkumin (CRC) i ferocenski analog kurkumina (CF) određene primjenom četiri *in vitro* metode 48 sati nakon tretmana CHO-K1 stanica

SPOJ	METODA	VRIJEME (48 h)		
		IC_{20} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{80} (μM)
RSV	*Neutral Red*	60,39	**	**
	Kenacid Blue	74,00	122,53*	158,03*
	MTT	35,56	113,85*	**
	Trypan Blue	15,31	36,91	71,22
RF	*Neutral Red*	197,59*	241,15*	275,42*
	Kenacid Blue	**	**	**
	MTT	**	**	**
	Trypan Blue	**	**	**
CRC	*Neutral Red*	8,34	19,64	22,48
	Kenacid Blue	8,59	19,95	34,56
	MTT	9,38	21,88	38,42
	Trypan Blue	5,17	15,00	27,15
CF	*Neutral Red*	32,10	59,83	84,17
	Kenacid Blue	19,26	50,90	82,75
	MTT	29,88	65,46	94,39
	Trypan Blue	24,43	49,81	78,94

*vrijednost određena iz interpolirane polinomne krivulje viša od eksperimentalno primijenjene najviše koncentracije RSV-a/RF-a; **vrijednost nije bilo moguće odrediti iz interpolirane polinomne krivulje

U ovom radu ispitan je učinak RSV-a, CRC-a, RF-a i CF-a i na vijabilnost i proliferaciju kancerozne stanične linije jetre – Hepa1-6. Vijabilnost i proliferacija stanica tretiranih s 1 – 100 μM RSV-om i 1 – 100 μM CRC-om određena je 24, 48 i 72 sata nakon tretmana, a 48 sati nakon tretmana s 1 – 100 μM RF-om i 1 – 100 μM CF-om upotrebom četiri *in vitro* metode – *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*. Za svaku upotrijebljenu metodu određena je inhibicija stanične vijabilnosti i proliferacije u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 5 μL DMSO-a mL^{-1} medija za uzgoj). Rezultati su prikazani na **Slikama 32 – 35** (RSV), **37 – 40** (CRC), **58 – 61** (RF), **62 – 65** (CF) kao ovisnost stanične vijabilnosti o primijenjenoj koncentraciji.

Ispitivanje učinka RSV-a i CRC-a na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica pokazuje o dozi ovisno djelovanje sa svim primijenjenim metodama (*NR*, *KB*, *MTT* i *TB*). Smanjenje stanične

vijabilnosti uočava se već 24 sata nakon izlaganja stanica koncentracijama RSV-a ≥ 2,5 μM što je potvrđeno svim primijenjenim metodama (**Slike 32 – 35**). Nakon izlaganja stanica CRC-u inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju uočava se nakon izlaganja CRC-u: ≥ 2,5 μM (*TB* – **Slika 40**, *MTT* – **Slika 39**), ≥ 20 μM (*KB* – **Slika 38**, *NR* – **Slika 37**). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s istraživanjem Du i sur. (2013), koje je ukazalo na to da i RSV i CRC dovode do o dozi i vremenu ovisne inhibicije proliferacije Hepa1-6 stanica 24 sata nakon izlaganja ovim polifenolima. Pri ispitivanju učinka RF-a i CF-a također se uočava o dozi ovisno smanjenje stanične vijabilnosti pri svim primijenjenim metodama (*NR*, *KB*, *MTT* i *TB*) 48 sati nakon tretmana. Iako nakon tretmana RF-om dolazi do pada u staničnoj vijabilnosti već pri najnižim primijenjenim koncentracijama (1 i 2,5 μM) (**Slike 58 – 61**), taj pad je blago izražen i ostaje gotovo nepromijenjen pri svim primijenjenim koncentracijama (1 – 100 μM), izuzev metoda *MTT* i *TB*, kod kojih je taj pad pri koncentracijama ≥ 50 μM nešto izraženiji. CF u odnosu na RF pokazuje izraženiji inhibitorni učinak na staničnu vijabilnost i proliferaciju pri svim primijenjenim koncentracijama, te je naročito izražen pri ≥ 35 μM (**Slike 62 – 65**).

Prilikom ispitivanja učinaka RSV-a, CRC-a, RF-a i CF-a na staničnu vijabilnost i proliferaciju, CHO-K1 stanična linija se pokazala kao prikladniji model dinamike rasta te održavanja stanica u kulturi u odnosu na Hepa1-6. Također, u drugoj fazi istraživanja kojoj je svrha bila selekcija bioaktivnih spojeva sa zaštitnim učincima na toksičnost induciranu PCB-ima – poznatim reprodukcijskim toksikantima, stanice ovarija bile su *a priori* odabir.

In vitro i *in vivo* studije pokazuju da polifenoli posjeduju antioksidacijsko djelovanje (Xiao i Högger, 2015). Antioksidansi mogu neutralizirati učinke ROS-a, a dijele se u dvije skupine – enzimski i neenzimski. Neenzimski antioksidansi uključuju vitamin C, vitamin E, selen, cink, β-karoten, taurin, hipotaurin i GSH, dok enzimski antioksidansi uključuju SOD, CAT, GR (Mulgund i sur., 2015). Fenolni spojevi s više od jedne -OH skupine učinkoviti su primarni antioksidansi (reagiraju direktno sa slobodnim radikalima) zbog sposobnosti doniranja H-atoma slobodnim radikalima, stvarajući relativno nereaktivne fenoksilne radikale (Hermund, 2018).

Studije učinaka polifenola na redoks stanje stanica podupiru njihovo anti- i prooksidacijsko djelovanje, koje u velikoj mjeri ovisi o koncentraciji polifenola i o tipu stanica (Piccolella i Pacifico, 2015). Istraživanja ukazuju na to da neki polifenoli (poput RSV-a) pokazuju bifazne učinke ovisno o primijenjenoj dozi te mogu djelovati kao anti- ili kao prooksidansi (Shaito i sur.,

2020). Stoga, kako bi se utvrdilo pri kojim dozama polifenoli djeluju anti-, a pri kojima prooksidacijski, u ovom radu je ispitan učinak 1 – 100 μM RSV-a i CRC-a na formiranje ROS-a u CHO-K1 stanicama primjenom DCFH-DA metode.

Studijom je utvrđeno da RSV u svim ispitanim koncentracijama (1 – 100 μM) djeluje antioksidacijski (**Slika 42**). Antioksidacijski potencijal RSV-a pripisuje se njegovoj sposobnosti uklanjanja ROS-a i regulaciji antioksidacijske obrane stanica (Salehi i sur., 2018). Prema dostupnoj literaturi, RSV u niskim koncentracijama djeluje kao antioksidans koji može zaštititi od oštećenja DNA i oksidacijskog stresa. S druge strane, u visokim koncentracijama djeluje kao prooksidans uzrokujući oštećenje DNA i povećavajući oksidacijski stres (Shaito i sur., 2020). RSV se može autooksidirati kako bi se generirali semikinoni i relativno stabilni 4′-fenoksil radikali, što u konačnici dovodi do formiranja ROS-a (Salehi i sur., 2018). Brojne studije opisuju tzv. hormetičke učinke RSV-a – pri niskim dozama (≤ 10 μM) RSV može djelovati kao antioksidans, stimulirajući staničnu proliferaciju i antioksidacijski odgovor, dok pri višim koncentracijama (≥ 50 μM), može djelovati kao prooksidans, uzrokujući stanična oštećenja i smanjujući staničnu vijabilnost (Gueguen i sur., 2015). I u ovom istraživanju vidljivo je da najviša primijenjena doza RSV-a, iako još uvijek djeluje antioksidacijski, nije više tako učinkovita u uklanjanju ROS-a u odnosu na niže ispitane doze (5, 20 i 50 μM).

Smatra se i da CRC posjeduje snažna antioksidacijska svojstva što se pripisuje -OH i -OCH_3 skupinama u strukturi, koje zajedno poboljšavaju uklanjanje slobodnih radikala (Devassy i sur., 2015; Kocaadam i Şanlier, 2015). CRC, isto kao i RSV pokazuje hormetički odgovor (Moghaddam i sur., 2018; Rainey i sur., 2019). U ovom radu utvrđeno je da CRC pri svim ispitanim koncentracijama (1 – 100 μM) smanjuje razinu ROS-a u stanicama, no samo pri 50 μM CRC-u je taj učinak statistički značajan (dok je kod RSV-a taj učinak bio statistički značajan pri svim ispitanim koncentracijama) (**Slike 42 i 43**).

Kako bi se utvrdilo posjeduju li RF i CF anti- ili prooksidacijska svojstva ispitan je i njihov učinak na formiranje ROS-a u CHO-K1 stanicama. Provedenom DCFH-DA metodom utvrđeno je da RF pri svim primijenjenim koncentracijama (1 – 100 μM) djeluje antioksidacijski, a statistički značajan ($p<0,05$ – $p<0,001$) učinak se uočava pri koncentracijama RF-a od 1 – 20 μM (**Slika 66**).

U ovome radu je i za CF utvrđeno da pri svim primijenjenim koncentracijama (1 – 100 μM) djeluje antioksidacijski (**Slika 67**), što je izraženije i statistički značajno ($p<0,05$ – $p<0,005$) pri dozama ≥ 20 μM. Većina istraživanja pokazuje da kompleksi kurkumin-metal imaju poboljšanu antioksidacijsku sposobnost u odnosu na sam kurkumin (Prasad i sur., 2021), što je i u skladu s ovim istraživanjem.

Ovom studijom je utvrđeno da su sva četiri ispitana spoja (polifenoli i njihovi ferocenski analozi) pokazala antioksidacijski učinak na CHO-K1 stanicama, a jasno je vidljivo da su RSV i RF, u odnosu na CRC i CF bili u tome učinkovitiji.

Stanice se iz tkiva uklanjaju kontroliranim (programiranim) načinom, koji uključuje niz biokemijskih i molekularnih događaja ili alternativno manje kontroliranim načinom, koji rezultira izlijevanjem staničnog sadržaja u okolna tkiva. Stanična smrt je rezultat niza različitih i visoko reguliranih energetski ovisnih procesa (apoptoza, piroptoza, autofagija) ili energetski neovisnih procesa (onkoza/nekroza). Ovi se različiti procesi stanične smrti razlikuju na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika (D'Arcy, 2019).

U ovom radu u svrhu utvrđivanja tipa stanične smrti (apoptoza/nekroza) koju inducira izloženost RSV-u, CRC-u, RF-u ili CF-u, CHO-K1 stanice inkubirane su s navedenim spojevima tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 5 – 100 μM (RSV, CRC, CF) te 2,5 – 100 μM (RF). Udio stanica u određenoj subpopulaciji (žive stanice, stanice u ranoj i kasnoj apoptozi, mrtve stanice) utvrđen je kvantitativnom analizom stanica primjenom metode protočne citometrije 6 i/ili 48 sati nakon tretmana stanica pojedinim spojem. U svrhu kvantifikacije stanica koriste se aneksin V (Ca^{2+}-ovisan fosfolipid vezujući protein), koji se veže na PS na membrani stanica u ranoj apoptozi te 7-AAD (fluorescentna boja), koja prodire kroz membranu oštećenih ili mrtvih stanica i veže se za DNA što omogućuje identifikaciju četiri populacije stanica (žive, rana i kasna apoptoza, mrtve) (Anthony i sur., 1998; Oh i sur., 2016).

Nakon tretmana CHO-K1 stanica RSV-om, CRC-om, RF-om ili CF-om, udio ukupno apoptotskih stanica mijenjao se ovisno o primijenjenoj koncentraciji spoja i vremenu inkubacije. Nakon 48 sati inkubacije CHO-K1 stanica s 5 μM RSV-om udio ukupno apoptotskih stanica iznosio je 5,93%, a mrtvih 3,50%, dok je pri 100 μM RSV-u udio ukupno apoptotskih stanica iznosio 18,29%, a mrtvih 10,31% (**Slika 44**). Rezultati su u skladu sa studijom Ahmada i sur.

(2006), koja je ukazala na to da RSV u niskim dozama (< 10 μM) inhibira aktivaciju kaspaza i DNA fragmentaciju induciranu s H_2O_2 u humanim stanicama akutne promijelocitne leukemije (HL60), dok je u visokim dozama (> 40 μM) inducirao apoptozu putem aktivacije kaspaza i u normalnim i u kanceroznim stanicama.

In vitro studije ukazuju na to da CRC inhibira proliferaciju i/ili izaziva staničnu smrt u različitim tipovima stanica, a najčešći tip stanične smrti je apoptoza. CRC može inducirati apoptotski put ovisan o mitohondrijima, kroz oslobađanje citokroma c i drugih proapoptogenih mitohondrijskih čimbenika (Salvioli i sur., 2007). CRC posjeduje bifazna svojstva, budući da ovisno o primijenjenim dozama djeluje stimulirajuće ili iskazuje inhibicijski učinak. U ovom radu, 48 sati nakon inkubacije CHO-K1 stanica s 5 μM CRC-om udio ukupno apoptotskih stanica iznosio je 3,78%, a mrtvih 1,93%, dok je pri 100 μM CRC-u udio ukupno apoptotskih stanica iznosio značajnih 92,57%, a mrtvih 2,88% (**Slika 47**). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Songa i sur. (2021) u kojem je utvrđeno da s povećanjem koncentracije CRC-a raste udio HaCaT stanica (humani keratinociti) u apoptozi. Također, primijećeno je da s produljenjem vremena inkubacije sa 6 na 48 sati proapoptotski učinak raste prilikom tretmana stanica CRC-om (doze > 20 μM), za razliku od tretmana stanica RSV-om gdje se s produljenom inkubacijom udio i apoptotskih i nekrotskih stanica smanjuje (**Slike 44 i 47**).

48 sati nakon inkubacije CHO-K1 stanica s 5 μM RF-om udio ukupno apoptotskih stanica iznosio je 7,89%, a mrtvih 0,43%, dok je pri 100 μM RF-u udio ukupno apoptotskih stanica iznosio 0,98%, a mrtvih 2,35% (**Slika 68**). 48 sati nakon inkubacije CHO-K1 stanica s 5 μM CF-om udio ukupno apoptotskih stanica iznosio je 4,19%, a mrtvih 3,44%, dok je pri 100 μM CF-u udio ukupno apoptotskih stanica iznosio 24,93%, a mrtvih 5,75% (**Slika 70**). Prema istraživanjima, kompleksi CRC-Fe ne mogu inducirati staničnu smrt kao što to čini sam CRC (Rainey i sur., 2019). Ovim istraživanjem utvrđeno je da je udio stanica u apoptozi nakon tretmana 100 μM CRC-om značajno veći od udjela stanica u apoptozi nakon tretmana istom dozom CF-a (**Slike 47** i **70**). Slično je utvrđeno i za RSV *vs*. RF (**Slike 44** i **68**). Rezultati analize stanične smrti su u skladu s rezultatima određivanja citotoksičnosti.

Sredinom devedesetih godina UNEP (engl. *Governing Council of the United Nations Environment Programme*) je pozvao na globalnu akciju u pogledu perzistentnih organskih zagađivača, definiranih kao *„kemijske tvari koje perzistiraju u okolišu, bioakumuliraju se putem*

hrane, i predstavljaju rizik od nanošenja štetnih učinaka na zdravlje ljudi i na okoliš" (Miodovnik, 2018). PCB, kao jedni od perzistentnih organskih zagađivača, cirkuliraju atmosferom i prisutni su u okolišu. Nakon puštanja u okoliš, pojedinačni kongeneri mogu proći kroz biorazgradnju i fotodegradaciju, što rezultira promjenom uzorka kongenera u usporedbi s izvornim tehničkim smjesama. Dok se neki niže klorirani kongeneri brzo metaboliziraju, više klorirani kongeneri znatno su stabilniji i akumuliraju se u hranidbenom lancu (EFSA, 2005). Kao posljedica izloženosti PCB-ima, može doći do razvoja upalnog odgovora i oksidacijskog stresa. To rezultira oštećenjima DNA, peroksidacijom lipida, oštećenjem membrana i organela, gubitkom vijabilnosti stanica i staničnim odumiranjem (Stohs, 2014). Obzirom da polifenoli djeluju protuupalno i antioksidacijski, u ovoj studiji ispitani su učinci RSV-a i CRC-a te njihovih ferocenskih analoga RF-a i CF-a na citotoksičnost induciranu PCB-ima (planarnim PCB-em 77 i neplanarnim PCB-em 153).

Saznanja dobivena u prvom dijelu ovog istraživanja omogućila su selekciju onih doza polifenola i njihovih analoga koje ne djeluju toksično na stanice i mogu potencijalno zaštitno djelovati pri izloženosti stanica toksičnim spojevima. Odabrane doze polifenola RSV-a i CRC-a su ≤ 20 μM, a njihovih ferocenskih analoga CF-a ≤ 20 μM te RF-a ≤ 100 μM.

Učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s RSV-om (2,5 – 20 μM) i CRC-om (1 – 20 μM) na staničnu vijabilnost i proliferaciju nakon tretmana planarnim PCB-em 77 ili neplanarnim PCB-em 153 (75 μM) praćen je 24 sata nakon tretmana stanica PCB kongenerom upotrebom *in vitro* metoda (*NR*, *KB*, *MTT* i *TB*). Oba PCB kongenera uzrokovala su statistički značajno smanjenje ($p<0,05$ – $p<0,001$) vijabilnosti CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s 15 μL DMSO mL^{-1}) što je utvrđeno svim primijenjenim metodama (**Slike 72 – 79**). Također, određen je izraženiji citotoksični učinak za planarni PCB 77. Pri tretmanu stanica PCB-em 77, RSV nije pokazao zaštitni učinak, štoviše kod svih primijenjenih metoda utvrđen je inhibitorni učinak na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 77, a predinkubiranih s RSV-om u dozama > 2,5 μM, u odnosu na stanice kojima RSV nije dodan (**Slike 72 – 75**). Do statistički značajnog smanjenja vijabilnosti stanica došlo je pri koncentraciji RSV-a od 20 μM (*NR:* $p<0,01$; *KB:* $p<0,001$; *MTT:* $p<0,001$; *TB:* $p<0,05$). RSV u koncentraciji od 2,5 μM pokazao je blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 153 (utvrđeno svim metodama – **Slike 72 – 75**), a kod *NR* i *TB* metoda taj učinak je i statistički značajan ($p<0,05$, $p<0,001$) (**Slike 72** i **75**). Međutim, pri višim koncentracijama RSV-a (10 i 20

μM) dolazi do sinergistički inhibitornog učinka na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 153. Zaštitni učinak niskih doza (do 5 μM) RSV-a na citotoksičnost uzrokovanu natrijevim arsenitom utvrdili su Chen i sur. (2013), dok je negativan učinak primijećen pri 20 μM RSV-u.

CRC (10 i 20 μM) nije pokazao zaštitni učinak na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih bilo planarnim bilo neplanarnim PCB-em. Štoviše, inhibitorni učinak CRC/PCB *vs*. PCB je izraženiji i statistički značajan pri 10 μM i 20 μM ($p<0,05$ – $p<0,001$) što je potvrđeno primijenom svih *in vitro* metoda (**Slike 76 – 79**). Niže koncentracije CRC-a (1 – 5 μM) pokazale su blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 77 ili PCB-em 153 što je određeno metodama *MTT* i *TB* (**Slike 78 i 79**), a statistički značajno ($p<0,001$) povećanje vijabilnosti stanica utvrđeno je pri koncentraciji CRC-a od 1 μM nakon tretmana stanica PCB-em 153 metodom *TB* (**Slika 79**). Buratta i sur. (2020) ispitivali su učinak CRC-a na citotoksičnost induciranu insekticidom rotenonom i rezultati su pokazali da koinkubacija s CRC-om u koncentraciji od 10 μM smanjuje citotoksične učinke izazvane ovim insekticidom. Također se u istraživanju Guan i sur. (2019), u kojem je ispitivan učinak CRC-a na citotoksičnost palmitinske kiseline na H9C2 kardiomiocite, uočilo da CRC u nižim koncentracijama (2,5 – 10 μM) poboljšava vijabilnost stanica, ali se već pri 20 μM uočava niža stanična vijabilnost.

I učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s RF-om (2,5 – 100 μM) i CF-om (1 – 20 μM) na staničnu vijabilnost i proliferaciju nakon tretmana planarnim PCB-em 77 ili neplanarnim PCB-em 153 (75 μM) praćen je 24 sata nakon tretmana PCB kongenerom primjenom *NR*, *KB*, *MTT* i *TB* *in vitro* metoda u odnosu na stanice koje nisu predinkubirane s RF-om/CF-om (**Slike 90 – 97**).

Izražen zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu *ortho*-supstituiranim kongenerom, pokazao je RF u dozama ≥ 35 μM, što je dokazano svim *in vitro* metodama (**Slike 90 – 93**). Primijenom metode *TB* navedeni učinak je uočen već pri koncentraciji RF-a 5 μM (**Slika 93**). Vijabilnost stanica predinkubiranih s najvišom dozom RF-a (100 μM), a potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 bila je približno ista onoj u kontrolnom uzorku (stanice tretirane DMSO-om), što RF izdvaja kao potencijalnu bioaktivnu tvar zaštitnog djelovanja. Za razliku od zaštitnog djelovanja RF-a pri tretmanu stanica neplanarnim kongenerom, isto nije uočeno za stanice tretirane „*dioksinu sličnim*“ kongenerom, gdje je citotoksični učinak i dalje izražen.

Predinkubacija stanica CF-om (1 – 20 μM) nije utjecala na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153 (**Slike 94 – 97**), osim statistički značajnog ($p<0,05$ – $p<0,001$) inhibitornog učinka CF-a pri koncentracijama ≥ 5 μM na toksičnost induciranu PCB-em 153 uočeno metodom *TB* (**Slika 97**).

Mnogobrojne studije sugeriraju da je nakupljanje DNA/kromosomskih oštećenja u stanicama potaknuto povećanom razinom ROS-a, što može biti čest odgovor na različite toksikante (Chen i sur, 2013). Oksidacijski stres i povećana razina ROS-a su jedna od posljedica negativnih intracelularnih učinaka PCB-a (Selvakumar i sur., 2012). U ovom istraživanju ispitan je potencijalan zaštitni učinak polifenola i ferocenskih analoga polifenola na razinu ROS-a nastalih nakon tretmana PCB kongenerima. Oba PCB kongenera, PCB 77 i PCB 153, statistički značajno ($p<0,05$ – $p<0,025$) su povisila razinu ROS-a u CHO-K1 stanicama (**Slike 80, 81, 98** i **99**).

Smanjenje razine ROS-a u CHO-K1 stanicama tretiranih PCB-em 77, a predinkubiranih s RSV-om uočeno je pri nižim koncentracijama RSV-a od 1 μM ($p<0,001$) i 2,5 μM. Međutim, pri višim koncentracijama (5 i 20 μM) uočava se blagi prooksidacijski učinak (**Slika 80**). Navedeno je u skladu s istraživanjem Chen i sur. (2013), koji su ispitivali učinak RSV-a na citotoksičnost induciranu natrijevim arsenitom ($NaAsO_2$) u humanoj A549 staničnoj liniji (adenokarcinom pluća). Zaštitni učinak RSV-a koji se manifestirao kao smanjena razina ROS-a bio je statistički značajan pri 1 i 5 μM RSV-u, dok je kod stanica izloženih 20 μM RSV-u uočeno povećanje oksidacijskog stresa (Chen i sur, 2013). Pri tretmanu stanica PCB-em 153 uočen je statistički značajan ($p<0,05$) antioksidacijski učinak RSV-a primijenjenom najviše koncentracije (20 μM) tog polifenola (**Slika 80**).

Prema istraživanjima, CRC iskazuje dvojake učinke na razinu ROS-a. Tako je u studiji Mahakunakorna i sur. (2003) istovremeni tretman CRC-om i H_2O_2 značajno smanjio oksidacijski stres izazvan H_2O_2 u hibridnoj staničnoj liniji NG108-15 (neuroblastom-gliom). Međutim, inkubacija s CRC-om prije tretmana H_2O_2 nije zaštitila stanice NG108-15 od oksidacijskog oštećenja. U ovom istraživanju učinka predinkubacije CHO-K1 stanica s CRC-om na razinu ROS-a nastale djelovanjem PCB kongenera, utvrđeno je smanjenje razine ROS-a (antioksidacijski učinak) u odnosu na stanice tretirane samo PCB kongenerima pri dozama CRC-a ≤ 2,5 μM. Statistički značajan ($p<0,025$) antioksidacijski učinak CRC-a u dozi 1 μM određen je nakon tretmana stanica PCB-em 77 (**Slika 81**). Međutim, porastom koncentracije CRC-a uočava se

prooksidacijski učinak, koji je i statistički značajan ($p<0,025$) pri koncentraciji CRC-a od 5 μM kod tretmana PCB-em 153 (**Slika 81**). CRC je pokazao antioksidacijsko djelovanje i u drugim studijama. Tako su npr. Buratta i sur. (2020) utvrdili da 10 μM CRC u PC12 stanicama (stanice feokromocitoma štakora) tretiranih insekticidom rotenonom, iskazuje antioksidacijsko djelovanje, a u studiji Jaiswala i sur. (2018) predtretman štakora CRC-om, koji su potom izloženi pesticidu karbofuranu, pružio je značajnu zaštitu od hepatotoksičnosti i neurotoksičnosti. Zaštita koju pruža CRC mogla bi biti posljedica njegovih antioksidacijskih svojstava i/ili indukcije jetrenih detoksikacijskih enzima.

Klinička primjena polifenola poput stilbena i kurkuminoida limitirana je njihovom nestabilnošću i lošom biodostupnošću. Unapređenje biološke aktivnosti polifenola postiže se modifikacijom broja i položaja fenilnih skupina, umetanjem alkilnih lanaca te aciliranjem -OH skupina. Unatoč sintezi velikog broja kemijski modificiranih polifenolnih spojeva, znanja o njihovom anti/prooksidacijskom učinku još su uvijek ograničena. Stoga se u ovom istraživanju, osim učinka RSV-a i CRC-a, ispitivao i učinak predinkubacije CHO-K1 stanica s RF-om i CF-om na razinu ROS-a nastalih nakon tretmana PCB kongenerima.

Istraživanjem učinka predinkubacije CHO-K1 stanica s RF-om na razinu ROS-a nastale djelovanjem PCB kongenera, utvrđeno je statistički značajno (RF/PCB 77 *vs*. PCB 77; $p<0,05$ – $p<0,01$) smanjenje razine ROS-a (antioksidacijski učinak) za 17,65 – 19,97% pri svim primijenjenim koncentracijama RF-a (1 – 20 μM), a nakon tretmana PCB-em 77 (**Slika 98**). Međutim, RF nije djelovao antioksidacijski prilikom tretmana stanica s *ortho*-supstituiranim kongenerom, već je pri višim dozama (5 i 20 μM) uočen statistički značajan ($p<0,005$) prooksidacijski učinak (**Slika 98**).

Istraživanjem učinka predinkubacije CHO-K1 stanica s CF-om na razinu ROS-a nastale djelovanjem PCB kongenera, utvrđeno je smanjenje razine ROS-a (antioksidacijski učinak) pri nižim primijenjenim koncentracijama CF-a (1 – 2,5 μM) nakon tretmana PCB kongenerima, s time da je taj pad statistički značajan ($p<0,05$) pri 2,5 μM CF-u nakon tretmana PCB-em 77 i 1 μM CF-u nakon tretmana PCB-em 153 (**Slika 99**). Međutim, povećanje razine ROS-a (prooksidacijski učinak) vidljiv je pri višim primijenjenim koncentracijama CF-a (5 i 20 μM), s time da je taj porast izraženiji nakon tretmana stanica planarnim PCB-em 77 (**Slika 99**).

Kao poznati induktor ROS-a u ovom istraživanju primijenjen je TBHP te je dokazano njegovo prooksidacijsko djelovanje u dozi 50 μM (**Slike 80, 81, 98** i **99**). RSV i CRC nisu pokazali učinak na sniženje ROS-a induciranog TBHP-om (**Slike 80** i **81**), dok je predinkubacija stanica s RF-om djelovala antioksidacijski (**Slika 98**). Za razliku od RF-a, CF je dodatno inducirao formiranje ROS-a u stanicama tretiranih TBHP-om (**Slika 99**).

Pojedine znanstvene studije su pokazale da polifenoli mogu zaštititi stanice od stanične smrti uzrokovane ksenobioticima. Sánchez-Martín i sur. (2011) su u svom istraživanju utvrdili da je 10 μM RSV u potpunosti zaštitio CDC (engl. *cerebellar granule cells*) stanice od apoptoze inducirane TCDD-om. Iz literature je poznato da pojedini neplanarni i planarni PCB induciraju staničnu smrt (apoptozu) npr. u stanicama karcinoma dojke i stanicama bubrega aktivacijom kaspaza (Hashmi i sur., 2017). Tako je i u ovom istraživanju dokazano da PCB 77 (**Slike 82, 86, 100** i **104**) i PCB 153 (**Slike 84, 88, 102** i **106**) uzrokuju smrt CHO-K1 stanica primarno putem apoptoze, a jači učinak uočen je za PCB 77.

RSV i RF nisu pokazali zaštitni učinak pri tretmanu stanica PCB-em 77, čak štoviše primijećen je sinergistički stimulatorni učinak (RSV i PCB 77 te RF i PCB 77) na indukciju stanične smrti primarno apoptozom (**Slike 82** i **100**). Niti drugim ispitanim polifenolom – CRC-om nije pokazan zaštitni učinak na odumiranje stanica inducirano planarnim kongenerom (PCB 77). Proapoptotska aktivnost izražena je pri 20 μM CRC-u u stanica tretiranih 75 μM PCB-em 77 (**Slika 86**). Između svih ispitanih spojeva jedino je CF pokazao antiapoptotski učinak na indukciju stanične smrti PCB-em 77 (**Slika 104**). Prilikom tretmana CHO-K1 stanica *ortho*-supstituiranim PCB kongenerom (PCB 153), zaštitni učinak pokazali su i RSV i RF (**Slike 84** i **102**), pri čemu je RF u svim ispitanim koncentracijama (2,5 – 100 μM) poboljšao staničnu vijabilnost te smanjio udio stanica u apoptozi i nekrozi (**Slika 102**). Također, uočen je zaštitni učinak CRC-a i CF-a (**Slike 88** i **106**) na toksičnost PCB-a 153, pri čemu se kao učinkovitiji pokazao CF.

Istraživanja provedena primjenom alternativnih (*in vitro*) testova toksičnosti na odabranoj staničnoj liniji CHO-K1, a u svrhu utvrđivanja mogućih zaštitnih učinaka biološki aktivnih tvari na citotoksičnost induciranu PCB-ima, pokazala su da se ovim metodama brzo i točno može dobiti uvid u intracelularne mehanizme djelovanja ispitanih spojeva. Primijenjene metode rezultirale su podacima o biološkoj aktivnosti polifenolnih spojeva resveratrola i kurkumina te njihovih i bioorganometalnih analoga, njihovom učinku na vijabilnost stanica, oksidacijski stres i staničnu

smrt. Iz dobivenih podataka kao spoj s najvećom zaštitnom aktivnošću na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima može se izdvojiti ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF). Ovaj bioorganometalni spoj pokazao je veći zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu PCB-em 153 (jednim od tri dominantna PCB kongenera u ljudskom masnom tkivu i kongenera s najvećom koncentracijom u majčinom mlijeku) u odnosu na citotoksičnost induciranu PCB-em 77. Iako je područje bioorganometalne kemije brzorastuće, učinci brojnih novosintetiziranih spojeva na staničnoj razini su nedovoljno istraženi. Ovim istraživanjem stekao se uvid u potencijal bioorganometalnih ferocenskih analoga u svrhu zaštite stanica od toksičnih učinaka okolišnih zagađivača, što je bitno za određivanje smjera budućih istraživanja u ovome području.

6. ZAKLJUČCI

1. Kolorimetrijske *in vitro* metode *NR*, *KB* i *TB* te enzimsko-kolorimetrijska metoda *MTT* prikladne su za kvantitativno određivanje učinka odabranih polifenola RSV-a i CRC-a te njihovih ferocenskih analoga RF-a i CF-a na vijabilnost i proliferaciju stanične linije ovarija kineskog hrčka (CHO-K1).
2. RSV (2,5 – 100 μM) i RF (2,5 – 100 μM) pokazali su različitu biološku aktivnost na vijabilnost CHO-K1 stanica utvrđeno sa sve četiri primijenjene metode u vremenskom intervalu inkubacije od 48 sati – RSV je pri dozama > 20 μM djelovao inhibitorno na rast stanica, dok RF pri istim dozama nije ispoljio antiproliferacijski učinak, već je u pojedinim koncentracijama djelovao stimulatorno.
3. CRC (1 – 100 μM) i CF (1 – 100 μM) pokazali su o dozi ovisan inhibitoran učinak na vijabilnost CHO-K1 stanica utvrđeno sa sve četiri primijenjene metode u vremenskom intervalu inkubacije od 48 sati. Izraženiji učinak uočen je za CRC.
4. Usporedbom IC_{50} vrijednosti određenih za polifenole i njihove analoge nakon 48 sati inkubacije CHO-K1 stanica, kao najtoksičniji spoj istaknuo se CRC, dok je za RF uočeno da pri ispitanim dozama nema citotoksično djelovanje. IC vrijednosti za RSV i CRC niže su u odnosu na one dobivene za njihove analoge RF i CF što ukazuje na značajno izmijenjenu biološku aktivnost uvođenjem ferocena u strukturu.
5. Citotoksičnost RSV-a na Hepa1-6 staničnoj liniji izraženija je u odnosu na CHO-K1, dok je CRC u obje stanične linije pokazao podjednak učinak (temeljem IC_{50} vrijednosti nakon 72 sata inkubacije). Ferocenski analozi polifenola ispoljili su znatno niži inhibitorni učinak na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica u odnosu na RSV i CRC, što je u skladu i s istraživanjima provedenima na CHO-K1 staničnoj liniji. RF u odnosu na CF pokazao je manje izražen inhibitorni učinak na vijabilnost i proliferaciju Hepa1-6 stanica.
6. Polifenoli i njihovi ferocenski analozi pokazali su antioksidacijski učinak na CHO-K1 stanicama, pri čemu su RSV i RF, u odnosu na CRC i CF bili u tom učinkovitiji.
7. Najizraženiji proapoptotski učinak na CHO-K1 stanicama određen je za CRC (u dozama ≥ 50 μM), za razliku od ferocenskih analoga polifenola koji su pokazali značajno manji učinak na indukciju apoptoze.

8. Poliklorirani bifenili (PCB 77 i PCB 153) pokazali su antiproliferativni, proapoptotski i prooksidacijski učinak, pri čemu se PCB 77 pokazao toksičnijim.
9. RSV u koncentraciji 2,5 μM pokazao je blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 153 (utvrđeno metodama *NR*, *KB*, *MTT* i *TB*), a kod *NR* i *TB* metoda taj učinak je i statistički značajan. Pri višim koncentracijama RSV-a (10 i 20 μM) dolazi do sinergistički inhibitornog učinka na proliferaciju stanica tretiranih PCB-em 153. Pri tretmanu stanica PCB-em 77, RSV nije pokazao zaštitni učinak.
10. CRC (10 i 20 μM) nije pokazao zaštitni učinak na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih bilo planarnim bilo neplanarnim PCB-em. Niže koncentracije CRC-a (1 – 5 μM) pokazale su blagi zaštitni učinak na stanice tretirane PCB-em 77 ili PCB-em 153 što je određeno metodama *MTT* i *TB*.
11. Izražen zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu *ortho*-supstituiranim kongenerom, pokazao je RF u dozama ≥ 35 μM, što je dokazano svim *in vitro* metodama. Vijabilnost stanica predinkubiranih s najvišom dozom RF-a (100 μM), a potom tretiranih 75 μM PCB-em 153 bila je približno ista onoj u kontrolnom uzorku (stanice tretirane DMSO-om), što RF izdvaja kao potencijalnu bioaktivnu tvar zaštitnog djelovanja. Zaštitni učinak RF ipak nije uočen pri tretmanu stanica „*dioksinu sličnim*“ kongenerom (PCB 77).
12. Predinkubacija stanica s CF-om (1 – 20 μM) nije utjecala na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica tretiranih PCB-em 77 ili PCB-em 153, osim statistički značajnog inhibitornog učinka CF-a pri koncentracijama ≥ 5 μM na toksičnost induciranu PCB-em 153 uočeno metodom *TB*.
13. Antioksidacijsko djelovanje RSV-a i CRC-a u CHO-K1 stanicama tretiranim PCB-em 77 uočeno je pri nižim koncentracijama polifenola ≤ 2,5 μM, dok je pri višim koncentracijama uočen blagi prooksidacijski učinak. Pri tretmanu stanica PCB-em 153 uočen je antioksidacijski učinak nakon tretmana stanica s RSV-om pri višim koncentacijama.
14. Izraženiji antioksidacijski učinak pri tretmanu CHO-K1 stanica PCB-em 77 pokazao je RF u odnosu na CF. Međutim, RF nije djelovao antioksidacijski prilikom tretmana stanica *ortho*-supstituiranim kongenerom (PCB 153), već je pri višim dozama (5 i 20 μM) uočen statistički značajan prooksidacijski učinak.
15. RSV, CRC i RF nisu pokazali zaštitni učinak pri tretmanu stanica PCB-em 77 već je primijećen sinergistički stimulatorni učinak polifenola i PCB-a 77 na indukciju stanične smrti, primarno

apoptozom. Od ispitanih polifenola i njihovih ferocenskih analoga jedino je CF pokazao antiapoptotski učinak na indukciju stanične smrti PCB-em 77. Također, uočen je zaštitni učinak RSV-a, CRC-a, RF-a i CF-a na toksičnost induciranu PCB-em 153, pri čemu su se kao učinkovitiji pokazali CF i RF (smanjen udio stanica u apoptozi i nekrozi).

16. Iz dobivenih podataka kao spoj s najvećom zaštitnom aktivnošću na citotoksičnost induciranu PCB kongenerima može se izdvojiti RF. Ovaj bioorganometalni spoj pokazao je veći zaštitni učinak na citotoksičnost induciranu PCB-em 153 u odnosu na citotoksičnost induciranu PCB-em 77.

7. LITERATURA

- Abella, V., Pérez, T., Scotece, M., Conde, J., Pirozzi, C., Pino, J., Lago, F., González-Gay, M. Á., Mera, A., Gómez, R., Gualillo, O. (2016) Pollutants make rheumatic disease worse: facts on polychlorinated biphenyls (PCBs) exposure and rheumatic diseases. *Life Sci.* **157**, 140-144. doi: 10.1016/j.lfs.2016.06.010.
- Ahmad, K. A., Clement, M.-V., Per Vaiz, S. (2006) Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 365-373. doi: 10.1196/annals.1299.067.
- Ahmadi, R., Ebrahimzadeh, M. A. (2020) Resveratrol - a comprehensive review of recent advances in anticancer drug design and development. *Eur. J. Med. Chem.* **200**, 112356. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112356.
- Alharbi, O. M. L., Basheer, A. A., Khattab, R. A., Ali, I. (2018) Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *J. Mol. Liq.* **263**, 442-453. doi: 10.1016/j.molliq.2018.05.029.
- Al-Salman, F., Plant, N. (2012) Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263** (1), 7-13. doi: 10.1016/j.taap.2012.05.016.
- Anthony, R. S., McKelvie, N. D., Cunningham, A. J., Craig, J. I. O., Rogers, S. Y., Parker, A. C. (1998) Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* **21**, 441-446.
- Arezeki, A., Chabot, G. G., Quentin, L., Scherman, D., Jaouen, G., Brulé, E. (2011) Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *Med. Chem. Commun.* **2**, 190-195. doi: 10.1039/c0md00231c.
- Arsenescu, V., Arsenescu, R. I., King, V., Swanson, H., Cassis, L. A. (2008) Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* **116**, 761-768. doi: 10.1289/ehp.10554.
- Ashkenazi, A., Salvesen, G. (2014) Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 337-356. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013226.

- Astruc, D. (2007) Metallocenes and sandwich complexes. U: *Organometallic Chemistry and Catalysis*, (Astruc, D., ured.), Springer, Berlin/Heidelberg, str. 251-288. doi: 10.1007/978-3-540-46129-6_13.
- ATCC (2020a) Animal. ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Animal.aspx?geo_country=hr#>. Pristupljeno 6. travnja 2020.
- ATCC (2020b) CHO-K1 (CCL-61). ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, < https://www.atcc.org/products/ccl-61 >. Pristupljeno 26. listopada 2020.
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Rodrigues, R. M. (2017) Assaying cellular viability using the Neutral Red uptake assay. U: *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*, (Gilbert, D. F., Friedrich, O., ured.), Springer, Berlin, str. 19-26. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_2.
- Athar, M., Back, J. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., Kim, A. L. (2009) Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **486**, 95-102. doi: 10.1016/j.abb.2009.01.018.
- ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.pdf>. Pristupljeno 17. lipnja 2019.
- Baker, N. A., English, V., Sunkara, M., Morris, A. J., Pearson, K. J., Cassis, L. A. (2013) Resveratrol protects against polychlorinated biphenyl-mediated impairment of glucose homeostasis in adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* **24** (12), 2168-2174. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.009.
- Banella, C., Catalano, G., Travaglini, S., Divona, M., Masciarelli, S., Guerrera, G., Fazi, F., Lo-Coco, F., Voso, M. T., Noguera, N. I. (2019) PML_RARa interferes with NRF2 transcriptional activity increasing the sensitivity to ascorbate of acute promyelocytic leukemia cells. *Cancers* **12**, 95. doi: 10.3390/cancers12010095.
- Basnet, P., Skalko-Basnet, N. (2011) Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* **16**, 4567-4598. doi: 10.3390/molecules16064567.
- Beyer, A., Biziuk, M. (2009) Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **201**, 137-158. doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6_5.

- Bhatt, V. (2016) Basic organometallic chemistry. U: *Essentials of Coordination Chemistry: A Simplified Approach with 3D Visuals*, (Bhatt, V., ured.), Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ Oxford/ Paris/ San Diego/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str. 173-190. doi: 10.1016/B978-0-12-803895-6.00007-0.
- Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R. A., Huang, X., Hutchins, J. T., Freimark, B., Empig, C., Mercer, J., Schroit, A. J., Schett, G., Hermann, M. (2016) Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* **23**, 962-978. doi: 10.1038/cdd.2016.11.
- Bisht, K., Wagner, K.-H., Bulmer, A. C. (2010) Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology* **278**, 88-100. doi: 10.1016/j.tox.2009.11.008.
- Borenfreud, E., Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119-124.
- Bradford, M. M. (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.
- Braga, S. S., Silva, A. M. S. (2013) A new age for iron: antitumoral ferrocenes. *Organometallics* **32**, 5626-5639. doi: 10.1021/om400446y.
- Buratta, S., Chiaradia, E., Tognoloni, A., Gambelunghe, A. Meschini, C., Palmieri, L., Muzi, G., Urbanelli, L., Emiliani, C., Tancini, B. (2020) Effect of curcumin on protein damage induced by rotenone in dopaminergic PC12 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2761. doi:10.3390/ijms21082761.
- Bursian, S. J., Newsted, J. L., Zwiernik, M. J. (2011) Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. U: *Reproductive and Developmental Toxicology*, (Gupta, R. C., ured.), Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ Oxford/ Paris/ San Diego/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str. 543-567.
- Čakić Semenčić, M., Barišić, L. (2017) Ferrocene bioconjugates. *Croat. Chem. Acta* **90** (4), 537-569. doi:10.5562/cca3246.

- Chen, C., Jiang, X., Zhao, W., Zhang, Z. (2013) Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **59**, 8-17. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.030.
- Chen, L., Mo, H., Zhao, L., Gao, W., Wang, S., Cromie, M. M., Lu, C., Wang, J.-S., Shen, C.-L. (2017) Therapeutic properties of green tea against environmental insults. *J. Nutr. Biochem.* **40**, 1-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.05.005.
- Chen, P. H., Luo, M. L. (1982) Comparative rates of elimination of some individual polychlorinated biphenyls from the blood of PCB-poisoned patients in Taiwan. *Food Chem. Toxicol.* **20**, 417-425.
- Chen, Y., Liu, Y. (2019) Non-coplanar and coplanar polychlorinated biphenyls potentiate genotoxicity of aflatoxin B1 in a human hepatocyte line by enhancing CYP1A2 and CYP3A4 expression. *Environ. Pollut.* **246**, 945-954. doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.041.
- Chen, C. J., Yu, W., Fu, Y. C., Wang, X., Li, J. L., Wang, W. (2009) Resveratrol protectscardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 389-393. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.110.
- Cheynier, V., Halbwirth, H. (2017) Polyphenols: physicochemical and biological properties and perspectives of their use in a zero-waste society. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 6343-6345. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02056.
- Chi, Y., Lin, Y., Zhu, H., Huang, Q., Ye, G., Dong, S. (2018) PCBs-high-fat diet interactions as mediators of gut microbiota dysbiosis and abdominal fat accumulation in female mice. *Environ. Pollut.* **239**, 332-341. doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.001.
- Cianfruglia, L., Minnelli, C., Laudadio, E., Scire, A., Armeni, T. (2019) Side effects of curcumin - epigenetic and antiproliferative implications for normal dermal fibroblast and breast cancer cells. *Antioxidants* **8**, 382-395. doi: 10.3390/antiox8090382.
- Cione, E., La Torre, C., Cannataro, R., Caroleo, M. C., Plastina, P., Gallelli, L. (2020) Quercetin, epigallocatechin gallate, curcumin, and resveratrol - from dietary sources to human microRNA modulation. *Molecules* **25**, 63. doi: 10.3390/molecules25010063.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.-W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., Stokes, W. (2005) Guidance on good cell culture practice – a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *ATLA – Altern. Lab. Anim.* **33**, 261-287.

- Dai, H., Wei Meng, X., Kaufmann, S. H. (2016) BCL2 family, mitochondrial apoptosis, and beyond. *Cancer Transl. Med.* **2**, 7-20. doi: 10.4103/2395-3977.177558.
- Dai, S., Zhao, L., Teng, Y., Wang, X., Ren, W. (2018) Effect of composition and microstructure of humic acid on 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl sorption. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25** (15), 14656-14665. doi: 10.1007/s11356-018-1536-y.
- Danial, N. N., Hockenbery, D. M. (2018) Cell death. U: *Hematology - Basic Principles and Practice*, 7. izd. (Hoffman, R., Benz, E. J., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I., Anastasi, J., Ali Abutalib, S., ured.), Elsevier, Philadelphia, str. 186-196.
- Danis, B., Cattini, C., Teyssié, J.-L., Villeneuve, J.-P., Fowler, S., Warnau, M. (2006) Coplanar and non-coplanar congener-specificity of PCB bioaccumulation and immunotoxicity in sea stars. *Aquat. Toxicol.* **79**, 105-113. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.05.004.
- D'Arcy, M. S. (2019) Cell death - a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582-592. doi: 10.1002/cbin.11137.
- Darlington, G. J., Bernhard, H. P., Miller, R. A., Ruddle, F. H. (1980) Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J. Natl. Cancer I.* **64**, 809-819.
- Dasgupta, A., Nomura, M., Shuck, R., Yustein, J. (2017) Cancer's achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1-23. doi:10.3390/ijms18010023.
- DelRaso, N. J. (1993) *In vitro* methodologies for enhanced toxicity testing. *Tox. Lett.* **68**, 91-99.
- Derakhshan, A., Chen, Z., Van Waes, C. (2016) Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clin. Cancer Res.* (objavljeno *online* 30. prosinca 2016.). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2172.
- Devassy, J. G., Nwachukwu, I. D., Jones, J. H. (2015) Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr. Rev.* **73**, 155-165. doi: 10.1093/nutrit/nuu064.
- Du, Q., Hu, B., An, H.-M., Shen, K.-P., Xu, L., Deng, S., Wei, M.-M. (2013) Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **29**, 1851-1858. doi: 10.3892/or.2013.2310.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., Santini, A. (2019) Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Res.* **33**, 1-23. doi: 10.1002/ptr.6419.

- EFSA (2005) Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food (Question N° EFSA-Q-2003-114). *EFSA J.* **284**, 1-137. Wiley Online Library, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2005.284>. Pristupljeno 17. lipnja 2019.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U., Kimchi, A. (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* **16**, 966-975. doi: 10.1038/cdd.2009.33.
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F. (1990) Toxicity test with mammalian cell cultures. U: *Short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects (SCOPE Series)*, (Bourdeau, P., Somers, E., Mark Richardson, G., Hickman, J. R., ured.), Wiley, New Jersey, str. 75-97.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Endo, F., Monsees, T. K., Akaza, H., Schill, W.-B., Pflieger-Bruss, S. (2003) Effects of single non-*ortho*, mono-*ortho*, and di-*ortho* chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCaP. *Reprod. Toxicol.* **17**, 229-236. doi: 10.1016/s0890-6238(02)00126-0.
- Epstein, J., Sanderson, I. R., MacDonald, T. T. (2010) Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies. *Brit. J. Nutr.* **103,** 1545-1557. doi: 10.1017/S0007114509993667.
- Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Vázquez-Nin, G. H. (2015) Necrosis as programmed cell death. U: *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, (Ntuli, T., ured.), IntechOpen, London, str. 419-434. doi: 10.5772/61483.
- Fadhel, Z., Lu, Z., Robertson, L. W., Glauert, H. P. (2002) Effect of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl on the induction of hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 associated enzyme activities in rats. *Toxicology* **175** (1-3), 15-25. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00086-0.
- Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Mathar, W., Heinrich-Hirsch, B., Chahoud, I. (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of 3, 3', 4, 4' - tetrachlorobiphenyl (PCB 77) in male adult rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **17**, 151-156. doi: 10.1177/096032719801700305.

- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J. i sur. (2015) Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer. Biol.* **35**, S25-S54. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.
- Feoktistova, M., Leverkus, M. (2015) Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* **282**, 19-31. doi:10.1111/febs.13120.
- Figueira, I., Menezes, R., Macedo, D., Costa, I., Nunes dos Santos, C. (2017) Polyphenols beyond barriers: a glimpse into the brain. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 562-594. doi: 10.2174/1570159XI4666161026151545.
- Fouda, M. F. R., Abd-Elzaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007) On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organometal. Chem.* **21**, 613-625. doi: 10.1002/aoc.1202.
- Francioso, A., Mastromarino, P., Masci, A., d'Erme M., Mosca, L. (2014) Chemistry, stability and bioavailability of resveratrol. *Med. Chem.* **10**, 237-245. doi: 10.2174/15734064113096660053.
- Freshney, R. I (2011) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Fritsch, E. B., Pessah, I. N. (2013) Structure-activity relationship of non-coplanar polychlorinated biphenyls toward skeletal muscle ryanodine receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **140-141**, 204-212. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.06.003.
- Gali-Muhtasib, H., Hmadi, R., Kareh, M., Tohme, R., Darwiche, N. (2015) Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis* **20**, 1531-1562. doi: 10.1007/s10495-015-1169-2.
- Gallagher, M. E. (2003) Toxicity testing requirements, methods and proposed alternatives. *Environs.* **26**, 257-273.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P. i sur. (2018) Molecular mechanisms of cell death - recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Gerszon, J., Rodacka, A., Puchała, M. (2014) Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Adv. Cell Biol.* **4**, 97-117. doi: 10.2478/acb-2014-0006.

- Ghosh, S., De, S., Chen, Y., Sutton, D. C., Ayorinde, F. O., Dutta, S. K. (2010) Polychlorinated biphenyls (PCB-153) and (PCB-77) absorption in human liver (HepG2) and kidney (HK2) cells *in vitro*: PCB levels and cell death. *Environ. Int.* **36**, 893-900. doi: 10.1016/j.envint.2010.06.010.
- Giampietri, C., Paone, A., D'Alessio, A. (2014) Cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, 1-2. doi: 10.1155/2014/864062.
- Gomes, H. I., Dias-Ferreira, C., Ribeiro, A. B. (2013) Overview of *in situ* and *ex situ* remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Sci. Total Environ.* **445-446**, 237-260. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.098.
- Gosslau, A. (2017) Measurement of toxicants and toxicity. U: *Food Toxicology*, (Bagchi, D., Swaroop, A., ured.), CRC Press, Boca Raton/ London/ New York, str. 11-34.
- Green, D. R., Llambi, F. (2015) Cell death signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1-25. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
- Grilo, T. F., Cardoso, P. G., Pato, P., Duarte, A. C., Pardal, M. A. (2014) Uptake and depuration of PCB-153 in edible shrimp *Palaemonetes varians* and human health risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **101**, 97-102. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.020.
- Guan, G., Lei, L., Lv, Q., Gong, Y., Yang, L. (2019) Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes. *Hum Exp Toxicol*. **38**, 655-664. doi: 10.1177/0960327119836222.
- Gueguen, N., Desquiret-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessières, E., Ayer, A., Henrion, D., Lenaers, G., Reynier, P., Procaccio, V. (2015) Resveratrol directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLoS ONE* **10**, e0144290. doi:10.1371/journal.pone.0144290.
- Guo, J.-Y., Wang, M.-Z., Wang, M.-S., Sun, T. Wei, F.-H., Yu, X.-T., Wang, C., Xu, Y.-Y., Wang, L. (2020) The undervalued effects of polychlorinated biphenyl exposure on breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **20**, 12-18. doi: 10.1016/j.clbc.2019.07.005.
- Gupta, P., Thompson, B. L., Wahlang, B., Jordan, C. T., Hilt, J. Z., Hennig, B., Dziubla, T. (2018) The environmental pollutant, polychlorinated biphenyls, and cardiovascular disease: a potential target for antioxidant nanotherapeutics. *Drug Deliv. Transl. Res.* **8** (3), 740-759. doi: 10.1007/s13346-017-0429-9.

- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B. C. (2016) Animal cell culture and cryopreservation. U: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, (Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B. C., ured.), Springer, Singapore, str. 59-75. doi: 10.1007/978-981-10-0875-7_3.
- Hanhineva, K. Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2010) Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1365-1402. doi: 10.3390/ijms11041365.
- Hartinger, C. G., Metzler-Nolte, N., Dyson, P. J. (2012) Challenges and opportunities in the development of organometallic anticancer drugs. *Organometallics* **31**, 5677-5686. doi: 10.1021/om300373t.
- Hashmi, M. Z., Zhang, J., Li, B., Su, X., Tariq, M., Ahmad, N., Malik, R. N., Ullah, K., Chen, C., Shen, C. (2017) Effects of structurally different noncoplanar and coplanar PCBs on HELF cell proliferation, cell cycle, and potential molecular mechanisms. *Environ. Toxicol.* **32** (4), 1183-1190. doi: 10.1002/tox.22315.
- Hasima, N., Ozpolat, B. (2014) Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Differ.* **5**, e1509. doi: 10.1038/cddis.2014.467.
- Haverić, A., Goletić, Š., Durgut, S., Hadžić, M., Haverić, S. (2018) Effects of curcumin and luteolin on viability and cell death induction in NFS-60 cell line. *G&A* **2**, 43-50. doi: 10.31383/ga.vol2iss2pp43-50.
- He, Q.-L., Zhang, L., Liu, S.-Z. (2021) Effects of polychlorinated biphenyls on animal reproductive systems and epigenetic modifications. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (objavljeno *online* 10. lipnja 2021.). doi: 10.1007/s00128-021-03285-6.
- Heilmann, J. B., Hillard, E. A., Plamont, M.-A., Pigeon, P., Bolte, M., Jaouen, G., Vessières, A. (2008) Ferrocenyl compounds possessing protected phenol and thiophenol groups: synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological effects against breast cancer. *J. Organomet. Chem.* **693**, 1716-1722. doi: 10.1016/j.jorganchem.2007.12.011.
- Heinze, K., Lang, H. (2013) Ferrocene – beauty and function. *Organometallics* **32**, 5623-5625. doi: 10.1021/om400962w.

- Hens, B., Hens, L. (2018) Persistent threats by persistent pollutants - chemical nature, concerns and future policy regarding PCBs - what are we heading for? *Toxics* **6**, 1-21. doi: 10.3390/toxics6010001.
- Herceg Romanić, S. (2002) Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisutnost u iglicama crnogoričnog drveća. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **53**, 21-30.
- Hermund, D. B. (2018) Antioxidant properties of seaweed-derived substances. U: *Bioactive Seaweeds for Food Applications - Natural Ingredients for Healthy Diets*, (Qin, Y., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 201-221. doi: 10.1016/B978-0-12-813312-5.00010-8.
- Hewlings, S. J., Kalman, D. S. (2017) Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods* **6**, 1-11. doi: 10.3390/foods6100092.
- Hoffman, J. B., Henning, B. (2017) Protective influence of healthful nutrition on mechanisms of environmental pollutant toxicity and disease risks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1398** (1), 99-107. doi: 10.1111/nyas.13365.
- Horwat, M., Tice, M., Kjellerup, B. V. (2015) Biofilms at work: bio-, phyto- and rhizoremediation approaches for soils contaminated with polychlorinated biphenyls. *AIMS Bioeng.* **2** (4), 324-334. doi: 10.3934/bioeng.2015.4.324.
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., Swanson, P. E. (2009) Cell death. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570-1583. doi: 10.1056/NEJMra0901217.
- Hsieh, J.-H., Huang, R., Lin, J.-A., Sedykh, A., Zhao, J., Tice, R. R., Paules, R. S., Xia, M., Auerbach, S. S. (2017) Real-time cell toxicity profiling of Tox21 10K compounds reveals cytotoxicity dependent toxicity pathway linkage. *PLoS ONE* **12**, e0177902. doi: 10.1371/journal.pone.0177902.
- Hussain, R. J., Gyori, J., DeCaprio, A. P., Carpenter, D. O. (2000) *In vivo* and *in vitro* exposure to PCB 153 reduces long-term potentiation. *Environ. Health Perspect.* **108**, 827-831. doi: 10.1289/ehp.00108827.
- Imanis Life Sciences (2020) Hepa1-6. <https://imanislife.com/products/hepa1-6-fluc-neo/>. Pristupljeno 26. listopada 2020.
- Jabłońska-Trypuć, A. (2021) Human cell culture, a pertinent *in vitro* model to evaluate the toxicity of landfill leachate/sewage sludge. A review. *Environments* **8**, 54. doi: 10.3390/environments8060054.

- Jackson, C. M., Esnouf, M. P., Winzor, D. J., Duewer, D. L. (2007) Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accres. Qual. Assur.* **12**, 283-294. doi: 10.1007/s00769-006-0254-1.
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A. K. (2018) Models and methods for *in vitro* toxicity. U: *In vitro Toxicology*, (Dhawan, A., Kwon, S., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 45-65.
- Jaiswal, S. K., Siddiqi, N. J., Sharma, B. (2018) Studies on the ameliorative effect of curcumin on carbofuran induced perturbations in the activity of lactate dehydrogenase in wistar rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1585-1592. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.03.002.
- Jang, D., Lein, P. J. (2010) Polychlorinated biphenyls increase apoptosis in the developing rat brain. *Curr. Neurobiol.* **1** (1), 70-76.
- Jankun, J., Wyganowska-Świątkowska, M., Dettlaff, K., Jelińska, A., Surdacka, A., Wątróbska-Świetlikowska, D., Skrzyoczak-Jankun, E. (2016) Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation (review). *Int. J. Mol. Med.* **37**, 1151-1158. doi: 10.3892/ijmm.2016.2524.
- Jaouen, G., Beck, W., McGlinchey, M. J. (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, (Jaouen, G., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 1-37. doi: 10.1002/3527607692.ch1.
- Jayaprakasha, G. K., Jagan, L., Rao, M., Sakariah, K. K. (2005) Chemistry and biological activities of *C. longa. Trends Food Sci. Techn.* **16**, 533-548. doi: 10.1016/j.tifs.2005.08.006.
- Jedrzejczak-Silicka, M. (2017) History of cell culture. U: *New Insights into Cell Culture Technology*, (Gowder, S. J. T., ured.), IntechOpen, London, str. 1-41. doi: 10.5772/66905.
- Jha, S., Kitsis, R. N. (2011) Myocardial basis for heart failure: role of cell death. U: *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 2. izd. (Mann, D. L., ured.), Saunders, Philadelphia, str. 85-102.
- Kaur, G., Dufour, J. M. (2012) Cell lines - valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**, 1-5. doi: 10.4161/spmg.2.1.19885.
- Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* **68**, 1039-1040.

- Kelly, P. S., Alarcon Miguez, A., Alves, C., Barron, N. (2018) From media to mitochondria - rewiring cellular energy metabolism of Chinese hamster ovary cells for the enhanced production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **22**, 71-80.
- Khan, M. A., Gahlot, S., Majumdar, S. (2012) Oxidative stress induced by curcumin promotes the death of cutaneous T-cell lymphoma (HuT-78) by disrupting the function of several molecular targets. *Mol. Cancer Ther.* (objavljeno *online* 31. svibnja 2012.). doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0141.
- Khezerlou, A., Jafari, S. M. (2020) Nanoencapsulated bioactive components for active food packaging. U: *Handbook of Food Nanotechnology: Applications and Approaches*, (Jafari, S. M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 493-532. doi: 10.1016/C2017-0-04228-3.
- Kinghorn, A. D. (1987) Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. *J. Nat. Prod.* **50** (6), 1009-1024.
- Kmetič, I., Murati, T., Kvakan, K., Ivanjko, M., Šimić, B. (2012) Poliklorirani bifenili – toksičnost i rizici. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **4**, 71-80.
- Kocaadam, B., Şanlier, N. (2015) Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit. Rev. Food Sci.* **57**, 2889-2895. doi: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- Kodavanti, P. R. S. (2014) Polychlorinated biphenyls (PCBs). U: *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2. izd. (Aminoff, M. J., Daroff, R. B., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 917-921. doi: 10.1016/B978-0-12-809324-5.03955-9.
- Kovač, V., Kmetič, I., Murati, T., Miletić, M., Barišić, L. (2016) Facile synthesis and cytotoxic activity of the first ferrocene-resveratrol conjugate. *Croat. Chem. Acta* **89**, 339-343 doi:10.5562/cca2992.
- Kowalski, K. (2018) Recent developments in the chemistry of ferrocenyl secondary natural product conjugates. *Coord. Chem. Rev.* **366**, 91 – 108. doi: 10.1016/j.ccr.2018.04.008.
- Krishna, G., Goel, S., Krishna, K. A. (2014) Alternative animal toxicity testing and biomarkers. U: *Biomarkers in Toxicology*, (Gupta, R. C., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 129-147.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G. (2005)

Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. **12**, 1463-1467. doi: 10.1038/sj.cdd.4401724.

- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H. (2017) Anticancer activities of african medicinal spices and vegetables. U: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, (Kuete, V., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 271-297. doi: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8.
- Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., Bernatonienė, J. (2016) Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina* **52**, 148-155. doi: 10.1016/j.medici.2016.03.003.
- Lagoa, R., Marques-da-Silva, D., Diniz, M., Daglia, M., Bishayee, A. (2020) Molecular mechanisms linking environmental toxicants to cancer development: significance for protective interventions with polyphenols. *Semin. Cancer Biol.* (objavljeno *online* 7. veljače 2020.). doi: 10.1016/j.semcancer.2020.02.002.
- Larik, F. A., Saeed, A., Fattah, T. A., Muqadar, U., Channar, P. A. (2016) Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *Appl. Organometal. Chem.* **31**, e3664. doi: 10.1002/aoc.3664.
- Lee, J. S., Lee, G. M. (2012) Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods* **56**, 375-382. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.11.006.
- Li, P.-Z., Liu, Z.-Q. (2011) Ferrocenyl-substituted curcumin: can it influence antioxidant ability to protect DNA? *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 1821 – 1826. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.041.
- Libro, R., Giacoppo, S., Soundara Rajan, T., Bramanti, P., Mazzon, E. (2016) Natural phytochemicals in the treatment and prevention of dementia: an overview. *Molecules* **21**, 1-38. doi: 10.3390/molecules21040518.
- Likhtenshtein, G. I. (2012) Stilbenes synthesis and applications. U: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 1-24. doi: 10.1002/0471238961.stillkh.a01.
- 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**, 2022-2042. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00078.

- Liu, Z.-Q. (2011) Potential applications of ferrocene as a structural feature in antioxidants. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 345-358.
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoaie, A. C., Trifan, A. (2019) Bioactivity of dietary polyphenols: the role of metabolites. *Crit. Rev. Food. Sci.* **60**, 626-659. doi: 10.1080/10408398.2018.1546669.
- Luck de Araújo, G., Amaral Campos, M. A., Santana Valente, M. A., Teixeira Silva, S. C., Dayrell França, F., Martins Chaves, M., Tagliati, A. (2014) Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz. J. Pharm. Sci.* **50**, 55-62. doi: 10.1590/S1984-82502011000100005.
- Luminex Corporation (2020) Muse® Annexin V & Dead Cell kit. <https://www.luminexcorp.com/muse-annexin-v-dead-cell-kit/#documentation>. Pristupljeno 2. studenoga 2020.
- Mahakunakorn, P., Tohda, M., Murakami, Y., Matsumoto, K., Watanabe, H., Vajaragupta, O. (2003) Cytoprotective and cytotoxic effects of curcumin: dual action on H2O2-induced oxidative cell damage in NG108-15 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 725–728. doi: 10.1248/bpb.26.725.
- Malik, P., Mukherjee, T. K. (2014) Structure-function elucidation of antioxidative and prooxidative activities of the polyphenolic compound curcumin. *Chin. J. Biol.* **2014**, 1-9. doi: 10.1155/2014/396708.
- Manzetti, S., van der Spoel, E. R., van der Spoel, D. (2014) Chemical properties, environmental fate, and degradation of seven classes of pollutants. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 713-737. doi: 10.1021/tx500014w.
- Meeker, J. D., Hauser, R. (2010) Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 122-131. doi: 10.3109/19396360903443658.
- Meng, X., Zhou, J., Zhao, C.-N., Gan, R.-Y., Li, H.-B. (2020) Health benefits and molecular mechanisms of resveratrol: a narrative review. *Foods* **9**, 340. doi: 10.3390/foods9030340.
- Merck KGaA (2019a) PCB No 77. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/35496?lang=en&region=HR>. Pristupljeno 8. veljače 2019.

- Merck KGaA (2019b) PCB No 153. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/pcbno153360883506527111?lang=en&region=HR>. Pristupljeno 8. veljače 2019.
- Metcalfe, C. D., Haffner, G. D. (1995) The ecotoxicology of coplanar polychlorinated biphenyls. *Environ. Rev.* **3**, 171-190.
- Miletić, M., Murati, T., Slavica, A., Kmetič, I. (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **16**, 11-19. doi: 10.31895/hcptbn.16.1-2.2.
- Minatel, I. O., Vanz Borges, C., Ferreira, M. I., Gomez Gomez, A. A., Chen, C.-Y. O., Pereira Lima, G. P. (2017) Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. U: *Phenolic Compounds - Biological Activity* (Soto-Hernández, M., ured.), IntechOpen, London. doi: 10.5772/66368.
- Miodovnik, A. (2018) Prenatal exposure to industrial chemicals and pesticides and effects on neurodevelopment. U. *Encyclopedia of Environmental Health*, 2. izd. (Nriagu, J., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 342-352. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11008-5.
- Mirzaei, H., Naseri, G., Rezaee, R., Mohammadi, M., Banikazemi, Z., Mirzaei, H. R., Salehi, H., Peyvandi, M., Pawelek, J. M., Sahebkar, A. (2016) Curcumin: a new candidate for melanoma therapy? *Int. J. Cancer* **139**, 1683-1695. doi: 10.1002/ijc.30224.
- Moghaddam, N. S. A., Oskouie, M. N., Butler, A. E., Petit, P. X., Barreto, G. E., Sahebkar, A. (2018) Hormetic effects of curcumin: what is the evidence? *J. Cell Physiol.* **2018**, 1-12. doi: 10.1002/jcp.27880.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth*. **65**, 55-63.
- Mostafalou, S. (2015) Persistent organic pollutants and concern over the link with insulin resistance related metabolic diseases. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **238**, 69-89. doi: 10.1007/398_2015_5001.
- Mulgund, A., Doshi, S., Agarwal, A. (2015) The role of oxidative stress in endometriosis. U: *Handbook of Fertility - Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health*, (Watson, R. R. ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 273-281. doi: 10.1016/B978-0-12-800872-0.00025-1.

- Murati, T., Šimić, B., Brozović, A., Kniewald, J., Miletić Gospić, A., Bilandžić, N., Kmetič, I. (2015) PCB 77 action in ovary cells - cytotoxicity, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Toxicol. Mech. Methods*. **25**, 302-311. doi: 10.3109/15376516.2015.1028605.
- Murati, T., Šimić, B., Pleadin, J., Vukmirović, M., Miletić, M., Durgo, K., Kniewald, J., Kmetič, I. (2017) Reduced cytotoxicity in PCB-exposed Chinese Hamster Ovary (CHO) cells pretreated with vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* **99**, 17-23. doi: 10.1016/j.fct.2016.11.014.
- Navarro, M., Castro, W., Biot, C. (2012) Bioorganometallic compounds with antimalarial targets – inhibiting hemozoin formation. *Organometallics* **31**, 5715-5727. doi: 10.1021/om300296n.
- Negroni, A., Cucchiara, S., Stronati, L. (2015) Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediat. Inflamm.* **2015**, 1-10. doi: 10.1155/2015/250762.
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**, 1-9. doi: 10.1093/database/bap024.
- Ngo, T., Kim, K., Bian, Y., An, G.-J., Bae, O.-N., Lim, K.-M., Chung, J.-H. (2019) Cyclocurcumin from *Curcuma longa* selectively inhibits shear stress-induced platelet aggregation. *J. Funct. Foods* **61**, 103462. doi: 10.1016/j.jff.2019.103462.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
- NRC (2007) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. NRC - National Research Council, Washington, D. C. doi: 10.17226/11970.
- Obrenovich, M. E., Nair, N. G., Beyaz, A., Aliev, G., Reddy, V. P. (2010) The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuv. Res.* **13**, 1-13. doi: 10.1089/rej.2010.1043.
- Oh, H., Yoon, G., Shin, J.-C., Park, S.-M., Cho, S.-S., Cho, J. H., Lee, M.-H., Liu, K., Cho, Y. S., Chae, J.-I., Shim, J.-H. (2016) Licochalcone B induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma through the extrinsic- and intrinsic-signaling pathways. *Int. J. Oncol.* **48**, 1749-1757. doi: 10.3892/ijo.2016.3365.
- Ozcan, A., Ogun, M. (2015) Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. U: *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* [online] (Thatha Gowder, S. J., ured.),

IntechOpen, London, str. 37-58, <https://www.intechopen.com/books/basic-principles-and-clinical-significance-of-oxidative-stress/biochemistry-of-reactive-oxygen-and-nitrogen-species> . Pristupljeno 13. srpnja 2020.

- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2011) Anti-oxidative action of resveratrol: implications for human health. *Arab. J. Chem.* **4**, 293-298. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.06.049.
- Parasuraman, S. (2011) Toxicological screening. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2**, 74-79. doi: 10.4103/0976-500X.81895.
- Passatore, L., Rosetti, S., Juwarkar, A. A., Massacci, A. (2014) Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives. *J. Hazard. Mater.* **278**, 189-202. doi: 10.1016/j.jhazmat. 2014.05.051.
- Pathiraja, G. (2018) Bioremediation of commercial polychlorinated biphenyl mixture *Aroclor* 1260 by naturally occurring microorganisms. Doctoral thesis. Science and Engineering Faculty, Queensland University of Technology, Australia.
- Patravale, V. B., Dandekar, P., Jain, R. (2012) Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. U: *Nanoparticulate Drug Delivery. Perspectives on the Transition from Laboratory to Market*, (Patravale, V. B., Dandekar, P., Jain, R., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 123-155.
- Pedotti, S., Patti, A., Dedola, S., Barberis, A., Fabbri, D., Dettori, M. A., Serra, P. A., Delogu, G. (2016) Synthesis of new ferrocenyl dehydrozingerone derivatives and their effects on viability of PC12 cells. *Polyhedron* **117**, 80-89. doi: 10.1016/j.poly.2016.05.039.
- Perkins, J. T., Petriello, M. C., Newsome, B. J., Henning, B. (2016) Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 2160-2172. doi: 10.1007/s11356-015-4479-6.
- Petriello, M. C., Newsome, B. J., Dziubla, T. D., Hilt, J. Z., Bhattacharyya, D., Hennig, B. (2014) Modulation of persistent organic pollutant toxicity through nutritional intervention: emerging opportunities in biomedicine and environmental remediation. *Sci. Total. Environ.* **491-492**, 11-16. 10.1016/j.scitotenv.2014.01.109.
- 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. doi: 10.1186/s12575-017-0056-3.

<https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12575-017-0056-3>. Pristupljeno 29. listopada 2020.

- Piccolella, S., Pacifico, S. (2015) Plant-derived polyphenols: a chemopreventive and chemoprotectant worth-exploring resource in toxicology. U: *Advances in Molecular Toxicology*, (Fishbein, J. C., Heilman, J. M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 161-214. doi: 10.1016/B978-0-12-802229-0.00005-0.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1-13. doi: 10.1155/2017/8416763.
- Prasad, S., DuBourdieu, D., Srivastava, A., Kumar, P., Lall, R. (2021) Metal–curcumin complexes in therapeutics - an approach to enhance pharmacological effects of curcumin. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7094. doi: 10.3390/ijms22137094.
- Priyadarsini, K. I. (2014) The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules* **19**, 20091-20112. doi: 10.3390/molecules191220091.
- Ptak, A., Ludewig, G., Rak, A., Nadolna, W., Bochenek, M., Gregoraszczuk, E. L. (2010) Induction of cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells by 4-chlorobiphenyl (PCB3) and the effects of its hydroxylated metabolites on cellular apoptosis. *Environ. Int.* **36** (8), 935-941. doi: 10.1016/j.envint.2009.06.012.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W., Doolittle, D. J. (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. In Vitro.* **16**, 599-607. doi: 10.1016/s0887-2333(02)00050-4.
- Quinete, N., Esser, A., Kraus, T., Schettgen, T. (2017) PCB 28 metabolites elimination kinetics in human plasma on a real case scenario: study of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) metabolites of PCB 28 in a highly exposed German Cohort. *Toxicol. Lett.* **276**, 100-107. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.025.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M. V. M., Costa, D., Monteiro, M. S. (2019) Effects of PCB-77 in adult zebrafish after exposure during early life stages. *J. Environ. Sci. Health.* **54** (5), 478-483. doi: 10.1080/10934529.2019.1568793.
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Kumar Sah, D., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B. S., Narayan Bhatt, A. (2018) Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits

the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci. Rep.* **8**: 1531. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.

- Rainey, N. E., Moustapha, A., Petit, P. X. (2019) Curcumin, a multifaceted hormetic agent, mediates an intricate crosstalk between mitochondrial turnover, autophagy, and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 3656419. doi: 10.1155/2020/3656419.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability-cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–1131. doi:10.1038/nprot.2008.75.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2013) Cell viability assays. U: *Assay Guidance Manual* [online] (Markossian, S., Sittampalam, G. S., ured.), NIH - National Institutes of Health, Rockville, Maryland, str. 1-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Pristupljeno 2. studenoga 2020.
- Rodrigues, J. L., Prather, K. L. J., Kluskens, L. D., Rodrigues, L. R. (2015) Heterologous production of curcuminoids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 39-60. doi: 10.1128/MMBR.00031-14.
- Safe, S., Hutzinger, O. (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. *Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 319-395.
- Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Valere Tsouh Fokou, P., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2018) Resveratrol: a double-edged sword in health benefits. *Biomedicines* **6**, 1-20. doi: 10.3390/biomedicines6030091.
- Salvioli, S., Sikora, E., Cooper, E. L., Franceschi, C. (2007) Curcumin in cell death processes - a challenge for cam of age-related pathologies. *eCAM* **4**, 181-190. doi: 10.1093/ecam/nem043.
- Sánchez-Martín, F. J., Fernández-Salguero, P. M., Merino, J. M. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J. Neurochem.* **118**, 153-162. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07291.x.
- Scapagnini, G., Colombrita, C., Amadio, M., D'Agata, V., Arcelli, E., Sapienza, M., Quattrone, A., Calabrese, V. (2006) Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 395-403. doi: 10.1089/ars.2006.8.395.

- Schatzschneider, U., Metzler-Nolte, N. (2006) New principles in medicinal organometallic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **45**, 1504-1507. doi: 10.1002/anie.200504604.
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunakaran, J. (2012) Polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress on rat hippocampus: a neuroprotective role of quercetin. *Sci. World J.* **2012**, 1-10. doi: 10.1100/2012/980314.
- Shaaban, S. (2011) Synthesis and biological activity of multifunctional sensor/effector catalysts. Doctoral thesis. Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaftender, Saarland University, Germany.
- Shain, W., Bush, B., Seegal, R. (1991) Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls: structure-activity relationship of individual congeners. *Toxicol. AppI. Pharmacol.* **111**, 33-42. doi: 0.1016/0041-008x(91)90131-w.
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., Pintus, G. (2020) Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-26. doi: 10.3390/ijms21062084.
- Sharif, M. K., Zahid, A., Shah, F. (2018) Role of food product development in increased food consumption and value addition. U: *Food Processing for Increased Quality and Consumption. Handbook of Food Bioengineering*, (Grumezescu, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 505-537. doi: 10.1016/B978-0-12-811447-6.00015-1.
- Sharma, J. K., Gautam, R. K., Nanekar, S. V., Weber, R., Singh, B. K., Singh, S. K., Juwarkar, A. A. (2018) Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyls contaminated soils. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **25** (17), 16355-16375. doi: 10.1007/s11356-017-8995-4.
- Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B. (2018) Development of in vitro toxicology - a historic story. U: *In vitro Toxicology*, (Dhawan, A., Kwon, S., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 1-19.
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., Al-Hiary, M. (2019) Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J. AOAC Int.* **102**, 1397-1400. doi: 10.5740/jaoacint.19-0133.
- Solenski, S., Larramendy, M. L. (2021) Cytotoxicity. U: *Cytotoxicity - New Insights into Toxic Assessment*, (Solenski, S., ured.), IntechOpen, London. doi: 10.5772/intechopen.99299.

- Song, W., Ren, Y.-J., Liu, L.-L., Zhao, Y.-J., Li, Q.-F., Yang, H.-B. (2021) Curcumin induced the cell death of immortalized human keratinocytes (HaCaT) through caspase-independent and caspase-dependent pathways. *Food Funct.* **12**, 8669-8680. doi: 10.1039/d1fo01560e.
- Sood, A., Mathew, R., Trachtman, H. (2001) Cytoprotective effect of curcumin in human proximal tubule epithelial cells exposed to shiga toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 36-41. doi: 10.1006/bbrc.2001.4749.
- Souto, E. B., Sampaio, A. C., Campos, J. R., Martins-Gomes, C., Aires, A., Silva, A. M. (2019) Polyphenols for skin cancer: chemical properties, structure-related mechanisms of action and new delivery systems. U: *Bioactive Natural Products*, (Rahman, A., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 21-42. doi: 10.1016/B978-0-12-817901-7.00002-2.
- Stemcell Technologies (2020) 7-AAD (7-Aminoactinomycin D). <https://www.stemcell.com/7-aad-7-aminoactinomycin-d.html>. Pristupljeno 4. studenog 2020.
- Stohs, S. J. (2014) Polychlorinated Biphenyls (PCBs). U: *Encyclopedia of Toxicology*, 3. izd. (Wexler, P., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 1035-1037. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00347-X.
- Strathmann, J., Schwarz, M., Tharappel, J. C., Glauert, H. P., Spear, B. T., Robertson, L. W., Appel, K. E., Buchmann, A. (2006) PCB 153, a non-dioxin–like tumor promoter, selects for β-catenin (*Catnb*)-mutated mouse liver tumors. *Toxicol. Sci.* **93** (1), 34-40. doi: 10.1093/toxsci/kfl041.
- Strimpakos, A. S., Sharma, R. A. (2008) Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 511-545. doi: 10.1089/ars.2007.1769.
- Strober, W. (2019) Trypan Blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, A3.B.1-A3.B.3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.
- Tait, S. W. G., Ichim, G., Green, D. R. (2014) Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* **127**, 2135-44. doi: 10.1242/jcs.093575.
- Tan, Y., Chen, C.-H., Lawrence, D., Carpenter, D. O. (2004) *Ortho*-substituted but not coplanar PCBs rapidly kill cerebellar granule cells. *Toxicol. Sci.* **80**, 54-59. doi: 10.1093/toxsci/kfh108.

- Tang, D., Kang, R., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Kroemer, G. (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* **29** (5), 347-364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
- Tannenbaum, J., Bennett, B. T. (2015) Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim.* **54**, 120-132.
- Teplova, V. V., Isakova, E. P., Klein, O. I., Dergachova, D. I., Gessler, N. N., Deryabina, Y. I. (2018) Natural polyphenols: biological activity, pharmacological potential, means of metabolic engineering (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **54**, 221-237. doi: 10.1134/S0003683818030146.
- Tian, B., Liu, J. (2019) Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J. Sci. Food Agric*. [online] **100**, 1392-1404. Wiley Online Library, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.10152>. Pristupljeno 2. srpnja 2020.
- Tilley, S. K., Fry, R. C. (2015) Priority environmental contaminants: understanding their sources of exposure, biological mechanisms, and impacts on health. U: *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health. From the Genome to the Epigenome*, (Fry, R. C., ured.), Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ Oxford/ Paris/ San Diego/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str. 117-169. doi: 10.1016/B978-0-12-801564-3.00006-7.
- Tiwari, K. N., Monserrat, J.-P., de Montigny, F., Jaouen, G., Rager, M.-N., Hillard, E. (2011) Synthesis and structural characterization of ferrocenyl-substituted aurones, flavones, and flavonols. *Organometallics* **30**, 5424-5432. doi:10.1021/om200644e.
- Tixeira, R., Caruso, S., Paone, S., Baxter, A. A., Atkin-Smith, G. A., Hulett, M. D., Poon, I. K. H. (2017) Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis* **22** (3), 475-477.
- Totland, C., Nerdal, W., Steinkopf, S. (2016) Effects and location of coplanar and noncoplanar PCB in a lipid bilayer - a solidstate NMR study. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 8290-8295. doi: 10.1021/acs.est.6b01723.
- Twaroski, T. P., O'Brien, M. L., Larmonier, N., Glauert, H. P., Robertson, L. W. (2001) Polychlorinated biphenyl-induced effects on metabolic enzymes, AP-1 binding, vitamin E, and oxidative stress in the rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **171**, 85-93. doi: 10.1006/taap.2000.9114.

- Upadhyay, S., Dixit, M. (2015) Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 504253. doi: 10.1155/2015/504253.
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., Sariboyaci, A. E. (2017) Cell and tissue culture: the base of biotechnology. U: *Omics Technologies and Bio-Engineering – Towards Improving Quality of Life*, (Barh, D., Azevedo, V., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 391-429.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Van Aken, B., Correa, P. A., Schnoor, J. L. (2010) Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises. *Environ. Sci. Technol.* **44** (8), 2767-2776. doi: 10.1021/es902514d.
- van Staveren, D. R., Metzler-Nolte, N. (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev.* **104**, 5931-5985. doi: 10.1021/cr0101510.
- Vasantha Rupasinghe, H. P., Nair, S. V. G., Robinson, R. A. (2014) Chemopreventive properties of fruit phenolic compounds and their possible mode of actions. U: *Studies in Natural Products Chemistry*, (Rahman, A., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 229-266. doi: 10.1016/B9780-444-63281-4.00008-2.
- Vaux, D. L., Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.
- Vergani, L., Mapelli, F., Zanardini, E., Terzaghi, E., Di Guardo, A., Morosini, C., Raspa, G., Borin, S. (2017) Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: an outlook on plant-microbe beneficial interactions. *Sci. Total Environ.* **575**, 1395-1406. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.218.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (2015) General introduction to cells, cell lines and cell culture. U: *The Impact of Food Bioactives on Health - in vitro and ex vivo models*, (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.), Springer Publishing, New York, str. 83-93.
- Wang, Y., Dansette, P. M., Pigeon, P., Top, S., McGlinchey, M J., Mansuy, D., Jaouen, G. (2017) A new generation of ferrociphenols leads to a great diversity of reactive metabolites,

and exhibits remarkable antiproliferative properties. *Chem. Sci.* **9**, 70-78. doi: 10.1039/c7sc04213b.

- Warner, J., Osuch, J. R., Karmaus, W., Landgraf, J. R., Taffe, B., O'Keefe, M., Mikucki, D., Haan, P. (2012) Common classification schemes for PCB congeners and the gene expression of *CYP17*, *CYP19*, *ESR1* and *ESR2*. *Sci. Total Environ.* **414**, 81-89. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.044.
- Werner, H. (2012) At least 60 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of the sandwich complexes. *Angew. Hem. Int. Ed.* **51**, 6052-6058. doi: 10.1002/anie.201201598.
- WHO (2000) Polychlorinated biphenyls (PCBs). U: *Air Quality guidelines for Europe*, 2. izd. [online] (Theakston, F., ured.), WHO - World Health Organization, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, str. 97-102, <https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf> . Pristupljeno 17. lipnja 2019.
- WHO (2003) Polychlorinated biphenyls: human health aspects. U: *Concise International Chemical Assessment Document 55*. WHO - World Health Organization, Geneva, <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad55.htm>. Pristupljeno 4. prosinca 2020.
- WHO/IARC (2015) Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. U: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. WHO – World Health Organization; IARC – International Agency for Research on Cancer, Ženeva, str. 423.
- Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M. C., Woodward, R. B. (1952) The structure of iron-*bis*-cyclopentadienyl. *Nature* **74**, 2125-2126.
- Worth, A. P. (2019) Types of toxicity and applications of toxicity testing. U: *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, (Balls, M., Combes, R., Worth, A., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 7-10.
- Xiao, J., Högger, P. (2015) Stability of dietary polyphenols under the cell culture conditions: avoiding erroneous conclusions. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 1547-1557. doi: 10.1021/jf505514d.
- Yilmaz, B., Sandal, S., Chen, C.-H., Carpenter, D. O. (2006) Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, $[Ca^{2+}]_i$ levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. *Toxicology* **217**, 184-193. doi: 10.1016/j.tox.2005.09.008.
- Yoshikawa, T., Naito, Y. (2002) What is oxidative stress? *JMAJ* **45** (7), 271-276.

- Zacharia, J. T. (2019) Degradation pathways of persistent organic pollutants (POPs) in the environment. U: *Persistent Organic Pollutants*, (Kudom Donyinah, S., ured.), IntechOpen, London, str. 17-29. doi: 10.5772/intechopen.79645.
- Zeka, K., Arro, R. R. J., Hasa, D., Beresford, K. J. M., Ruparelia, K. C. (2018) New resveratrol analogues for potential use in diabetes and cancer. *Biomedical* **6**, 1-6. doi: 10.26717/BJSTR.2018.06.001339.
- Zhu, Y., Kalen, A. L., Li, L., Lehmler, H.-J., Robertson, L. W., Goswami, P. C., Spitz, D. R., Aykin-Burns, N. (2009) Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1762-1771. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.024.
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Brnčić, M., Rimac-Brnčić, S. (2018) New trends in food technology for green recovery of bioactive compunds from plant materials. U: *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, (Grumezescu, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge, str. 1-36. doi: 10.1016/B978-0-12-811448-3.00001-2.
- Žlender, V. (2003) Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. **54**, 267-274.
- Zurlo, J., Rudacille, D., Goldberg, A. M. (1994) *Animals and Alternatives in Testing: History, Science, and Ethics*, Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York.
- Żwierełło, W., Maruszewska, A., Skórka-Majewicz, M., Goschorska, M., Baranowska-Bosiacka, I., Dec, K., Styburski, D., Nowakowska, A., Gutowska, I. (2020) The influence of polyphenols on metabolic disorders caused by compounds released from plastics – review. *Chemosphere* **240**, 124901. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124901.

ŽIVOTOPIS

Marina Miletić rođena je 19. ožujka 1989. godine u Zagrebu, Hrvatska. Diplomu diplomirane magistre nutricionizma stekla je 2012. godine obranivši diplomski rad izrađen u Laboratoriju za toksikologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimira Šimića naslova „*Učinci polikloriranih bifenila i vitamina E na CHO (Chinese Hamster Ovary)-K1 staničnu liniju*“. Na temelju ocjena ostvarenih tijekom studija, 2013. godine dodijeljena joj je potpora Biotehničke zaklade. Diplomu diplomirane inženjerke prehrambenog inženjerstva stekla je dvije godine kasnije (2015.) obranivši diplomski rad izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes naslova „*Određivanje sastava ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina*“.

U travnju 2016. godine zaposlila se na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu kao asistent u Laboratoriju za toksikologiju Zavoda za kemiju i biokemiju. Iste godine upisala je poslijediplomski sveučilišni studij *„Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam“*. Trenutno je suradnica na dva projekta Hrvatske zaklade za znanost - „*Bolničke zaštitne tekstilije*“ te „*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*“.

Osim u znanstvenim istraživanjima sudjeluje i u nastavnom procesu predmeta *Osnove toksikologije* preddiplomskog studija te predmetima *Toksikologija, Toksikologija hrane, Toksikološki aspekti pripreme hrane* i *Metodika znanstvenog rada i zaštita intelektualnog vlasništva* na diplomskim studijima te pomaže studentima pri izradi njihovih završnih i diplomskih radova. Od početka zaposlenja aktivna je članica različitih Odbora PBF-a (Odbor za nastavu, Odbor za znanost, Odbor za poslijediplomske studije te Odbor za završne i diplomske radove).

Znanstveni rad Marine Miletić obuhvaća istraživanja u području *in vitro* toksikologije, pogotovo u primjeni alternativnih modela u ispitivanjima citoksičnih učinaka različitih biološki aktivnih spojeva. Autorica je deset znanstvenih radova, od kojih su šest iz kategorije a1 te je aktivno sudjelovala na četiri međunarodna skupa.

Znanstveni radovi iz skupine a1:

- **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**, 326-332. doi: 10.2478/aiht-2021-72-3588.
- Murati, T., **Miletić, M.**, Pleadin, J., Šimić, B., Kmetič, I. (2020) Cell membrane-related toxic responses and disruption of intercellular communication in PCB mechanisms of toxicity: a review. *J. Appl. Toxicol.* **40**, 1592-1601. doi: 10.1002/jat.4019.
- Murati, T., **Miletić, M.**, Kolarić, J., Lovrić, V., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Dragović-Uzelac, V., Kmetič, I. (2019) Toxic activity of Prunus spinosa L. flower extract in hepatocarcinoma cells. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **70**, 303-309. doi: 10.2478/aiht-2019-70-3322.
- Murati, T., **Miletić, M.**, Štefanko, A., Landeka Jurčević, I., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Kmetič, I. (2019) Comparative assessment of Prunus spinose L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *S. Afr. J. Bot.* **123**, 36-42. doi: 10.1016/j.sajb.2019.02.006.
- Murati, T., Šimić, B., Pleadin, J., Vukmirović, M., **Miletić, M.**, Durgo, K., Kniewald, J., Kmetič, I. (2017) Reduced cytotoxicity in PCB-exposed Chinese Hamster Ovary (CHO) cells pretreated with vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* **99**, 17-23. doi: 10.1016/j.fct.2016.11.014.
- Kovač, V., Kmetič, I., Murati, T., **Miletić, M.** (2016) Facile synthesis and cytotoxic activity of the first ferrocene-resveratrol conjugate. *Croat. Chem. Acta* **89**, 339-343. doi: 10.5562/cca2992.

Znanstveni radovi iz skupine a2:

- Kmetič, I., Roller, M., **Miletić, M.**, Murati, T. (2022) Znanstvena istraživanja u 21. stoljeću - etički aspekti uporabe laboratorijskih životinja i alternativni modeli. *Veterinarska stanica*, **53**, 626-636. doi: 10.46419/vs.53.5.4.
- **Miletić, M.**, Murati, T., Slavica, A., Kmetič, I. (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *CJFTBN*, **16 (1-2)**, 11-19.
- **Miletić, M.**, Murati, T., Puntarić, A., Bilandžić, N., Kmetič, I. (2018) Utjecaj pripremnih tehnika i termičkih postupaka procesiranja na sadržaj ostataka pesticida u namirnicama. *CJFTBN,* **13 (3-4)**, 78-85.

Znanstveni rad iz skupine a3:

- Kmetič, I., Murati, T., **Miletić, M.** (2018) Primjena kultura stanica u toksikološkim ispitivanjima. Conference Proceedings Holistic Approach to the Patient (Kregar Velikonja, N., ur.), Faculty of Health Sciences Novo mesto, Slovenia, str. 220-228, ISBN 978-961-94392-0-3. International Scientific Conference, Novo mesto, Slovenia, 16th November 2017, Higher Education Centre Novo mesto.