

Procjena antiproliferativne aktivnosti paladijevih (II) kompleksa in vitro

Jeleč, Antonela

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:346511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonela Jeleč

PROCJENA ANTIPROLIFERATIVNE
AKTIVNOSTI PALADIJEVIH (II)
KOMPLEKSA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonela Jeleč

PROCJENA ANTIPROLIFERATIVNE
AKTIVNOSTI PALADIJEVIH (II)
KOMPLEKSA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu stanica na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima 27 stranica i 11 slika.

ZAHVALA

Veliku i posebnu zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na predloženoj temi i pruženoj prilici za suradnju tijekom izrade završnog rada. Hvala na strpljenju, svim savjetima i razjašnjavanju svih nejasnoća koje su me pratile tijekom pisanja završnoga rada.

Zahvaljujem i višoj tehničarki Ivani Jelavić, mag.med.lab.diagn., na prenesenim vrijednim praktičnim i teorijskim znanjima o radu u Laboratoriju za kulturu stanica te utrošenom vremenu tijekom suradnje.

Zahvaljujem i svim profesorima i suradnicima na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku na prenesenim vještinama i znanjima tijekom preddiplomskog studija.

Veliko hvala mom dečku i prijateljima koji su mi pružili bezuvjetnu podršku te su se zajedno sa mnom iskreno radovali položenim ispitima.

Na kraju, najviše hvala mojim roditeljima i braći koji su mi omogućili školovanje te pružili potporu u trenucima kad je bilo najpotrebnije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Paladij	1
1.1.1. Paladij	1
1.1.2. Paladijevi kompleksi	1
1.2. Kultura stanice i uzgoj	2
1.2.1. Kultura stanice	2
1.2.2. Rast stanica <i>in vitro</i>	3
1.3. Genska osnova raka	4
1.3.1. Nastanak tumora	4
1.3.2. Osobine tumorskih stanica	5
1.3.3. Geni uključeni u nastanak tumora	6
1.4. Metode određivanja citotoksičnosti	6
1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti	6
1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom - MTT	7
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Ustroj studije	10
4.2. Materijali	10
4.2.1. Ispitivani spojevi	10
4.2.2. Kemikalije	13
4.2.3. Stanične linije	13
4.3. Metode	14
4.3.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	14
4.3.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi	14
4.3.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	14
4.4. Statističke metode	15
5. REZULTATI	16
6. RASPRAVA	19
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

ATP	adenozin trifosfat
BJ	stanice normalnih humanih fibroblasta
DMEM	(eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) medij
DMSO	dimetil sulfoksid
FBS	fetalni goveđi serum
M	mol/dm ³
MDCK.1	stanična kultura dobivena od psećih normalnih bubrežnih stanica podtipa I
MEM	(eng. <i>Minimal Essential Medium</i>) medij
MTT	test citotoksičnosti <i>in vitro</i>
NCI-H358	stanice humanog podrijetla bronhoalveolarnog karcinoma
PBS	fosfatom puferirana otopina soli (eng. <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PANC-1	stanična linija humanog podrijetla izolirana iz karcinoma gušterače (duktalni adenokarcinom)
RPMI 1640	(eng. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>) medij
UV	ultraljubičasto zračenje

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Paladij

1.1.1. Paladij

Paladij je kemijski element iz grupe platinskih metala koji je u periodnom sustavu elemenata označen simbolom Pd, atomskog broja 46 i atomske mase 106,42. Otkrio ga je engleski kemičar William Hyde Wollaston 1803. godine, a nazvan je prema tada otkrivenom asteroidu Pallasu.

Paladij je srebrno-bijeli, tvrdi metal, gustoće $11,8 \text{ g/cm}^3$ i tališta 1555°C (1). U skupini platinskih metala koju čine paladij, platina, rodij, rutenij, iridij i osmij, paladij ima najmanju gustoću i najniže talište (2). Kemijski je najsličniji platini. Pri sobnoj temperaturi paladij ne reagira s atmosferskim kisikom i stoga je prilično stabilan. Zagrijavanjem na zraku do temperature oko 800°C , paladij s kisikom oksidira u PdO (paladijev (II) oksid) koji se pri još jačem zagrijavanju raspada. Otapa se u jakim kiselinama kao što je dušična kiselina. Karakteristično svojstvo paladija je da dobro apsorbira vodik i u tom obliku je vrlo reaktivan (2). Zbog toga se rabi kao katalizator pri hidrogeniranju. Osim kao katalizator pri hidrogeniranju, paladij se upotrebljava i kao zamjena za mnogo skuplju platinu. Koristi se za izradu električnih kontakata, kao prevlaka na zrcalima reflektora i srebrnom nakitu. Paladij je svoju ulogu pronašao i u medicini, također kao zamjena za platinu. Na temelju strukturne analogije između kompleksa platine (II) i paladija (II), provedene su razne studije o paladijevim (II) kompleksima kao potencijalnim lijekovima protiv malignih oboljenja (3).

1.1.2. Paladijevi kompleksi

Posljednjih godina intenzivno se istražuju kompleksi metala s ciljem dobivanja citostatika sa što boljim antiproliferativnim djelovanjem i manje izraženim nuspojavama. Jedan od često primijenjivanih kemoterapeutika je *cis*-platina (*cis* - diammin dikloroplatina (II)) koja je svoju učinkovitost pokazala u kliničkoj praksi u liječenju određenih tipova tumora poput tumora testisa, jajnika i pluća (3). Međutim, primjena *cis*-platine ima značajne nuspojave poput nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti i ototoksičnosti koje su ograničile primjenu platinskih spojeva i rezultirale razvojem druge generacije lijekova (karbplatina), s manjim nuspojavama i

1. UVOD

kliničkom primjenom identičnom prvobitnoj generaciji (4). Najnovija varijanta je oxaliplatina koja je 2004. godine u Sjedinjenim Američkim Državama odobrena za liječenje kolorektalnog karcinoma (5). 15 godina kasnije i dalje se intenzivno istražuju novi platinski kompleksi i kompleksi drugih metala s ciljem dobivanja citostatika sa što boljim antitumorskim djelovanjem i farmaceutskom primjenom (3). Stoga se pažnja usmjerava na paladij koji stvara komplekse kao i platina te se može zamijeniti istom. Biološka aktivnost tih kompleksa jako ovisi o prirodi liganda te su mnoga današnja istraživanja usmjerena na metalne komplekse s biološki važnim ligandima u svrhu proširenja spektra djelovanja (6). Istraživanja su do sada pokazala da Pd kompleksi koji sadrže S i N donorske ligande pokazuju učinkovitost u supresiji staničnog rasta HI-60, 3T3, JURKAT, Pam212 i Pam-ras staničnih linija (7,8). Slične rezultate pokazali su i Pd kompleksi sa miješanim ligandima poput aminokiselina i 1,10 – fenantrolina na Molt-4 staničnoj liniji (8). Biološka aktivnost kompleksa ispituje se određivanjem njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti prema različitim normalnim i tumorskim stanicama ljudskog i životinjskog podrijetla.

1.2. Kultura stanice i uzgoj

1.2.1. Kultura stanice

Kultura stanice proces je u kojem se stanice uzgajaju u kontroliranim uvjetima. Povijest kulture stanica seže u 1907. godinu kada je Ross Granville Harrison uspio izolirati i kultivirati živčano vlakno iz žabljeg embrija. Ta se kultura nije mogla dugo održati zbog problema kontaminacije, međutim tijekom tog eksperimenta, došlo je do stvaranja spoznaja koju su dovele do revolucije u staničnoj kulturi. Do velikog napretka dolazi 1912. godine kada je u postupke izolacije i kultivacije stanica uvedena sterilna tehnika rada. Međutim, ni sterilna tehnika rada nije bila dovoljna kako bi se stanice održale u kulturi kroz neko dulje vrijeme. Nedostajali su im nutritivni sastojci, precizno održavanje temperature, vlage i pH. Tijekom sljedećih 50 godina nije bilo značajnog pomaka u kulturi stanica. Harry Eagle je 1959. godine definirao medij za stanice u kulturi koji se sastoji od najmanje 13, za većinu staničnih kultura, esencijalnih aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, soli i seruma sisavaca (9). Koncentracije svih sastojaka hranjive podloge moraju biti točno definirane kako bi osmotski tlak u posudi za kultivaciju bio jednak onom fiziološke otopine. Višak ili smanjena koncentracija samo jedne esencijalne aminokiseline može dovesti i do smrti stanica. Sama hranjiva podloga (medij), bez

1. UVOD

krvnog seruma sisavaca, nije dovoljna za preživljavanje stanica, stoga se dodaje odgovarajući serum, npr. fetalni goveđi serum. On omogućava rast i održavanje stanica u kulturi jer osim hranjivih komponenti sadrži i specifične faktore rasta.

Kako bi se uspostavila stanična kultura, najprije je potrebno izolirati stanice od interesa iz živog tkiva mehaničkim ili enzimskim postupcima, a izolirane stanice uzgajaju se u adekvatnom mediju. Osnovni medij za uzgoj stanica koji se danas koristi naziva se MEM (eng. *Minimum Essential Medium*), a njegova modifikacija DMEM po Dulbeccu za adherentne i RPMI 1640 (eng. *Royal Park Memorial Institute 1640*) za stanice u suspenziji. Optimalna temperatura za uzgoj humanih staničnih linija je 37°C sa 95% atmosferskog zraka i 5% ugljikovog (IV) oksida, a postiže se uzgojem u inkubatoru.

Rad sa staničnim kulturama zahtjeva strogo kontrolirane i sterilne uvjete. Zbog toga je potrebno osigurati rad u kabinetu s laminarnim protokom zraka (10). Strujanje zraka u kabinetu podešeno je tako da se smanji mogućnost kontaminacija. Sterilni uvjeti rada u laboratoriju postižu se svakodnevnim čišćenjem i sterilizacijom. Radne površine i preparati održavaju se čistima uz 70 %-tni etanol. Prije i nakon rada sa staničnim kulturama, radni prostor sterilizira se UV zračenjem. Zaštita pri radu postiže se nošenjem odgovarajuće laboratorijske odjeće.

1.2.2. Rast stanica *in vitro*

Primarna kultura odnosi se na stanice izolirane iz tkiva i stavljene u odgovarajuću sredinu za kultiviranje. Možemo je dobiti mehaničkim postupkom usitnjavanja tkiva ili enzimskom razgradnjom. Svrha takvog postupka je oslobađanje stanica od vezivnog tkiva kako bi se dobile pojedinačne stanice. Broj dioba takvih stanica je ograničen i podudara se s brojem dioba stanica u organizmu. Subkultivacija ili presađivanje (franc. *passaga*) je postupak koji se odnosi na prebacivanje dijela stanica iz originalne kulture u novu posudicu s novim medijem za rast i razvoj. Postupak se ponavlja svakih nekoliko dana uz primjenu komponente koja se koristi za odvajanje stanica od podloge na kojoj rastu u posudi (11). Najčešće se koristi tripsin koji cijepa peptidnu vezu u fibronektinu ekstracelularnog matriksa. Stanice u kulturi rastu u jednom sloju, ako se radi o kulturama izoliranim iz tkiva, a ako se radi primjerice o krvnim stanicama, one rastu u suspenziji. Stanice su metabolički aktivne, dijele se i prolaze kroz tri faze staničnog ciklusa (12). Prva faza je lag faza koja označava razdoblje adaptacije stanica na uvjete u kulturi. Druga faza je log faza u kojoj stanice eksponencijalno rastu sve dok ne dosegnu točku konfluencije odnosno kontaktnu inhibiciju. Treća faza nastaje nakon točke konfluencije

1. UVOD

gdje stanice ulaze u stacionarnu (plato) fazu koja je karakterizirana sporim rastom stanica, zbog nedostatka svježeg medija. U toj su fazi rast i ugibanje stanica gotovo jednaki.

U primarnoj staničnoj kulturi može doći do promjene staničnih svojstava uslijed djelovanja kemijskih reagensa ili virusa. U tom slučaju, stanice umiru ili postaju imortalizirane. Imortalizirane stanične linije poznate su pod nazivom transformirane stanične linije koje karakterizira nestabilni genotip i neograničen broj dioba. Pojam "transformirano" odnosi se na promjenu u svojstvima rasta, što nužno ne znači da su to tumorske stanice koje unosom u eksperimentalnu životinju uzrokuju tumor.

1.3. Genska osnova raka

1.3.1. Nastanak tumora

Tumori ili neoplazme odnose se na svaku nekontroliranu proliferaciju stanica u tijelu. Razlikujemo benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne) tumore (13). Benigni tumori lokalizirani su na području na kojem su nastali i predstavljaju manji rizik za zdravlje u odnosu na maligne tumore koji se mogu proširiti na okolno zdravo tkivo, pa čak i cijelo tijelo preko krvožilnog i limfnog sustava te stvarati metastaze (13, 14). Karcinogeneza je proces nastanka tumora koji se sastoji od više koraka tijekom kojih stanice postupno postaju zloćudne (15). Inicijacija tumora je prvi korak. To je ireverzibilan proces gdje genetičke promjene u stanici uzrokuju nastanak početne monoklonske populacije tumorskih stanica. Nakon toga slijedi progresija tumora koja se odnosi na postepeno nakupljanje dodatnih mutacija zbog čega tumorske stanice postaju još zloćudnije, što doprinosi invazivnosti tumora i dovodi do zadnjeg koraka u procesu nastanka tumora, a to je metastaziranje. Metastaziranje označava širenje tumorskih stanica iz primarnog tumora na udaljene organe (16).

Karcinogeni su čimbenici koji mogu dovesti do nastanka tumora, a tu ubrajamo različite kemijske mutagene, različita zračenja i onkogene viruse. Kemijske tvari izazivaju mutacije tijekom izravne reakcije s molekulom DNA ili neizravno, ometanjem molekula koje sudjeluju u mehanizmu popravka DNA. Policiklički ugljikovodici (benzpiren, dibenzantracen), razne azo-boje, aromatski amini, aflatoksini samo su neki od kemijski karcinogenih spojeva koji uzrokuju 80-90% zloćudnih tumora (17). Osim toga, ionizirajuće zračenje (x-zrake, gama-zrake) i ultraljubičasto zračenje također mogu potaknuti stvaranje tumora. Ionizirajuće zračenje

1. UVOD

uzrokuje nastanak dvostrukih lomova, a ultraljubičasto zračenje nastanak pirimidinskih dimera. Dokazano je da i virusi imaju ulogu u karcinogenezi. Virus se vežu na specifične stanične receptore, prodiru u stanicu, gube svoju ovojniciu i tada se njihov genetski materijal ugrađuje u gen domaćina što inducira promjenu tog gena (17). Onkogeni virusi su virus hepatitisa B i C, Epstein-Barrov virus, ljudski T stanični limfotropni virus. Postoji i druga vrsta karcinogena koji ne oštećuju DNA, već pridonose nastanku raka stimulirajući proliferaciju stanica. To su promotori tumora i oni uzrokuju povećanje broja dioba stanica.

Rizik i predispozicija pojedinca da nakon kontakta s nekim karcinogenim čimbenikom oboli od nekakvog tumora ovisi o naslijeđenom genomu, dobi, spolu, imunološkom sustavu, ranijoj izloženosti utjecaju karcinogena i drugim faktorima ovisnim o pojedincu.

1.3.2. Osobine tumorskih stanica

Tumorske stanice imaju nekoliko važnih karakteristika koje ih razlikuju od normalnih stanica. U tumorskim stanicama poremećeni su mehanizmi koji reguliraju diferencijaciju, proliferaciju i preživljavanje. Krajevi kromosoma, telomere, skraćuju se prilikom svake diobe normalnih stanica te zbog toga normalne stanice imaju ograničen životni vijek, ograničen broj dioba. Kad telomere postignu kritičnu duljinu, pokreću proces starenja kojim se ireverzibilno zaustavlja proliferacija. Za razliku od tih normalnih stanica, tumorske stanice imaju neograničen proliferativni potencijal. Tumorske stanice eksprimiraju enzim telomerazu koja produžuje telomere i na taj se način tumorske stanice mogu beskonačno dijeliti. Zdrave, normalne stanice proliferiraju dok ne dosegnu odgovarajuću gustoću, što predstavlja fenomen inhibicije rasta ovisne o gustoći koja opet ovisi o prisutnosti faktora rasta. Kad je postignuta odgovarajuća gustoća, normalne stanice ulaze u fazu mirovanja (G_0), a tumorske stanice pak nastavljaju proliferaciju. Osim toga, još jedna važna osobina tumorskih stanica je i autokrini stimulacija rasta, gdje tumorske stanice same sebi stvaraju faktore rasta koji potiču daljnju proliferaciju. Tumorske su stanice izgubile sposobnost kontaktne inhibicije. One imaju smanjenu ekspresiju staničnih adhezijskih molekula, stoga su manje ograničene interakcijama s drugim stanicama i sastojcima tkiva što doprinosi njihovoj sposobnosti metastaziranja (17). Još jedna važna karakteristika tumorskih stanica je sposobnost angiogeneze. Tumorske stanice stvaraju vlastitu mrežu krvnih žila kroz koju se opskrbljuju kisikom i hranjivim tvarima što pridonosi njihovom bržem rastu i širenju. Kod tumorskih stanica izostaje programirana stanična

1. UVOD

smrt (apoptoza). Gubitak apoptotičke kontrole omogućava tumorskim stanicama dulji opstanak i daje im više vremena za nakupljanje mutacija kojim se povećava invazivnost tumora (18).

1.3.3. Geni uključeni u nastanak tumora

U nastanku tumora ključnu ulogu imaju dvije skupine gena, a to su onkogeni i tumor-supresorski geni. Protoonkogeni su geni koji kodiraju proteine u signalnim putevima koji kontroliraju proliferaciju stanice. Onkogeni nastaju nakupljanjem mutacija ili nekontroliranom ekspresijom protoonkogenena. S obzirom da protoonkogeni inhibiraju diobu stanica, njihova će mutacija dovesti do nekontrolirane proliferacije i nastanka tumora. Protoonkogeni se u onkogene aktiviraju na tri načina: mutacijom, translokacijom i amplifikacijom. Postoji više od 100 poznatih onkogenena koji u ljudi dovode do maligniteta. Primjerice, ras porodicu onkogenena čine tri gena: H-ras, K-ras i N-ras. Mutacija proteina kodiranih od ras-onkogenena dovodi do nekontroliranog rasta i diobe stanica. Ras-protein mutiran je u oko 25% humanih maligniteta (13). Tumor-supresorski geni koče proliferaciju stanica i kontroliraju stanični ciklus. Kod nastanka tumora, ti se geni gube ili se inaktiviraju čime se uklanjaju negativni regulatori stanične proliferacije. Najznačajniji tumor-supresorski gen je p53 koji je mutiran u više od 60% tumora (19). Ako je mutiran ili deletiran iz genoma, stanica umnaža oštećenu DNA i preživljava, ali je genetički nestabilna.

1.4. Metode određivanja citotoksičnosti

1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti

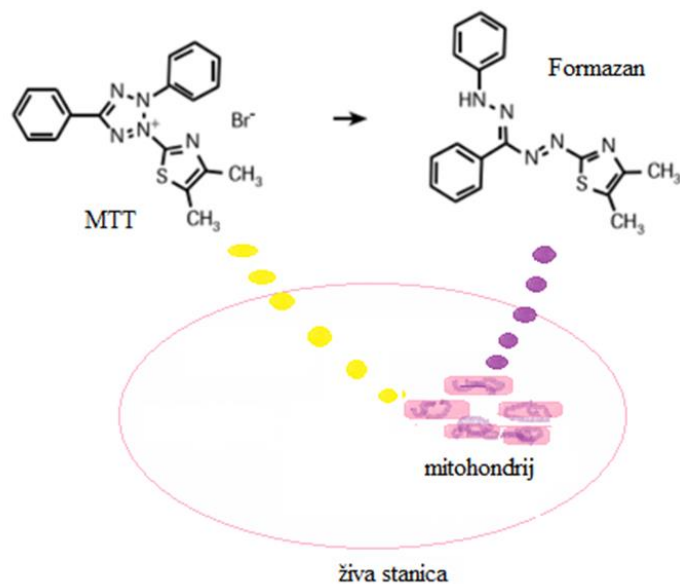
Toksičnost označava štetan učinak koji neka supstanca može imati na organizam. Da bi se utvrdila stanična smrt uzrokovana takvim oštećenjima, potreban je brz, pouzdan i reproducibilan test (20). Najznačajniji testovi koji se koriste za određivanje citotoksičnosti su redukcija tetrazolijumom, redukcija resazurinom, markeri proteaza i detekcija ATP-a (21). Neovisno o tome koja vrsta testa se primjenjuje, potrebno je kvantitativno određivanje broja preživjelih stanica koje su bile tretirane testnom kemikalijom. Svi ovi testovi zahtijevaju inkubaciju reagensa sa živim stanicama kako bi se supstrat pretvorio u obojeni ili fluorescentni

1. UVOD

spoj koji se može otkriti pomoću optičkog čitača. Nakon što stanica umre, ona gubi sposobnost pretvorbe supstrata u produkt (21).

1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom - MTT

MTT je test citotoksičnosti *in vitro* koji služi za kvantitativnu procjenu stanične vijabilnosti. Princip testa zasniva se na mjerenju aktivnosti mitohondrijskog enzima sukcinat dehidrogenaze koja reducira žutu tetrazolijevu sol (MTT) u ljubičaste kristale formazana (Slika 1) (22). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica, a mjeri se spektrofotometrijski na 595nm. MTT test jedan je od najčešće korištenih kolorimetrijskih testova za procjenu citotoksičnosti i vitalnosti stanica (23).



Slika 1. Kemijski princip citotoksičnosti MTT testa. (autorski crtež)

2. HIPOTEZA

2. HIPOTEZA

Paladijevi (II) kompleksi inhibitorno djeluju na rast tumorskih stanica.

3. CILJEVI

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) ispitati utjecaj Pd (II) kompleksa na rast četiriju staničnih linija (NCI-H358, PANC1, BJ, MDCK1) u uvjetima *in vitro*
- 2) odrediti koji Pd (II) kompleks ima najučinkovitije antiproliferativno djelovanje na tumorske stanične linije
- 3) ispitati postoji li razlika u osjetljivosti tumorskih i normalnih staničnih linija na testirane Pd (II) komplekse

4. MATERIJALI I METODE

4. MATERIJALI I METODE

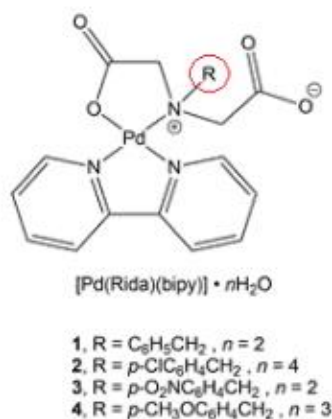
4.1. Ustroj studije

Rad je ustrojen kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek 20. lipnja 2020. pod brojem 2158-61-07-20-95.

4.2. Materijali

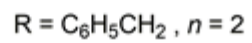
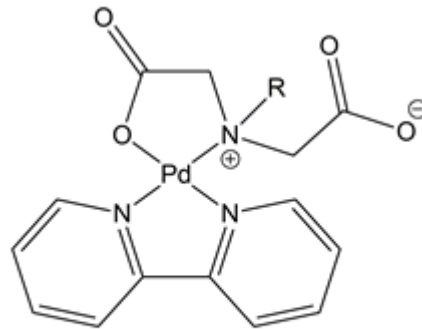
4.2.1. Ispitivani spojevi

Novosintetizirani paladijevi (II) kompleksi (Slika 2) koji su se koristili u istraživanju su: (N-benziliminodiacetato)(2,2'-bipiridin)paladij(II) dihidrat (Slika 3); (2,2'-bipiridin)(N-(p-klorbenzil)iminodiacetato)paladij(II) tetrahidrat (Slika 4); (2,2'-bipiridin)(N-(p-nitrobenzil)iminodiacetato)paladij(II) dihidrat (Slika 5); (2,2'-bipiridin)(N-(p-metoksibenzil)iminodiacetato)paladij(II) trihidrat (Slika 6). Spojevi su sintetizirani na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, Katedra za kemiju i ekologiju, pri Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju. Spojevi su pripremljeni otapanjem u 100% DMSO u koncentraciji 10^{-2} mol/dm³ (M), a konačan niz koncentracija je bio 10^{-4} M, 10^{-5} M i 10^{-6} M.

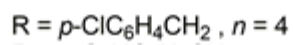
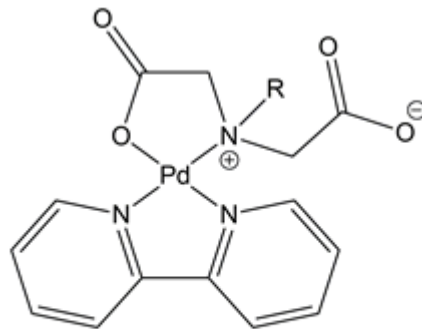


Slika 2. Osnovna struktura spoja s naznačenim radikalima (24)

4. MATERIJALI I METODE

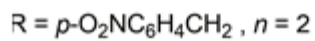
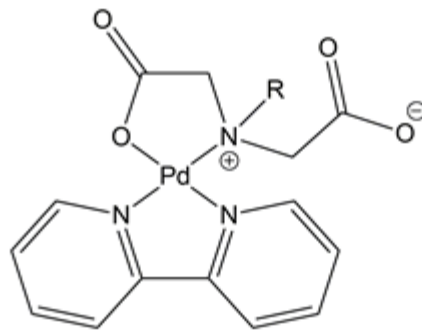


Slika 3. (N-benziliminodiacetato)(2,2'-bipiridin)paladij(II) dihidrat (Pd 1)
(24)

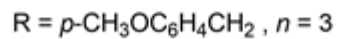
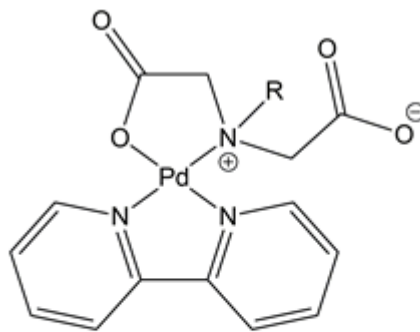


Slika 4. (2,2'-bipiridin)(N-(p-klorbenzil)iminodiacetato)paladij(II)
tetrahidrat (Pd 2) (24)

4. MATERIJALI I METODE



Slika 5. (2,2'-bipiridin)(N-(p-nitrobenzil)iminodiacetato)paladij(II) dihidrat (Pd 3) (24)



Slika 6. (2,2'-bipiridin)(N-(p-metoksibenzil)iminodiacetato)paladij(II) trihidrat (Pd 4) (24)

4. MATERIJALI I METODE

4.2.2. Kemikalije

Za pokus je upotrijebljeno: DMEM (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s visokim udjelom glukoze, 4,5 g/L (SIGMA-ALDRICH, Ujedinjeno Kraljevstvo), L-alanine-L-glutamine (SIGMA ALDRICH), RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute* medij; SIGMA-ALDRICH, Ujedinjeno Kraljevstvo), Na-piruvat, HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina; Fluka), 0,25% tripsin EDTA (SIGMA-ALDRICH, Sjedinjene Američke Države), FBS (fetalni goveđi serum; SIGMA-ALDRICH, Brazil), 10% PBS (fosfatni pufer, smjesa NaCl, KCl, Na₂HPO₄ x 2H₂O, KH₂PO₄), DMSO (dimetilsulfoksid; ACROS ORGANICS), erythrosin B, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid; MERCK, Njemačka).

4.2.3. Stanične linije

Učinak paladijevih (II) kompleksa ispitan je na četirima staničnim linijama, trima humanog podrijetla i jednoj animalnog podrijetla.

Humane stanične linije korištene u pokusu su:

- PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) - stanična linija humanog podrijetla izolirana iz karcinoma gušterače (duktalni adenokarcinom)
- BJ (ATCC® CRL-2522™) - stanice normalnih humanih fibroblasta
- NCI-H358 [H-358, H358] (ATCC® CRL-5807™) - stanice humanog podrijetla bronhoalveolarnog karcinoma (NSCLC - karcinom ne-malih stanica)

Animalna stanična linija korištena u radu je:

- MDCK.1 (ATCC® CRL-2935™) - stanična kultura dobivena od psećih normalnih bubrežnih stanica podtipa I (MDCK I)

4. MATERIJALI I METODE

4.3. Metode

4.3.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Adherentne stanice PANC-1, BJ i MDCK.1 uzgajaju se u plastičnim T-bocama površine 25 cm² u DMEM hranjivom mediju uz dodatak 10% FBS-a, L-glutamina (2mM), i kombinacije antibiotika-antimikotika (100 U/0,1 mg). Adherentna stanična linija NCI-H358 iznimno je kultivirana u bocama za uzgoj adherentnih stanica u RPMI 1640 mediju s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-om. Stanice se inkubiraju u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37 °C / 5 % CO₂ uz visoku vlažnost kako bi se oponašali *in vivo* uvjeti. Konfluentnost stanica svakodnevno se provjerava pod inverznim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Stanične se linije ispiru s 2 ml PBS-a čime se uklanja ostatak medija. Nakon toga dodaje se 2 ml tripsina koji služi za odvajanje stanica jedne od druge, ali i za njihovo odvajanje od površine. Nakon inkubacije u trajanju od 6 minuta, tripsin je inaktiviran dodatkom 5 ml svježeg medija, a stanična suspenzija dobro resuspendirana propuhivanjem kroz pipetu. U boci je ostavljen 1 ml suspenzije, a ostatak je prebačen u sterilne tubice i pohranjen na +4°C.

4.3.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Za brojanje stanica uzima se 20 µL stanične suspenzije i 20 µL boje eritrozina B koja specifično boja mrtve stanice u crveno zbog njihove oštećene membrane. Stanična suspenzija s bojom nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu te se broj stanica očitava u brojaču stanica (Countess II FL, Invitrogen, USA). Broj živih stanica određujemo prema formuli:

$N/4 * 3 = X * 10^4$ stanica/cm³, gdje je

N - broj stanica,

4 - broj polja u komorici i

3 - faktor razrjeđenja.

4.3.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri aktivnost enzima sukcinat dehidrogenaze u živim stanicama. Taj enzim nalazi se u mitohondriju živih stanica i cijepa

4. MATERIJALI I METODE

tetrazolni prsten. Dolazi do pretvorbe žutog MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) u ljubičaste kristale formazana koji se otapaju u DMSO (dimetil sulfoksid) (22). Intenzitet obojenja izmjeren je na valnoj duljini od 595 nm uz pomoć automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA). Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica.

Postupak:

Na 96 jažica mikrotitarske ploče nasađene su adherentne stanične linije (180 μ l) u koncentraciji od 2×10^4 st/ml. Stanične linije inkubirane su na 24 sata te su poslije toga tretirane paladijevim (II) kompleksima (20 μ l) u različitim koncentracijama. Nakon toga slijedi inkubacija u CO₂ inkubatoru u trajanju od 72 sata.

Nakon inkubacije sa stanica se uklanja medij i dodaje se 40 μ l MTT/PBS u omjeru 1:10. Mikrotitarske ploče vraćene su u inkubator, ovaj put na 4 sata. Nakon inkubacije, nastali formazanski kristali otopljeni su dodavanjem 160 μ l DMSO u svaku jažicu nakon čega slijedi trešnja na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia) 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Intenzitet razvijene boje izmjeren je pri valnoj duljini od 595 nm. Na temelju dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (background) određen je postotak preživljenja prema formuli (Slika 7):

$$\% = \frac{(A_{\text{tretman}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}})} \cdot 100$$

Slika 7. Formula za dobivanje postotka živih stanica u kulturi

4.4. Statističke metode

Račun MTT testa provodi se u Microsoft Excelu. On će nam dati uvid u postotak inhibicije rasta stanica nakon djelovanja paladijevih (II) kompleksa. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu Statistica 13.3. Podaci su analizirani primjenom Deskriptivne statistike za određivanje normalnosti razdiobe podataka i neparametrijskim Mann-Whitney U-testom usporedbe dvije nezavisne grupe podataka uz granicu statističke značajnosti $P < 0,05$.

5. REZULTATI

Protutumorski učinak paladijevih (II) spojeva istražen je na četirima adherentnim staničnim linijama (NCI - H358, PANC-1, BJ, MDCK.1). Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka tih kompleksa prikazani su na slikama od 8 do 11. Svi testni spojevi ispitani su na spomenutim staničnim linijama u koncentracijskom nizu 10^{-4} M, 10^{-5} M i 10^{-6} M. Citotoksični učinak procijenjen je primjenom MTT testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija ($\Delta \pm SD$) triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu. Granica statističke značajnosti ($P < 0,05$) označena je (*).

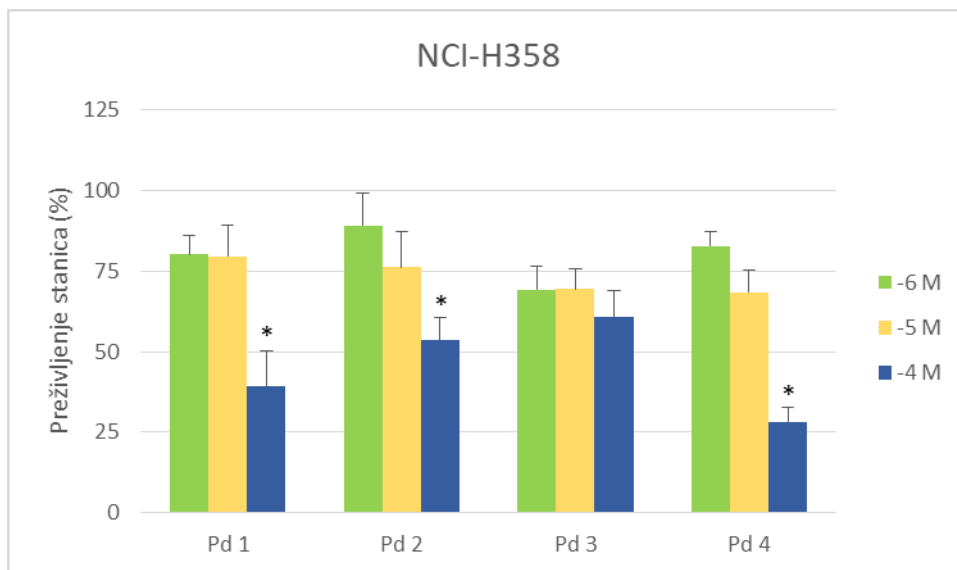
Pri koncentraciji od 10^{-4} M Pd 1 i Pd 2 imaju slično djelovanje na staničnu liniju NCI-H358 (Slika 8). Pd 1 inhibira rast stanica za oko 50-65%, a Pd2 45 - 50%. Najsnažniju aktivnost pokazuje Pd 4 pri koncentraciji od 10^{-4} M inhibirajući stanični rast za 65 - 70%. Isti derivati pri ostalim koncentracijama od 10^{-5} M do 10^{-6} M nemaju značajan učinak. Pd 3 ne pokazuje značajan inhibitorni učinak ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji.

Djelovanje ispitivanih spojeva na PANC-1 staničnu liniju pokazalo je da pri koncentraciji od 10^{-4} M Pd 1 ima 45 - 55% inhibicijski učinak, dok Pd 4 pri istoj koncentraciji pokazuje tek 20 - 30% inhibicijskog učinka (Slika 9). Stanična linija PANC-1 pokazala se kao naotpornija na djelovanje Pd 4 pri koncentracijama od 10^{-5} M i 10^{-6} M.

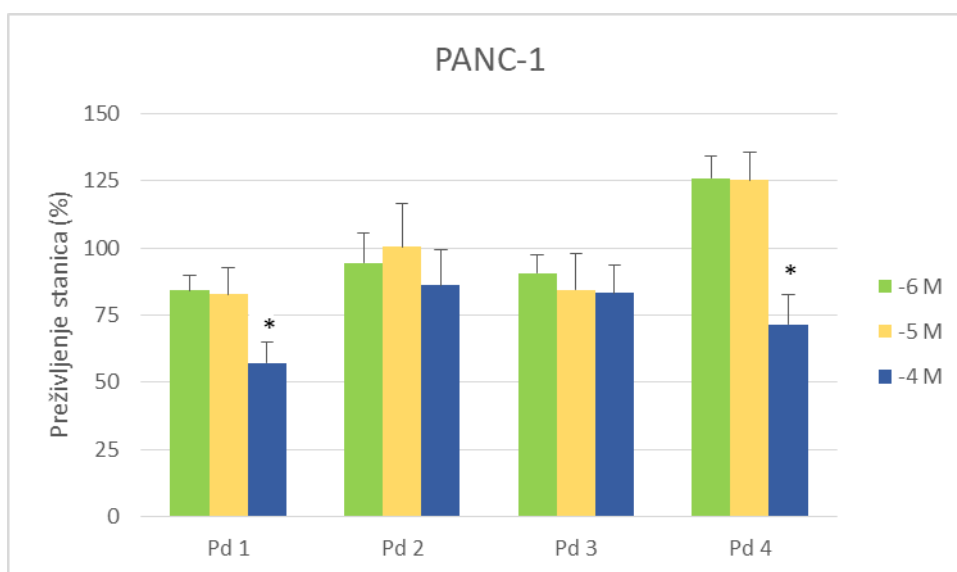
Na BJ staničnoj liniji djelovanje ispitivanih spojeva gotovo je jednako kao i kod PANC-1 stanične linije (Slika 10). Pri koncentraciji od 10^{-4} M, 45 - 50% inhibicijskog učinka daje Pd 1, a Pd 4 iste stanice inhibira za 35 - 45%. Pd 2 i Pd 3 nemaju značajno djelovanje.

Tretiranjem MDCK1 stanične linije svim Pd spojevima, pri koncentraciji od 10^{-4} M, uočen je 75%-tni inhibicijski učinak. U preostalim dvjema koncentracijama izostaje značajan inhibicijski učinak svih testnih spojeva (Slika 11).

5. REZULTATI

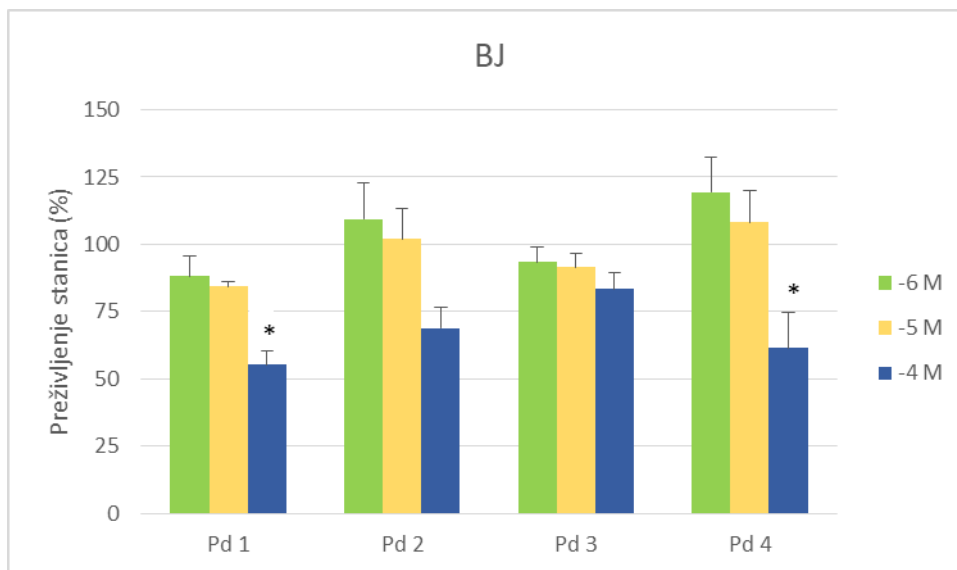


Slika 8. Citotoksični učinak paladijevih (II) kompleksa na NCI-H358 staničnu liniju određeno primjenom MTT testa nakon 72 sata izloženosti tretmanu. (* $P < 0,05$).

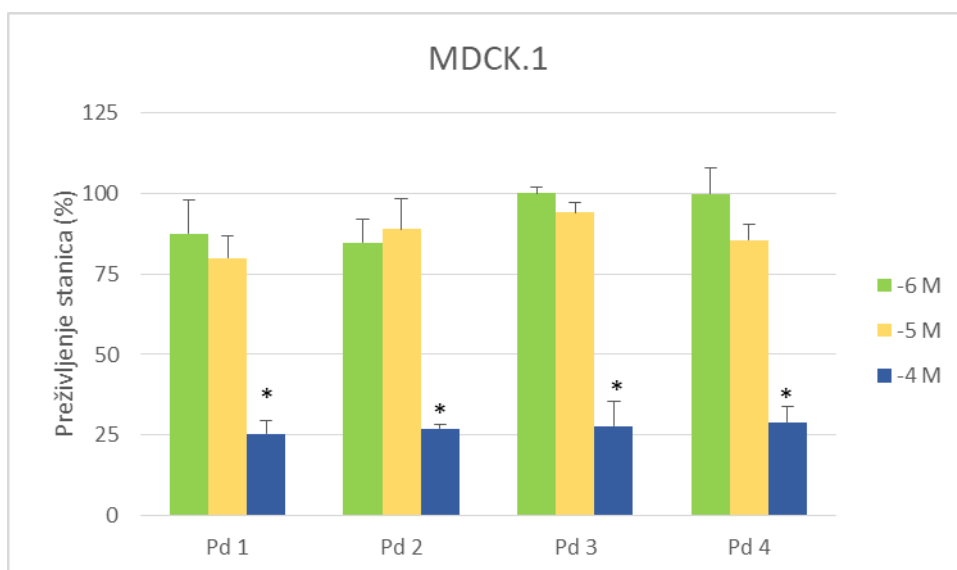


Slika 9. Citotoksični učinak paladijevih (II) kompleksa na PANC-1 staničnu liniju određeno primjenom MTT testa nakon 72 sata izloženosti tretmanu. (* $P < 0,05$).

5. REZULTATI



Slika 10. Citotoksični učinak paladijevih (II) kompleksa na BJ staničnu liniju određeno primjenom MTT testa nakon 72 sata izloženosti tretmanu. (* $P < 0,05$).



Slika 11. Citotoksični učinak paladijevih (II) kompleksa na MDCK.1 staničnu liniju određeno primjenom MTT testa nakon 72 sata izloženosti tretmanu. (* $P < 0,05$).

6. RASPRAVA

Maligna oboljenja drugi su vodeći uzrok smrti na globalnoj razini. U svijetu svake godine od raka oboli 11, a umre 7 milijuna ljudi. Rak pluća, prostate, debelog crijeva, želuca i jetre najčešći su tipovi raka u muškaraca, dok su rak dojke, kolorektalni, plućni, rak grlića maternice i štitnjače najčešći kod žena (26). Pojavnost i smrtnost od zloćudnih bolesti u svijetu i kod nas su u uzlaznoj putanji. Maligna oboljenja šire se velikom brzinom iz dana u dan. Tumorske stanice napadaju organizam i imaju veliku mogućnost preživljavanja i mutacije što dovodi do postojanja različitih vrsta tumora. Razumijevanje složenih načina na koje tumorske stanice komuniciraju sa svojom okolinom, utječe na učinkovitu prevenciju i terapiju tumora. Liječenje kemoterapeutičima jedan je od najčešćih oblika terapije tumorskih oboljenja. Posljednjih godina uloženo je puno istraživačkog napora na dizajn i razvoj inovativnih kompleksa prijelaznih metala s antiproliferativnim djelovanjem *cis*-platine. *Cis*-platina je široko korišten lijek u kemoterapijama, međutim niz nuspojava koje se javljaju uz njezinu primjenu ograničile su njenu kliničku upotrebu (4). Iz tog se razloga istraživanje proširilo i na ostale metalne komplekse. Na temelju strukturne analogije između kompleksa platine (II) i paladija (II), provedene su razne studije o paladijevim (II) kompleksima kao potencijalnim lijekovima protiv malignih oboljenja (3). Biološka aktivnost kompleksa ovisi o prirodi liganda, pa su današnja istraživanja usmjerena na metalne komplekse s biološki važnim ligandima u svrhu proširenja spektra djelovanja kompleksa. Razmatra se odnos antitumorske aktivnosti kompleksa o njihovim strukturnim i fizičko-kemijskim svojstvima.

Istraživanja Tušek-Božić i suradnika bila su usmjerena na komplekse paladija (II) s derivatima aminofosfonskih kiselina, s dietil i monoetil 2- i 8-kinolilmetilfosfonatima. Biološka svojstva kompleksa ispitivana su određivanjem njihove *in vitro* antitumorske aktivnosti prema KB stanicama karcinoma kože kod ljudi i L1210 stanicama leukemije kod miša. Rezultati njihovog testiranja pokazali su da su kompleksi nešto aktivniji prema stanicama leukemije kod miša te da su aktivniji kompleksi diestera u odnosu na komplekse monoestera. Osim toga, desetak kompleksa pokazalo je visoku antitumorsku aktivnost (6).

Neka istraživanja koja su do sada provedena pokazala su da Pd kompleksi koji sadrže S i N donorske ligande pokazuju učinak u supresiji staničnog rasta H1-60, 3T3, JURKAT, Pam212 i Pam-ras staničnih linija (7,8). Antiproliferativna aktivnost paladijevih (II) kompleksa sa S i N donorskim ligandima (deoxyalliin), na ispitivanim staničnim linijama, povećavala se s istovremenim povećavanjem koncentracija kompleksa.

6. RASPRAVA

Slične rezultate pokazali su i Pd kompleksi s miješanim ligandima poput aminokiselina i 1,10-fenantrolina na Molt-4 staničnoj liniji (8). Takvi kompleksi pokazali su značajnu aktivnost koja je bliska *cis*-platini.

Biološka aktivnost kompleksa ispituje se određivanjem njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti prema različitim normalnim i tumorskim stanicama ljudskog i životinjskog podrijetla. Citotoksični učinak novih paladijevih (II) kompleksa određen je na četiri adherentne stanične linije, tri humane stanične linije i jednoj animalnoj staničnoj liniji, koje su tretirane navedenim spojevima. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je kako paladijevi (II) kompleksi pokazuju različito citotoksično djelovanje na testirane stanične linije. Rezultati pokazuju utjecaj kompleksa na smanjen postotak staničnog rasta staničnih linija. Učinak kompleksa ovisan je o vrsti stanične linije i koncentraciji pri kojoj je bila tretirana. Istraživanje je pokazalo da kod svih spojeva, na svim staničnim linijama preživljenje gotovo uvijek iznad 75% pri koncentracijama reda 10^{-6} M do 10^{-5} M. Pd 1 i Pd 4 pokazali su se kao kompleksi s najjačim inhibicijskim učinkom koji pri najvišoj koncentraciji imaju izraženu citotoksičnost na sve testirane stanične linije.

Najveći potencijal za daljnji razvoj pokazuju Pd 1 i Pd 4 čija se antiproliferativna aktivnost najviše ističe u rezultatima ovog rada. Potrebno je smanjiti njihov inhibitorski učinak na normalne stanice kako bi se mogli koristiti kao protumorski lijekovi.

Paladijevi (II) kompleksi, kao potencijalni protumorski lijekovi, pokazali su zadovoljavajuće citotoksično djelovanje, no njihovu je djelotvornost potrebno ispitati na što više različitih staničnih linija kako bismo dobili što konkretnije informacije o mehanizmima njihova djelovanja.

7. ZAKLJUČAK

- Uočen je antiproliferativni učinak testiranih spojeva na stanične linije, gdje je veća citotoksičnost primijećena pri većim koncentracijama ispitivanih kemijskih spojeva.
- Najučinkovitije antiproliferativno djelovanje pokazali su novosintetizirani paladijevi (II) kompleksi, Pd 1 i Pd 4, na svim tumorskim stanicama, najbolje pri koncentraciji 10^{-4} M.
- Najmanje učinkovito antiproliferativno djelovanje pokazali su Pd 2 i Pd 3 na svim staničnim linijama, pri svim ispitivanim koncentracijama.
- Normalne stanice humanog podrijetla, BJ, pokazale su malu osjetljivost na ispitivane paladijeve (II) komplekse što je značajno jer upućuje na netoksično djelovanje kompleksa na normalne stanične linije pri ispitivanim koncentracijama.
- Najveću osjetljivost pokazala je normalna stanična linija mišjeg podrijetla, MDCK1, pri djelovanju svih spojeva pri koncentraciji od 10^{-4} M.

8. SAŽETAK

Uvod: Maligna oboljenja su drugi vodeći uzrok smrti na globalnoj razini. S obzirom na veliki broj smrti uzrokovanih malignim promjenama, potražnja za antitumorskim lijekovima je vrlo velika. Jedan od često primijenjenih kemoterapeutika je *cis*-platina, međutim primjena *cis*-platine pokazala je mnoge nuspojave. Stoga se pažnja usmjerava na paladij koji stvara komplekse kao i platina te se stoga može zamijeniti istom.

Ciljevi: Ispitati citotoksični učinak paladijevih (II) kompleksa na rast četiriju staničnih linija (PANC1, BJ, MDCK.1, NCI-H358) u uvjetima *in vitro*.

Materijali i metode: Paladijevi (II) kompleksi sintetizirani su na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku, Katedra za kemiju i ekologiju, pri Zavodu za primjenjenu kemiju i ekologiju. Spojevi su pripremljeni otapanjem u 100% DMSO u koncentraciji 10^{-2} mol/dm³ (M), a konačan niz koncentracija je bio 10^{-4} M, 10^{-5} M i 10^{-6} M. Kultivacija stanica odvijala se u CO₂ inkubatoru pri 37°C. Stanična vijabilnost određena je MTT testom nakon inkubacije od 72 sata.

Rezultati: Uočen je antiproliferativni učinak testiranih spojeva na stanične linije gdje je veća citotoksičnost primijećena pri većim koncentracijama ispitivanih kemijskih spojeva. Najučinkovitije antiproliferativno djelovanje pokazali su Pd 1 i Pd 4, na svim tumorskim stanicama, najbolje pri koncentraciji 10^{-4} M. Normalne stanice humanog podrijetla, BJ, pokazale su dobru otpornost na ispitivane spojeve uz postotak preživljenja od 50-65% pri najvišoj koncentraciji. Najveću osjetljivost pokazala je mišja, MDCK1 stanična linija.

Zaključak: Paladijevi (II) kompleksi smanjuju rast tumorskih stanica. Inhibicija rasta ovisi o koncentraciji spoja i vrsti stanične linije.

Ključne riječi: antiproliferativni učinak; kultura stanica; paladij; tumorske stanice

9. SUMMARY

Evaluation of the antiproliferative activity of palladium (II) complexes *in vitro*

Introduction: Malignant diseases are worlds second leading cause of death. The request for anti-tumor drugs is growing due to a large number of deaths caused by malignant changes. One of the most used chemotherapeutics is cisplatin. However, cisplatin use led to numerous side effects. Because of this, our attention is shifted to palladium, which forms complexes same as platinum, so may be a supstitute for platinum.

Objective: To research the cytotoxic effect of palladium (II) complexes on the growth of four cell lines (PANC1, BJ, MDCK.1, NCI-H358) under *in vitro* conditions.

Materials and methods: Palladium (II) complexes were synthesized at the Faculty of Food Technology in Osijek, Subdepartment of Chemistry and Ecology, at the Department of Applied Chemistry and Ecology. Compounds were made by dissolvment of 100% DMSO in concentration of 10^{-2} mol/dm³ (M), and final count of concentrations was 10^{-4} M, 10^{-5} M and 10^{-6} M. Cultivation of the cells was carried out in an CO₂ incubator at 37°C. The cell viability was determined by MTT assay after 72-hour incubation.

Results: An antiproliferative effect of the tested compounds on cell lines was observed. A higher cytotoxicity was noticed at higher concentrations of the tested chemical compounds. Most effective antiproliferative action were showed by Pd 1 and Pd 4, on all tumor cells at concentration of 10^{-4} M. Normal cells that originated from humans, BJ, showed a good resistance for tested samples and with survival percentage of about 50-65% within highest concentration. Largest sensitivity showed mouse MDCK1 colony.

Conclusion: Palladium (II) complexes reduce the growth of tumor cells. The inhibition of growth depends on the concentration of the compound and the cell line type.

Key words: antiproliferative effect; cell culture; palladium; tumor cells

10. LITERATURA

1. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Palladium, chemical element. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/palladium-chemical-element>. Datum pristupa: 10.8.2020.
2. The Editors of Lenntech. Palladium - Pd. Dostupno na adresi: <https://www.lenntech.com/periodic/elements/pd.htm>. Datum pristupa: 10.8.2020.
3. Bakalova A, Buyukliev R, Momekovb G. Palladium Complexes with 3-Substituted Derivatives of 5-Methyl-5-(4-pyridyl)hydantoins. Synthesis, Study and in vitro Cytotoxicity. Croat. Chem. Acta 87 (3) (2014) 195–199.
4. Butour JL , Wimmer S, Wimmer F, Castan P. Palladium(II) Compounds With Potential Antitumour Proerties and Their Platinum Analogues: A Comparative Study of the Reaction of Some Orotic Acid Derivatives With DNA in Vitro. Chem Biol Interact 104(2-3) (1997) 165-78.
5. Crean D, Jones E. Platinum Cancer Drugs. Dostupno na adresi: <https://chemoth.com/medicines/cisplatin>. Datum pristupa: 11.8.2020.
6. Tušek-Božić Lj: Antitumorska aktivnost kompleksa platine(II) i paladija(II) s etil kinolilmetilfosfonatima. Med Vjesn 2010; 42 (3-4): 231-240.
7. Gómez Quiroga A, Navarro Ranninge C. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes: Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. Coordination Chemistry Reviews, Volume 248, Issues 1–2, January 2004, 119-133.
8. Pedro P. Corbi, Antonio C. Massabni, Andréia G. Moreira, Francisco J. Medrano, Miriam G. Jasiulionis, and Claudio M. Costa-Neto. Synthesis, characterization, and biological activity of a new palladium (II) complex with deoxyalliin. Can. J. Chem. 2005. 83: 104–109.
9. The Editors of Biocompare. MEM. Dostupno na adresi: <https://www.biocompare.com/Search-Cell-Culture-Media/?soids=2278018&vcmpv=true>. Datum pristupa: 11.8.2020.

10. LITERATURA

10. The Editors of Contained Air Solutions. Laminar Flow Cabinet. Dostupno na adresi: <https://www.laminarflows.co.uk/>. Datum pristupa: 11.8.2020.
11. The Editors of American Type Culture Collection. ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines 2014. Dostupno na adresi: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx. Datum pristupa: 12.8.2020.
12. The Editors of Invitrogen. Cell culture basics. Dostupno na adresi: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. Datum pristupa: 10.8.2020.
13. Cooper GM, Hausmann RE. Stanica - molekularni pristup, 5. izdanje, Medicinska naklada: Zagreb, 2010.
14. Costa J. Cancer. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/cancer-disease>. Datum pristupa: 13.8.2020.
15. The Editors of CancerQuest. Cancer Development. Dostupno na adresi: <https://www.cancerquest.org/cancer-biology/cancer-development>. Datum pristupa: 12.8.2020.
16. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013; 18(1-2): 43–73.
17. Čepelak I, Čvorišćec D, Štrausova Medicinska biokemija. Medicinska naklada: Zagreb, 2009.
18. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Targer for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb; 19(2): 448.
19. Pećina-Šlaus N, Bulić-Jakuš F, Radić K. Tumor - supresorski geni. *Medicinar.* 2005; 46; 44-47.

10. LITERATURA

20. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. DOI: 10.5772/intechopen.71923. 2017: 1-12.
21. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, i sur. Cell Viability Assays. U: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, i sur. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1] str. 295-319.
22. Twarużek M, Zastempowska E, Soszczyńska E, and Ałtyn I. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. Folia Biol. Oecol. 2019; 14: 23-32.
23. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK and Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. Bangladesh J Pharmacol. 2017; 12:115-118.
24. Smrečki-Lolić N. (2014.) "Koordinacijski spojevi nikla(II) i paladija(II) s N-arilalkilnim derivatima iminodiocetene kiseline", doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
25. The Editors of World Health Organization. Cancer. Dostupno na adresi: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Datum pristupa: 17.8.2020.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonela Jeleč

Datum rođenja: 17. travnja 1998.

Adresa: Livana, Cvjetna 15, Čepin

E-mail: antonelajelec@gmail.com

Obrazovanje:

2013. - 2017. I. gimnazija Osijek, Županijska 4, Osijek

2017. - 2020. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Dodatna usavršavanja:

2013. - 2017. Njemačka jezična diploma drugog stupnja (DSD II, nivo B2/C1)