

Biološka aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom

Jeleč, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:152:129549>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonela Jeleč

**BIOLOŠKA AKTIVNOST CU (II)
KOORDINACIJSKOG KOMPLEKSA S
KROMON-2-KARBOKSILNOM
KISELINOM**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonela Jeleč

**BIOLOŠKA AKTIVNOST CU (II)
KOORDINACIJSKOG KOMPLEKSA S
KROMON-2-KARBOKSILNOM
KISELINOM**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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 34 stranice, 9 slika i 1 tablicu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na predloženoj temi i pruženoj prilici za suradnju tijekom izrade diplomskog rada. Veliko hvala na trudu, utrošenom vremenu, stručnoj i nesebičnoj pomoći pri realizaciji rada.

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 diplomskog studija.

Veliko hvala mom dečku Svenu na pruženoj podršci, ljubavi i nesebičnoj pomoći tijekom studiranja. Hvala što si moje studiranje učinio ljepšim i ugodnijim.

I na kraju, hvala mojim roditeljima koji su mi pružili ljubav, razumijevanje i financijsku potporu tijekom studiranja.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Bakar | 1 |
| 1.1.1. Fiziološka važnost bakra | 1 |
| 1.1.2. Kompleksni spojevi bakra | 1 |
| 1.2. <i>In vitro</i> kultivacija stanica | 2 |
| 1.2.1. Kultura stanice..... | 2 |
| 1.2.2. Rast stanica <i>in vitro</i> - 2D i 3D..... | 3 |
| 1.2.3. Dvodimenzionalna kultura stanica - 2D..... | 3 |
| 1.2.4. Trodimenzionalna kultura stanica - 3D..... | 4 |
| 1.3. Oksidativni stres..... | 5 |
| 1.3.1. Slobodni radikali | 6 |
| 1.3.2. Antioksidansi..... | 6 |
| 1.4. Kolorektalni karcinom..... | 8 |
| 2. HIPOTEZA | 10 |
| 3. CILJEVI | 11 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 12 |
| 4.1. Ustroj studije | 12 |
| 4.2. Materijali | 12 |
| 4.2.1. Ispitivani spojevi | 12 |
| 4.2.2. Kemikalije | 12 |
| 4.2.3. Stanične linije..... | 13 |
| 4.3. Metode..... | 13 |
| 4.3.1. Formiranje sfera | 13 |
| 4.3.2. 3D MTT test..... | 13 |
| 4.3.3. Uzgoj sfera na agaroznom nosaču..... | 14 |
| 4.3.4. Određivanje antioksidativnog statusa - određivanje glutaciona..... | 15 |
| 4.4. Statističke metode..... | 15 |
| 5. REZULTATI..... | 16 |
| 5.1. Određivanje citotoksičnosti bakar (II) nitrat - kromon (II) karboksilne kiseline u 3D kulturi... .. | 16 |
| 5.2. Formiranje sferoida različitih staničnih linija..... | 18 |
| 5.3. Određivanje ukupnog i reduciranog glutaciona u MRC-5 i Caco-2 stanicama | 20 |
| 6. RASPRAVA..... | 22 |
| 7. ZAKLJUČAK | 25 |
| 8. SAŽETAK..... | 26 |
| 9. SUMMARY | 27 |

| | |
|----------------------|----|
| 10. LITERATURA | 28 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 34 |

POPIS KRATICA

| | |
|---------------|---|
| Caco-2 | stanična linija izolirana iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma |
| CAT | katalaza (engl. <i>catalase</i>) |
| DMEM | (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) medij |
| DMSO | dimetil sulfoksid (engl. <i>dimethyl sulfoxide</i>) |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina |
| EDTA | etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| FBS | fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| γ -GCS | γ -glutamilcistein-sintetaza |
| GPx | glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i>) |
| GS | glutation sintetaza |
| GSH | glutation (engl. <i>glutathione</i>); reducirani oblik glutaciona |
| GSSG | oksidirani oblik glutaciona |
| HT-29 | stanična linija izolirana iz humanog primarnog kolorektalnog adenokarcinoma |
| MEM | (engl. <i>Minimal Essential Medium</i>) medij |
| MRC-5 | normalna stanična linija humanih plućnih fibroblasta |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>) |
| PBS | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer</i>) |
| RNS | reaktivne dušikove vrste (engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i>) |
| ROS | reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| RPMI 1640 | (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>) medij |
| SOD | superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>) |
| UV | ultraljubičasto zračenje |

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Bakar

Bakar je kemijski element koji se nalazi u 11. skupini periodnog sustava elemenata, atomskog broja 29 i atomske mase 63,546. To je crvenkast i mekan, teški metal gustoće 8,92 g/cm³ i tališta 1083 °C. Nakon srebra, najbolji je vodič topline i elektriciteta (električne struje), otporan je na koroziju, lako se prerađuje i stvara slitine. Pod utjecajem atmosferilija prevlači se zaštitnim slojem zelene patine (bazični karbonat ili sulfat). Ne otapa se u razrijeđenim kiselinama, samo ga dušična kiselina nagriza.

Bakar je poznat još iz prapovijesnih vremena. Upotrebljavao se u neolitikumu (8000 god. pr. Kr.), u Egiptu oko 5000 god. pr. Kr., na Cipru i Kreti oko 3000 god. pr. Kr (1). U antičko doba većina bakra dolazila je s otoka Cipra, pa je bio poznat pod nazivom „*aes cyprum*“ (ciparska ruda) ili skraćeno *cyprium*, a od tog naziva potječe latinski naziv *cuprum*, po čemu je bakar i dobio simbol Cu u periodnom sustavu elemenata. Tisućama godina kasnije, bakar je i dalje sveprisutan metal. Zbog svoje otpornosti prema koroziji i dobrih mehaničkih svojstava koristi se elektrotehnici, metalurgiji i dr.

1.1.1. Fiziološka važnost bakra

Bakar je esencijalan element koji se u ljudskom organizmu nalazi u tragovima. U tijelu se pohranjuje u jetri, mozgu i skeletnim mišićima, dok se apsorpcija bakra odvija u tankom crijevu i želucu. Nalazi se u aktivnim mjestima brojnih enzima kao što su citokrom oksidaza, superoksid dismutaza, askorbat oksidaza i tirozinaza. Zajedno s enzimima, bakar sudjeluje u prijenosu elektrona u stanicama i zaštiti organizma od slobodnih radikala (2).

1.1.2. Kompleksni spojevi bakra

Prve ideje o antitumorskom djelovanju kompleksa bakra javljaju se 60-ih godina prošlog stoljeća i to nakon otkrivanja *cis*-platine (*cis* - diamin dikloroplatina (II)) koja se tada pokazala kao vrlo uspješan citostatik u liječenju nekoliko vrsta tumora. Međutim, nedugo nakon toga, pokazalo se da primjena *cis*-platine ima značajne nuspojave poput nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti i ototoksičnosti, pa se zbog toga javila i potreba za sintezom novih spojeva sa smanjenim nuspojavama (3,4). U tu svrhu, istražuju se različiti organometalni spojevi, među kojima su se svojom antitumorskom aktivnošću istaknuli kompleksi bakra. Biološka aktivnost

1. UVOD

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. Istraživanja su do sada pokazala da Cu kompleksi s miješanim ligandima poput 2,2'-bipiridina i 1,10-fenantrolina s 5-fenil-7-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinom imaju citotoksičan učinak na stanice melanoma B16 (5). Slične rezultate pokazali su i Cu kompleksi s heterocikličkim sulfonamidima kao ligandima na tumorskim staničnim linijama HeLa i WM35. Kompleksi iz tog istraživanja pokazali su i određenu selektivnost, s obzirom da su znatno manje djelovali citotoksično na normalne stanice HFL1 (6). Biološka aktivnost kompleksa ispituje se određivanjem njihove *in vitro* antiproliferativne aktivnosti prema različitim normalnim i tumorskim stanicama ljudskog i životinjskog podrijetla.

1.2. *In vitro* kultivacija stanica

1.2.1. Kultura stanice

Kultura stanice proces je u kojem se stanice uzgajaju u kontroliranim uvjetima. Temelje razvoja kulture stanica postavio je Ross Granville Harrison kada je 1907. godine prvi put uspješno izolirao i kultivirao živčano vlakno iz žabljeg embrija (7). Ta se kultura nije dugo održala, međutim, zahvaljujući tom eksperimentu, došlo je do značajnih otkrića za održavanje stanične kulture. Do velikog napretka dolazi 1912. godine kada se uvodi sterilna tehnika rada u kulturu stanica. Međutim, ni sterilna tehnika rada nije bila dovoljna kako bi se stanice održale u kulturi neko dulje vrijeme. Za uspješan rast stanica bilo je nužno osigurati i nutritivne sastojke, odgovarajući pH, optimalnu temperaturu i koncentraciju CO₂. 1959. godine Harry Eagle definirao je medij koji omogućuje rast animalnih stanica što je označavalo veliku prekretnicu na ovom području. Ustanovio je da medij treba sadržavati najmanje 13 esencijalnih aminokiselina, vitamine, glukozu koja služi kao izvor energije, različite soli za održavanje osmolalnosti te serum sisavaca (8). Koncentracije svih sastojaka hranjive podloge moraju biti točno definirane kako bi osmotski tlak u posudi za kultivaciju bio jednak onom fiziološke otopine. Povišena ili snižena koncentracija samo jedne esencijalne aminokiseline može dovesti do smrti stanica. Osim prethodno navedenih, serum je također bitan sastojak hranjive podloge jer predstavlja izvor hranjivih tvari, hormona, ali i specifičnih faktora rasta (9).

Svaka kultivacija stanica započinje izoliranjem pojedinačnih stanica iz izvornog tkiva mehaničkim putem ili pomoću enzima te njihovim nasađivanjem na hranjivi medij. Osnovni medij za uzgoj stanica koji se danas koristi naziva se MEM (engl. *Minimum Essential Medium*),

1. UVOD

a njegova modifikacija DMEM po Dulbeccu za adherentne i RPMI 1640 (engl. *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, što se postiže uzgojem u inkubatoru. Kontrola pH vrši se vizualno provjerom boje medija. Promjena boje medija indikator je promjene pH što zahtijeva zamjenu trenutnog medija novim.

Rad sa staničnim kulturama zahtjeva strogo kontrolirane i sterilne uvjete. Primjenom aseptične tehnike rada sprječava se većina onečišćenja koja se mogu pojaviti u staničnoj kulturi. Zbog toga je potrebno osigurati rad u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Strujanje zraka u kabinetu podešeno je tako da smanji mogućnost kontaminacije (9,10). Neophodno je svakodnevno čišćenje, pranje i sterilizacija radnih prostorija i pripadajuće opreme. Radne površine i preparati održavaju se čistima uz 70 %-tni etanol. Prije i nakon rada sa staničnim kulturama, radni prostor sterilizira se UV zračenjem. Potrebna je redovita zamjena UV lampi zbog smanjenja učinkovitosti s povećanjem broja radnih sati. Zaštita pri radu postiže se nošenjem odgovarajuće laboratorijske odjeće i obuće.

1.2.2. Rast stanica *in vitro* - 2D i 3D

Stanice u kulturi su metabolički aktivne, dijele se, rastu i prolaze kroz tri faze staničnog ciklusa. Prva faza je lag faza koja predstavlja proces pričvršćivanja stanica za podlogu i njihovu adaptaciju na nove uvjete. U ovoj fazi, stanice su metabolički aktivne, međutim ne razmnožavaju se. Druga faza je log faza u kojoj stanice eksponencijalno rastu sve dok ne dosegnu točku konfluencije odnosno kontaktnu inhibiciju. Treća faza je stacionarna faza za koju je karakterističan spori rast stanica zbog nedostatka svježeg medija. U toj su fazi rast i ugibanje stanica gotovo jednaki (11).

1.2.3. Dvodimenzionalna kultura stanica - 2D

U dvodimenzionalnoj kulturi stanice obično rastu u monosloju pričvršćene za ravnu podlogu. Tako postavljena kultura ne odgovara u cijelosti prirodnoj okolini stanica, koje su inače, u *in vivo* uvjetima, okružene drugim stanicama i izvanstaničnim prostorom. Takva abnormalna morfologija stanica u dvodimenzionalnoj kulturi utječe na mnoge stanične procese uključujući proliferaciju, diferencijaciju, proteinsku i gensku ekspresiju te apoptozu.

U tako postavljenoj staničnoj kulturi, svim je stanicama omogućeno da dobiju jednaku količinu hranjivih tvari i čimbenika rasta iz medija tijekom uzgoja te zbog toga dvodimenzionalna stanična kultura ne oponaša dovoljno dobro prirodno okruženje stanica (12).

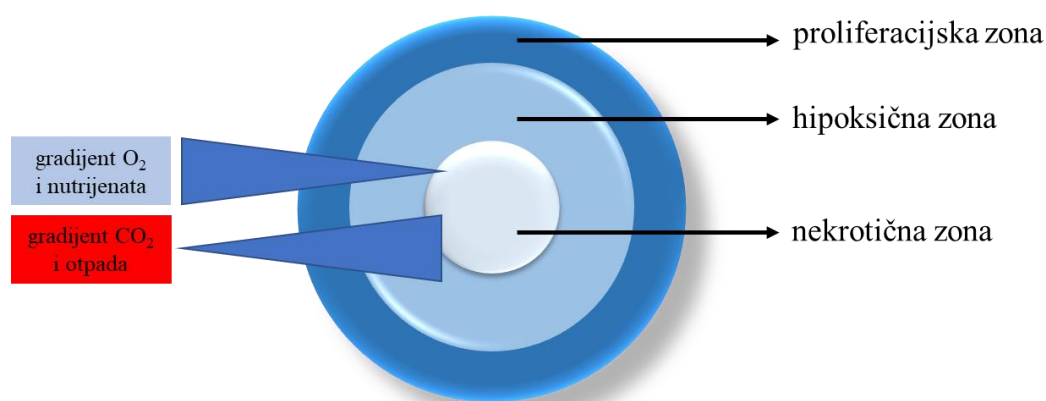
1. UVOD

Kao rezultat toga, testovi koji se provode u dvodimenzionalnoj kulturi, a posebno oni koje se odnose na mjerenje učinka lijekova, često doživljavaju neuspjeh što je povezano s neprirodnim okolišem stanica uslijed kojeg je stanični odgovor na lijek promijenjen (13).

Zbog brojnih nedostataka dvodimenzionalne stanične kulture, pojavila se potreba za pronalaskom alternativnih modela, *in vitro* staničnih sustava koji će bolje oponašati prirodno okruženje stanica *in vivo* i samim time osigurati bolje rezultate u *in vivo* testovima.

1.2.4. Trodimenzionalna kultura stanica - 3D

Trodimenzionalna kultura stanica odražava *in vivo* okruženje stanica. Temelji se na stvaranju sferoida u kojima su stanice smještene u slojevima u različitim stadijima rasta. Struktura sferoida sastoji se od tri zone. Vanjski sloj odnosno proliferacijsku zonu čine vijabilne, proliferirajuće stanice, žive stanice koje se aktivno umnožavaju. Središnji dio sferoida čini nekrotična zona s umirućim stanicama zbog nedostatka hranjivih tvari i smanjene dostupnosti kisika. Između ta dva sloja nalazi se sloj neaktivnih stanica koje formiraju hipoksičnu zonu (Slika 1) (14). Uzgojem stanica u trodimenzionalnoj kulturi može se proučavati stanični odgovor koji nalikuje *in vivo* uvjetima.



Slika 1. Shematski prikaz strukture sferoida (autorski crtež)

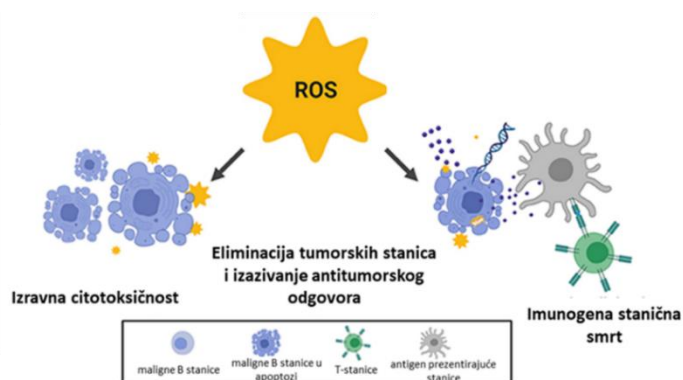
Posljednjih desetak godina ističe se važna uloga trodimenzionalne kulture u istraživanju i liječenju tumora. Trodimenzionalna stanična kultura prikladan je model za oponašanje tumora u koje teško prodiru kemoterapijske supstance, slično kao i u sferoide. Provedena istraživanja u kojima se ispitivao antitumorski učinak različitih kemoterapijskih supstanci na tumorskim Biološka aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom 4

1. UVOD

stanicama pokazuju da je zbog nedovoljnog prodiranja, potrebna puno veća koncentracija kemoterapijske supstance u trodimenzionalnoj kulturi za razliku od dvodimenzionalne, da bi se pokazala citotoksičnost. Sposobnost predviđanja ishoda u pretkliničkim životinjskim modelima i kliničkim ispitivanjima može se bolje razumjeti u trodimenzionalnoj kulturi stanica jer pozitivni antitumorski učinci uočeni u dvodimenzionalnim kulturama često ne uspijevaju tijekom testiranja *in vivo* (15).

1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres definira se kao stanje poremećene ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Oksidativni stres nastaje u uvjetima kada u organizmu postoji povećana proizvodnja slobodnih radikala i smanjena sposobnost organizma za njihovu neutralizaciju. Slobodni radikali mogu se kovalentno vezati na makromolekule stanice poput ugljikohidrata, lipida, proteina, nukleinskih kiselina te tako uzrokovati gubitak njihove funkcije. Oni sudjeluju u procesima kao što su stanična proliferacija, genska transkripcija, unutarstanična signalizacija te apoptoza. Povećana količina slobodnih radikala u stanici posljedično uzrokuje poremećaje u tim procesima što na kraju dovodi i do oštećenja tkiva i organa. Oksidativni stres rizični je čimbenik za nastanak mnogih bolesti u našem organizmu, od ubrzanog starenja organizma, nastanka različitih kroničnih i malignih bolesti pa sve do izazivanja smrti stanica. Oksidativni stres povezuje se s patogenezom mnogih bolesti kao što su neurodegenerativne, kardiovaskularne, autoimune bolesti, maligne bolesti i sl. (16). S druge strane, nastajanje male količine slobodnih radikala ima pozitivan utjecaj na organizam. Mnogi procesi u kojima slobodni radikali djeluju kao posrednici zapravo štite stanicu od oksidativnog stresa kojeg slobodni radikali uzrokuju te se na taj način održava redoks ravnoteža u mnogim procesima u organizmu (Slika 2) (18).



Slika 2. Učinak slobodnih radikala na tumorske stanice (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 17)

1. UVOD

1.3.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Zbog nastojanja da popune vanjsku orbitalu i na taj način postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju, smatraju se visoko reaktivnim molekulama. Kako bi postigli elektronsku stabilnost, slobodni radikali reagiraju s prvom susjednom molekulom uzimajući njezin elektron te na taj način stvaraju novu molekulu slobodnog radikala. Susjedne molekule time i same postaju nestabilne, reagiraju s drugim prostorno bliskim molekulama te na taj način pokreću kaskadnu reakciju.

Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) i reaktivne dušikove vrste (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) najvažnija su vrsta slobodnih radikala u organizmu (19).

U reaktivne kisikove vrste ubrajaju se superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni radikal (ROO^{\cdot}), alkoksilni radikal (RO^{\cdot}), hidroperoksilni radikal (HOO^{\cdot}), vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorasta kiselina ($HOCl$), hipobromasta kiselina ($HOBr$), ozon (O_3) te singlet kisik ($1\Delta gO_2$). Hidroksilni radikal je najreaktivniji od svih reaktivnih kisikovih vrsta i može oštetiti proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline. Također može započeti peroksidaciju lipida oduzimanjem elektrona iz polinezasićenih masnih kiselina (20).

U reaktivne dušikove vrste ubrajaju se dušikov (II) oksid (NO^{\cdot}), dušikov (IV) oksid (NO_2^{\cdot}), nitrozil (NO^+), nitritna kiselina (HNO_2), dušikov (III) oksid (N_2O_3), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) i alkilperoksinitrit ($ROONO$). Reaktivne dušikove vrste djeluju zajedno s reaktivnim kisikovim vrstama i oštećuju stanice, uzrokujući nitrozativni stres. Stoga se ove dvije vrste često zajednički nazivaju ROS/RNS (21).

U homeostazi, organizam nastoji uspostaviti i kontinuirano održavati ravnotežu između nastajanja slobodnih radikala i njihovog uklanjanja iz organizma. Stanje ravnoteže postiže se produkcijom antioksidansa koji uklanjaju reaktivne kisikove vrste i reaktivne dušikove vrste. Poremećaj takve homeostaze izazvat će oksidativni stres.

1.3.2. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji imaju sposobnost stabiliziranja ili deaktiviranja slobodnog radikala prije nego što slobodni radikal ošteti stanične komponente. Antioksidans predaje svoj elektron slobodnom radikalu i na taj ga način stabilizira, a sam ne postaje slobodni radikal.

1. UVOD

Mehanizam djelovanja antioksidansa uključuje hvatanje reaktivnih kisikovih vrsta, minimiziranje reaktivnosti kisikovih vrsta, popravljjanje ili zamjenu oštećenih ciljnih molekula. Sustav antioksidativne obrane sastoji se od enzimskih antioksidansa i neenzimskih antioksidansa.

U skupinu enzimskih antioksidansa ubrajaju se superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase* - SOD), katalaza (engl. *catalase* - CAT) i glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase* - GPx). Superoksid dismutaza ima najvažniju ulogu u kontroli razine reaktivnih kisikovih vrsta i zbog toga je glavni pokazatelj oksidativnog stresa. To je enzim koji katalizira pretvorbu superoksida u kisik i vodikov peroksid. Međutim, i vodikov peroksid posjeduje visok reaktivni oksidacijski potencijal pa će njegovo prekomjerno nakupljanje i dalje biti štetno. Zbog toga, sav suvišni vodikov peroksid mora odmah biti razgrađen u organizmu, a za to su odgovorni enzimi katalaza i glutation peroksidaza (22).

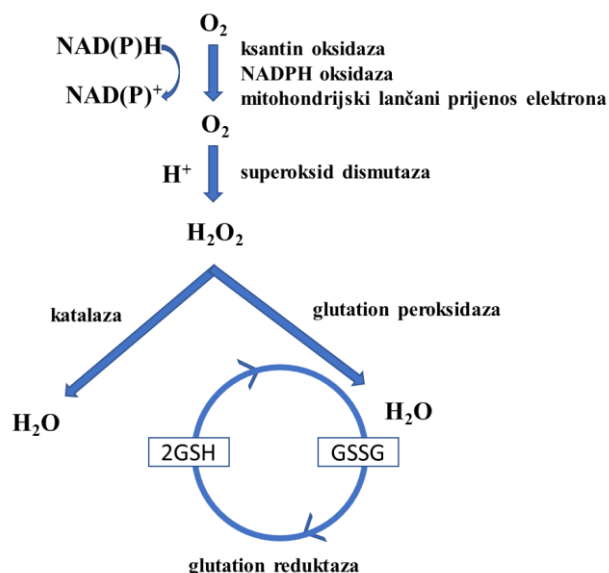
Superoksid dismutaza kao kofaktor sadrži različite elemente kao što su cink, mangan, željezo, nikal, bakar. U oksidativnom stresu najznačajniju ulogu ima Cu, Zn-SOD (bakar, cink superoksid dismutaza) koju nalazimo u citosolu, intermembranskom prostoru mitohondrija i u jezgri. Ova izoforma se još označava i kao SOD1. SOD2 označava Mn-SOD (mangan superoksid dismutaza) koju nalazimo u matriksu mitohondrija. Treća izoforma enzima (engl. *extracellular SOD*) smještena je u izvanstaničnom prostoru, a manjim dijelom u plazmi i drugim izvanstaničnim tekućinama, i često se označava kao SOD3. Nedostatak superoksid dismutaze povezan je s povećanom razinom staničnih oštećenja poput peroksidacije lipida i karbonilacije proteina (23).

Neenzimski antioksidansi koji sudjeluju u obrani od oksidativnog stresa su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), karotenoidi, flavinoidi i glutation (engl. *glutathione* - GSH). GSH je najvažnija antioksidativna molekula stanice koja je po svojoj strukturi tripeptid, γ -glutamyl-cisteinil-glicin. Sintetizira se u jetri sisavaca djelovanjem γ -glutamylcistein-sintetaze (γ -GCS) te glutation sintetaze (GS).

Sulfhidrilna skupina (-SH) cisteina sudjeluje u reakcijama redukcije i konjugacije koje su važne za uklanjanje peroksida, a ovisno o njenoj prisutnosti, glutation se može pronaći u dva različita stanja, reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku. Prilikom oksidacije, dvije molekule GSH spajaju se disulfidnom vezom i nastaje oksidirani oblik glutationa (GSSG). Enzim glutation reduktaza uz nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - NADPH) omogućuje regeneraciju oksidiranog GSSG u

1. UVOD

reducirani GSH (Slika 3). Odnos aktivnog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) predstavlja glavnu odrednicu oksidativnog stresa (25).



Slika 3. Mehanizam antioksidativnog djelovanja glutationa (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 24)

Glutation ima višestruko važnu ulogu u organizmu. U pojedinim reakcijama djeluje kao kofaktor za detoksikaciju enzima kao što su glutation peroksidaza i glutation transferaza, zatim sudjeluje u aminokiselinskom prometu kroz membranu, regenerira oksidirane vitamine C i E. Osim njegove antioksidativne uloge u organizmu, glutation je važan i u metabolizmu i regulaciji različitih procesa u stanici uključujući ekspresiju gena, sintezu DNA i proteina, proliferaciju stanica i apoptozu (26).

1.4. Kolorektalni karcinom

Reaktivne kisikove vrste mogu oštetiti lipide, nukleinske kiseline i proteine, mijenjajući tako njihove funkcije. Kada se poremeti ravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i antioksidativne obrane, dolazi do stanja oksidativnog stresa. Oksidativni stres dovodi do mnogih bolesti, uključujući i tumorske bolesti, a jedna od njih je i kolorektalni karcinom. Zbog stalno rastuće pojavnosti, kolorektalni karcinom postaje sve važniji dijagnostički i terapijski problem. Prema procjenama Svjetske organizacije za istraživanje raka, godišnje od njega oboli gotovo 2 milijuna osoba, a umre 0,95 milijuna. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog

1. UVOD

zavoda za javno zdravstvo, kolorektalni karcinom najučestalija je zloćudna bolest u Hrvatskoj. Godišnje prosječno oboli oko 3600 osoba, od čega oko 60 % muškaraca (27). Najvažniji čimbenik rizika za ovaj karcinom jest starija životna dob. U ostale rizike za nastanak kolorektalnog karcinoma ubrajaju se polipi debelog crijeva, pozitivna obiteljska anamneza, upalne bolesti kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest te nepravilna prehrana. U patogenezi ovog karcinoma još uvijek vrijedi pravilo da većina kolorektalnih karcinoma nastaje iz adenoma – tzv. adenomsko-karcinomski slijed (28). Ove potencijalno premaligne lezije treba razlikovati od juvenilnih polipa, hamartoma i upalnih polipa koji nemaju maligni potencijal. S obzirom da se kolorektalni karcinom širi lokalnom invazijom, limfnim, hematogenim, transperitonealnim i perineuralnim putem, to zahtijeva otkrivanje novih lijekova koji bi utjecali na njegovu smanjenu pojavnost i mogućnost izlječenja. Danas se sve više pažnja usmjerava na organometalne spojeve koji se ističu svojom antiproliferativnom aktivnošću prema kolorektalnom karcinomu. Nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da Cu (II) kompleksi 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin i 1,10-fenantrolin ligandima pokazuju učinkovitost u supresiji staničnog rasta staničnih linija kolorektalnog karcinoma, HT-29, LS174T i Caco-2 (29). S obzirom na dobivene rezultate, potrebno je još dodatno istražiti potencijalnu antiproliferativnu sposobnost navedenih spojeva.

2. HIPOTEZA

2. HIPOTEZA

Koordinacijski kompleks Cu (II) s kromon-2-karboksilnom kiselinom pokazuje antiproliferativnu aktivnost i djeluje inhibitorno na rast Caco-2 i HT -29 stanične linije u 3D modelu uzgoja *in vitro*.

3. CILJEVI

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) ispitati antitumorsku aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom na uzgojene sferoide
- 2) ispitati postoji li razlika u učinku kompleksa na tumorske Caco-2 i HT-29 sfere u odnosu na normalne MRC-5 sfere
- 3) izmjeriti količinu glutationa u stanicama kao pokazatelja antioksidativnog djelovanja ispitivanog Cu (II) kompleksa

4. MATERIJALI I METODE

4. MATERIJALI I METODE

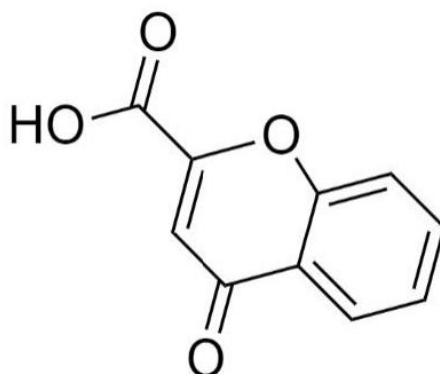
4.1. Ustroj studije

Rad je ustrojen kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek 6. srpnja 2022. pod brojem 2158-61-46-22-165.

4.2. Materijali

4.2.1. Ispitivani spojevi

Spoj koji se koristi u istraživanju jest Cu (II) koordinacijski kompleks s kromon-2-karboksilnom kiselinom. Kompleks je sintetiziran na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera Osijek. Kromon-2-karboksilna kiselina jest ligand molekulske formule $C_{10}H_6O_4$ čiji je sustavni naziv 4-oksokromen-2-karboksilna kiselina (Slika 4).



Slika 4. Kromon-2-karboksilna kiselina

4.2.2. Kemikalije

Za pokus je upotrijebljeno: DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s visokim udjelom glukoze, 4,5 g/L (Sigma Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo), L-alanine-L-glutamine (SIGMA ALDRICH), 0,25 % tripsin EDTA (Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države), fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum* - FBS) (Sigma Aldrich, Brazil), 10 % fosfatni pufer (engl. phosphate buffer - PBS; smjesa NaCl, KCl, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, KH_2PO_4), DMSO (dimetilsulfoksid; ACROS ORGANICS), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid; MERCK, Njemačka), agarozna visoke rezolucije (Sigma Aldrich, Biološka aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom

4. MATERIJALI I METODE

Missouri, USA), kolorimetrijski kit za određivanje glutationa (GSH + GSSG / GSH set, ab239709, Abcam, SAD).

4.2.3. Stanične linije

U svrhu istraživanja, biološka aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom ispitana je na humanim staničnim linijama u 3D staničnoj kulturi. Korištene su adherentne stanične linije, dvije tumorske i jedna normalna stanična linija.

Humane tumorske stanične linije:

- Caco-2 (ATCC® HTB-37™) - stanična linija izolirana iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma
- HT-29 (ATCC® HTB-38™) - stanična linija epitelne morfologije izolirana iz humanog primarnog kolorektalnog adenokarcinoma

Humana normalna stanična linija:

- MRC-5 (ATCC® CCL-171™) - normalna stanična linija humanih plućnih fibroblasta

4.3. Metode

4.3.1. Formiranje sfera

Sve stanične linije (Caco-2, HT-29, MRC-5) nasađene su u volumenu od 180 μl i koncentraciji od 1×10^4 st/mL u ploče s V dnom u DMEM hranjivi medij s 10 % FBS-a bez antibiotika. Nakon nasađivanja, ploče su kratko centrifugirane (1100 ok/min; 15 sek) kako bi se ubrzala njihova agregacija. Nakon centrifugiranja, nasađene ploče trodimenzionalne kulture stavljene su u inkubator (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) u vremenskom razdoblju od 3 dana na 37 °C i 5 % CO₂ radi formiranja sferoida. Nakon toga su stanice, uz izmjenu medija, tretirane s 20 μL ispitivanog kompleksa u konačnim koncentracijama od 1×10^{-5} mol/dm³ i 1×10^{-6} mol/dm³. Stanice su bile izložene tretmanu s ispitivanim kompleksom tijekom 72 sata, što je bio jednokratni tretman, i višekratnom tijekom sljedeća 72 sata.

4.3.2. 3D MTT test

3D MTT test je test citotoksičnosti *in vitro* koji služi za kvantitativnu procjenu metaboličke aktivnosti stanica mjerenjem aktivnosti sukcinat dehidrogenaze, mitohondrijskog

4. MATERIJALI I METODE

enzima. Princip testa zasniva se na redukciji žuto obojenog MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) kojeg metabolički aktivne stanice prevode u ljubičasto obojeni formazan. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica, a mjeri se spektrofotometrijski na 595 nm. MTT test jedan je od najčešće korištenih kolorimetrijskih testova za procjenu citotoksičnosti i vitalnosti stanica (30).

Nakon trodnevne izloženosti tretmanu ispitivanim kompleksom sa stanica se uklanja medij i dodaje se 40 µl 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 µl 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 uz pomoć automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA). Na temelju dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (background) određen je postotak preživljenja prema formuli (Slika 5):

$$\% = \frac{(A_{\text{tretman}} - A_{\text{pozadina}})}{(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{pozadina}})} \times 100$$

Slika 5. Formula za dobivanje postotka živih stanica u kulturi

Takav 3D MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) i 6 dana (višekratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Istovremeno je, realnom vremenu, praćen i rast sfera od trenutka uzgoja do završetka testa primjenom invertnog mikroskopa uz dodatak mjerne skale.

4.3.3. Uzgoj sfera na agaroznom nosaču

Za uzgoj sfera na agaroznom nosaču korištene su ploče sa 96 jažica ravnog dna. Agarozni nosač pripremljen je razlijevanjem 50 µL / jažici 1,5 % sterilne otopine agaroze koja se temperirala na stanične uvjete (37°C) prije nanošenja stanične suspenzije. Stanice su nasadene u koncentraciji od 3×10^4 st/mL (200 µL (6000 stanica) / jažici) i uzgajane u uvjetima 5 % CO₂ / 37°C iz izmjenu medija svaka 3 dana. Osmog i jedanaestog dana kultivacije na stanice je, prilikom izmjene medija, dodan ispitivani kompleks u konačnim koncentracijama od 1×10^{-5} mol/dm³ i 1×10^{-6} mol/dm³. Razvoj i formiranje sferoida fotografirano je svakih 72 sata na invertnom mikroskopu (Carl Zeiss Axiovert 25, Njemačka) u vidljivom dijelu spektra.

4. MATERIJALI I METODE

4.3.4. Određivanje antioksidativnog statusa - određivanje glutaciona

Stanice (MRC-5; Caco-2) nasadene su na ploče sa 6 jažica u ukupnoj koncentraciji 3×10^5 / jažici u ukupnom volumenu od 3 mL. Za kultivaciju je primijenjen DMEM hranjivi medij s 10 % FBS i 2 mM stabilnim glutaminom. Nakon 24-satne prilagodbe, stanice su izložene djelovanju bakrovog (II) nitrata kompleksiranog s kromon-2-karboksilnom kiselinom (1×10^{-5} mol/dm³) u vremenskom periodu od 24 sata.

Za mjerenje koncentracije glutaciona primijenjen je kolorimetrijski kit (GSH + GSSG / GSH set, ab239709, Abcam, SAD) koji se zasniva na kruženju glutaciona koji reagira s Ellmanovim reagensom (5,5'-ditio(2-nitrobenzojeva kiselina - DTNB) i glutation reduktazom pri čemu nastaje kompleks žute boje. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 415 nm.

4.4. Statističke metode

Račun za MTT test i količine glutaciona provodi se u Microsoft Excelu. Rezultati staničnog rasta i preživljenja kao i glutaciona prikazuju se grafički uz statističku obradu podataka programu Statistica verzija 14.0.0.15 (TIBCO Palo Alto, SAD). 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 $P < 0,05$. Student t test primijenjen je za usporedbu međusobnih nezavisnih tretmana u ovisnosti o vremenu, koncentraciji i vremenu izlaganja ($P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (#)).

5. REZULTATI

5.1. Određivanje citotoksičnosti bakar (II) nitrat - kromon (II) karboksilne kiseline u 3D kulturi

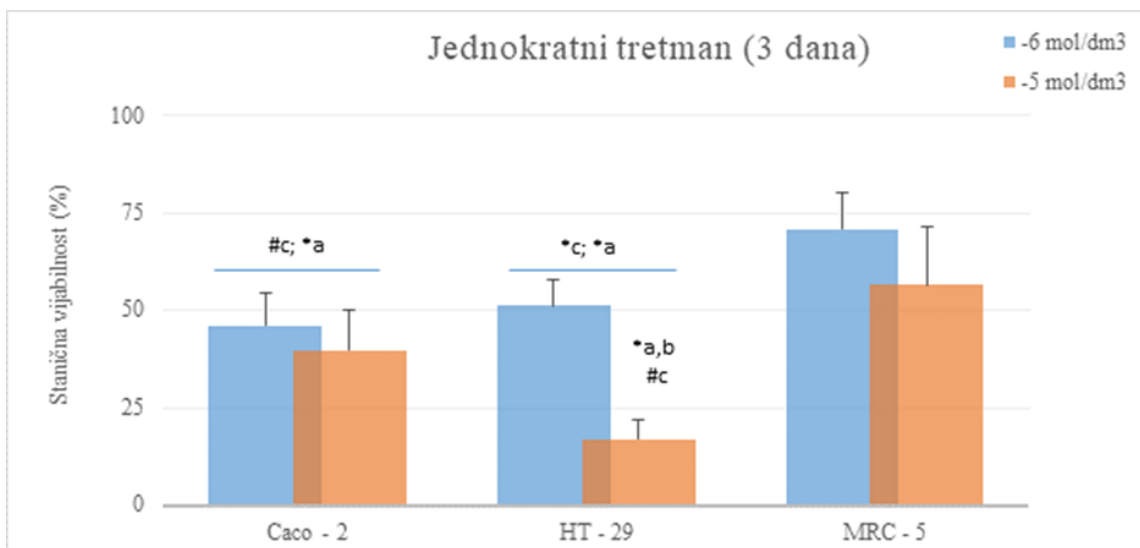
Protumorski učinak bakar (II) nitrat - kromon (II) karboksilne kiseline ispitan je na trima staničnim linijama (Caco-2, HT-29, MRC-5) u 3D kulturi. MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) i 6 dana (višekratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na: a) kontrolne stanice; b) koncentracije (1×10^{-5} mol/dm³; 1×10^{-6} mol/dm³); c) vremenske tretmane (3 i 6 dana).

Djelovanje ispitivanog kompleksa tijekom jednokratnog tretmana na Caco-2 staničnu liniju pokazalo je da pri koncentraciji od 1×10^{-6} mol/dm³ kompleks ima 55 % inhibicijski učinak, a pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ 65 % inhibicijski učinak. Djelovanje istog kompleksa na istoj staničnoj liniji tijekom višekratnog tretmana pokazalo je manji inhibicijski učinak, i to pri koncentraciji od 1×10^{-6} mol/dm³ oko 20 %, a pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ oko 30 %.

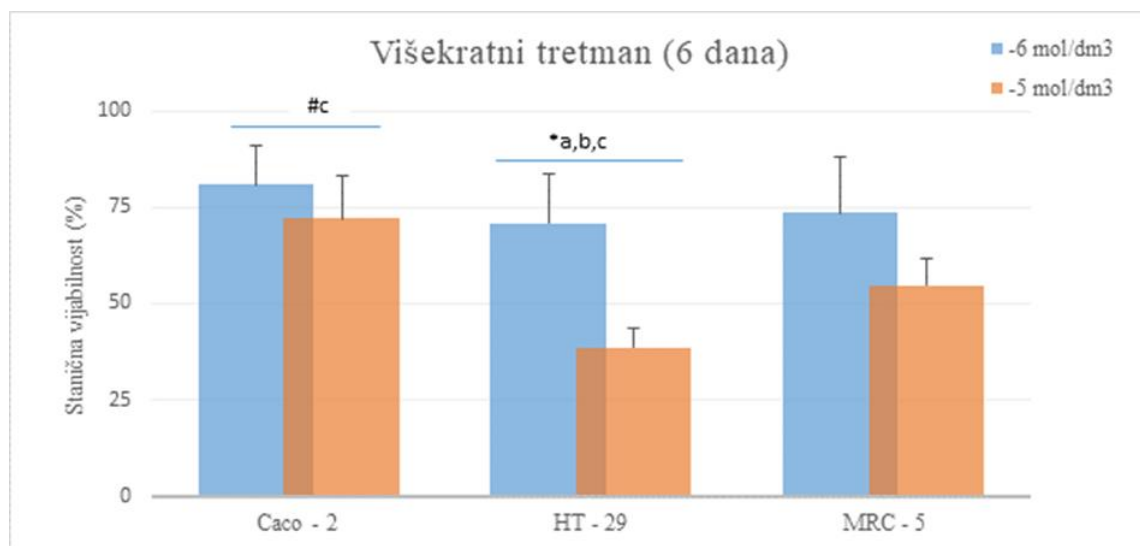
Ispitivani kompleks tijekom jednokratnog tretmana inhibira rast HT-29 stanične linije za oko 50 % pri koncentraciji od 1×10^{-6} mol/dm³. Izrazito jaku aktivnost ispitivani kompleks pokazuje na toj staničnoj liniji pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ inhibirajući stanični rast za oko 80 %. Djelovanje istog kompleksa na istoj staničnoj liniji tijekom višekratnog tretmana pokazalo je manji inhibicijski učinak, i to pri koncentraciji od 1×10^{-6} mol/dm³ oko 30 %, a pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ oko 60 %.

Ispitivani kompleks nije pokazao značajan citotoksični učinak na staničnoj liniji MRC-5 ni u jednoj vrsti tretmana, ni pri jednoj koncentraciji (Slika 6).

5. REZULTATI



A)



B)

t test; $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (#)

a - u odnosu na normalne stanice

b - u odnosu na koncentracije

c - u odnosu na vremenske tretmane

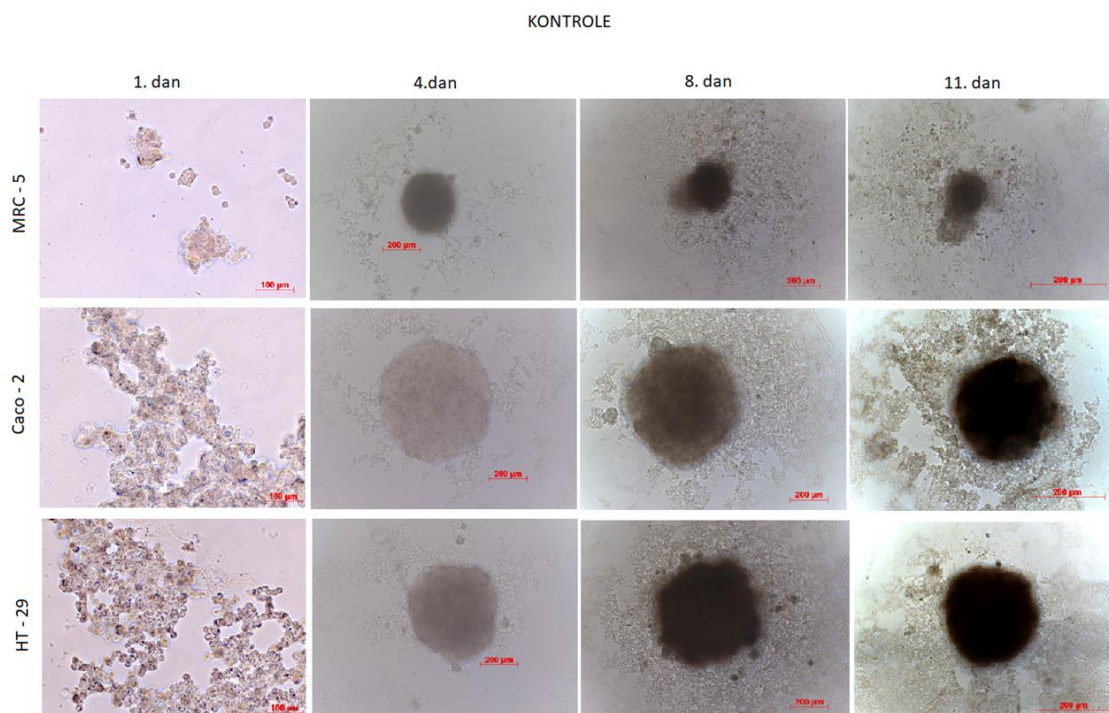
Slika 6. Protutumorski učinak bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline na 3D modelu. MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) (A) i 6 dana (višekratno) (B) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na a) kontrolne stanice; b) koncentracije (1×10^{-5} mol/dm³; 1×10^{-6} mol/dm³); c) vremenske tretmane (3 i 6 dana)

5. REZULTATI

5.2. Formiranje sferoida različitih staničnih linija

Uzgoj i formiranje sferoida triju staničnih linija (Caco-2, HT-29, MRC-5) praćen je tijekom 11 dana. Sferoidi su bili izloženi djelovanju kompleksa bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilna kiselina koji je dodan u dvije različite koncentracije (1×10^{-5} mol/dm³ i 1×10^{-6} mol/dm³) u ponovljenoj aplikaciji s vremenskim odmakom od 72 sata (8. i 11. dan).

Uzgojem staničnih sferoida na agaroznom nosaču uočeno je spontano agregiranje stanica u nepravilne nakupine već prvi dan kultivacije. Unutar takvih ranih sferoida mogu se vidjeti pojedinačne stanice. Četvrtog dana uzgoja, sve stanične linije poprimaju okrugle stanične forme. Caco-2 stanična linija i HT-29 stanična linija u kulturi rastu kompaktno u pravilnom okruglom obliku te zadržavaju takvu formaciju tijekom cijelog perioda kultiviranja. Zadnji dan promatranja razvoja sferoida, vidljivo je da su stanice Caco-2 i HT-29 stvorile podjednako velike sferoide na agaroznom nosaču, dok MRC-5 stanice najslabije rastu, tvoreći najmanje sferoide. Nakon jedanaestog dana na MRC-5 stanicama vidljiva je djelomična degradacija sfere (Slika 7).

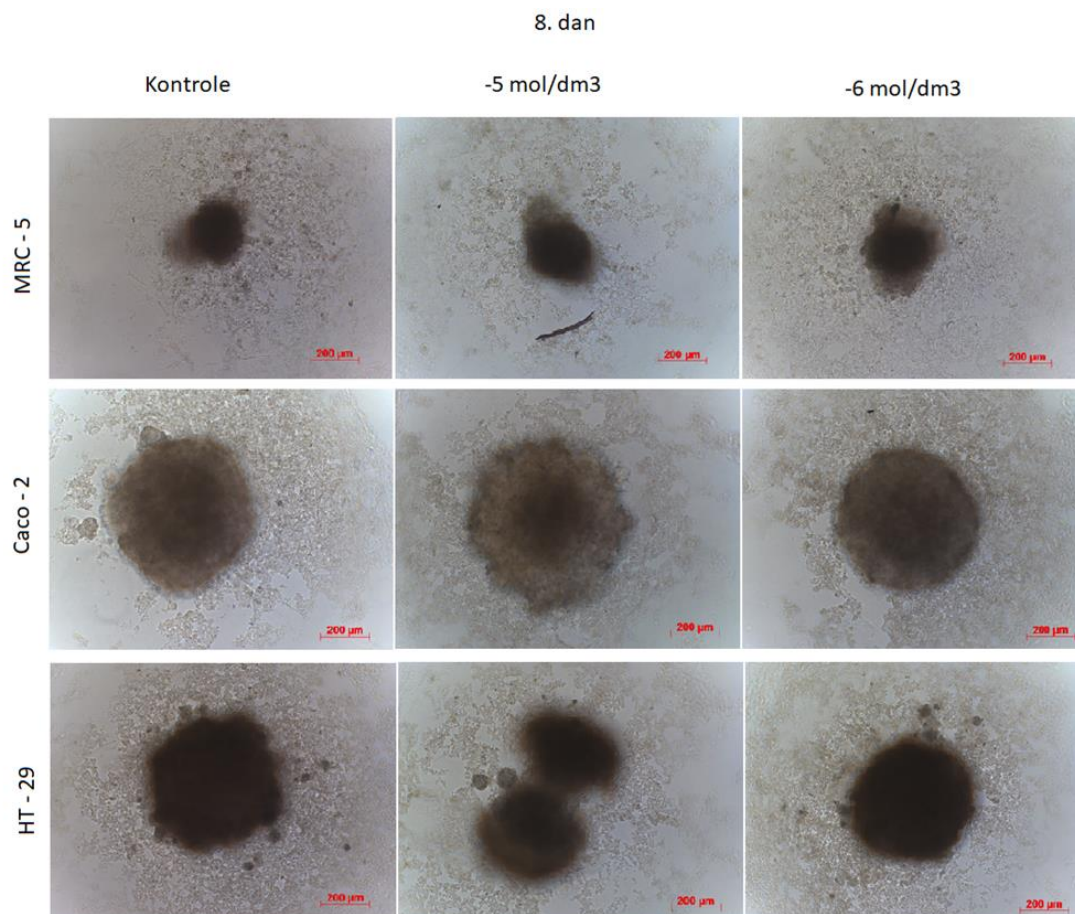


Slika 7. Uzgoj i formiranje sferoida različitih staničnih linija tijekom 11 dana. Formiranje sferoida fotografirano je svakih 72 sata na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu.

Povećanje 100x.

5. REZULTATI

Nakon jednokratnog tretmana (8. dan) ispitivanim kompleksom, većina staničnih linija tvorila je jedan samostalan sferoid, osim HT-29 stanične linije pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ kod koje je uočena podjela nastalog sferoida na dva podjednaka dijela. Kod Caco-2 stanične linije, pri svim ispitivanim koncentracijama, uočeni su sferoidi manje gustoće u odnosu na ostale stanične linije (Slika 8).



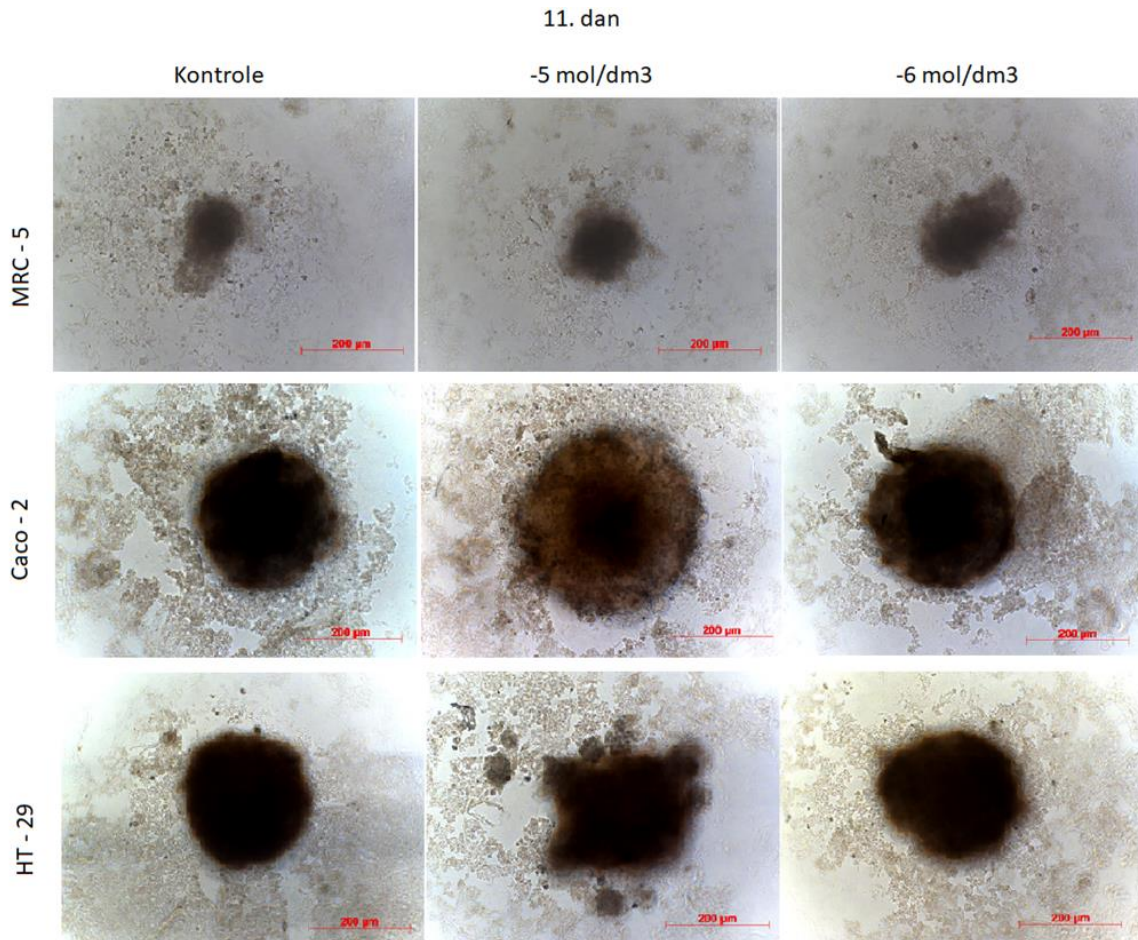
Slika 8. Izgled sferoida nakon jednokratnog izlaganja djelovanju bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline. Kompleks je dodan u dvije različite koncentracije (1×10^{-5} mol/dm³ i 1×10^{-6} mol/dm³). Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu.

Povećanje 100x.

Nakon višekratnog tretmana (11. dan) ispitivanim kompleksom, vidljivo je kako većina staničnih linija tvori jedan samostalan sferoid. Sferoidi MRC-5 stanične linije najmanje su veličine u usporedbi s ostalim promatranim staničnim linijama. Vidljivi su nepravilni rubovi. Kod HT-29 stanične linije pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ ispitivanog kompleksa, uočena

5. REZULTATI

je degradacija sferoida. Primijećeno je da stanice pri toj koncentraciji stvaraju više manjih sfera uz središnju najveću (Slika 9).



Slika 9. Izgled sferoida nakon višekratnog izlaganja djelovanju bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline. Kompleks je dodan u dvije različite koncentracije ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ i $1 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) u ponovljenoj aplikaciji s vremenskim odmakom od 72 sata. Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu. Povećanje 100x.

5.3. Određivanje ukupnog i reduciranog glutationa u MRC-5 i Caco-2 stanicama

Stanice MRC-5 i Caco-2 bile su izložene djelovanju bakrovog (II) nitrata kompleksiranog s kromon-2-karboksilnom kiselinom ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) u vremenskom periodu od 24 sata s ciljem određivanja ukupnog i reduciranog glutationa. Razina reduciranog glutationa kod MRC-5 stanične linije za kontrolni uzorak bila je $0,318 \mu\text{g}$, a za tretman $0,493 \mu\text{g}$. Razina ukupnog glutationa za kontrolni uzorak bila je $80,04 \text{ ng}$, a za tretman $104,5 \text{ ng}$. Kod

5. REZULTATI

Caco-2 stanične linije razina glutaciona nije se mogla odrediti. Daljnja statistička obrada nije bila moguća s obzirom da se vrijednosti glutaciona kod normalne i tumorske stanične linije nisu mogle usporediti (Tablica 1).

| <i>Glutation</i> | | | | |
|------------------------|------------------|------------------|-----------------|---------|
| | <i>MRC-5</i> | | <i>Caco-2 *</i> | |
| | kontrola | tretman | kontrola | tretman |
| <i>reducirani (μg)</i> | 0,318 (0,072) | 0,493 (0,056) | / | / |
| <i>ukupni (ng)</i> | 80,04 (11,3) | 104,5 (15,2) | / | / |

* vrijednosti u Caco-2 staničnoj liniji nije bilo moguće očitati odabranim testom

Tablica 1. Sadržaj ukupnog i reduciranog glutaciona u MRC-5 i Caco-2 stanicama 24 sata nakon izlaganja kompleksa bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilna kiselina. Vrijednost glutaciona je prikazana aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom tri biološke i 6 tehničkih replika.

6. RASPRAVA

Kolorektalni karcinom treći je najčešći karcinom u svijetu. Treći je najčešći karcinom po učestalosti u muškaraca i drugi najčešći karcinom u žena. U 2020. godini bilo je više od 1,9 milijuna novih slučajeva kolorektalnog karcinoma (31). Zbog stalno rastuće pojavnosti, kolorektalni karcinom postaje sve važniji dijagnostički i terapijski problem.

Dosadašnje liječenje karcinoma baziralo se na korištenju kemoterapeutika. Međutim, uspješnost spojeva na bazi platine, koji su jedan od najčešćih kemoterapeutika, ograničena je zbog njihove opće toksičnosti i česte pojave otpornosti karcinoma na takvu terapiju (3,4). Stoga se, u posljednje vrijeme, pažnja usmjerava na istraživanje novih selektivnijih i učinkovitijih lijekova. U sklopu istraživanja novih spojeva, pažnja je okrenuta na organometalne spojeve na bazi različitih metala koji nude nove mogućnosti u dizajnu protutumorskih lijekova. Biološka aktivnost takvih spojeva jako ovisi o prirodi liganda te su mnoga današnja istraživanja usmjerena na metalne komplekse s biološki važnim ligandima u svrhu proširenja spektra djelovanja.

Jedan od značajnih metala bez kojih naš organizam ne može jest bakar. Sposobnost prijelaza između (+1) i (+2) oksidacijskog stanja jedna je od značajki koje bakru omogućuju formiranje različitih spojeva odnosno kompleksa uključujući i potencijalne protutumorske lijekove budućnosti. Toksičnost bakra rezultat je njegovih redoks kapaciteta (interkonverzija redoks stanja Cu (I) i Cu (II) u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama), svojstva istiskivanja drugih iona s veznih mjesta enzima, visokog afiniteta vezanja za DNA i sposobnosti poticanja prekida lanca DNA molekule. U većini slučajeva, bakar modificira okosnicu kompleksiranog liganda i daje bolji afinitet, specifičnost i stabilnost DNA. Promjena oksidacijskog stanja povezuje se s citotoksičnošću do sada sintetiziranih bakrenih kompleksa koji su ispitani *in vitro* i *in vivo* na panelu različitih staničnih linija poput Hela, HT1080, SW872, MCF – 7, A 549, Hep-G2; HL-60, normalni humani fibroblasti (32). Općenito, toksični učinak bakrenih kompleksa se povezuje s indukcijom stanične smrti aktivacijom apoptoze ili nekroze što je utvrđeno za bakrene komplekse s fenantrolinom (33 - 38). Također je utvrđena i povezanost indukcije apoptoze za bakreni kompleks koji djeluje na proteasom (32, 39, 40). Bakreni kompleksi s tiosemikarbazonским derivatima i polidentantnim ligandima - donorima N/O/P dovode do produkcije ROS-a i oksidacije glutationa (41), odnosno djeluju tako da uzrokuju oksidativni stres u stanici (42). 2000. godine prvi se puta u literaturi pojavljuje pojam „neapoptotskog puta programirane stanične smrti“ ili paraptoza kao alternativnog načina

Biološka aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom 22

6. RASPRAVA

djelovanja na tumorske stanice (43) i sve veći broj istraživanja bakrenih kompleksa koji pokazuju citotoksičnu aktivnost usmjerava se na istraživanje neapoptotskog puta stanične smrti (44 - 48) u kombinaciji s produkcijom reaktivnih kisikovih / dušikovih vrsta. Glutation je tripeptid (gly-cys-glu) prisutan u milimolarnim količinama unutar stanice. Njegova raspodjela određuje ispravan redukcijski okoliš za stanične organele (49). Kao dio unutarstanične antioksidativne obrane, cisteinski ostatak glutaciona oksidira se u disulfid stvarajući oksidirani GSH (GSSG) u prisutnosti oksidirajućih sredstava. Povratno, glutation reduktaza prevodi GSSG u GSH i održava redoks ravnotežu sustava. Uz to, s obzirom na visok afinitet tiolnih skupina za Cu (I) i s obzirom na visoku koncentraciju GSH u citosolu, GSH također ima ulogu unutarstaničnog pratioca u razvoju bakrenih kompleksa s protutumorskim karakteristikama. Promijenjeni metabolizam stanica raka i različita reakcija između normalnih i tumorskih stanica na opterećenje bakrom mogu otvoriti put uspjehu strategija protiv raka temeljenih na bakrenim kompleksima. Ligand koji se kompleksira s bakrenim ionom doprinosi ukupnoj učinkovitosti bakrenog kompleksa budući da može modulirati ciljanje i svojstva toksičnosti metala: donorski ligandi sumpora i fosfora stabiliziraju Cu (I), dok donorski ligandi dušika i kisika preferirano stabiliziraju Cu (II). Dodatno, ligand znatno utječe na lipofilnu / hidrofилnu prirodu nastalog kompleksa i može odrediti njegovu topljivost u izvanstaničnim tekućinama kao i sposobnost prolaska kroz lipidni dvosloj stanične membrane (50).

Naše istraživanje na 3D modelu uzgoja staničnih sferoida pokazalo je citotoksični učinak novog bakrenog kompleksa, konkretno bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline, na trima staničnim linijama (Caco-2, HT-29, MRC-5). MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) i 6 dana (višekratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da ispitivani kompleks pokazuje različito citotoksično djelovanje na testirane stanične linije. Veća citotoksičnost kompleksa je utvrđena za tumorske stanične linije Caco-2 i HT – 29, u odnosu na MRC-5. Najjači inhibicijski učinak kompleks je imao na HT-29 staničnu liniju nakon jednokratnog tretmana pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³ inhibirajući stanični rast za oko 80 %. Zanimljivo je da ispitivani kompleks nije pokazao značajan citotoksični učinak na normalnoj staničnoj liniji MRC-5 ni u jednoj vrsti tretmana, ni pri jednoj koncentraciji, što ukazuje na njegovu selektivnu aktivnost. Slično, nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da Cu (II) kompleksi 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin i 1,10-fenantrolin ligandima pokazuju učinkovitost u supresiji staničnog rasta staničnih linija kolorektalnog karcinoma, HT-29, LS174T i Caco-2 (29). Dobiveni rezultati su u suglasnosti s literaturom (32), štoviše, čini se da u različitim tumorskim staničnim linijama, u našem slučaju

6. RASPRAVA

maligne stanice adenokarcinoma debelog crijeva, postoji korelacija između nakupljanja bakra u stanicama i osjetljivosti na metalni kompleks. U nekim tumorskim staničnim linijama dolazi do nakupljanja bakra jer te stanice imaju promijenjenu sposobnost eliminacije bakra te dolazi do njegovog nakupljanja i posljedično toksičnog učinka (32).

Vrijeme izlaganja, primijenjena koncentracija i model aplikacije (jednokratni – višekratni tretman) upućuju da je za ispitivani kompleks dostatna jednokratna aplikacija u koncentraciji 1×10^{-5} mol/dm³ kako bi se postigla visoka učinkovitost supresije staničnog rasta Caco-2 i HT-29 stanica. Rast i formiranje sfera i njihovo ponašanje u prisutnosti bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline, praćen je vizualno, uzgojem sfera na agaroznom nosaču. S obzirom na dobivene rezultate, vidljivo je da ne postoji velika razlika u izgledu formiranih sfera. Najveća razlika koja se uočava je veličina nastale sfere. MRC-5 (normalni fibroblasti) sfere su manje i sporije rastu u odnosu na Caco-2 i HT-29 sfere koje su dvostruko veće budući da je vrijeme diobe malignih stanica kraće u odnosu na fibroblaste. Kod gotovo svih staničnih linija, pri objema ispitivanim koncentracijama, nakon oba provedena tretmana, nastale su okrugle sferoide strukture. HT-29 stanična linija pokazala je nepravilan rast pri većoj koncentraciji ispitivanog kompleksa nakon oba tretmana, što je vrlo vjerojatno u korelaciji s visokim citotoksičnim djelovanjem ispitivanog kompleksa utvrđenog MTT testom (80 % inhibicija).

Zadnji dio istraživanja odnosio se na određivanje koncentracije glutaciona. Razina reduciranog i ukupnog glutaciona određena je nakon 24-satne izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Kod MRC-5 stanične linije uočena je viša razina reduciranog glutaciona u odnosu na ukupni glutacion, što je dobar pokazatelj zdravlja stanice, s obzirom da bi se u zdravim stanicama više od 90 % ukupnog glutaciona trebalo nalaziti u reduciranom obliku (51). Kod Caco-2 stanične linije razina glutaciona nije se mogla odrediti odabranim setom kemikalija. Usljed navedenog, statistička usporedba vrijednosti glutaciona kod normalne i tumorske stanične linije nije bila moguća.

Rezultati provedenog istraživanja citotoksične aktivnosti bakrenog kompleksa bakar (II) nitrat - kromon-2-karboksilne kiseline upućuju na potrebu za daljnjim istraživanjem njegove biološke aktivnosti i potencijalnog mehanizma djelovanja s naglaskom na redukciji glutaciona i mogućoj paraptosi kao puta stanične smrti.

7. ZAKLJUČAK

- Ispitivani kompleks pokazuje protutumorsku aktivnost na sve stanične linije pri čemu je kombinacija jednokratnog tretmana i više koncentracije ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) pokazala najbolju učinkovitost u zaustavljanju rasta malignih staničnih linija.
- Veća citotoksičnost uočena je na tumorskim stanicama Caco-2 i HT-29 u odnosu na normalnu staničnu liniju MRC-5.
- Najučinkovitiju antitumorsku aktivnost kompleks je pokazao na HT-29 staničnoj liniji nakon jednokratnog tretmana pri koncentraciji od $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$.
- Ispitivani kompleks nije pokazao značajan citotoksični učinak na normalnoj staničnoj liniji MRC-5 ni u jednoj vrsti tretmana, ni pri jednoj koncentraciji.
- Kompleks bakar (II) - nitrat - kromon-2-karboksilna kiselina selektivno djeluje na tumorske uz poštediti učinak na normalne stanice.
- Kod MRC-5 stanične linije uočena je viša razina reduciranog glutationa u odnosu na ukupni glutation.

8. SAŽETAK

Uvod: Zbog stalno rastuće pojavnosti, kolorektalni karcinom postaje sve važniji dijagnostički i terapijski problem. To zahtijeva otkrivanje novih lijekova koji bi utjecali na njegovu smanjenu pojavnost i mogućnost izlječenja. Pažnja se sve više usmjerava na organometalne spojeve koji se ističu svojom antiproliferativnom aktivnošću prema kolorektalnom karcinomu.

Ciljevi: Ispitati antitumorsku aktivnost Cu (II) koordinacijskog kompleksa s kromon-2-karboksilnom kiselinom na uzgojene sferoide te utvrditi postoji li razlika u učinku kompleksa na tumorske Caco-2 i HT-29 sfere u odnosu na normalne MRC-5 sfere. Izmjeriti količinu glutaciona u stanicama kao pokazatelja antioksidativnog djelovanja ispitivanog Cu (II) kompleksa.

Materijali i metode: Spoj koji se koristi u istraživanju jest Cu (II) koordinacijski kompleks s kromon-2-karboksilnom kiselinom. Kompleks je sintetiziran na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera Osijek. Antitumorsko djelovanje ispitivanog kompleksa ispitano je MTT testom na 3D uzgojenim sferama. Antioksidativno djelovanje ispitivanog kompleksa određeno je mjerenjem glutaciona.

Rezultati: Ispitivani kompleks pokazuje protutumorsku aktivnost na sve stanične linije pri čemu je kombinacija jednokratnog tretmana i više koncentracije (1×10^{-5} mol/dm³) pokazala najbolju učinkovitost u zaustavljanju rasta malignih staničnih linija. Najučinkovitiju antitumorsku aktivnost kompleks je pokazao na HT-29 staničnoj liniji nakon jednokratnog tretmana pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol/dm³. Ispitivani kompleks nije pokazao značajan citotoksični učinak na normalnoj staničnoj liniji MRC-5 ni u jednoj vrsti tretmana, ni pri jednoj koncentraciji. Kod MRC-5 stanične linije uočena je viša razina reduciranog glutaciona u odnosu na ukupni glutation.

Zaključak: Ispitivani Cu (II) kompleks smanjuje rast tumorskih stanica.

Ključne riječi: antioksidativnost; citotoksičnost; 3D kultura stanica

9. SUMMARY

Biological activity of Cu (II) coordination complex with chromone-2-carboxylic acid

Introduction: Due to the constantly growing incidence, colorectal cancer is becoming an increasingly important diagnostic and therapeutic problem. This requires the discovery of new drugs that would affect its reduced incidence and the possibility of cure. Today, attention is increasingly focused on organometallic compounds that stand out for their antiproliferative activity against colorectal cancer.

Objective: To test the antitumor activity of the Copper (II) coordination complex with chromone-2-carboxylic acid on cultured spheroids and to determine whether there is a difference in the effect of the compound on tumor Caco-2 and HT-29 spheres compared to normal MRC-5 spheres. Measure the amount of glutathione in the cells as an indicator of the antioxidant effect of the examined Cu (II) complex.

Materials and methods: The compound used in the research is a Copper (II) coordination complex with chromone-2-carboxylic acid. The complex was synthesized at the Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University Osijek. The antitumor activity of the tested compound was tested by MTT test on 3D cultured spheres. The antioxidant activity of the tested compound was determined by measuring glutathione.

Results: The tested complex shows anti-tumor activity on all cell lines, whereby the combination of a single treatment and a higher concentration ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) showed the best effectiveness in stopping the growth of malignant cell lines. The complex showed the most effective antitumor activity on the HT-29 cell line after a single treatment at a concentration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. The tested complex did not show a significant cytotoxic effect on the normal cell line MRC-5 in any type of treatment, at any concentration. In the MRC-5 cell line, a higher level of reduced glutathione compared to total glutathione was observed.

Conclusion: Copper (II) complex reduce the growth of tumor cells.

Key words: antioxidant activity; cytotoxicity; 3D cell culture

10. LITERATURA

1. Joseph R D, i sur. Copper and copper alloys. ASM international, 2001. 3-4.
2. Tapiero H, Townsend DÁ, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. Biomed. Pharmacother. 2003;57(9):386-398.
3. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin. Chem. Res. Toxicol. 2019;32(8):1469-1486.
4. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Bioorg. Chem. 2019;88: 102925.
5. Rostas AM, Badea M, Ruta LL, Farcasanu IC, Maxim C, Chifiriuc MC, i sur. Copper (II) complexes with mixed heterocycle ligands as promising antibacterial and antitumor species. Molecules. 2020;25(17):3777.
6. Hangan A, Vicas LG, Stan RL, Pall E, Oprean LS, Ionescu CML, i sur. Synthesis, characterization and biological activity of two new Copper (II) complexes with N-sulfonamide ligand. Rev. Chim. 2019;70:4060-4067.
7. Pal A. Tissue or Cell Cultures. In Protocols in Advanced Genomics and Allied Techniques. Springer. 2022;211-220.
8. Sharma AK, Singh AK, Kumar S. An Introduction to Cell Culture. In Clinical Biochemistry and Drug Development. AP. 2020;1-5.
9. Srisongkram T. Basic principles and applications of animal cell culture in pharmaceutical sciences. 2022.
10. Niehues H, Jansen PA, Rodijk-Olthuis D, Rikken G, Smits JP, Schalkwijk J, i sur. Know your enemy: Unexpected, pervasive and persistent viral and bacterial contamination of primary cell cultures. Exp. Dermatol. 2020;29(7):672-676.

10. LITERATURA

11. The Editors of Invitrogen. Cell culture basics. Dostupno na adresi:
<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. Datum pristupa: 10.8.2022.
12. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, i sur. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *AMS*. 2018;14(4):910-919.
13. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon F. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J Cell Physiol*. 2014;230(1):16-26
14. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, i sur. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci. Rep*. 2016;6(1):1-11.
15. Godugu C, Patel AR, Desai U, Andey T, Sams A, Singh M. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PloS one*. 2013;8(1):e53708.
16. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, i sur. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front. Physiol*. 2020;11:694.
17. Domka K, Goral A, Firczuk M. cROSSing the line: between beneficial and harmful effects of reactive oxygen species in B-cell malignancies. *Front. Immunol*. 2020;11:1538.
18. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2006;50-75.

10. LITERATURA

19. Ifeanyi OE. A review on free radicals and antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.* 2018;4(2):123-133.
20. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Med. Flum.* 2007;43(2.):84-93.
21. Poljšak B, Fink, R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014.
22. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;17(3):235-248.
23. Yan Z, Spaulding HR. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. *Redox Biol.* 2020;32:101508.
24. Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad F K, Ciarcia G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front. Endocrinol.* 2014;5:56.
25. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. *Biomolecules.* 2020;10(10):1429.
26. Circu ML, Yee Aw T. Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 2008;42(8):689-706.
27. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/>. Datum pristupa: 24.8.2022.
28. Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom. *Medicus*, 15(1_Gastroenterologija). 2006;89-97.

10. LITERATURA

29. Ruiz MC, Perelmutter K, Levín P, Romo AI, Lemus L, Bollati-Fogolín M, i sur. Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharm Sci.* 2022;169:106092.
30. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12827.
31. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl. Oncol.* 2021;14(10):101174.
32. Tardito S, Luciano M. Copper Compounds in Anticancer Strategies. *Curr. Med. Chem.* 2009;16:1325-1348.
33. Sigman DS, Graham DR, D'Aurora V, Stern, AM. Oxygendependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* 1979;254:12269-12272.
34. Que BG, Downey KM, So AG. Degradation of deoxyribonucleic acid by a 1,10-phenanthroline-copper complex: the role of hydroxyl radicals. *Biochem.* 1980;19:5987-5991.
35. Sigman DS. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. *Acc. Chem. Res.* 1986;1:180-186.
36. Dizdaroglu M, Aruoma OI, Halliwell B. Modification of bases in DNA by copper ion-1,10-phenanthroline complexes. *Biochem.* 1990;29:8447-8451.
37. Tsang SY, Tam SC, Bremner I, Burkitt MJ. Copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical. *Biochem. J.* 1996;317:13-16.

10. LITERATURA

38. Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D. Novel copper (II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J. Med. Chem.* 2008;51:470-478.
39. Daniel KG, Chen D, Yan B, Dou QP. Copper-binding compounds as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer. *Front Biosci.* 2007;12:135-144.
40. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2004;67:1139-1151.
41. Saryan LA, Mailer K, Krishnamurti C, Antholine W, Petering DH. Interaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone copper (II) with Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1981;30:1595-1604.
42. Zhang Y. Cell toxicity mechanism and biomarker. *CLIN TRANSL MED.* 2018;7(1):1-6.
43. Sperandio S, de BI, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:14376-14381.
44. Abraham MC, Lu Y, Shaham S. A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell.* 2007;12:73-86.
45. Asare N, Landvik NE, Lagadic-Gossmann D, Rissel M, Tekpli X, Ask K, i sur. 1-Nitropyrene (1-NP) induces apoptosis and apparently a non-apoptotic programmed cell death (paraptosis) in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;230:176-185.
46. Jadus MR, Chen Y, Boldaji MT, Delgado C, Sanchez R, Douglass T, Al-Atar U, Schulz W, Lloyd C, Wepsic HT. Human U251MG glioma cells expressing the

10. LITERATURA

membrane form of macrophage colony-stimulating factor (mM-CSF) are killed by human monocytes in vitro and are rejected within immunodeficient mice via paraptosis that is associated with increased expression of three different heat shock proteins. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:411-420.

47. Rao RV, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row R. H, del RG, i sur. Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 2004;279:177-187.
48. Sperandio S, Poksay K, de BI, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* 2004;11:1066-1075.
49. Gad SC. Glutathione, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 2014.
50. Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 2008;4:176-185.
51. Bioterra - trgovina zdravog življenja. Glutation - najmočniji antioksidans. Dostupno na adresi: <https://bioterra.hr/blog-zdravog-zivljenja/zdrav-zivot/glutation-najmocniji-antioksidans>. Datum pristupa: 11.9.2022.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonela Jeleč

Datum rođenja: 17. travnja 1998.

Adresa: Livana, Cvjetna 15, 31431 Čepin

E-mail: antonelajelec@gmail.com

Obrazovanje:

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

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

2020. - 2022. Diplomski sveučilišni 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)

2020. - 2021. volontiranje - drive-in uzimanje uzoraka za PCR i antigensko testiranje, Dom zdravlja Osječko baranjske županije, Park Kralja Petra Krešimira IV/6, 31000 Osijek