

Učinkovitost novih bakar (II) spojeva kompleksiranih s kromon-2- karboksilnom kiselinom na proliferaciju malignih stanica in vitro

Vukovac, Antonio

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:812758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

Antonio Vukovac

UČINKOVITOST NOVIH BAKAR (II)
SPOJEVA KOMPLEKSIRANIH S
KROMON-2-KARBOKSILNOM
KISELINOM NA PROLIFERACIJU
MALIGNIH STANICA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2022.

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

Antonio Vukovac

UČINKOVITOST NOVIH BAKAR (II)
SPOJEVA KOMPLEKSIRANIH S
KROMON-2-KARBOKSILNOM
KISELINOM NA PROLIFERACIJU
MALIGNIH STANICA *IN VITRO*

Završni 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 24 stranice, 6 slika i 1 tablicu.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na predloženoj temi, pruženoj prilici za suradnju tijekom izrade završnog rada te potpori mojemu stručnom i znanstvenom usavršavanju. Hvala na strpljenju, svim savjetima i odgovorima na sva moja pitanja koja sam imao prilikom pisanja ovoga rada, a bila su itekako ključna za realizaciju ovog rada.

Zahvaljujem i višoj tehničarki Ivani Jelavić, univ.bacc.med.lab.diagn., na prenesenim praktičnim i teorijskim znanjima i vještinama 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 Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na prenesenim vještinama i znanjima tijekom preddiplomskog studija, a posebice na suradnji tijekom pisanja rada.

Veliko hvala bratu, sestri i prijateljima koji su mi bili oslonac i podrška sve ove godine studiranja i zajedno sa mnom prolazili svaki moj pad i uspon.

Na kraju, najveću zahvalu dugujem mojim predivnim roditeljima što su mi omogućili nesmetano školovanje i što su mi u ključnim trenucima bili najveća potpora. Bez njih ovo ne bi bilo moguće i zbog njih ne bih bio ovo što danas jesam!

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Bakar.....	1
1.2	Kromon-2-karboksilna kiselina	2
1.3	Stanične kulture i uzgoj <i>in vitro</i>	2
1.3.1	Stanične kulture.....	2
1.3.2	<i>In vitro</i> uzgoj stanica.....	4
1.4	Tumorske stanice i uzroci nastanka.....	4
1.4.1	Tumorske stanice.....	4
1.4.2	Karcinogeneza.....	5
1.5	Metode određivanja citotoksičnosti.....	6
1.5.1	Stanični testovi citotoksičnosti.....	6
1.5.2	Redukcija tetrazolijumom – MTT test	6
2	HIPOTEZA	7
3	CILJEVI	8
4	MATERIJALI I METODE	9
4.1	Ustroj rada	9
4.2	Materijali	9
4.2.1	Ispitivani spojevi	9
4.2.2	Stanične linije.....	10
4.3	Metode.....	10
4.3.1	Uzgoj i održavanje staničnih kultura <i>in vitro</i>	10
4.3.2	Određivanje živih stanica u kulturi	10
4.3.3	Procjena proliferacijske aktivnosti MTT testom.....	11
4.4	Statističke metode.....	12
5	REZULTATI	13
6	RASPRAVA	17
7	ZAKLJUČAK	19
8	SAŽETAK	20
9	SUMMARY	21
10	LITERATURA	22
11	ŽIVOTOPIS	24

POPIS KRATICA

ATP – adenzin trifosfat

DMEM – Dulbecov modificirani medij (*engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid*)

EBV – Epstein-Barrov virus

FBS – fetalni goveđi serum (*engl. fetal bovine serum*)

HBV – virus hepatitisa B

HCV – virus hepatitisa C

HTLV – ljudski T stanični limfotropni virus

M – mol/dm³

MEM – Minimalni esencijalni medij (*engl. Minimal Essential Medium*)

MTT – test citotoksičnosti *in vitro* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)

PBS – fosfatom puferirana otopina soli (*engl. Phosphate-buffered saline*)

RNA – ribonukleinska kiselina (*engl. ribonucleic acid*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (*engl. reactive oxygen species*)

RPMI 1640 – (*engl. Roswell Park Memorial Institute 1640*) medij

UV – ultraljubičasto zračenje

1 UVOD

1.1 Bakar

Bakar je kemijski element 11. skupine i 4. periode periodnog sustava elemenata. Na temelju položaja unutar istog pripada prijelaznim metalima i nosi oznaku Cu. Atomski mu je broj 29, dok mu atomska masa iznosi 63,546. Ime mu potječe od latinskog naziva za otok Cipar koji glasi Cyprium. Bakar je metal crvenkaste boje čija gustoća iznosi $8,92 \text{ g/cm}^3$, a talište $1084,62^\circ\text{C}$. Iako ga je u prirodi moguće naći u njegovom elementarnom stanju, daleko češće se on nalazi i dobiva iz spojeva kao što su halkopirit (CuFeS_2), kuprit (Cu_2O) i ostali (1). S biološke i medicinske strane bakar je značajan kao esencijalni element prisutan u tragovima u svim tkivima humanog organizma. Nezaobilazna je komponenta metaloenzima poput citokrom c oksidaze, tirozinaze i Zn-Cu superoksid dismutaze, enzima koji sudjeluju u reakcijama oksido redukcije. U tim reakcijama bakar mijenja svoj oksidacijski status od (+I) do (+II) oksidacijskog stanja. Važnost bakrenih iona u ljudskom organizmu otkrivena je davne 1928. godine nakon istraživanja provedenog na laboratorijskim štakorima koji su razvili anemiju zbog nedostatka bakra u hrani koju su konzumirali (2). Nedostane količine bakra u ljudskom organizmu prvenstveno dovode do pojave anemije, abnormalnosti u strukturi kostiju i promjenama u imunološkom sustavu. Preporučeni dnevne količine bakra su od 0,9 do 3,0 mg/dan uz izmjerenu koncentraciju u serumu od 1,0 mg/L (3). Deficit bakra u ljudskom organizmu rezultira iscrpljenošću, učestalim prehladama, krhkim kostima te problemima s pamćenjem. S druge strane, povišena koncentracija bakra u organizmu je toksična, jer proizvodi reaktivne kisikove vrste (ROS od engl. *reactive oxygen species*) koje izravno cijepaju nukleinske kiseline (deoksiribonukleinska - DNA i ribonukleinska kiselina - RNA). Upravo navedene spoznaje o djelovanju bakrenih iona u organizmu dovele su do potrebe za istraživanjem raznih bakrenih kompleksa ispitivanjem *in vitro* i *in vivo* na laboratorijskim miševima. Rezultati su uputili na antitumorska djelovanja bakrovih kompleksa dovodeći do inhibiciji rasta malignih stanica kao i inhibiciju angiogeneze. Antitumorsko djelovanje bakrovih kompleksa primarno se povezuje s sposobnošću izazivanja oksidativnog stresa, ali novija istraživanja upućuju na sposobnost bakrovih kompleksa da inhibiraju proteosoma i/ili aktiviraju paraapoptotske putove programirane stanične smrti (2). Osim toga antitumorsko djelovanje vidljivo je i u mogućnosti da kompleksi koji služe za izdvajanje bakra poput trientina, D-penicilamina te

UVOD

tetratiomolibdata, osim što se primjenjuju u liječenju Wilsonove bolesti, u velikoj mjeri se primjenjuju kao blokatori novih krvnih žila što posljedično uzrokuje smanjenu angiogenezu i smanjenje veličine tumora (2).

Bakar se može pronaći u različitim oksidacijskim stanjima i oni variraju od (+I) do (+IV) i jedini je element prve prijelazne serije metala d-bloka kojemu je oksidacijsko stanje (+I) stabilno. Rijetko se nalazi u obliku Cu (III) ili Cu (IV), dok je najstabilniji njegov Cu (II) ion koji stvara komplekse sa raznim ligandima i pri tome, najčešće, ima koordinacijski broj 4 (4).

1.2 Kromon-2-karboksilna kiselina

Kromon-2-karboksilna kiselina je karboksilna kiselina koja nosi molekulsku formulu $C_{10}H_6O_4$. U sistemskoj klasifikaciji Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (*engl. The international union of Pure and Applied Chemistry-IUPAC*) nosi naziv 4-oksokromen-2-karboksilna kiselina. Tali se pri temperaturi od $260^{\circ}C$, a molekulska masa joj iznosi 190,15 g/mol. Ovaj je spoj zapravo vaskularni zaštitni agens koji se koristi u liječenju venskih poremećaja i mikrovaskularnih bolesti. Peroralno liječenje štakora ovom kiselinom pokazalo je značajno smanjenje degradacije stijenke krvnih žila intravenskom kolagenazom. Liječenje ovim spojem dovodi do manjeg povećanja propusnosti krvno-moždane barijere, kraćeg vremena oporavka, niže razine hidroksiprolina u cerebrospinalnoj tekućini i manjeg smanjenja sadržaja kolagena u bazalnoj lamini moždanih kapilara. Učinkovitiji je od vitamina C u prevenciji oksidacije glutationa u krvi (5).

1.3 Stanične kulture i uzgoj *in vitro*

1.3.1 Stanične kulture

U današnje suvremeno doba, nezaobilazan pristup sveobuhvatnom proučavanju i ispitivanju stanica predstavljaju stanične kulture. Sama njihova povijest seže u 1907. godinu kada je Ross Harrison prvi puta uspio izolirati i kultivirati živčano vlakno iz žabljeg embrija. Po definiciji, stanične kulture predstavljaju rast, odnosno uzgajanje stanica u strogo kontroliranim, umjetnim

UVOD



Slika 1. CO₂ inkubator za uzgoj staničnih kultura u optimalnim uvjetima . Izvor: Osobna galerija autora završnog rada

uvjetima (6). Da bi stanica mogla rasti kao kultura, prvi korak u cijelom ovom složenom procesu predstavlja izolacija samih stanica koje želimo kultivirati. Stanici je, da bi mogla normalno rasti i razvijati se, potrebno osigurati odgovarajući medij koji sadrže osnovne esencijalne hranjive tvari poput aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i minerala uz održavanje strogo kontroliranih uvjeta kao što su pH, tlak i temperatura (7). Takvi se uvjeti održavaju inkubacijom u inkubatoru (Slika 1). Najpoznatiji medij koji je danas u najčešćoj uporabi je MEM (engl. *Minimal Essential Medium*) i njegova modifikacija po Dulbeccu (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM) za adherentne te RPMI 1640 za stanice u suspenziji i adherentne stanične linije. Od posebne je važnosti pri radu sa staničnim kulturama osigurati sterilnost rada sa što manje kontaminacija, a važan faktor u ostvarenju toga čini kabinet sa laminarnim protokom zraka. Kontaminacija je smanjena podešenim strujanjem zraka kroz ugrađene HEPA filtere, a neposredno prije i nakon rada, prostor se sterilizira UV zračenjem. Osobna se zaštita postiže nošenjem odgovarajuće laboratorijske odjeće, obuće, zaštitnih rukavica i naočala po potrebi.

UVOD

1.3.2 *In vitro* uzgoj stanica

Primarnom staničnom kulturom označavamo onu kulturu stanica koja je kultivirano neposredno nakon njene izolacije. Takve stanice imaju ograničen broj dioba i posljedično tome ograničenog su životnog vijeka. Te je stanice moguće subkultivirati, odnosno prenijeti ih u novu posudu sa medijem u kojoj će iste nastaviti rasti. Također su i ove stanice ograničenog životnog vijeka i broja dioba. Razlog ograničenog broja dioba leži u telomerama. Naime, krajnji dijelovi kromosoma, telomere, svakom se diobom skraćuju i u onom trenu kada dosegnu kritičnu duljinu pokreću apoptotske procese koji rezultiraju apoptozom, odnosno programiranom smrću tih stanica (6). Takvu staničnu liniju koja se dijeli određen broj puta nazivamo konačnom. Međutim neki kemijski agensi ili virusi mogu inducirati proces transformacije nakon kojega određene stanične linije steknu sposobnost neograničene diobe i takve su stanične linije poznate kao kontinuirane (7). Svojstva slična kontinuiranim stanicama imaju i tumorske stanice koje se također dijele neograničen broj puta, odnosno besmrtno su. Razlog tomu leži u aktivnosti enzima telomerase koji nakon svake diobe telomere produži i time onemogućava tumorskim stanicama starenje (6).

Obzirom na način rasta stanica u kulturi, razlikujemo dvije vrste - adherentne i suspenzijske. Adherentne su one koje rastu u monosloju u kontaktu s podlogom, dok su suspenzijske stanice one koje rastu neovisno o podlozi i one su nešto jednostavnije za kultivirati, ali zahtijevaju konstantno praćenje rasta i brojanje stanica (7).

1.4 Tumorske stanice i uzroci nastanka

1.4.1 Tumorske stanice

Ono što je oduvijek predstavljalo glavnu razliku normalnih i tumorskih stanica svakako je stupanj njihove stanične proliferacije. Odnosno, tumorske stanice ne reagiraju na stanične signale za prestanak proliferacije i samim time neograničeno se dijele i neprestano rastu što im omogućuje njihovo širenje u udaljenija tkiva i organe. Razlog njihove neograničene proliferacije leži u telomerazi, enzimu koji produžuju telomere koje se kod normalnih stanica skraćuju svakom diobom i u trenutku njihove kritične duljine pokreću apoptozu. Tumorske stanice također imaju sposobnost uzimati hranjive tvari domaćinu pomoću vlastitog spleta krvnih žila koje su se razvile procesom angiogeneze. Ovisno o tome na kojoj vrsti stanice se

UVOD

tumor razvio, razlikujemo karcinome kada su u pitanju epitelne stanice, sarkome kada je u pitanju vezivno tkivo i hemoblastome kada su zahvaćene stanice hematopoetskog sustava. Tumore radi lakše klasifikacije dijelimo u dvije kategorije – benigne i maligne. Glavna razlika između ove dvije vrste tumora je mogućnost malignih da metastaziraju, odnosno da se šire iz primarnog mjesta na udaljene organe. Benigni su, nasuprot tome, ograničeni na svoje primarno mjesto i vrlo lako se liječe kirurškim putem. Osobe kod kojih je utvrđena prisutnost metastaza imaju sužen izbor liječenja, lošiju prognozu i obično su kirurški neoperabilni (6).

1.4.2 Karcinogeneza

Pojmom karcinogeneze označavamo kompleksan put nastanka tumora koji se sastoji od nekoliko koraka. Prvi korak u tom procesu zove se inicijacija i tijekom nje nastaje početna monoklonska maligna populacija kao posljedica novonastalih genetičkih promjena u stanici. Drugi se korak zove progresija i obilježena je dodatnim nakupljanjem mutacija koje će rezultirati povećanoj invazivnosti tumora koja će, u konačnici, dovesti do metastaziranja. Metastaziranje je treći i posljednji korak karcinogeneze, a definirana je kao krvlju ili limfom širenje tumorskih stanica na mjesta udaljena od primarnog porijekla tumora. Bolesnici koji imaju metastaze imaju lošiju prognozu kliničkog tijeka bolesti i užu lepezu mogućih metoda liječenja. Tumori mogu biti izazvani različitim tvarima – genima od kojih treba izdvojiti tumor supresore i onkogene, karcinogene kao predstavnike kemijskih čimbenika koji dovode do tumora ili pak uzrok mogu biti virusi (6).

Protoonkogeni su geni koji su zaduženi za kontrolu stanične proliferacije, a njihovom mutacijom nastaju onkogeni. Ta će mutacija uzrokovati inhibiciju kontrole stanične proliferacije i samim time neograničen broj dioba što je karakteristika tumorskih stanica. Među najpoznatijim onkogenima svakako je skupina ras onkogeni koju čine 3 gena: *K-ras*, *H-ras* i *N-ras* (6).

Tumor-supresorski geni, s druge pak strane, koče staničnu proliferaciju i kontroliraju stanični ciklus, ali pri nastanku tumora kao rezultat mutacija ti se geni inaktiviraju čime je izgubljen mehanizam kontrole staničnog ciklusa. Prvi takav otkriveni tumor-supresor je Rb koji je otkriven u retinoblastomu, a odmah uz njega poznat je i p53 kojega nalazimo mutiranog u velikom postotku novodijagnosticiranih tumora (8).

Karcinogeni su skupina tvari u koju su ubrojani kemijski agensi i zračenja, a koja pridonose bržem razvoju tumora. Kemijske tvari djeluju tako da izazivaju mutacije ili ometaju molekule

UVOD

koje su bitne u mehanizmu popravka DNA. Zračenja bilo koje vrste nastanku tumora pridonose uzrokujući dvostruke lomove DNA i nastanak pirimidinskih, odnosno timidinskih dimera. Virusi pak u karcinogenezi sudjeluju tako da se ugrade u genom domaćina i time uzrokuju promjenu gena. U skupinu takvih, onkogenih, virusa ubrajamo virus hepatitisa B (HBV), virus hepatitisa C (HCV), Epstein – Barrov virus (EBV) te ljudski T stanični limfotropni virus (HTLV) (9).

1.5 Metode određivanja citotoksičnosti

1.5.1 Stanični testovi citotoksičnosti

Štetan učinak koju neka tvar ili supstanca ostavlja na stanicu definiramo kao citotoksičnost. Testovi takve prirode uglavnom se provode pri identifikaciji spojeva potencijalnog mutagenog ili kancerogenog učinka na ljudsko zdravlje ili prilikom farmakoloških testiranja novih proizvoda. Dakle, izlaganjem stanice određenom citotoksičnom spoju, ona podliježe nekrozi i to je osnova ovih testova. Postoji više vrsta ovih testova kao što su redukcija resazurinom, detekcija nastalog ATP produkta ili redukcija tetrazolijumom, odnosno MTT test. Neovisno o vrsti testa koji je korišten, za svaki od njih je važno izložiti stanice reagensu i potom kvantitativno odrediti broj živih stanica nakon inkubacije. Princip testa zasniva se na tome da žive stanice mogu pretvoriti supstrat u obojeni ili fluorescentni produkt koji se po tom čita optičkim čitačem dok stanica koja je mrtva tu mogućnost nema (10).

1.5.2 Redukcija tetrazolijumom – MTT test

MTT test ili test redukcije tetrazolijumom je kolorimetrijski test koji počiva na pretvorbi žute soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida u ljubičasti formazan. Ta pretvorba boje posljedica je cijepanja tetrazolnog prstena pomoću enzima dehidrogenaza koje se kod živih stanica nalaze u mitohondriju. Intenzitet obojenja koji je nastao promjenom boje, izravno je proporcionalan broju preživjelih stanica koje su i dalje metabolički aktivne (11, 12).

HIPOTEZA

2 HIPOTEZA

Bakar u kompleksu s kromon (II) karboksilnom kiselinom djeluje antiproliferativno na rast tumorskih staničnih linija.

CILJEVI

3 CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. ispitati utjecaj bakrovih (II) kompleksa na rast četiriju staničnih linija (KATO III, Hep-G2, HT-29, MRC-5) u uvjetima *in vitro*
2. ispitati učinak liganda (kromon (II) karboksilne kiseline) na rast ispitivanih staničnih linija
3. ispitati postoji li razlika u osjetljivosti i rastu tumorskih i normalne stanične linija u prisutnosti ispitivanih kompleksa i liganda

4 MATERIJALI I METODE

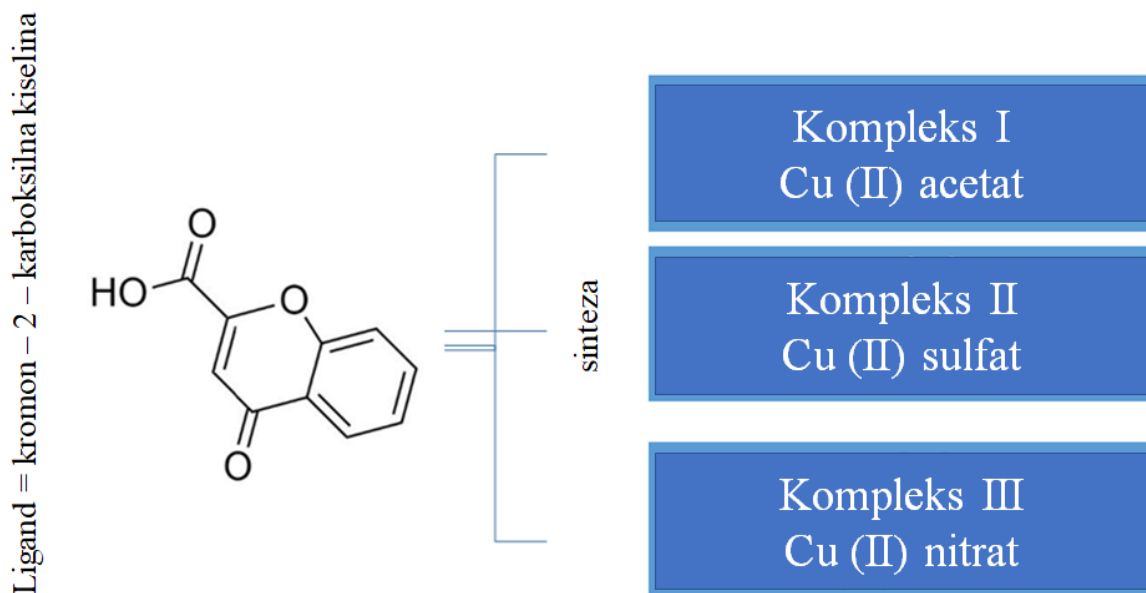
4.1 Ustroj rada

Rad je ustrojen kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek 31. ožujka 2022. godine.

4.2 Materijali

4.2.1 Ispitivani spojevi

Spojevi koji su ispitivani tijekom ovog istraživanja su: kromon-2-karboksilna kiselina ($C_{10}H_6O_4$); bakrovi (II) kompleksi s acetatom, sulfatom i nitratom sintetizirani na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Spojevi su prethodno pripremljeni otapanjem u DMSO, a konačan niz koncentracija je bio 10^{-5} do 10^{-7} mol/dm³ (M) . Shema sinteze navedenih spojeva prikazana je na slici 2.



Slika 2. Shema sinteze bakrovih (II) kompleksa

MATERIJALI I METODE

4.2.2 Stanične linije

Učinak sintetiziranih kompleksa ispitan je na sljedećim staničnim linijama:

- MRC-5 (ATCC® CCL-171™) - normalne stanične linije humanih fibroblasta pluća
- Hep G2 (ATCC® HB - 8065™) - stanična linija karcinoma jetre epitelne morfologije
- HT-29 (ATCC® HTB-38™) - stanična linija kolorektalnog karcinoma epitelne morfologije
- KATO III (ATCC® HTB-103™) - stanična linija karcinoma želuca sferoidne morfologije

4.3 Metode

4.3.1 Uzgoj i održavanje staničnih kultura *in vitro*

Adherentne stanice MRC-5, Hep G2, HT-29 i KATO III uzgajane su u modificiranom DMEM mediju s povišenim udjelom glukoze 4,5 g/l (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) obogaćenim sa 10% FBS (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija), 2mM L – glutaminom (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija) te 100U/0,1mg antibiotik/antimikotik (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija). Iste su inkubirane u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri unaprijed određenim uvjetima koji su uključivali temperaturu od 37°C, 5% CO₂ i visoku vlažnost.

4.3.2 Određivanje živih stanica u kulturi

Prije izvođenja MTT testa, nužno je odrediti broj živih stanica. U tu je svrhu korištena Bürker-Türk-ova komorica. Stanice su resuspendirane i uzeto je 50µL stanične suspenzije te potom 100µL bojila eritrozina b (Sigma - Aldrich, SAD) koje je služilo za određivanje vijabilnosti stanica. Stanice u komorici su promatrane i brojane pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Brojanje se zasniva na činjenici da žive stanice, koje su metabolički aktivne i imaju očuvanu staničnu membranu, onemogućuju ulazak boje u njih te ostaju nebojene, za razliku od mrtvih stanica koje zbog oštećene stanične membrane tu boju poprimaju. Stanice se broje unutar 4 kvadratića Bürker-Türk komorice, a ukupan broj živih stanica određen je pomoću formule:

MATERIJALI I METODE

$$R = \frac{3}{4} \times N \times 10^4 \text{ stanica/ml}$$

gdje je slovom R označen ukupan broj živih stanica, N je označavao broj živih stanica u Bürker-Türk komorici. Broj 4 je broj polja u komorici, a 3 je faktor razrijeđenja.

4.3.3 Procjena proliferacijske aktivnosti MTT testom

Kolorimetrijski MTT test je korišten u svrhu određivanja stupnja proliferacijske aktivnosti stanica, odnosno za određivanje citotoksičnosti koju ispitivani spojevi imaju na određene stanične linije. Test se temelji na promjeni boje žutog dimetiltiazol difenil tetrazol bromida u ljubičaste kristaliće formazana kao posljedica cijepanja tetrazolnog prstena. Taj prsten u živim stanicama cijepaju enzimi koji se nalaze unutar mitohondriji, a poznati su pod nazivom dehidrogenaze. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski optičkim čitačem (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) pri 595 nm.

Postupak:

Pripremljena je ploča sa sveukupno 96 jažica ravnog dna. U svaku od navedenih jažica su u ukupnom volumena od 200 μ L (180 μ L stanične suspenzije + 20 μ L spoja) nasađene stanice u koncentraciji od 2×10^4 stanica/mL. Stanice su potom stavljene u CO₂ inkubator na 37°C kroz 24 sata. Prvog dana testa stanice su tretirane različitim koncentracijama pripremljenih spojeva koji su djelovali sljedećih 72 sata. Po isteku vremena, stanice su tretirane s 5mg/mL MTT otopine (BioChemica, AppliChem; Darmstadt, Njemačka) i reinkubirane tijekom 4 sata. Nastali produkti ljubičastih formazanskih kristalića otopaju se dodatkom DMSOa (Acros organics; New Jersey, SAD). Rezultati su očitani spektrofotometrijski na 595 nm. Nakon dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (background), udio živih stanica izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\% = \frac{(A_{uzorka} - A_{slijepa proba})}{(A_{kontrola} - A_{slijepa proba})} \times 100$$

MATERIJALI I METODE

4.4 Statističke metode

Račun MTT testa proveden je u Microsoft Excelu. On nam je dao uvid u postotak inhibicije rasta stanica nakon izlaganja bakrovom (II) kompleksu i ligandu. Dobiveni rezultati su statistički obrađeni u programu TIBCO Statistica™ 14.0.0 (TIBCO, Palo Alto, SAD)

Analizirani su podaci prikupljeni tijekom tri biološke replike koje su rezultirale s devet tehničkih replika. Dobiveni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike za određivanje normalnosti razdiobe podataka i neparametrijskim Mann-Whitney U-testom usporedbe dvije nezavisne grupe podataka uz granicu statističke značajnosti $P < 0,05$.

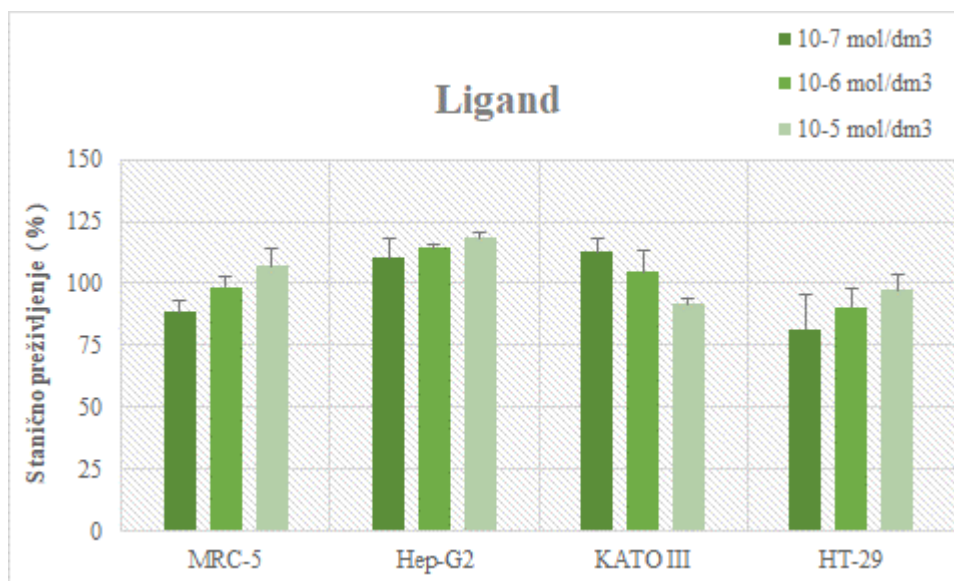
REZULTATI

5 REZULTATI

Učinkovitost novih bakar (II) spojeva kompleksiranih s kromon-2-karboksilnom kiselinom na proliferaciju malignih stanica praćen je na četiri stanične linije: MRC-5, Hep-G2, KATO III i HT-29. Stanice su tretirane trima bakrovim (II) kompleksima sa kromon-2-karboksilnom kiselinom i samim ligandom koja je bila kromon-2-karboksilna kiselina. Legenda spojeva kojima su navedene stanične linije bile tretirane dana je niže:

- *Ligand* – kromon-2-karboksilna kiselina
- *Kompleks I* – Cu (II) acetat + kromon-2-karboksilna kiselina
- *Kompleks II* – Cu (II) sulfat + kromon-2-karboksilna kiselina
- *Kompleks III* – Cu (II) nitrat + kromon-2-karboksilna kiselina

Ispitivanjem djelovanja liganda na sve četiri ispitivane stanične linije nije uočen niti jedan značajan antiproliferativni učinak istoga niti u jednoj koncentraciji. Preživljenje stanica je iznad 80% Djelovanje liganda na stanične linije prikazan je na slici 3.

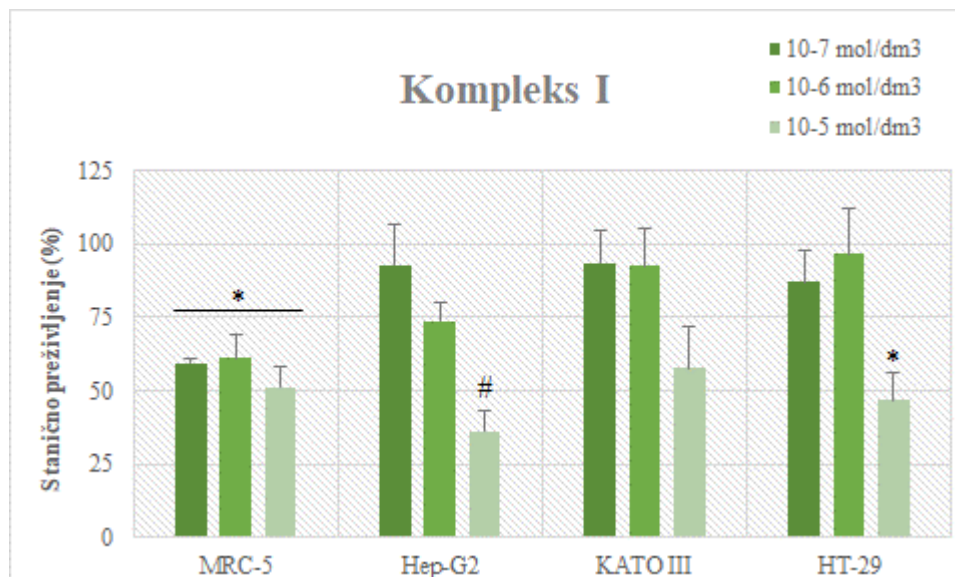


Slika 3. Citotoksični utjecaj liganda (kromon – 2 - karboksilne kiseline). Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplicatu. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na kontrolne stanice.

Kompleks I pokazao je značajniju antiproliferativnu aktivnost na dvije stanične linije: Hep-G2 i HT-29 pri čemu je inhibitorski učinak jači na jetrenu staničnu liniju Hep-G2. Na nju

REZULTATI

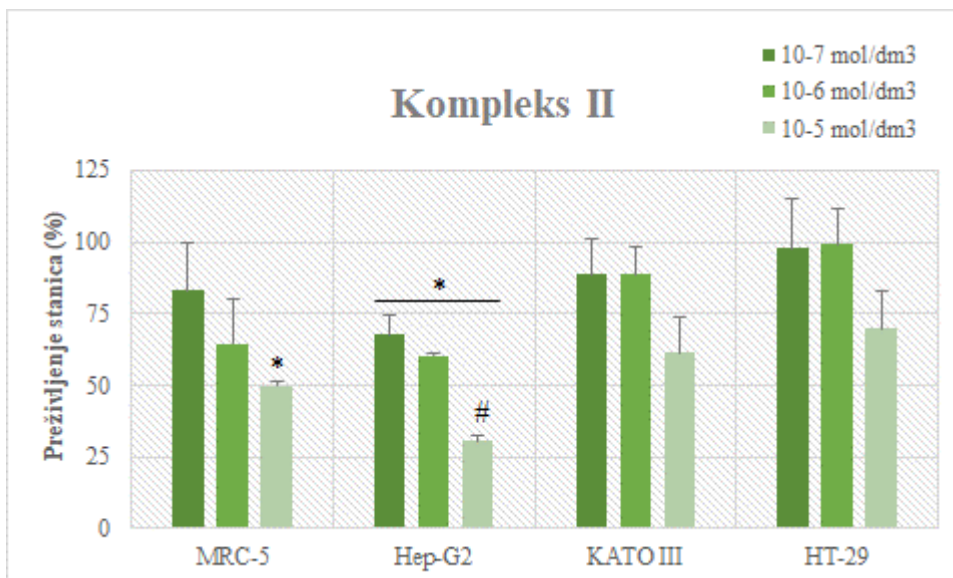
kompleks I pri koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje inhibitorni učinak od 60 – 65 %, dok na staničnu liniju HT-29 pri istoj koncentraciji inhibitorni učinak iznosi 50 – 55 %. Pri svim koncentracijama ovaj kompleks pokazuje inhibitorni učinak od 35 – 50% na staničnu liniju MRC-5 (Slika 4).



Slika 4. Antiproliferativni učinak Komplexa I (Cu (II) acetat) na stanične linije. Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na kontrolne stanice.

Inhibitorni učinak kompleksa II vidljiv je na staničnim linijama MRC-5 te Hep-G2 pri čemu je isti učinkovitiji na Hep - G2 staničnu liniju. Na tu staničnu liniju pri koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje inhibitorni učinak od čak 70%, dok je pri koncentracijama 10^{-6} M i 10^{-7} M učinak slabiji i iznosi 35 - 40 %. Na staničnu liniju MRC-5 primijećen je inhibitorni učinak ovog kompleksa pri koncentraciji od 10^{-5} M i on iznosi 50 % (Slika 5). Na KATO III i HT- 29 stanice efikasnost bakrovog kompleksa broj II je zanemarivo mala.

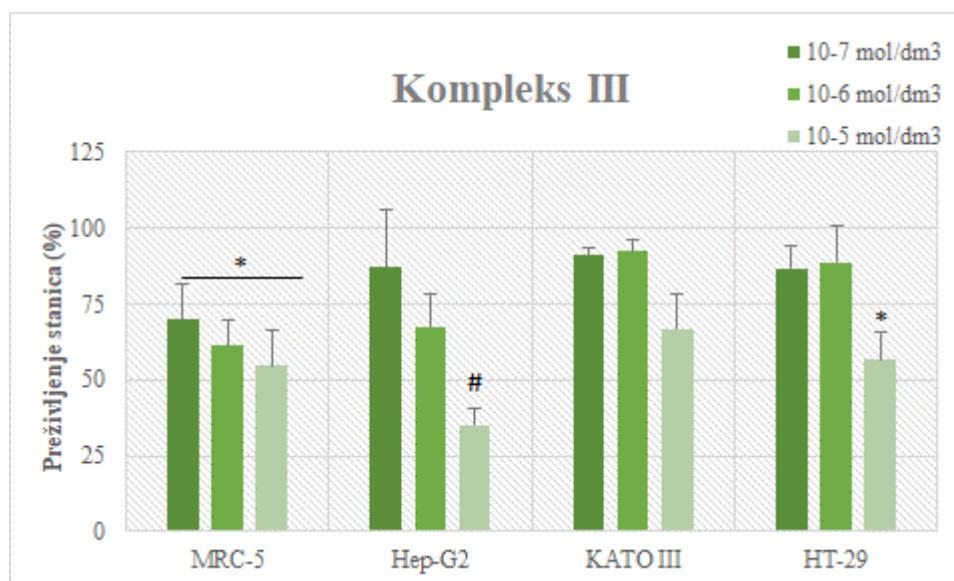
REZULTATI



Slika 5. Antiproliferativni učinak Kompleksa II (Cu (II) sulfat) na stanične linije. Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na kontrolne stanice.

Kompleks III svoj inhibitorski učinak ostavlja na 3 stanične linije i to MRC-5, Hep-G2 te HT-29 pri čemu je opet najveći inhibitorski učinak uočen na staničnoj liniji Hep-G2 pri koncentraciji od 10^{-5} M i on iznosi 60 - 65%. Pri ostalim koncentracijama nema značajnog učinka ovog spoja na staničnu liniju Hep-G2. Na staničnu liniju MRC-5 vidljiv je inhibitorski učinak ovog spoja pri svim koncentracijama i on iznosi 30 - 40%. Kada je riječ o staničnoj liniji HT-29, kompleks III svoj učinak pokazuje pri koncentraciji 10^{-5} M i on iznosi 40 % dok pri ostalim koncentracijama ovog spoja nije uočen značajan inhibitorski učinak na ovu staničnu liniju (Slika 6).

REZULTATI



Slika 6. Antiproliferativni učinak Kompleksa III (Cu (II) nitrat) na stanične linije. Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($P < 0,05$; $P < 0,01$) u odnosu na kontrolne stanice.

Za sve navedene ispitivane bakrene komplekse određena je koncentracija pri kojoj se postiže polovica maksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}) odnosno ona koncentracija koja inhibira rast 50% stanica (Tablica 1) s ciljem bolje evaluacije antiproliferativnog djelovanja ispitivanih kompleksa.

Tablica 1. Vrijednosti za IC_{50} ispitivanih spojeva na sve stanične linije od interesa

Stanična linija	$IC_{50} / \mu M$			
	Kompleks I	Kompleks II	Kompleks III	Ligand
MRC 5	10,5	9,9	10,9	>20
Hep-G2	7,2	6,1	7,0	>20
KATO III	11,5	12,2	13,4	>20
HT - 29	9,4	13,8	11,3	>20

6 RASPRAVA

Kao posljedica sveprisutnog zagađenja okoliša, starenja svjetske populacije i popularizacije sve užurbanijeg načina života i njemu pridruženog stresa, pojačana je incidencija pojave tumorskih bolesti koje u današnjem svijetu pripadaju među vodeće uzročnike smrti. Tako je 2017. godine na području samo Europske unije rak bio uzrok smrti za 1.2 milijuna ljudi što brojčano predstavlja čak četvrtinu svih uzroka smrti (13). Zbog svega navedenoga maligne bolesti predstavljaju velik javnozdravstveni problem i golemi društveni teret stoga je potreba za pronalaskom antitumorskih lijekova izrazito velika. Dosadašnji modeli liječenja obuhvaćaju kirurško odstranjivanje nastalih novotvorina te radio i imunoterapiju. Otkrićem brojnih kemoterapeutika, posebice cisplatine počela je nova era mogućih antitumorskih lijekova. Literatura upućuje na istraživanja u području metalo kemije i kemijskih elemenata koji poput platine mogu stvarati komplekse. Spojevi s centralnim atomom paladija (Pd), zlata (Au) ili rutenija (Ru) pokazuju učinkovitost protiv brojnih malignih tvorbi istraživanih na setu staničnih linija poput raka vrata maternice (HeLa), karcinoma dojke (MCF – 7) i tumorskih stanica pluća (14, 15). Jedan od zanimljivih prijelaznih elemenata je bakar čiji su kompleksi s različitim ligandima od sve većeg interesa u medicini (16-18). Uvidom u rezultate tih istraživanja uočeno je antiproliferacijsko djelovanje bakrovih kompleksa dovodeći do inhibiciji rasta malignih stanica kao i inhibiciju angiogeneze. Antitumorsko djelovanje bakrovih kompleksa primarno se temeljilo na izazivanju oksidativnog stresa, ali novija istraživanja upućuju na sposobnost bakrovih kompleksa da inhibiraju proteasoma i/ili aktiviraju paraapoptotske putove programirane stanične smrti (2).

Kompleksiranje bakra s kromon-2-karboskilnom kiselinom u prisutnosti aniona poput nitrata, sulfata i acetata dalo je nove spojeve koje smo ispitali s ciljem procjene njihove antiproliferative sposobnosti. Usporedbom citotoksičnog učinka primijenjenih spojeva na sve ispitivane stanične linije u različitim koncentracijama, primijećeno je da je stanična linija Hep - G2 najosjetljivija na djelovanje većine primijenjenih spojeva i to u koncentraciji od 10^{-5} M. Također primijećen je i određen inhibitorski učinak na staničnu liniju HT-29 pri tretiranju kompleksima I i III, ali ono što te komplekse isključuje iz daljnjih istraživanja kao mogućih antitumorskih lijekova u budućnosti je njihov nezanemariv inhibitorski učinak na stanice normalne stanične linije MRC-5. Razlog isključenja navedenih spojeva iz daljnjih istraživanja leži u tome da bi antitumorski lijekovi trebali selektivno djelovati na tumorske stanice sa nikakvim ili minimalnim učinkom na normalne stanice. Taj kriterij antitumorskih lijekova

RASPRAVA

prema dobivenim rezultatima ispunjava kompleks II koji pokazuje značajan inhibitorski učinak na Hep - G2 staničnu liniju pri svim primijenjenim koncentracijama dok istovremenu pokazuje minimalan inhibitorski učinak na normalne stanične linije MRC-5 i to samo pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 10^{-5} M.

Rezultati prijašnjih istraživanja antitumorske aktivnosti bakra i njegovih kompleksa te samog liganda kromon-2-karboksilne kiseline potvrdila su postojanu protutumorsku aktivnost. Tako je tim istraživanjima dokazana protutumorska aktivnost bakrova (II) kompleksa na stanice humanog hepatocelularnog karcinoma indukcijom apoptoze (19) te kolorektalnog karcinoma ljudi proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta, indukcijom apoptoze te inhibicijom NF- κ B proteina što rezultira smanjenom metastatskom i angiogenetskom funkcijom tumora (20). Ovo provedeno istraživanje je samo potvrdilo dosadašnje rezultate i otkrića primjene bakra i njime kompleksiranih spojeva u kemoterapeutske svrhe.

Veliki doprinos ovoga istraživanja je primjena kromon-2-karboksilne kiseline kao liganda za kompleksiranje budući da je ta molekula nova na područje kemije kompleksnih spojeva. Molekula se ubraja u skupinu benzopirona, koji su uz izuzetak kumarina, slabo istraženi. Tome u prilog govori podatak da je kristalna i molekulska struktura kromon-2-karboksilne kiseline riješena tek 2018. godine (21). Biološka svojstva su gotovo potpuno ne istražena, dok su fizikalna i kemijska svojstva istražena samo djelomično (22). Stoga je pretraživanje znanstvene literature uputilo na ovaj ligand kao potencijalu novu molekulu koji prema rezultatima našeg istraživanja, ne iskazuje citotoksični učinak. Posebno je značajno što jedan od tri sintetizirana kompleksa sa bakrom, odnosno kompleks bakrova (II) sulfata sa kromon-2-karboksilnom kiselinom (kompleks II) pokazuje potencijal za daljnja istraživanja u području citotoksičnosti i određivanja mogućeg mehanizma djelovanja.

ZAKLJUČAK

7 ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

- uočen je antiproliferativni učinak bakrovih (II) kompleksa na sve ispitane stanične linije (HT-29, HepG2, MRC-5 i KATO III)
- sam ligand ne pokazuje antiproliferativnu aktivnost
- antiproliferativna aktivnost je rezultat uspješnog kompleksiranja Cu (II) s ligandom
- najveću osjetljivost je iskazala Hep-G2 stanična linija na sva tri kompleksa s naglaskom na Kompleks II
- citotoksičan učinak na normalne stanice (MRC-5) je manji nego na Hep-G2 što upućuje na selektivnost u djelovanju spojeva
- niske vrijednosti za IC_{50} upućuje na visoku učinkovitost ispitivanih bakrenih (II) kompleksa u inhibiciji staničnog rasta malignih stanica

SAŽETAK

8 SAŽETAK

Uvod: Obzirom na to da maligne bolesti postaju sve prisutnije, a kao takve predstavljaju golem javnozdravstveni problem i društveni teret sve je učestalija potraga za antitumorskim lijekovima. Obzirom da cis-platina kao jedan od najčešće korišten kemoterapeutika pokazuje brojne nuspojave, a poznavajući ranija antitumorska svojstva bakra, istraživanja su pomaknuta u svrhu istraživanja antiproliferacijskog učinka bakra i bakrovih (II) kompleksa.

Ciljevi: Ispitati antiproliferacijski učinak novih bakar (II) spojeva kompleksiranih sa kromon-2-karboksilnom kiselinom na rast četiriju staničnih linija (MRC-5, HT-29, Hep - G2 te KATO III).

Materijali i metode: Spojevi koji su ispitivani tijekom ovog istraživanja su: kromon-2-karboksilna kiselina ($C_{10}H_6O_4$); bakrovi (II) kompleksi s acetatom, sulfatom i nitratom sintetizirani na Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Spojevi su prethodno pripremljeni otapanjem u DMSO, a konačan niz koncentracija je bio 10^{-5} M, 10^{-6} M i 10^{-7} M. Nakon tretiranja staničnih linija spojevima i inkubacije od 72h u inkubatoru, MTT testom je određen broj živih stanica.

Rezultati: Bakrovi (II) spojevi kompleksirani s kromon-2-karboksilnom kiselinom pokazali su inhibitorni učinak na rast ispitivanih staničnih linija. Kompleks Cu (II) sa sulfatom odnosno Kompleks II je pokazao najveći citotoksični učinak, dok se kao najosjetljivija stanična linija istaknula stanična linija karcinoma jetre (Hep-G2). Uočena je povezanost između antiproliferativnog učinka i primijenjene koncentracije određenog ispitivanog spoja.

Zaključak: Bakrovi (II) spojevi kompleksirani s kromon-2-karboksilnom kiselinom pokazuju antiproliferativni učinak na stanične linije. Antiproliferativni učinak ovisi o koncentraciji te vrsti stanične linije.

Ključne riječi: bakar; bakrovi (II) kompleksi; citotoksični učinak; kultura stanica; tumorske stanice

SUMMARY

9 SUMMARY

EFFICIENCY OF NEW COPPER (II) COMPOUNDS COMPLEXED WITH CHROMONE-2-CARBOXYLIC ACID ON THE PROLIFERATION OF MALIGNANT CELLS *IN VITRO*

Introduction: As malignant diseases become more prevalent, and as such represent a huge public health problem and a social burden, the search for antitumor drugs is becoming more frequent. Given that cis-platinum as one of the most commonly used chemotherapeutics shows a number of side effects, and knowing the earlier antitumor properties of copper, research has been moved to investigate the antiproliferative effect of copper and copper (II) complexes.

Objectives: To investigate the antiproliferative effect of new copper (II) compounds complexed with chromone-2-carboxylic acid on the growth of four cell lines (MRC-5, HT-29, HepG2 and KATO III).

Materials and methods: The compounds tested during this study were: chromone-2-carboxylic acid ($C_{10}H_6O_4$); copper (II) complexes with acetate, sulfate and nitrate synthesized at the Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Compounds were previously prepared by dissolving in DMSO and the final concentration range was $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ and $10^{-7}M$. After treatment of cell lines with compounds and incubation for 72 h in an incubator, the MTT assay determined the number of living cells.

Results: Copper (II) compounds complexed with chromone-2-carboxylic acid showed an inhibitory effect on the growth of the tested cell lines. Complex Cu (II) with sulfate, or Complex II, showed the greatest cytotoxic effect, while the liver cancer cell line (Hep-G2) stood out as the most sensitive cell line. A correlation was observed between the antiproliferative effect and the applied concentration of a particular tested compound.

Conclusion: Copper (II) compounds complexed with chromone-2-carboxylic acid show an antiproliferative effect on cell lines. The antiproliferative effect depends on the concentration and type of cell line.

Key words: copper; copper (II) compounds; cytotoxic effect; cell culture; tumor cells

LITERATURA

10 LITERATURA

1. Eni Generalic. Bakar - EniG. Periodni sustav elemenata. Dostupno na: <https://www.periodni.com/hr/cu.html>. Pristupljeno dana 28. ožujka 2022.
2. Saverio Tardito and Luciano Marchiò. Copper Compounds in Anticancer Strategies. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16, 1325-1348.
3. National Research Council. Recommended dietary allowances. 1989. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press. Within EU the recommended dietary allowance of copper is 0.9 mg/day. Dostupno na adresi: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/index_en.html. Pristupljeno dana: 16.04.2022.
4. "Modern Organocopper Chemistry" Norbert Krause, Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
5. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2741, Chromocarb. Dostupno na adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chromocarb>. Pristupljeno 25. travnja 2022.
6. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. Izd. Medicinska naklada Zagreb. 2004. 725-45.
7. Freshny RI 1987. Culture of animals cells. A manual of basic technique. New York, Alan R. Liss Inc 796 pp.
8. Pećina-Šlaus N, Bulić-Jakuš F, Radić K. Tumor - supresorski geni. *Medicinar*. 2005; 46; 44-47.
9. The Editors of CancerQuest. Cancer Development. Dostupno na adresi: <https://www.cancerquest.org/cancer-biology/cancer-development>. Datum pristupa: 19.4.2022.
10. Aslantürk Ö. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. 2018.
11. Bahuguna A, Khan I, Bajpai V, Kang S. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2).
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

LITERATURA

13. Cancer statistics - Statistics Explained. Dostupno na adresi:
https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cancer_statistics.
Datum pristupa: 16.04.2022.
14. Chrzanowska A, Drzewiecka-Antonik A, Dobrzyńska K, Stefańska J, Pietrzyk P, Struga M, i sur. The Cytotoxic Effect of Copper (II) Complexes with Halogenated 1,3-Disubstituted Arylthioureas on Cancer and Bacterial Cells. 2022.
15. Popović Z, Smrečki N, Jović O, Mišković Špoljarić K, Gašo-Sokaci D, Bušić V, i sur. Ternary palladium(II) complexes with N-benzyliminodiacetic acid derivatives and 2,2'-bipyridine: Preparation, thermogravimetric, vibrational spectroscopic, DFT, NMR studies and biological activity in vitro. *Inorganica Chimica Acta*. 2021;516:120131.
16. Glavaš-Obrovac L, Jukić M, Mišković K, Marković I, Saftić D, Ban Ž, i sur. Antiproliferative and proapoptotic activity of molecular copper(II) complex of N-1-tosylcytosine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;55:216-222.
17. Parsa F, Feizi M, Safaralizadeh R, Hosseini-Yazdi S, Mahdavi M. Molecular mechanisms of apoptosis induction in K562 and KG1a leukemia cells by a water-soluble copper(II) thiosemicarbazone complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2020;25(3):383-394.
18. Bacher F, Do motor O, Chugunova A, Nagy N, Filipović L, Radulović S, i sur.. Strong effect of copper(II) coordination on antiproliferative activity of thiosemicarbazone–piperazine and thiosemicarbazone–morpholine hybrids. *Dalton Transactions*. 2015;44(19):9071-9090.
19. Rezaei A, Khanamani Falahati-Pour S, Mohammadizadeh F, i sur. Effect of a Copper (II) Complex on The Induction of Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(10):2877-2884.
20. Ruiz M, Perelmutter K, Levín P, Romo A, Lemus L, Fogolín M, i sur. Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF-κB inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;169:106092.
21. The Cambridge Structural Database (CSD) - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). Dostupno na adresi: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-core/components/csd/>. Pristupljeno dana 08.07.2022.
22. (2S)-2-HYDROXY-2H-CHROMENE-2-CARBOXYLIC ACID: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. Dostupno na adresi:
<https://go.drugbank.com/drugs/DB06952>. Pristupljeno dana: 08.07.2022.

ŽIVOTOPIS

11 ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonio Vukovac

Datum rođenja: 24.08.2000

Adresa: Faličevci 58, 32251 Privlaka

Mail: antoniovukovac00@gmail.com

Obrazovanje:

2015.-2019. – Gimnazija „Matija Antun Reljković“ Vinkovci

2019. – 2022. – Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Osobna postignuća:

2019. – dobitnik nagrade „Volonter godine“ - Crveni križ Vinkovci

2020. – član tima dobitnika nagrade „Volonterski tim godine“ – Hrvatski crveni križ

2021.-danas. – vođenje studentske udruge imena Hrvatska udruga studenata medicinsko-laboratorijske dijagnostike (CMLDSA) te organizacija pripadajućih studentskih aktivnosti

2022. – sudjelovanje na popularizaciji znanosti u sklopu Festivala znanosti 2022.