# Ekotoksikološko ispitivanje eutektičnih otapala primjenom kulture stanica

**Kovačević, Ida**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:674138

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

# EKOTOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE EUTEKTIČNIH OTAPALA PRIMJENOM KULTURE STANICA

**Ida Kovačević**

6666/BT

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Kristine Radošević. Završni rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta br. 9550 „Zelena otapala za zelene tehnologije“.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Kristini Radošević na uloženom trudu, strpljivosti i pomoći u izradi ovog rada.

**DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

# EKOTOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE EUTEKTIČNIH OTAPALA PRIMJENOM KULTURE STANICA

**Ida Kovačević, 6666/BT**

**SAŽETAK:** Eutektična otapala predstavljaju novu generaciju otapala širokog područja primjene. Smatraju se manje toksičnom alternativom ionskih kapljevina. Eutektična otapala sastavljena su od amonijevih soli i donora vodikovih veza, a temperatura tališta ovakve smjese znatno je niža od one pojedinih sastavnih komponenata. U ovom radu ispitan je utjecaj osam sintetiziranih eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju MTS metodom. Otapala nisu pokazala inhibitorni učinak na rast stanica, što potvrđuje pretpostavku da su to nova zelena, netoksična otapala boljeg ekotoksikološkog profila nego druga alternativna otapala.

**Ključne riječi:** eutektična otapala, MCF-7 stanična linija, ekotoksičnost

**Rad sadrži:** 22 stranice, 8 slika, 1 tablicu, 13 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc. dr. sc. Kristina Radošević

**Rad predan:** 4. srpnja, 2016.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**FINAL WORK**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Bioengineering**

**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

# ECOTOXICOLOGICAL PROFILING OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS USING CELL CULTURE

**Ida Kovačević, 6666/BT**

**ABSTRACT:** Deep eutectic solvents (DESs) are considered to be a new generation of solvents with a broad range of applications and seems to be a less toxic alternative to ionic liquids. DESs are composed of ammonium salts and H-bond donors. The melting point of eutectic mixture is much lower than that of either of its components. In this final work, the impact of eight synthetized DESs on MCF-7 cell line was examined using MTS method. Solvents have not shown inhibitory effect on cell growth, what confirms the assumption that DESs are new generation of green solvents, usually non toxic and with a better ecotoxicological profile than other alternative solvents.

**Keywords:** deep eutectic solvents, MCF-7 cell line, ecotoxicity

**Thesis contains:** 22 pages, 8 figures, 1 table, 13 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic version (pdf format) deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Kristina Radošević, Assistant professor

**Thesis delivered:** 4$^{th}$ of July, 2016.

**SADRŽAJ**

**1. UVOD ..... 1**
**2. TEORIJSKI DIO ..... 2**
2.1. Eutektična otapala ..... 2
2.1.1. Svojstva i primjena eutektičnih otapala ..... 2
2.1.2. Ispitivanje i učinak eutektičnih otapala na okoliš ..... 4
2.2. Ekotoksikologija ..... 5
2.2.1. Primjena kultura stanica u ekotoksikološkim ispitivanjima ..... 6
2.2.2. Toksičnost eutektičnih otapala ..... 7
**3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 8**
3.1. Materijali ..... 8
3.1.1. Kemikalije ..... 8
3.1.2. Otopine i puferi ..... 8
3.1.3. Uređaji i oprema ..... 9
3.1.4. Humana stanična linija ..... 9
3.1.5. Eutektična otapala ..... 10
3.2. Metode rada ..... 11
3.2.1. Uzgoj MCF-7 stanica ..... 11
3.2.2. Određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo ..... 11
3.2.3. Nacjepljivanje i tretman MCF-7 stanica ..... 13
3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica ..... 13
3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto ..... 14
**4. REZULTATI ..... 15**
4.1. Utjecaj eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju ..... 15
4.2. Morfologija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima ..... 16
**5. RASPRAVA ..... 18**
**6. ZAKLJUČCI ..... 20**
**7. LITERATURA ..... 21**

# 1. UVOD

Organska otapala danas se primjenjuju u mnogim kemijskim procesima kao što su separacija, ekstrakcija i sinteza. Međutim, njihova uporaba je nepovoljna za zdravlje radnika i sigurnost procesa zbog svojstava toksičnosti, lake hlapljivosti, zapaljivosti i eksplozivnosti. Primjena organskih otapala također ne zadovoljava ekološke principe. Zadatak zelene kemije je pronaći odgovarajuću alternativu organskim otapalima i razviti nova zelena otapala. Eutektična otapala smatraju se zelenima jer se sastoje od amonijevih soli i donora vodikovih veza (alkoholi, karboksilne kiseline, amidi, amini ili šećeri), spojeva koji sami po sebi nisu toksični i štetni za okoliš.

Iako se za eutektična otapala pretpostavlja da zadovoljavaju principe zelene kemije, njihov ekotosikološki profil nije u potpunosti poznat. Istraživanja toksikoloških profila od iznimne su važnosti kako bi se procijenila sigurnost korištenja i utjecaj kemikalije na okoliš i zdravlje ljudi. Ekotoksikološka istraživanja provode se na staničnim linijama kao alternativa korištenju živih organizama i životinja.

U ovom radu određeni je ekotoksikološki profil osam eutektičnih otapala, a u svrhu istraživanju koristila se MCF-7 stanična linija tumora dojke.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. Eutektična otpala

### 2.1.1. Svojstva i primjena eutektičnih otapala

Eutektična otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DESs) smatraju se novom generacijom zelenih otapala. Pridodana im je posebna pozornost jer su se pokazala kao prikladna zamjena za organska otapala, iako njihov ekotoksikološki profil još uvijek nije u potpunosti poznat.

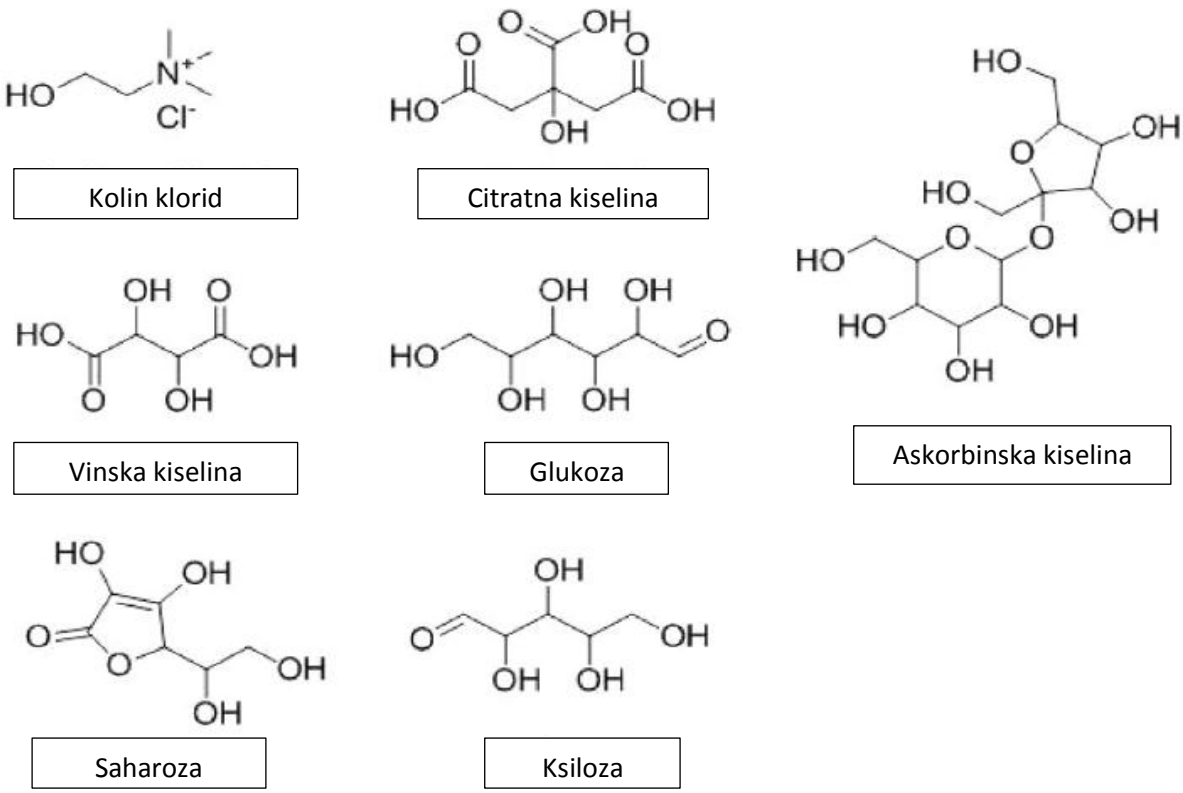
Posljednjih nekoliko desetljeća veliku ulogu u zelenoj tehnologiji imale su ionske kapljevine. Ionske kapljevine su soli sastavljene od iona u tekućem agregatnom stanju pri sobnoj temperaturi. Kombinacijama kationa i aniona postižu se mnoga različita fizikalno-kemijska svojstva tih otapala, te samim time imaju široko područje primjene. Međutim, primjena ionskih kapljevina je ograničena zbog visoke cijene, a mnoge pokazuju izrazito visoku toksičnost i slabo su biorazgradive.

Alternativa su DES-ovi koji se ponekad smatraju četvrtom generacijom ionskih kapljevina, što i nije sasvim točno jer nisu u potpunosti sastavljeni od ionskih vrsta. DES-ovi se pripremaju miješanjem dvije ili tri jeftine organske komponente, te se formira eutektična smjesa stvaranjem vodikovih veza čija je temperatura tališta mnogo niža od one pojedinog sastojka (Radošević i sur., 2015). Najčešće korišten sastojak je kolin klorid, kvarterna amonijeva sol niske toksičnosti, jeftina i sigurna za upotrebu. Uz kolin klorid kao sastojci najčešće pripravljanih eutektičnih smjesa koriste se i karboksilne kiseline, urea, limunska kiselina, sukcinska kiselina i glicerol (Paiva i sur., 2014). Zahtjevi koje većinom ispunjavaju sastojci tih smjesa su laka dostupnost, niska cijena, niska toksičnost te sigurnost pri rukovanju. Eutektična otapala su tekućine pri sobnoj temperaturi i imaju fizikalno-kemijska svojstva slična onima ionskih kapljevina, ali su pogodnija za upotrebu zbog pristupačnije cijene proizvodnje i ekološki su prihvatljivija.

U posljednje vrijeme za sintezu DES-a počeli su se koristiti prirodni spojevi, odnosno primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, šećeri, urea, derivati kolina) čije su strukture prikazane na Slici 1. Eutektične smjese pripravljene od tih sastojaka nazivaju se prirodnim eutektičnim smjesama (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Zbog velike kemijske raznovrsnosti ovih spojeva moguće je pripraviti velik broj kombinacija NADES-a. Iz toga proizlazi mogućnost prilagođavanja otapala za mnoga područja primjene. NADES su

zbog svoje biorazgradivosti i niske toksičnosti izuzetno zanimljivi za primjenu u farmaceutskoj industriji.

Prirodne eutektične smjese mogu se pronaći i u prirodi u živim organizmima. Analize nektara iz biljaka pokazale su da se nektar sastoji od šećera koji su u čvrstom agregatnom stanju pri sobnoj temperaturi, ali njihova kombinacija čini tekuću smjesu (Kudlak, 2015).




**Slika 1.** Kemijske strukture različitih tvari koje mogu biti sastavne komponente prirodnih eutektičnih otapala (Paiva i sur., 2014).

Eutektična otapala kao moguća zamjena za ionske kapljevine u literaturi se prvi put spominju 2004. godine. Od te godine pa nadalje ova tema je sve zastupljenija u znanstvenim člancima i sve se više istražuju fizikalno-kemijska svojstva i termodinamika sustava s eutektičnim smjesama. Znanstvena istraživanja se najviše provode u područjima kemije, znanosti o materijalima, fizici i elektrokemiji. Primjena DES-ova se također intenzivno

istražuje te je poznata njihova uporaba u obradi metala, elektrokemiji, ekstrakciji glicerola iz biodizela te kao katalitički i reakcijski medij (Kudlak, 2015).

Primjena DES-ova kao katalitički i reakcijski medij pokazala je zanimljive rezultate kod mnogih biokatalitičkih reakcija. Iako su sastavljeni od denaturirajućih agensa kao što su citratna kiselina i urea, mnoge lipaze aktivne su u toj okolini. Za primjer se navodi *Candida antartica* lipaza B koja pokazuje visoku aktivnost i stabilnost u DES-u čiji je sastojak kolin klorid. Korištenjem DES-a (kolin klorid/urea) u transesterifikaciji etil valerata s 1-butanolom, lipaza je pokazala povećanje stabilnosti 20-35 puta u odnosu na reakciju u vodenom mediju (Paiva i sur., 2014).

Eutektična otapala imaju mogućnost doniranja i primanja elektrona i protona, te stvaraju vodikove veze. Ovo svojstvo povećava njihovu sposobnost otapanja raznih materijala. Slabo topive molekule, kao što su benzojeva kiselina, griseofulvin, danazol i itrakonazol, topive su 5 do 20 000 puta bolje u određenim eutektičnim otapalima (kolin klorid/urea i kolin klorid/ malonska kiselina) nego u vodi (Paiva i sur., 2014).

Iako su DES-ovi pokazali mnoge pozitivne učinke i potencijal u raznim područjima znanosti do danas je objavljeno tek nekoliko radova koji govore o njihovoj toksičnosti. Potrebno je poznavati u potpunosti ekotoksikološki profil ovih otapala prije nego li ih sa sigurnošću možemo zvati zelenim otapalima.

### 2.1.2. Ispitivanje i učinak eutektičnih otapala na okoliš

Iako su eutektična otapala pokazala potencijal za brojne primjene u zelenim tehnologijama, prije upotrebe u industriji i proizvodnje u širokom mjerilu potrebno je ispitati utjecaj na okoliš. Pretpostavlja se da su DES-ovi netoksični zbog činjenice da se za njihovu sintezu koriste tvari izvorno prirodnog podrijetla, odnosno primarni metaboliti. Treba uzeti u obzir i moguće sinergističko djelovanje komponenti koje tvore eutektičnu smjesu i koje može rezultirati većom toksičnošću DES-ova nego što je toksičnost samih komponenti, kao što je istaknuto u radu Hayyana i sur. (2013a; 2013b). U radu Hayyana i sur. (2013a; 2013b) ispitana je toksičnost DES-ova baziranih na kolin kloridu i fosfonijevom ionu na bakterijama i larvama račića te se pokazalo da toksičnost ovisi o sastavu, viskoznosti i koncentraciji DES-a.

Blagu antimikrobnu djelotvornost pokazali su DES-ovi koji sadrže fosfonijev ion, dok oni bazirani na kolin kloridu nisu imali citotoksičan učinak.

Osim toksičnog učinka na razne organizme za ekotoksikološki profil eutektičnih otapala bitno je odrediti i mogućnosti njihove biorazgradnje. Radošević i sur. (2015) proveli su istraživanje o biorazgradivosti DES-ova baziranih na kolin kloridu. DES-ovi su dodani u vodeni medij inokuliran mikroorganizmima otpadnih voda te je mjerena biokemijska potrošnja kisika (eng. *Biochemical Oxygen Demand*, BOD) u određenim periodima. Rezultati istraživanja su pokazali da se ispitivane eutektične smjese mogu smatrati otapalima s dobrim potencijalom biorazgradnje 60-100 % unutar 28 dana.

Danas još nisu u potpunosti poznati mehanizmi interakcija tvari u eutektičnim smjesama i stoga je potrebno provesti još mnoga istraživanja njihovog utjecaja na okoliš. Bolje poznavanje tih interakcija može rezultirati racionalnijim odabirom sastavnih komponenti te formiranjem DES-ova što povoljnijeg ekotoksikološkog profila.

## 2.2. Ekotoksikologija

Ekotoksikologija je multidisciplinarna znanost koja je utemeljena prije više od trideset godina te integrira toksikologiju i ekologiju. Proučava toksične učinke nastale kao posljedica prisutnosti prirodnih ili sintetskih štetnih tvari na ljude, životinje, biljke, mikroorganizme i ostale sastavne dijelove ekosustava (Thruhaut, 1997).

Ekotoksikološka istraživanja usmjerena su na razumijevanje toksikološkog fenomena u različitim biotama, populacijama i ekosustavima i ekoloških procesa na kontaminiranom području. Vođenjem istraživanja koje objedinjuje ekološke i toksikološke koncepte te koncepte kemije okoliša, dobiva se više informacija o toksičnim utjecajima antropogenih spojeva (Fent, 2001). Jedna od strategija za procjenu razine onečišćenja nekog područja je korištenje biomarkera kojima se utvrđuje prisutnost zagađivača, a drugi pristup su laboratorijska *in vivo* i *in vitro* istraživanja u kojima se određuju potencijalni toksični utjecaji ispitivane tvari.

U ekotoksikološkim istraživanjima, proučavanje staničnih procesa od jednake je važnosti kao i provođenje laboratorijskih testova na modelnim organizmima, jer se primarne

interakcije između ispitivane kemikalije i okoliša odvijaju na površini ili unutar stanice. Dakle, toksikologija na razini stanice pruža osnovni koncept za razumijevanje ekotoksikoloških procesa i utjecaja na više biološke vrste (Fent, 2001).

### 2.2.1. Primjena kultura stanica u ekotoksikološkim ispitivanjima

Ekotoksikološka ispitivanja se danas sve više provode kako bi se zaštitio okoliš i ljudsko zdravlje boljom i ranijom identifikacijom potencijalno toksičnih kemikalija. Ova istraživanja postaju nužna zbog činjenice da se svake godine proizvede oko 1000 novosintetiziranih tvari dok je već u upotrebi oko 10000 različitih kemikalija.

*In vivo* testovi koji se provode na životinjama nastoje se što manje koristiti zbog etičkih, socijalnih i znanstvenih razloga, odnosno dobrobiti životinja. Testovi koji se provode na cijelim, živim organizmima pokušavaju se zamijeniti alternativnim metodama. U Europskoj uniji je iz tog razloga razvijen REACH sustav koji je na snazi od 2007. godine. Cilj ovog sustava je registrirati kemikalije na tržištu, evaluirati, autorizirati i ograničiti njihovu upotrebu. Ključ REACH regulacije je zamjena najopasnijih kemikalija prikladnim alternativama, a istovremeno kako bi se umanjio broj testova na životinjama snažno podržavaju alternativne metode, kao što su *in vitro* testovi na staničnim linijama (Hayyan i sur., 2015). Uz *in vitro* testove razvijaju se i druge alternativne metode u toksikologiji kako bi se što više unaprijedili testovi za određivanje toksičnosti kemikalija i reducirao broj *in vivo* testova. Metode koje se koriste u te svrhe su: fizikalno-kemijske tehnike, QSAR (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationships*) i metaboličko i kinetičko modeliranje.

Korištenje *in vitro* sustava (staničnih frakcija, staničnih linija, kultura organa, dijelova tikva itd.) široko je rasprostranjeno, ovi sustavi idealno su prilagođeni za bolje razumijevanje molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama kemijski izazvane toksičnosti (Kniewald i sur., 2005).

Interakcija antropogene kemikalije i okoliša započinje djelovanjem tvari na stanicu, a stanični odgovori prva su manifestacija toksičnosti. U biomedicinskim i toksikološkim ispitivanjima, gdje su *in vitro* sustavi utemeljeni kao vrlo važne metode, sve se više koriste stanične linije. Laboratorijski testovi na staničnim kulturama, dijelovima tkiva i organa ne mogu u potpunosti zamijeniti kompleksni *in vivo* sustav.

### 2.2.2 Toksičnost eutektičnih otapala

Iako postoji mogućnost široke primjene DES-ova u području zelenih tehnologija, prije industrijske upotrebe potrebno je kritično i opsežno procijeniti njihovu toksičnost. Osnovni cilj ispitivanja citotoksičnosti *in vitro* je unaprijediti zaštitu okoliša i ljudskog zdravlja boljom i ranijom identifikacijom potencijalno toksičnih kemijskih tvari (Hayyan i sur., 2015).

Radošević i sur. (2015) objavili su rad u kojem su ispitali toksičnost kolinijevih DES-ova koji sadrže glukozu, glicerol i oksalnu kiselinu. Za ispitivanje citotoksičnosti DES-ova korištena je humana (MCF-7) i stanična linija riba (CCO). Dobiveni rezultati izraženi su kao $EC_{50}$ vrijednost, a ispitivana eutektična otapala pokazala su nisku do umjerenu citotoksičnost prema MCF-7 i CCO staničnoj liniji. DES-ovi kolin klorid:glukoza (ChCl:Glu) i kolin klorid:glicerol (ChCl:Gly) nisu uzrokovali 50% inhibicije stanica pri ispitivanim koncentracijama (1-2000 mg $L^{-1}$) . No otapalo kolin klorid:oksalna kiselina (ChCl:OA) pokazalo je umjerenu citotoksičnost prema ispitivanim staničnim linijama. CCO stanična linija je nešto osjetljivija prema ChCl:OA nego MCF-7 humane stanice, što dokazuje da mehanizmi reakcija zavise o vrsti stanica ili o podrijetlu stanične linije. Paiva i sur. (2014) prvi su testirali 11 DES-ova i 2 ionske kapljevine na L929 stanicama fibroblasta te usporedili rezultate. Rezultati nisu pokazali jasnu povezanost između citotoksičnosti i sastava otapala. Međutim, iz provedenog istraživanja zaključili su da postotak preživljenja stanica ovisi o koncentraciji otapala te da su DES-ovi bazirani na kolinu netoksični. Hayyan i sur. (2013a, 2013b) također su u svome radu potvrdili rezultate o netoksičnosti kolinijevih eutektičnih otapala koristeći larve račića i bakterije.

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

# 3.1. Materijali

## 3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij], Promega, NY, SAD
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Eutektična otapala: kolin klorid:jabučna kiselina (Ch:Ma), prolin:jabučna kiselina (Pro:Ma), kolin klorid:prolin:jabučna kiselina (Ch:Pro:Ma), betain:jabučna kiselina (B:Ma), jabučna kiselina:glukoza:glicerol (Ma:Glu:Gyl), betain:citratna kiselina (B:Cit), kolin klorid:citratna kiselina (Ch:Cit), citratna kiselina:glukoza:glicerol (Cit:Glu:Gyl); Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, RH

## 3.1.2. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

| | |
|---|---|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| $Na_2HPO_4$ | 1,44 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,24 g |

Destilirana voda do 1000 mL

0,4% otopina tripan-plavo

boja tripan-plavo 0,04 g

PBS pufera do 10 mL

0,2% otopina kristal ljubičasto

boja kristal ljubičasto 0,02 g

2% etanol do 10 mL

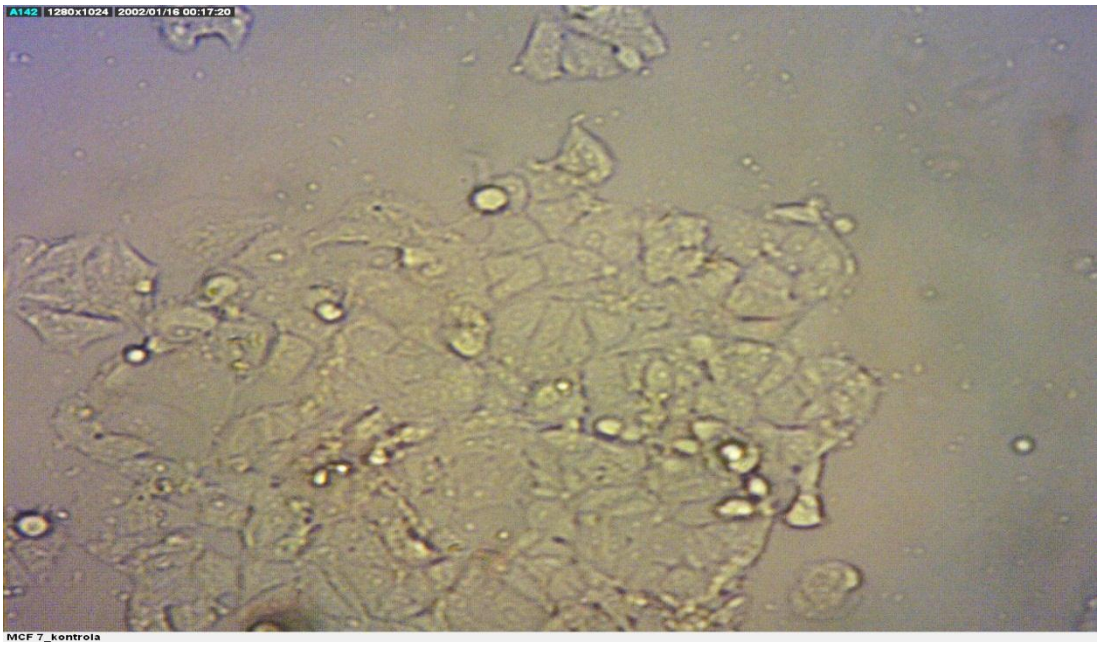
### 3.1.3. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom $CO_2$, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- T-boce od 25 $cm^2$, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannendorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Digitalna vaga Tehnica ET-1111, Železnik, Slovenija
- Digitalna vaga AX200, Shimadzu Co., Japan
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše)

### 3.1.4. Humana stanična linija

U ovom radu korištena je MCF-7 humana stanična linija tumora dojke iz ATCC (eng. *American Type Culture Collection*) banke stanica prikazana na slici 2. MCF-7 stanična linija

uspostavljena je 1973. godine na institutu Michigan Cancer Foundation-7 u Detroitu, odakle joj potječe i naziv. Uzgoj ove stanične linije potrebno je provoditi u kontroliranim uvjetima, točnije, u inkubatoru s atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5% ugljikovog dioksida pri temperaturi od 37 °C, a korišteni medij za rast MCF-7 stanica je DMEM uz dodatak 10% (v/v) FBS. MCF-7 stanice su morfološki epitelnog tipa i spadaju u skupinu adherentnih stanica (Slika 2). Uzgoj navedenih stanica provodi se u Petrijevim zdjelicama prilikom održavanja biomase stanica, ili u pločama s jažicama, za postavljanje pojedinačnih pokusa ispitivanja citotoksičnosti eutektičnih otapala.




**Slika 2**. Mikroskopska slika MCF-7 stanične linije (povećanje 400x), (vlastiti izvor)

## 3.1.5. Eutektična otapala

Eutektična otapala korištena u ovom radu sintetizirana su u Laboratoriju za tehnologiju stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu i popisana u Tablici 1.

**Tablica 1.** Eutektična otapala korištena u radu

| EUTEKTIČNA OTAPALA | | |
|---|---|---|
| | **Ime** | **Kratica** |
| 1 | kolin klorid: jabučna kiselina | ChCl:Ma |
| 2 | prolin: jabučna kiselina | Pro:Ma |
| 3 | kolin klorid: prolin:jabučna kiselina | ChCl:Pro:Ma |
| 4 | betain:jabučna kiselina | B:Ma |
| 5 | jabučna kiselina:glukoza:glicerol | Ma:Glu:Gly |
| 6 | betain:citratna kiselina | B:Cit |
| 7 | kolin klorid:citratna kiselina | ChCl:Cit |
| 8 | citratna kiselina:glukoza:glicerol | Cit:Glu:Gly |

## 3.2. Metode rada

Rad sa staničnim linijama zahtijeva aseptične uvjete i korištenje steriliziranog laboratorijskog pribora. Tijekom ovog istraživanja sve manipulacije sa MCF-7 stanicama izvodile su se u laminaru, a kao mjera aseptičnog rada sa ciljem spriječavanja kontaminacija, ruke i radna površina prije rada prebrisana je 70 %-tnim etanolom.

### 3.2.1. Uzgoj MCF-7 stanica

MCF-7 stanice čuvane su u ampulama na -70 °C. Ampule je potrebno odmrznuti uranjanjem u vodenu kupelj te zagrijavanjem na 37 °C, a nakon odmrzavanja suspenzija se centrifugira i uklanja se medij za zamrzavanje. Talog se resuspendira u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10 % seruma. Stanice se održavaju u kontroliranim uvjetima u inkubatoru pri 37 °C i u atmosferi koja sadrži 5 % ugljikovog dioksida. Obzirom da su MCF-7 stanice adherentnog tipa, prilikom precjepljivanja ih je potrebno tretirati tripsinom kako bi se stanice odvojile od podloge za rast. Kada stanice prerastu oko 80 % površine posude za uzgoj izlažu

se kratkom djelovanju tripsina kako bi se odvojile od površine, a zatim se precijepljuju u nove posude sa svježim medijem. Ovim postupkom stanična linija se pdržava u eksponencijalnoj fazi rasta kako bi se u pojedinačne pokuse išlo sa zdravim i vitalnim stanicama.

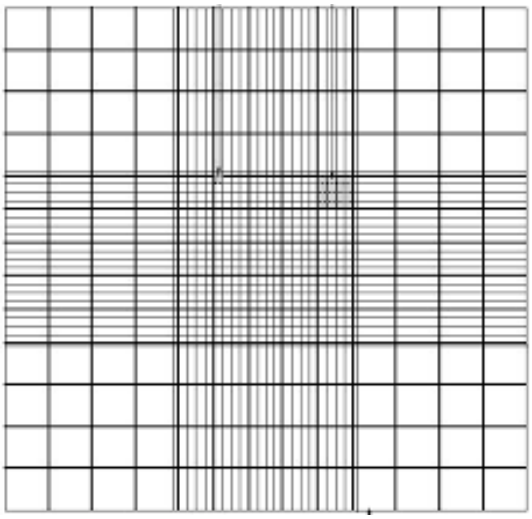
### 3.2.2. Određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo

Uzorak za određivanje broja stanica se najprije treba pripremiti tako da se stanice prihvaćene za podlogu Petrijeve zdjelice tretiraju tripsinom. Tripsinizacija omogućuje odvajanje stanica od podloge, a zatim se alikvot suspenzije stanica (10 $\mu L$) miješa s bojom tripan-plavo (10 µL). Boja tripan-plavo oboja samo mrtve stanice zbog njihovih propusnih membrana, dok žive stanice ostaju neobojene. Nakon bojanja broj stanica se određuje u Neubauerovoj komorici (Slika 3.). Komorica za brojenje se sastoji od velikog kvadrata u kojem je 9 manjih kvadratića, a stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze na krajevima velikog kvadrata (Slika 4.). Broj stanica u 1 mililitru suspenzije određuje se tako da se zbroj stanica u 4 kvadrata pomnoži s 5000, odnosno prema formuli (1):

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \qquad (1)$$




**Slika 3**. Neubauerova komorica za brojanje stanica



**Slika 4**. Izgled mrežice i podjela Neubauerove komorice

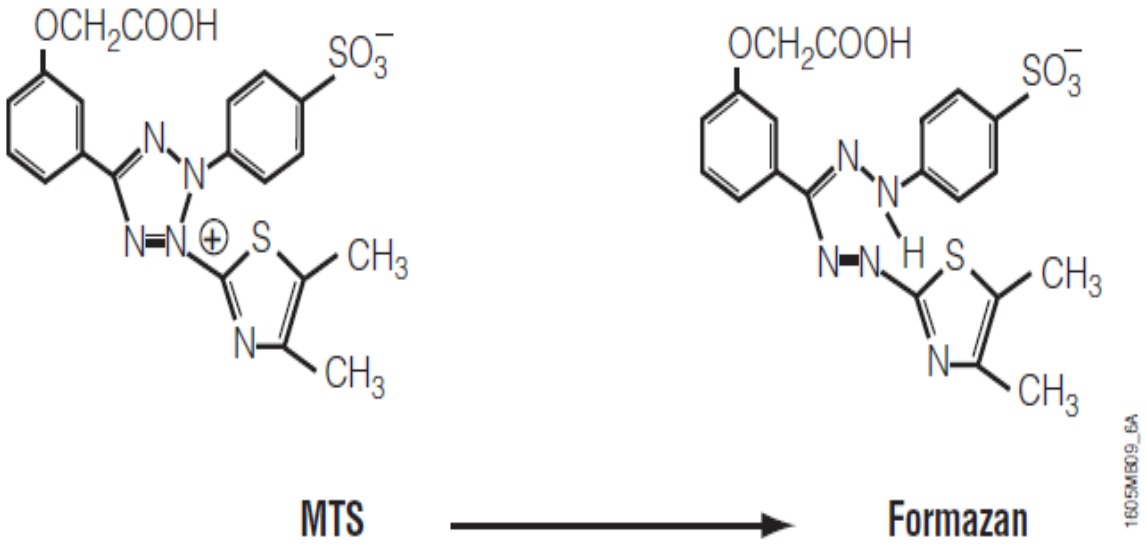
### 3.2.3. Nacjepljivanje i tretman MCF-7 stanica

Nakon brojanja stanica izračunato je koliko je potrebno suspenzije stanica kako bi se priredili dovoljni volumeni stanica za postavljanje pokusa s početnom koncentracijom $3\times 10^4$ stanica $mL^{-1}$. Pokusi su postavljeni u ploče sa 96 jažica, a u svaku jažicu nacijepljeno je 100 µL tako pripravljene suspenzije stanica. Ploča s jažicama zatim se inkubira 24 sata na 37 °C da se stanice prihvate za podlogu i počnu ponovno dijeliti i rasti. Nakon inkubacije, MCF-7 stanice tretirane su različitim koncentracijama (500 mg $L^{-1}$, 1000 mg $L^{-1}$ i 2000 mg $L^{-1}$) pripremljenih ishodnih otopina eutektičnih otapala ChCl:Ma, Pro:Ma, ChCl:Pro:Ma, B:Ma, Ma:Glu:Gly, B:Cit, ChCl:Cit, Cit:Glu:Gly. Za svaku koncentraciju eutektičnih otapala postavljene su četiri paralele, a kontrolnim stanicama je dodana destilirana voda koja je korištena za pripravu razrjeđenja. Stanice su zatim inkubirane 72 sata, a nakon inkubacije određen je učinak otapala na MCF-7 stanice MTS metodom.

### 3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica

U citotoksičnim istraživanjima koristi se kolorimetrijska MTS metoda za određivanje preživljenja stanica. Kit koji se koristi za provođenje ove metode sastoji se od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES (eng. *Phenazine ethosulfate*) koji povećava kemijsku stabilnost reagensa.

Tetrazolijevu sol MTS mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama pomoću NADPH ili NADH reduciraju u formazan ljubičaste boje koji je topiv u mediju (Slika 5.). Količina nastalog formazana mjeri se spektrofotometrijski pri 490 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica.




**Slika 5**. Strukture MTS-a i reduciranog produkta formazana

Stanicama koje su tretirane eutektičnim otapalima nakon tretmana od 72 sata uklonjen je medij te je dodan svježi DMEM s MTS reagensom 10% (v/v). Potom je potrebno inkubirati stanice 1-4 sata na 37 °C, a zatim se izmjeri apsorbancija pri 490 nm. Postotak preživljenja stanica izražava se kao omjer apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica pomnožen sa 100.

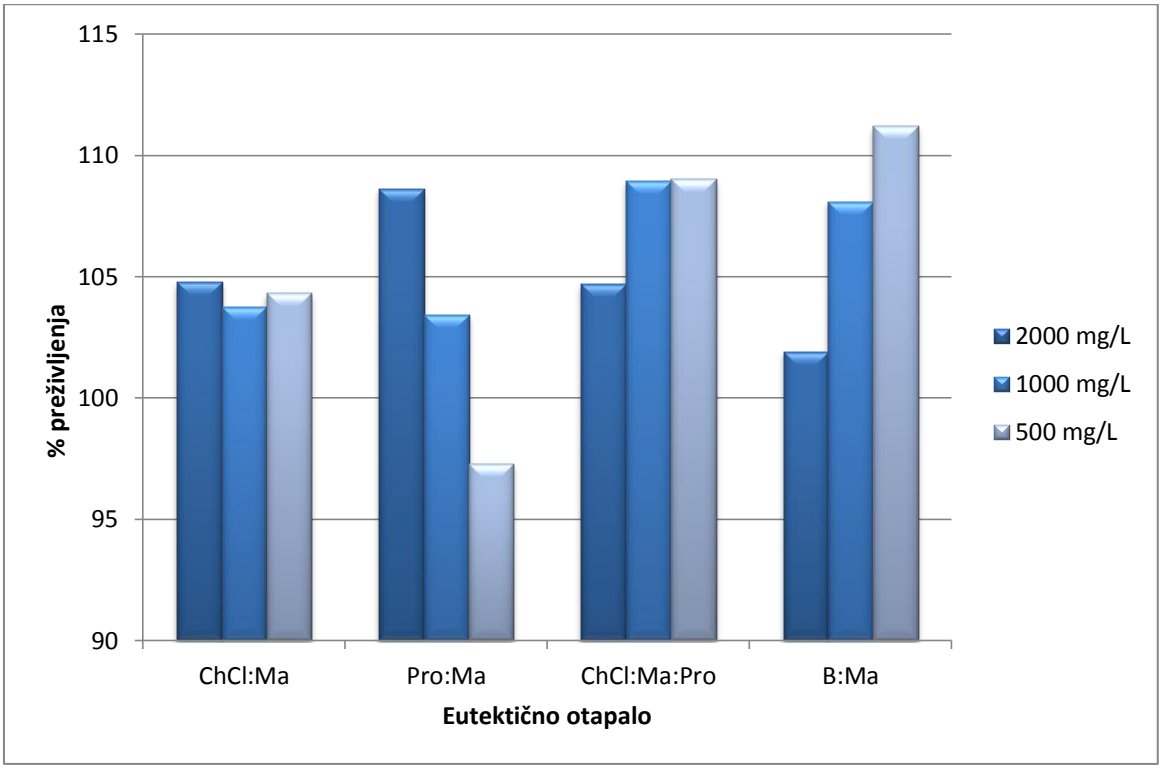
### 3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Prilikom rada sa stanicama i postavljanja pojedinačnih pokusa, MCF-7 stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim svjetlosnim mikroskopom, kako bi se pratio izgled i morfologija stanica te uočile eventualne promjene u izgledu tretiranih stanica. Da bi stanice bile bolje vidljive za fotografiranje i da se lakše uoče eventualne morfološke promjene, stanice su obojane bojom kristal-ljubičasto. U ploču s 4-6 jažica nacijepljeno je 2 mL suspenzije stanica početne koncentracije $3\times10^4$ stanica $mL^{-1}$ te su stanice tretirane s 200 μL ishodne otopine eutektičnih otapala: Pro:Ma, B:Ma i B:Cit. Ploča je zatim stavljena u inkubator na 72 sata. Nakon inkubacije uklonjen je medij i stanice su isprane dodatkom 1 mL PBS pufera, a zatim je dodana boja kristal-ljubičasto te je ploča vraćena na inkubaciju na 10-ak minuta. Stanice su ponovno bile isprane PBS puferom i slikane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

# 4. REZULTATI

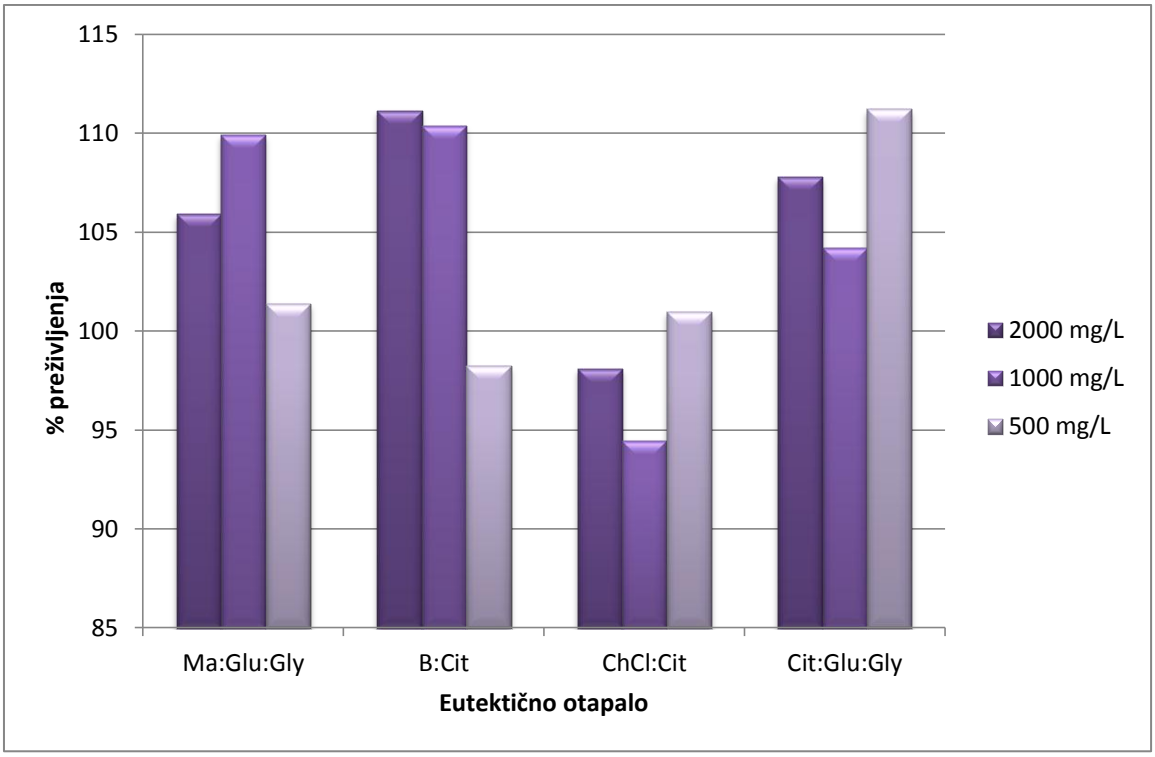
## 4.1. Utjecaj eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju

Svrha ovog istraživanja je ispitati utjecaj osam eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju tumora dojke. Ispitani su DES-ovi, kolin klorid:jabučna kiselina (ChCl:Ma), prolin:jabučna kiselina (Pro:Ma), kolin klorid:prolin:jabučna kiselina (ChCl:Pro:Ma), betain:jabučna kiselina (B:Ma), jabučna kiselina:glukoza:glicerol (Ma:Glu:Gly), betain:citratna kiselina (B:Cit), kolin klorid:citratna kiselina (ChCl:Cit) i citratna kiselina:glukoza:glicerol (Cit:Glu:Gly). MCF-7 stanice početne koncentracije $3\times10^4$ stanica $mL^{-1}$ nacijepljene su na ploču s 96 jažica i inkubirane 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije stanice su tretirane eutektičnim otapalima, sintetiziranim u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Nominalne koncentracije DES-ova u jažicama su bile 500 mg $L^{-1}$, 1000 mg $L^{-1}$ i 2000 mg $L^{-1}$, a zatim je ploča ponovno vraćena u inkubator na 72 sata. MTS kolorimetrijskom metodom određen je postotak preživljenja MCF-7 stanica tretiranih DES-ovima u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (Slike 6. i 7.).




**Slika 6**. Učinak ChCl:Ma, Pro:Ma, ChCl:Pro:Ma, B:Ma na MCF-7 staničnu liniju

Iz rezultata na slici 6. vidljivo je da ispitivana eutektična otapala nemaju citotoksični učinak na MCF-7 staničnu liniju pri svim ispitivanim koncentracijama.

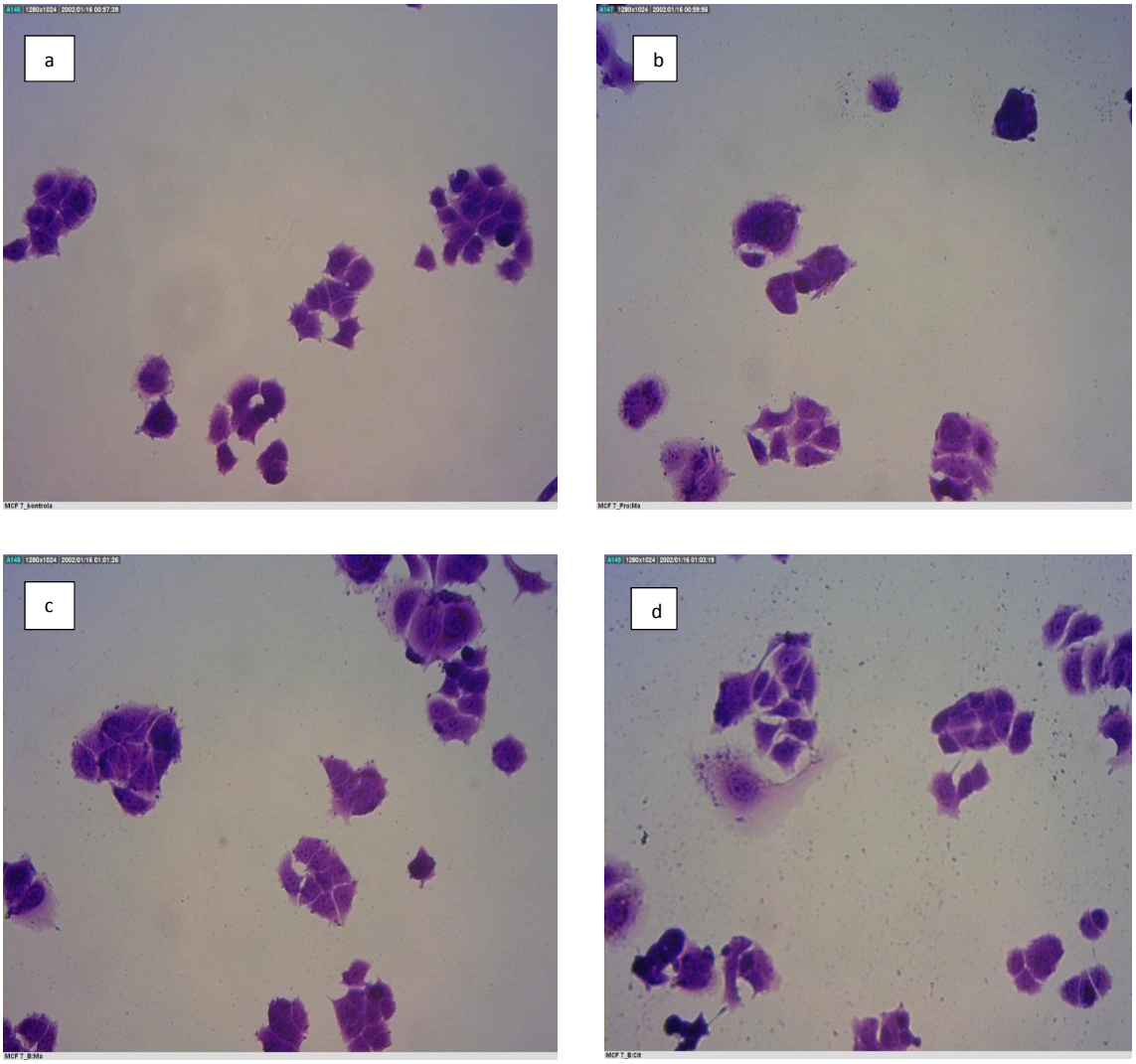



**Slika 7**. Učinak Ma:Glu:Gly, B:Cit, ChCl:Cit i Cit:Glu:Gly na MCF-7 staničnu liniju

Rezultati sa slike 7. Pokazuju da niti kod ovih eutektičnih otapala nije smanjeno preživljenje tretiranih MCF-7 stanica u odnosu na kontrolne stanice.

## 4.2. Morfologija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima

Potencijalna toksičnost eutektičnih otapala na MCF-7 stanice može se očitovati promjenama u izgledu stanica stoga je svjetlosnim mikroskopom praćena brojnost i izgled stanica tijekom tretmana eutektičnim otapalima. Kako bi stanice bile bolje uočljive obojane su bojom kristal-ljubičasto. Na slici 8. prikazane su kontrolne stanice i one tretirane eutektičnim otapalima (Pro:Ma, B:Ma i B:Cit) u koncentraciji 2000 mg $L^{-1}$.




**Slika 8**. MCF-7 stanice obojane kristal-ljubičastim i slikane pod inverznim svjetlosnim mikroskopom: kontrolne stanice (a), stanice tretirane s 2000 mg $L^{-1}$ Pro:Ma (b), B:Ma (c) i B:Cit (d)

Slika 8a prikazuje kontrolne MCF-7 stanice koje nisu tretirane DES-ovima. Morfologija stanica na slikama 8b, 8c i 8d (stanice izložene djelovanju Pro:Ma, B:Ma, i B:Cit) vrlo je slična onoj kontrolnih stanica. Brojnost i morfologija tretiranih stanica potvrđuje rezultate MTS metode, odnosno da ispitivana eutektična otapala nemaju citotoksičan učinak na MCF-7 staničnu liniju.

# 5. RASPRAVA

Zelena kemija u posljednje vrijeme sve više dobiva na važnosti te se zalaže za provođenje pravila održivog razvoja kako bi se smanjilo zagađenje okoliša uzrokovano tehnološkim procesima, a istovremeno unaprijedilo to područje znanosti i poboljšala sigurnost i produktivnost proizvodnih procesa (Kudlak i sur., 2015). Organska otapala, korištena u mnogim industrijskim procesima, su otapala koja ne zadovoljavaju principe zelene kemije. Naime, organska otapala nisu sigurna za upotrebu zbog svoje eksplozivnosti, toksičnosti, hlapljivosti i loše biorazgradivosti. Alternativu organskim otapalima predstavljaju ionske kapljevine i eutektična otapala. Međutim, ionske kapljevine uz sve prednosti ipak ne predstavljaju idealno zeleno otapalo zbog visoke cijene sinteze, često su toksične i slabo biorazgradive. Eutektična otapala za razliku od ionskih kapljevina za sada se pokazuju kao netoksična otapala, jeftinija su zbog lako dostupnih kemikalija za njihovu sintezu te su lako biorazgradiva. DES-ovi su mješavina dva ili više organska sastojka koja pri sobnoj temperaturi mogu biti u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju. Zagrijavanjem i miješanjem formiraju se vodikove veze između komponenti smjese i nastaje eutektična smjesa koja je u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi, a temperatura njenog tališta niža je od one pojedinih komponenata smjese. DES-ovi imaju široko područje primjene, koriste se u organskim sintezama, ekstrakcijama, elektrokemiji, enzimskim reakcijama i u mnogim drugim područjima zelenih tehnologija.

Iako su eutektična otapala pokazala mnoge potencijale i mogućnosti primjene u raznim industrijskim područjima, potrebno je poznavati njihov ekotoksikološki profil prije značajnije uporabe u industrijskom mjerilu. Ekotoksikološka istraživanja provode se kako bi se ispitao utjecaj novosintetiziranih tvari na ljudsko zdravlje i okoliš te utvrdila sigurnost njihove primjene. U svrhu istraživanja i određivanja potencijalne toksičnosti tvari primjenjuju se *in vitro* i *in vivo* testovi. *In vitro* testovi, u kojima se koriste stanične linije, kulture organa i dijelovi tkiva, imaju zadatak reducirati broj laboratorijskih životinja korištenih u toksikološkim *in vivo* ispitivanjima. Ovi testovi omogućuju i bolje razumijevanje molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama kemijski izazvane toksičnosti (Kniewald i sur., 2005). Kako su eutektična otapala nova generacija alternativnih otapala, potrebno je provesti još mnoga istraživanja da bi se u potpunosti ispitao i odredio njihov ekotoksikološki profil.

U ovom radu ispitivana je toksičnost osam eutektičnih otapala sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF-a na MCF-7 staničnoj liniji. Uzgoj MCF-7 stanične linije tumora dojke provodio se pri kontroliranim uvjetima u

inkubatoru. Za ispitivanje toksičnosti, MCF-7 stanice nacijepljene su u ploču sa 96 jažica te su tretirane različitim koncentracijama eutektičnih otapala: kolin klorid:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, betain:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, betain:citratna kiselina, kolin klorid:citratna kiselina, citratna kiselina:glukoza:glicerol. Nakon 72 sata MTS metodom određen je postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice te su rezultati grafički prikazani na slikama 6. i 7. Svi DES-ovi ispitani u ovom radu ne pokazuju inhibitorni učinak na rast MCF-7 stanica niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 2000 mg $L^{-1}$ što znači da navedeni DES-ovi prema trenutnoj klasifikaciji toksičnosti za ionske kapljevine (http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de) nisu toksični za MCF-7 stanice. Za eutektično otapalo kolin klorid:jabučna kiselina (ChCl:Ma) ispitano na CCO staničnoj liniji u radu Radošević i sur. (2016) također nije bilo moguće izračunati $EC_{50}$ vrijednost jer ni pri najvećoj ispitanoj koncentraciji DES-a nije došlo do 50%-tne inhibicije rasta stanica, što je uskladu s rezultatima u ovom radu. Paiva i sur. (2014) naveli su u svome radu veću citotoksičnost eutektičnih otapala koji kao donore vodikove veze u svojoj strukturi sadrže organske kiseline. Kao primjer naveden je DES kolin klorid:citratna kiselina (ChCl:Cit) koji je uzrokovao značajnu inhbiciju L929 stanica fibroblasta. U ovom radu nije uočen inhibitorni učinak ChCl:Cit na MCF-7 staničnu liniju niti pri najvišoj koncentraciji od 2000 mg $L^{-1}$, što ukazuje na moguće razlike između staničnih linija te da je nužno provesti ispitivanja kako na više različitih staničnih linija tako i na više različitih modelnih sustava.

Osim MTS metode promatrana je i morfologija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima (Pro:Ma, B:Ma i B:Cit) pod svjetlosnim inverznim mikroskopom. Stanice su obojane bojom kristal-ljubičasto kako bi lakše uočili eventualno nastale morfološke promjene (Slika 8.) Brojnost i izgled tretiranih stanica vrlo je slična kontrolnim stanicama što potvrđuje rezultate MTS metode, odnosno da ispitana eutektična otapala nemaju citotoksičan utjecaj na MCF-7 staničnu liniju.

Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da su eutektična otapala odgovarajuća alternativa štetnim organskim otapalima. Budući da su ispitivanja toksičnosti i ekotoksikološkog profila DES-ova tek na početku, potrebno je nastaviti s takvim istraživanjima kako bi sa sigurnošću znali da ova otapala uistinu zadovoljavaju principe zelene kemije.

# 6. ZAKLJUČCI

**Iz rezultata prikazanih u ovom radu proizlaze sljedeći zaključci:**

1. Ispitana eutektična otapala (ChCl:Ma, Pro:Ma, ChCl:Pro:Ma, B:Ma, ChCl:Cit, Ma:Glu:Gly, B:Cit, Cit:Glu:Gly) nisu citotoksična za MCF-7 staničnu liniju.
2. Svjetlosna mikroskopija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima potvrđuje rezultate citotoksičnosti određene MTS metodom.

# 7. LITERATURA

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessement of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. in Vitro.* **15**, 477-488.

Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., Al-Saadi, M.A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., Saheed, O.K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? Chemosphere 90, 2193-2195.

Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saadi, M.A., Hayyan, A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., (2013b) Assessment of cytoxicity and toxycity for phosphonium-based deep eutectic solvents, *Chemosphere* **93**, 455-459.

Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Ali Hashim, M. (2015) In Vitro and In Vivo Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. PloS One **10,** e0117934.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. **56**, 195-204.

Kudlak, B., Owezarek, K., Namiesnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975-11992.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., L. Reis, R., C. Duarte, A.R. (2014) Natural deep eutectic solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxiyol. and Environ. Saf.* **112**, 46-53.

Radošević, K., Železnjak, J., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2016) Comparative in vitro study of cholinum-based ionic liquids and deep eutectic solvents towards fish cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. **131**, 30-36.

Truhaut, R. (1977) Eco-Toxicology - objectives, principles and perspectives. *Ecotox. Environ. Saf*. **1**, 151–173.