

Utjecaj otapala na vijabilnost ljudskih stanica i određivanje parametara kinetike enzima acetilkolinesteraze

Zibar, Gabrijelela

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:038687>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Gabrijela Zibar
0058215836**

**UTJECAJ OTAPALA NA VIJABILNOST LJUDSKIH
STANICA I ODREĐIVANJE PARAMETARA KINETIKE
ENZIMA ACETILKOLINESTERAZE
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Biokemija 2

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj otapala na vijabilnost ljudskih stanica i određivanje parametara kinetike enzima
acetilkolinesteraze

Gabrijela Zibar, 0058215836

Sažetak:

U ovom radu ispitivan je utjecaj otapala dimetil sulfoksida (DMSO) i etanola (EtOH) na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze i vijabilnost PC-3 stanica raka prostate s ciljem određivanja koncentracija otapala pri kojima bi se mogla provoditi medicinska istraživanja lijekova bez značajnog utjecaja otapala na rezultate ispitivanja. Aktivnost acetilkolinesteraze u prisutnosti otapala određivana je metodom po Ellmanu te se iz dobivenih rezultata može zaključiti kako koncentracija DMSO do 0,1 % te EtOH do 0,5 % nema značajan inhibicijski učinak na enzim, pri koncentracijama supstrata acetiltiokolina od 0,1, 0,2 i 0,4 mmol/dm³. Pri ispitivanju citotoksičnosti otapala na PC-3 stanicama koristila se MTS metoda te je iz dobivenih rezultata vidljivo kako pri koncentraciji DMSO od 0,625 % ne dolazi do značajnog gubitka vijabilnosti, dok za EtOH ta koncentracija iznosi 5 %. Iz sveukupnih rezultata vidljivo je kako DMSO ima jači inhibicijski i citotoksični učinak, iz čega se može zaključiti kako bi pri ispitivanju učinkovitosti lijekova EtOH bio bolji izbor kao otapalo.

Ključne riječi: dimetil sulfoksid, etanol, acetilkolinesteraza, PC-3 stanice

Rad sadrži: 33 stranice, 12 slika, 6 tablica, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Komentor: dr. sc. Maja Katalinić

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effects of solvents on the viability of human cells and the determination of the kinetic parameters of the enzyme acetylcholinesterase

Gabrijela Zibar, 0058215836

Abstract: In this study, the impact of the solvents dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethanol (EtOH) on the activity of human acetylcholinesterase and the viability of PC-3 prostate cancer cells was examined, with the aim of determining solvent concentrations at which medicinal drug research could be conducted without significant solvent interference on the test results. The activity of acetylcholinesterase in the presence of solvents was determined using the Ellman method, and from the obtained results, it can be concluded that a DMSO concentration of up to 0,1 % and an EtOH concentration of up to 0,5 % do not have a significant inhibitory effect on the enzyme at substrate concentrations of acetylthiocholine of 0,1, 0,2 and 0,4 mmol/dm³. In the investigation of solvent cytotoxicity on PC-3 cells, the MTS method was used, and from the obtained results, it is evident that at a DMSO concentration of 0,625 % there is no significant loss of viability, whereas for EtOH, that concentration is 5 %. Overall, the results indicate that DMSO has a stronger inhibitory and cytotoxic effect, leading to the conclusion that EtOH would be a better choice as a solvent in drug efficacy studies.

Keywords: dimethyl sulfoxide, ethanol, acetylcholinesterase, PC-3 cells

Thesis contains: 33 pages, 12 figures, 6 tables, 40 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Igor Stuparević, PhD, Associate Professor

Co-mentor: Maja Katalinić, PhD

Thesis defended: September 8th 2023

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 1 |
| 2.1. ISTRAŽIVANJE I RAZVOJ NOVIH LIJEKOVA | 1 |
| 2.1.1. ACETILKOLINESTERAZA..... | 2 |
| 2.1.2. RAK PROSTATE..... | 5 |
| 2.2. ODABIR ODGOVARAJUĆEG OTAPALA U ISTRAŽIVANJU LIJEKOVA | 7 |
| 2.2.1. DIMETIL SULFOKSID (DMSO, C ₂ H ₆ OS) | 7 |
| 2.2.2. ETANOL (ETOH, C ₂ H ₅ OH) | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 9 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 9 |
| 3.1.1. KEMIKALIJE I REAGENSI | 9 |
| 3.1.2. PRIPREMA PUFERA, SUPSTRATA I REAGENSA | 10 |
| 3.1.3. ENZIMSKI PREPARAT | 11 |
| 3.1.4. PRIPREMA MEDIJA ZA UZGOJ STANICA..... | 12 |
| 3.1.5. ODMRZAVANJE I UZGOJ STANICA..... | 12 |
| 3.1.6. ODREĐIVANJE BROJA STANICA | 14 |
| 3.2. METODE | 14 |
| 3.2.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ACETILKOLINESTERAZE METODOM PO ELLMANU | 14 |
| 3.2.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI DIMETILSULFOKSIDA I ETANOLA MTS METODOM | 17 |
| 3.2.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA..... | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ACETILKOLINESTERAZE U PRISUTNOSTI OTAPALA DMSO I ETOH 22 | |
| 4.2. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI OTAPALA DMSO I ETOH NA PC-3 STANICAMA RAKA PROSTATE | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 28 |
| 6. POPIS LITERATURE..... | 29 |

1. UVOD

Acetilkolinesteraza je ciljna molekula enzima u tretiranju neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove, Alzheimerove bolesti i miastenije gravis, gdje se simptomi javljaju zbog manjka acetilkolina koji je prijenosnik živčanih impulsa (Khoury i sur., 2018). Pri razvijanju terapije za spomenute bolesti istražuju se aktivne molekule kao inhibitori acetilkolinesteraze kako bi se zaustavila razgradnja acetilkolina i neometano odvijao prijenos impulsa (Čolović i sur., 2013). Pokazalo se da mnogi spojevi koji inhibiraju acetilkolinesterazu mogu djelovati i na stanice raka, što predstavlja dodatni potencijal spojeva za istraživanje (Zandona i sur., 2023).

U razvoju novih lijekova bitno je dobro odabrati aktivnu molekulu i njezinu biološku metu u organizmu koja će se ispitivati te otapalo koje će se koristiti u ispitivanju, a pri odabiru otapala potrebno je odrediti kako utječe na cjelokupni sustav, odnosno postoji li interakcija s molekulom potencijalnog lijeka, njezinom metom te ima li samo otapalo citotoksični utjecaj na ljudske stanice (Perez-Vega i sur., 2013).

Cilj ovog završnog rada bio je odrediti utjecaj etanola i dimetil sulfoksida, kao najčešće korištenih otapala, na enzimsku aktivnost ljudske acetilkolinesteraze i na vijabilnost stanica raka prostate, a u svrhu procjene sigurnosti njihovog korištenja kao otapala u istraživanju potencijalnih lijekova vezanih uz ove biološke mete.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Istraživanje i razvoj novih lijekova

Razvoj novih lijekova dugotrajan je proces zbog brojnih ispitivanja koja se moraju provesti nad spojevima kako bi se istražila njihova sigurnost i učinkovitost u terapijskoj primjeni (Lihtar, 2020). Proces razvoja lijeka može se podijeliti u pet koraka (FDA, 2018).

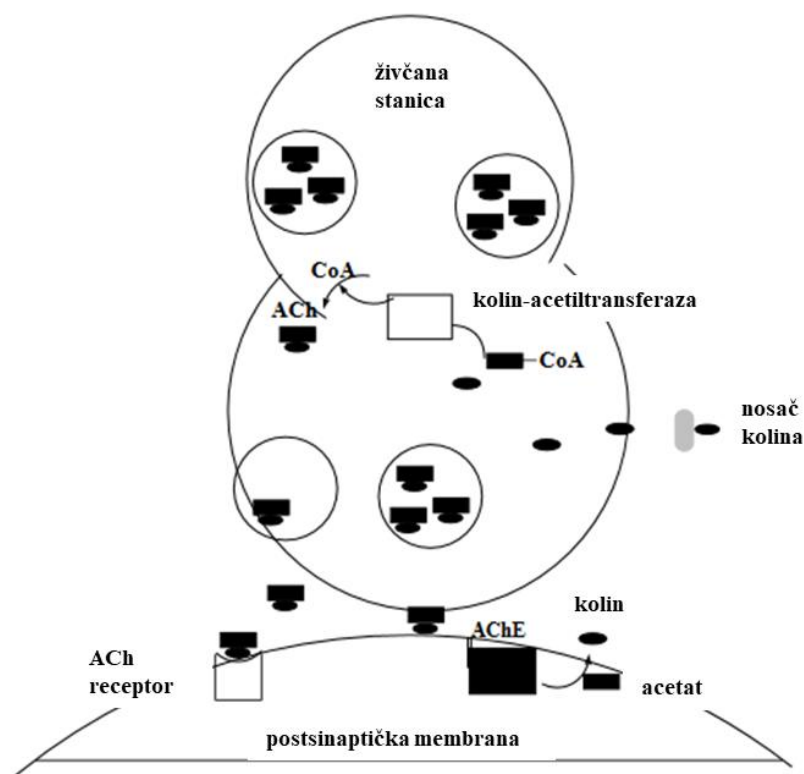
Prvi korak je istraživanje i razvoj, pri čemu se brojne molekule testiraju kako bi se istražila njihova fizikalno-kemijska svojstva i procijenila učinkovitost djelovanja prema ciljanim metama u organizmu, a time i učinkovitost u budućoj medicinskoj primjeni. Sljedeći korak su preklinička istraživanja u kojima se ispituje sigurnost molekula od interesa *in vitro* i *in vivo* na

životinjskim modelima. Molekule koje se pokazu najučinkovitijima ulaze u treći korak, odnosno klinička istraživanja koja se provode na pacijentima koji dobrovoljno sudjeluju u istraživanju. Ako se neka odabrana molekula pokaže sigurnom i učinkovitom tijekom ovih testiranja, svi rezultati se predaju na uvid nadležnoj agenciji za razvoj lijekova te se nakon odobrenja i iznošenja lijeka na tržište, nastavljaju motriti sigurnost i moguće nuspojave lijeka (FDA, 2018).

Aktualna područja u razvijanju novih lijekova u današnje vrijeme su područje terapije neurodegenerativnih bolesti, pri čemu je ciljna meta enzim acetilkolinesteraza te područje tretmana raka, ponajprije raka prostate i raka dojke koji predstavljaju velik javnozdravstveni problem (Lazarević-Pašti i sur., 2017). U ovim područjima istraživanja, većina novosintetiziranih spojeva koji se ispituju kao potencijalni lijekovi u pretkličkim *in vitro* testovima, su slabo topljivi u vodenim medijima zbog lipofilnosti koja bi im omogućila prolaz kroz biološke membrane, kao npr. krvno-moždanu barijeru (Sit i sur., 2011). Iz tog razloga se otopine za testiranje ovih spojeva pripremaju u drugim otapalima, poput etanola ili dimetil sulfoksida, pri čemu je važno uzeti u obzir svojstva tih otapala i njihov utjecaj na rezultat *in vitro* testova u procesu procjene potencijala nekog novog spoja (Kovarik i sur., 2019; Perez-Vega i sur., 2013).

2.1.1. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (AChE, E.C. 3.1.1.7.) je serinska esteraza koja hidrolizira acetilolin (Slika 1.), molekulu prijenosnika živčanih impulsa, pri čemu se njegovom hidrolizom prijenos impulsa zaustavlja (Mesulam i sur., 2002). AChE djeluje u sinaptičkoj pukotini, a eksprimirana je u živčanim stanicama, mozgu i mišićima te je također prisutna u krvi, gdje je vezana na eritrocite, ali njena funkcija na eritrocitima još uvijek nije poznata (Bosak i sur., 2011).



Slika 1. Djelovanje acetilkolinesteraze (AChE) u sinapsi, odnosno hidroliza acetilkolina kao prijenosnika živčanih impulsa (slika preuzeta i modificirana prema referenci Čolović i sur., 2013)

Ljudsku AChE (Slika 2.) čini oko 550 aminokiselina (~ 66 kDa), a nastaje kao produkt ekspresije gena na kromosomskoj poziciji 7q22 (Taylor i Radić, 1994). Acetilkolinesteraza je monomer koji se sastoji od 12 β nabranih ploča i 14 α uzvojnica, a aktivno mjesto enzima je sastavljeno od „anionskog“ i „esterskog“ dijela, pri čemu anionsko mjesto veže kvaterni amin kolinskog ostatka acetilkolina, a estersko mjesto čini katalitičku jedinicu sastavljenu od aminokiselinskih ostataka serina, histidina i glutamata (Čolović i sur., 2013). Sam gen za AChE u ljudi je konzerviran, no moguće su takozvane mutacije jednog nukleotida, odnosno SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) koje ne mijenjaju glavne karakteristike enzima, već mogu pojačati njegovu osjetljivost prema nekim inhibitorima ili utjecati na protein-protein interakcije, na primjer supstitucija triptofana na poziciji 84 alaninom uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima 3000 puta (Hasin i sur., 2005; Čolović i sur., 2013).



Slika 2. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze u obliku dimera (PDB kod: 4PQE)
(Dym i sur., 2015)

Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze može se provesti različitim metodama, pri čemu se u pravilu koriste kolorimetrijske metode, kao npr. metoda po Ellmanu (Ellmanu i sur., 1961) ili metoda korištenja nanopločica manganovog dioksida (MnO_2) u kojoj se enzimskom hidrolizom pomoću AChE hidrolizira acetiltiokolin čiji produkt tiokolin zatim uzrokuje razgradnju nanopločica što dovodi do smanjenja vrijednosti apsorbancije otopine te se dodatkom inhibitora enzima može kvantitativno odrediti smanjenje aktivnosti mjerenjem povećanja vrijednosti apsorbancije (Yan i sur., 2017). Za istraživanja aktivnosti ljudske acetilkolinesteraze danas se koristi ili acetilkolinesteraza izolirana iz ljudskih eritrocita ili ona pripremljena tehnikom rekombinantnog inženjerstva (Bosak i sur., 2011).

Iako je acetilkolinesteraza najpoznatija kao meta djelovanja visokotoksičnih organofosfornih pesticida i živčanih bojnih otrova, trenutno se istražuje u polju biomedicine kao ciljna molekula u tretmanima nekih neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te miastenije gravis, a kod kojih postoji manjak acetilkolina i javlja se poremećaj u prijenosu

živčanih impulsa (Čolović i sur., 2013; Khoury i sur., 2018). U tretmanu spomenutih bolesti koriste se inhibitori acetilkolinesteraze kao aktivne tvari, pri čemu vezanje inhibitora smanjuje aktivnost acetilkolinesteraze te time sprječava hidrolizu acetilkolina i zaustavljanje prijenosa živčanih impulsa (Čolović i sur., 2013). Nove spoznaje o mehanizmu djelovanja acetilkolinesteraze dovele su do boljeg razumijevanja njezinog doprinosa u razvitku i napredovanju spomenutih bolesti, pri čemu se istražuju već poznati inhibitori ovog enzima te se ulaže napor u pronalazak novih (Bosak i sur., 2011; Pohanka i sur., 2011).

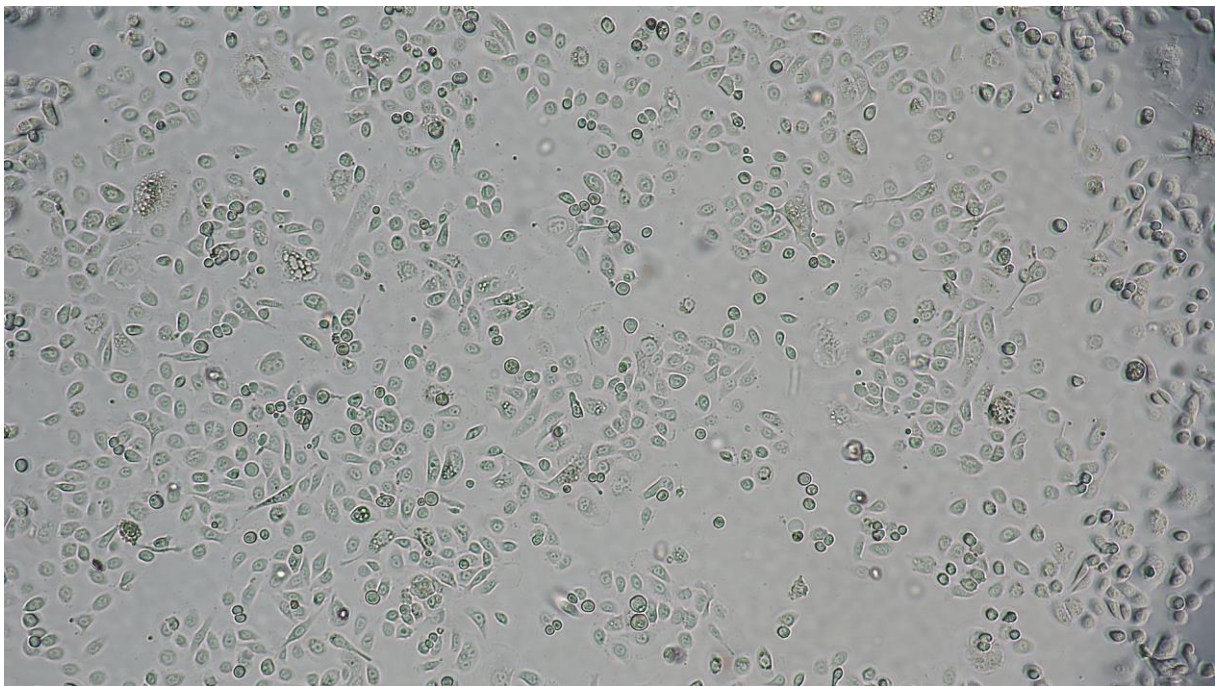
2.1.2. Rak prostate

Prostata je žlijezdani organ koji se nalazi u donjem dijelu zdjelice, ispod mokraćnog mjehura te kroz nju prolazi gornji dio mokraćne cijevi muškog spolnog organa (Dunn i Kazer, 2011). Organ je podijeljen na dva dijela: vanjski dio građen od vezivno-mišićnog tkiva koji tvori 30% veličine organa i unutarnji dio kojeg čine žlijezde i izvodni kanalići, a sačinjen je od epitelnog tkiva, endotelne vaskulature i imunoloških stanica te sačinjava 70% veličine organa (Packer i sur., 2016). Prostata je važan reproduktivni organ jer izlučuje enzime, lipide, amine i metalne ione u sjemenu tekućinu koji omogućuju normalnu funkciju muških spolnih stanica (Kumar i Majumder, 2007).

Rak prostate razvija se zbog mutacija u stanicama koje im donose proliferativnu prednost pred drugim stanicama te se mitozom takvih stanica širi tumorogeni potencijal (Vogelstein i sur., 2013). Povećan rizik za razvijanje raka prostate imaju osobe starije životne dobi te osobe s poviješću malignih bolesti, genetskih mutacija ili nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma u obitelji (Sung i sur., 2021). Način života također može utjecati na vjerojatnost razvijanja raka prostate, prilikom čega su čimbenici koji povećavaju vjerojatnost: pušenje, prekomjerna tjelesna težina te učestala konzumacija crvenog mesa (Sung i sur., 2021). Također, intenzivno se istražuje pojava prostatitisa uzrokovanog bakterijama (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*) ili virusima (humani papiloma virus, *Herpes simplex virus* tipa 1 i 2) kao uzročnik razvoja raka prostate, prilikom čega je uočena korelacija u 20% slučajeva (Packer i sur., 2016).

Rak prostate drugi je najčešći oblik raka (nakon raka pluća) te je peti najčešći uzročnik smrti kod muškaraca (Rawla, 2019). Najčešća terapija u liječenju raka prostate je terapija radijacijom, pri čemu su brojna istraživanja pokazala kako veće doze radijacijske terapije omogućuju kontrolu nad širenjem raka prostate, ali također povećavaju rizike za razvoj komplikacija tijekom liječenja (Nakamura i sur., 2007). Zbog toksičnosti radijacijske terapije već se desetljećima ulažu napori u razvoj novih metoda liječenja kako bi se smanjile nuspojave i utjecaj na zdrave stanice (Lee i sur., 2005).

Kao model raka prostate u *in vitro* istraživanjima danas se koriste stanične linije kao što su DU-145, PC-3 (Slika 3.) i LNCaP ili primarne stanice tumora izolirane iz pacijenata nakon učinjene biopsije (Young i sur., 2014).



Slika 3. Mikroskopska slika (povećanje 200x) PC-3 stanica raka prostate korištenih za ispitivanje citotoksičnosti otapala DMSO i EtOH u ovom radu (vlastita fotografija)

2.2. Odabir odgovarajućeg otapala u istraživanju lijekova

Odabir odgovarajućeg otapala ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima otapala i ispitivanog spoja, kao što su reaktivnost, polarnost, toksičnost, zapaljivost i sl., ali i o vrsti *in vitro/in vivo* testova kojima se ispituje djelovanje samog spoja. Postoje razne metode koje se koriste u odabiru otapala, poput probira svojstava (engl. *property screening*), procjene svojstava i topljivosti putem termodinamičkih modela ili procjene reaktivnosti (Perez-Vega i sur., 2013). Također je važno uzeti u obzir cijenu otapala, pogotovo prilikom provođenja ekstenzivnih istraživanja, te njegovu efikasnost kako bi troškovi bili što manji (Song i sur., 2021). Najčešće se odabir odgovarajućeg otapala ipak bazira na iskustvu, analogiji i eksperimentalnom testiranju (Perez-Vega i sur., 2013).

2.2.1. Dimetil sulfoksid (DMSO, C₂H₆OS)

Dimetil sulfoksid (DMSO) je organski spoj bez boje, okusa i mirisa koji se na sobnoj temperaturi nalazi u tekućem stanju. Otkriven je kao nusprodukt prilikom proizvodnje papira iz drvene mase u 19. stoljeću (Capriotti i Capriotti, 2012). Prvi put ga je sintetizirao Alexander Zaytsev, 1867. godine. U kemijskoj industriji, DMSO je polarno, aprotično otapalo sa širokom primjenom zbog njegove mogućnosti otapanja polarnih i nepolarnih molekula te svojstava krioprotektora te se već desetljećima koristi kao otapalo u reakcijskim sustavima i kao medij u analitičkim istraživanjima (Awan i sur., 2020). DMSO se koristi i u farmaceutskoj industriji zbog svojih protuupalnih svojstava te je također najčešće korišteno otapalo kod pripreme otopina novosintetiziranih spojeva koji se istražuju kao potencijalni lijekovi (Tashrifi i sur., 2020).

DMSO se u velikoj mjeri koristi kao krioprotektor pri čuvanju staničnih linija (Cardoso i sur., 2017). Iako omogućuje sigurno i stabilno čuvanje stanica, njegov utjecaj na fiziologiju stanica i zapažena citotoksičnost su faktori zbog kojih se istražuju novi, manje citotoksični krioprotektori i načini na koje je moguće modificirati korištenje DMSO-a kako bi utjecaj citotoksičnosti bio manji (Cardoso i sur., 2017). Jedan od načina na koji je uspješno smanjen toksični učinak DMSO-a na stanice je korištenje disaharida u kombinaciji s DMSO pri čemu se smanjila koncentracija DMSO u otopini za čuvanje stanica zbog prisutnih krioprotektorskih svojstava disaharida (Cardoso i sur., 2017). Uz razvoj krioprotektora u kojima bi se smanjila

koncentracija DMSO, također se razvijaju krioprotektori koji ne sadrže DMSO. Ovakvi spojevi su široko ispitivani, ali još uvijek nisu našli redovitu primjenu u medicini i industriji (Awan i sur., 2020).

DMSO se proizvodi kontinuiranom oksidacijom dimetil sulfida (DMS) pri čemu se kao katalizator koristi NO_x (smjesa NO, N₂O₃, NO₂ i N₂O₄). U tekuću fazu DMS-a se uvodi smjesa plinova NO_x te plin bogat kisikom koji oksidira DMS u reakciji nastanka DMSO. NO_x se zatim reciklira za ponovno korištenje kako bi se povećala ekonomičnost procesa (Fukui i sur., 2002).

2.2.2. Etanol (EtOH, C₂H₅OH)

Etanol je bezbojna tekućina karakterističnog okusa i mirisa. Koristi se u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao otapalo ili sredstvo za ekstrakciju aktivnih tvari te također ima široku uporabu u medicini kao učinkovit dezinficijens zbog svojih antibakterijskih, antifungalnih i antiviralnih svojstava (Parke i Birch, 1999). U današnje vrijeme, najširu primjenu ima kao biogorivo, zbog čega se u vrijeme podizanja svijesti o štetnosti fosilnih goriva povećala potražnja za proizvodnjom i razvitkom etanola kao biogoriva (Sun i Wang, 2014).

Tradicionalno se proizvodi iz sirovina bogatih šećerom (melase šećerne repe i trske) ili škrobom (pšenica, kukuruz) tako da se inducira alkoholno vrenje radnog mikroorganizma, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pri čemu se šećeri prevode u etanol i CO₂. U novije vrijeme razvio se proces proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina (celuloza, hemiceluloza, lignin), pri čemu je potrebno provesti predtretman sirovina, a zatim hidrolizirati polimere do jednostavnih šećera koje radni mikroorganizam može prevesti u etanol (Taherzadeh i Karimi, 2007). Ovaj način proizvodnje razvijen je kako bi se smanjili troškovi proizvodnje etanola jer korištenje lignoceluloznih sirovina iz otpadnih materijala drvne i poljoprivredne industrije ne konkurrira proizvodnji hrane, zbog čega ne dolazi do porasta cijene prehrambenih proizvoda ni lignoceluloznih sirovina (Jansen i sur., 2017; Oliviera i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i reagensi

- Dimetil sulfoksid (DMSO) – Kemika (Hrvatska)
- Etanol (EtOH) – Kemika (Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) – Kemika (Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) – Kemika (Hrvatska)
- Standardna otopina pufera za baždarenje pH-metra (pH = 7) – Mettler Toledo (Švicarska)
- Acetiltiokolin (ATCh) – Sigma-Aldrich (SAD)
- 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) – Sigma-Aldrich (SAD)
- DMEM/F-12 medij (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) – Sigma-Aldrich (SAD)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) – Sigma-Aldrich (SAD)
- P/S (Penicilin/Streptomicin) – Sigma-Aldrich (SAD)
- NAA (*Non-essential Amino Acid Solution*) – Sigma-Aldrich (SAD)
- Natrijev klorid (NaCl) – Kemika (Hrvatska)
- Kalijev klorid (KCl) – Kemika (Hrvatska)
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) – Kemika (Hrvatska)
- Tripsin – Sigma-Aldrich (SAD)
- Tripin plava boja – Invitrogen (SAD)
- Kit za određivanje citotoksičnosti otapala, odnosno određivanje vijabilnosti stanica uz prisutstvo otapala: CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) – Promega (SAD)

3.1.2. Priprema pufera, supstrata i reagensa

Pufer korišten za *in vitro* određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze u eksperimentalnom dijelu je fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen iz otopina natrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4) i natrijevog dihidrogenfosfata (NaH_2PO_4).

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Na_2HPO_4 | 14,19 g |
| H_2O (deionizirana) | 1 L |

Otopina je zagrijavana i miješana na magnetnoj mješalici (Nahita (Auxilab), Španjolska) kako bi se povećala topljivost Na_2HPO_4 .

| | |
|-------------------------------------|--------|
| NaH_2PO_4 | 7,80 g |
| H_2O (deionizirana) | 0,5 L |

Nakon što su otopine pripremljene i ohlađene na sobnu temperaturu cca 22-25 °C, pH-metar (Mettler Toledo, Švicarska) je baždaren standardnom otopinom pH 7.

U staklenu čašu za pripremu uliveno je 600 mL lužnatije otopine (Na_2HPO_4) te se uz konstantno miješanje dokapavala kiselija otopina (NaH_2PO_4) do postizanja vrijednosti pH 7,4.

Supstrat korišten pri određivanju aktivnosti acetilkolinesteraze je acetiltiokolin (ATCh) koji je pripremljen kao 20 mmol/dm³ otopina u vodi.

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Acetiltiokolin (ATCh) | 0,05402 g |
| H_2O (deionizirana) | 9,34 mL |

Pri mjerenju aktivnosti acetilkolinesteraze kao reagens je korištena 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) koja je pripremljena kao 6 mmol/dm³ otopina u vodi.

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| DTNB | 0,10393 g |
| H_2O (deionizirana) | 43,70 mL |

Za ispiranje PC-3 stanica raka prostate korišten je 1x PBS (*Phosphate-buffered Saline Solution*) koji je pripremljen za provođenje pokusa, a prije korištenja temperiran na temperaturu uzgoja stanica, odnosno 37 °C. Opisana je priprema 10x PBS-a u 1 L H₂O, nakon čega se prilikom korištenja otopina razrjeđuje do 1x u vodi.

| | | |
|----------------------------------|--------|--------------------------|
| NaCl | 80 g | 1,37 mol/dm ³ |
| KCl | 2 g | 27 mmol/dm ³ |
| Na ₂ HPO ₄ | 14,4 g | 100 mmol/dm ³ |
| KH ₂ PO ₄ | 2,4 g | 18 mmol/dm ³ |

Kemikalije se otope u cca 800 mL vode te se zatim podešava vrijednost pH na 7,4 pomoću HCl ili NaOH te se nakon podešavanja pH nadopunjava do 1 L.

3.1.3. Enzimski preparat

Kao izvor ljudske acetilkolinesteraze (AChE) korišten je uzorak heparinizirane ljudske krvi, odnosno izoliranih eritrocita gdje je AChE vezana na membrane. Eritrociti su prethodno pripremljeni prema standardnom protokolu u laboratoriju i u skladu s odobrenjem Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb. Nakon pripreme eritrociti su zamrznuti na -20 °C te odmrznuti netom prije pokusa. Za pokus mjerenja aktivnosti AChE uzorak eritrocita razrijeđen je 40x u ranije pripremljenom fosfatnom puferu, te je konačno razrjeđenje u reakcijskoj smjesi bilo 400x.

| | |
|----------------|----------|
| eritrociti | 0,125 mL |
| fosfatni pufer | 4,875 mL |

Otopina se priprema neposredno prije mjerenja.

3.1.4. Priprema medija za uzgoj stanica

PC-3 stanice raka prostate (ECACC 90112714, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska) uzgajane su u DMEM/F-12 mediju (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*). Opisana je priprema 100 mL medija.

| | |
|--|-------|
| DMEM/F-12 | 88 mL |
| FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>) | 10 mL |
| P/S (Penicilin/Streptomycin) | 1 mL |
| NAA (<i>Non-essential Amino Acid Solution</i>) | 1 mL |

Medij je pripremljen iz sterilnih otopina termostatiranih na 37 °C pri aseptičnim uvjetima u laminaru (Termofisher Scientific, SAD).

3.1.5. Odmrzavanje i uzgoj stanica

PC-3 stanice raka prostate koje su korištene za ispitivanje citotoksičnosti otapala čuvale su se zamrznute u posebnom krio mediju (sadrži DMSO) u spremniku s tekućim dušikom (-196 °C). Prije odleđivanja stanica potrebno je temperirati ranije pripremljeni medij u vodenoj kupelji (Cole-Parmer, SAD) na 37 °C, odnosno temperaturu uzgoja stanica. Stanice se odmrzavaju u vodenoj kupelji 1-2 minute te se suspenzija dokapava u posudu za uzgoj (engl. *T-flask*) s medijem odmah po odmrzavanju. Nacjepljivanje stanica provodi se u aseptičnim uvjetima u laminaru. Nakon nacjepljivanja stanice se inkubiraju u kontroliranim uvjetima (37 °C, 5 % CO₂) te im se idući dan zamijeni medij kako bi se uklonio DMSO u kojem su bile zamrznute te se zatim vrate u inkubator (Termofisher Scientific, SAD).

| | |
|----------------------------|--------------------|
| posuda za uzgoj - površina | 75 cm ² |
| medij | 10 mL |
| suspenzija stanica | 1 mL |

Tijekom provođenja eksperimenta potrebno je održavati staničnu liniju vitalnom, što podrazumijeva promjenu medija i pasažu (presađivanje) stanica. Medij je nužno mijenjati jer stanice tijekom diobe i rasta troše hranjive tvari i izmjena medija osigurava održavanje stanica živima. DMEM/F-12 medij pripremljen na način koji je opisan ranije sadrži indikator pH otopine fenol-crveno, a kada su potrošene hranjive tvari dolazi do promjene pH te je uočljiva promjena boje medija u žutu, što daje do znanja da ga je potrebno zamijeniti. Izmjena medija također se provodi u aseptičnim uvjetima, tako da se iskorišteni medij ukloni iz posude vakuum sisaljkom, pri tome pazeći da se ne oštete stanice zalijepljene na dnu posude, te se zatim doda svježe pripremljen medij temperiran na temperaturu uzgoja.

| | |
|----------------------------|--------------------|
| posuda za uzgoj - površina | 75 cm ² |
| medij | 10 mL |

Pasaža stanica provodi se kad je prekrivenost površine za rast veća od 70-80 % te stanice počinju odumirati zbog pojave kompeticije za hranu. Prvi korak u pasaži stanica je uklanjanje medija na isti način na koji se uklanja i prilikom zamjene medija. Zatim se stanice ispiru sa 100 µL 1x PBS-a, kako bi se u potpunosti uklonio serum FBS (inaktivira enzim tripsin koji se dodaje za odljepljivanje stanica od podloge). Potom se dodaje otopina tripsina 0,25 % kako bi se stanice odlijepile s dna posude, odnosno kako bi se pocijepali peptidni lanci kojima se stanice pričvršćuju za podlogu. Stanice tretirane tripsinom se inkubiraju 1-2 minute. Ako se nastavlja uzgoj, određen volumen suspenzije stanica se otpipetira u novu posudu te se doda potreban volumen cjelokupnog medija (s FBS-om), pri čemu se inaktivira tripsin, što omogućuje ponovno vezanje stanica za dno posude. Zatim se posuda vrati u inkubator kako bi se nastavio uzgoj. U slučaju da se stanice tripsiniziraju kako bi se koristile u eksperimentu, potrebno ih je prebrojati kako bi se znala točna koncentracija stanica u suspenziji za daljnji rad. Pesađivanje stanica se također odvija u aseptičnim uvjetima rada.

| | |
|------------------------------------|--------------------|
| posuda za uzgoj - površina | 75 cm ² |
| PBS | 10 mL |
| tripsin 0,25 % | 2 mL |
| medij DMEM/F-12 | 10 mL |
| suspenzija stanica za presađivanje | 1 mL |

3.1.6. Određivanje broja stanica

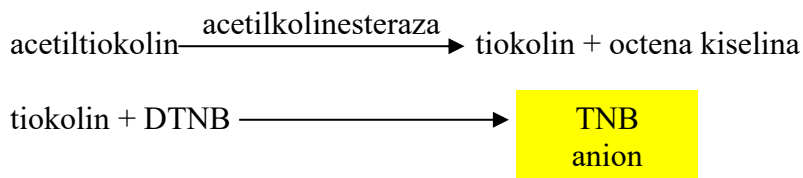
Za brojanje stanica korišten je uređaj TC-20 Cell Counter (BioRad, SAD). Suspenziji stanica dodaje se boja Tripan plava u omjeru 1:1 te se 10 µL pripremljene suspenzije nanese u komoricu na pločici za brojanje (BioRad, SAD) koja se zatim umetne u uređaj. Na uređaju se odabere opcija „Count“, nakon čega se postavi raspon veličine stanica koje se broje. Uređaj, nakon što izbroji stanice, prikazuje točan broj stanica po mililitru, pri čemu uzima u obzir razrjeđenje bojom, te daje informaciju o ukupnom broju stanica u uzorku te postotku živih/mrtvih stanica u suspenziji.

| | |
|--------------------------------|-------|
| suspenzija stanica za brojanje | 20 µL |
| Tripan plava boja | 20 µL |

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu

Metoda po Ellmanu je metoda koja se koristi za mjerenje aktivnosti kolinesteraza, a bazira se na reakciji između tiokolina i tiolnog reagensa DTNB (Ellman i sur., 1961). U reakcijskoj smjesi, supstrat za enzim acetilkolinesterazu je acetiltiokolin, koji se u enzimskoj reakciji cijepa na octenu kiselinu i tiokolin. Nastali tiokolin reagira s reagensom DTNB i nastaje TNB anion, spoj žute boje, čiji se intenzitet zatim mjeri spektrofotometrom (Slika 4.). Aktivnost acetilkolinesteraze ovisi o koncentraciji enzima, temperaturi, pH i koncentraciji supstrata.



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz reakcija u metodi po Ellmanu

U eksperimentu su se koristili: acetilkolinesteraza iz ljudske krvi (400x konačno razrjeđenje), fosfatni pufer, otopine DTNB (0,33 mmol/dm³ konačna koncentracija) i ATCh (raspon koncentracija), a čija je priprema opisana ranije te komercijalno dostupna otapala DMSO (0,1 – 10 %) i etanol (0,5 – 10 %). Mjerenje se provodilo Cary 3500 UV-VIS Multicell Peltier spektrofotometrom (Agilent Technologies, Inc., SAD) pri 25 °C i valnoj duljini od 436 nm u trajanju od 2 min te je eksperiment ponovljen četiri puta za određivanje utjecaja DMSO-a i tri puta za određivanje utjecaja etanola na aktivnost AChE. Dobiveni eksperimentalni rezultati prikazani su kao promjena apsorbancije u jedinici vremena, odnosno $\Delta A/\text{min}$.

Aktivnost enzima mjerila se pri koncentracijama acetiltiokolina (ATCh) od 0,1 mmol/dm³, 0,2 mmol/dm³ i 0,4 mmol/dm³ u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena od 1 mL.

$$c_1 (\text{ATCh}) = 20 \text{ mmol/dm}^3$$

$$V_2 (\text{ATCh}) = 3 \text{ mL} = 3000 \mu\text{L}$$

Koncentracije pripremljenih otopina ATCh:

$$c_2 (\text{ATCh}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 (\text{ATCh}) = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{1 \text{ mM} \cdot 3000 \mu\text{L}}{20 \text{ mM}} = 150 \mu\text{L}$$

| | |
|---------------------------------|--------------------|
| ATCh (20 mmol/dm ³) | 150 μL |
| H ₂ O (deionizirana) | 2850 μL |

$$c_2 (\text{ATCh}) = 2 \text{ mmol/dm}^3$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 (\text{ATCh}) = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{2 \text{ mM} \cdot 3000 \mu\text{L}}{20 \text{ mM}} = 300 \mu\text{L}$$

| | |
|---------------------------------|--------------------|
| ATCh (20 mmol/dm ³) | 300 μL |
| H ₂ O (deionizirana) | 2700 μL |

$$c_2 (\text{ATCh}) = 4 \text{ mmol/dm}^3$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 (\text{ATCh}) = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{4 \text{ mM} \cdot 3000 \mu\text{L}}{20 \text{ mM}} = 600 \mu\text{L}$$

| | |
|---------------------------------|--------------------|
| ATCh (20 mmol/dm ³) | 600 μL |
| H ₂ O (deionizirana) | 2400 μL |

Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze bez prisutnosti otapala volumena 1 mL, odnosno 1000 μL , sadržavala je supstrat (ATCh), enzim (AChE), reagens (DTNB) i pufer (Tablica 1.) .

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu

| pripremne otopine | volumen u reakcijskoj smjesi | konačna koncentracija |
|--|-------------------------------------|--|
| ATCh (1 mmol/dm ³ , 2 mmol/dm ³ , 4 mmol/dm ³) | 100 μL | 0,1 mmol/dm ³ , 0,2 mmol/dm ³ , 0,4 mmol/dm ³ |
| AChE (razrijeđen 40x) | 100 μL | razrijeđen 400x |
| DTNB (6 mmol/dm ³) | 50 μL | 0,3 mmol/dm ³ |
| fosfatni pufer | 750 μL | - |

Aktivnost acetilkolinesteraze se mjerila pri različitim koncentracijama potencijalnih inhibitora DMSO i etanola, pri čemu se u reakcijskoj smjesi volumen pufera smanjio za volumen dodanog otapala (Tablica 2., Tablica 3.).

DMSO (izvorni) = 100 %

Tablica 2. Koncentracije DMSO dodane u reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze

| konačna koncentracija DMSO | volumen izvornog DMSO | volumen pufera | volumen reakcijske smjese |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 0,1 % | 1 μL | 749 μL | 1000 μL |
| 1 % | 10 μL | 740 μL | 1000 μL |
| 10 % | 100 μL | 650 μL | 1000 μL |

EtOH (izvorni) = 96 %

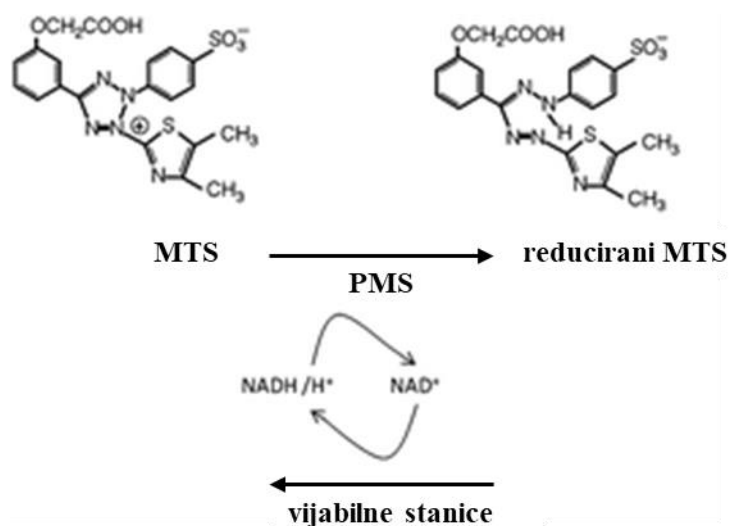
Tablica 3. Koncentracije EtOH dodane u reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze

| konačna koncentracija EtOH | volumen izvornog EtOH | volumen pufera | volumen reakcijske smjese |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 0,5 % | 5,21 μ L | 745 μ L | 1000 μ L |
| 2,5 % | 26 μ L | 724 μ L | 1000 μ L |
| 10 % | 104 μ L | 646 μ L | 1000 μ L |

Konačni rezultati izraženi su kao omjer $\Delta A/\text{min}$ aktivnosti uz i bez prisutnog otapala, odnosno, postotak inhibicije aktivnosti AChE u prisutnosti otapala DMSO ili etanola.

3.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti dimetil sulfoksida i etanola MTS metodom

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi pri određivanju citotoksičnosti ispitivanih spojeva na stanice. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol), pri čemu nastaje obojeni formazanski produkt (Slika 5.). Nakon tretiranja suspenzije stanica ispitivanim spojevima, u ovom slučaju otapalima DMSO i etanolom, mjeri se apsorbancija tretirane suspenzije i kontrolne suspenzije (u koju nisu dodana otapala) te se dobije informacija o postotku vijabilnih stanica u tretiranoj suspenziji.



Slika 5. Pojednostavljeni prikaz redukcije MTS reagensa od strane vijabilnih metabolički aktivnih stanica (slika preuzeta i modificirana prema referenci Henriques i sur., 2011)

PC-3 stanice raka prostate koje se tretiraju otapalima DMSO i EtOH nacjepljuju se na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica dan prije pokusa. Koncentracija stanica pri nacjepljivanju treba biti oko $1 \cdot 10^5$ st/mL kako bi se rezultati MTS metode mogli jasno očitati te se u slučaju prevelike koncentracije suspenzija može razrijediti dodatkom medija. Iz ranije opisane metode brojanja stanica dobiven je podatak o koncentraciji stanica u suspenziji (Tablica 4.) i prema tome pripremljen pokus.

Tablica 4. Podaci o koncentraciji stanica u suspenziji dobiveni brojanjem na uređaju TC-20 Cell Counter (BioRad, SAD)

| broj pokusa | raspon veličine stanica | postotak živih stanica | izvorna koncentracija stanica | nacjepljena koncentracija stanica |
|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| pokus 1 | 4 – 22 nm | 100 % | $1,58 \cdot 10^5$ st/mL | $0,79 \cdot 10^5$ st/mL |
| pokus 2 | 4 – 24 nm | 83 % | $2,88 \cdot 10^5$ st/mL | $1,15 \cdot 10^5$ st/mL |

Provedena su dva pokusa, pri čemu su u svakom pokusu korištene dvije mikrotitarske pločice s 96 jažica te je u svaku jažicu, osim u „slijepe probe“ (jažice u koje je dodan pripremljeni medij, ali ne i suspenzija stanica), nacijepljeno 100 μ L suspenzije stanica. Stanice su zatim inkubirane preko noći kako bi se zalijepile za dno. Sljedeći dan stanicama je uklonjen medij te su tretirane različitim koncentracijama DMSO i etanola koje su pripremljene serijskim

razrjeđenjem (Tablica 5., Tablica 6., Slika 6.) i ponovno inkubirane 24 sata. Svaka koncentracija otapala testirana je u duplikatu.

DMSO (izvorni) = 100 %

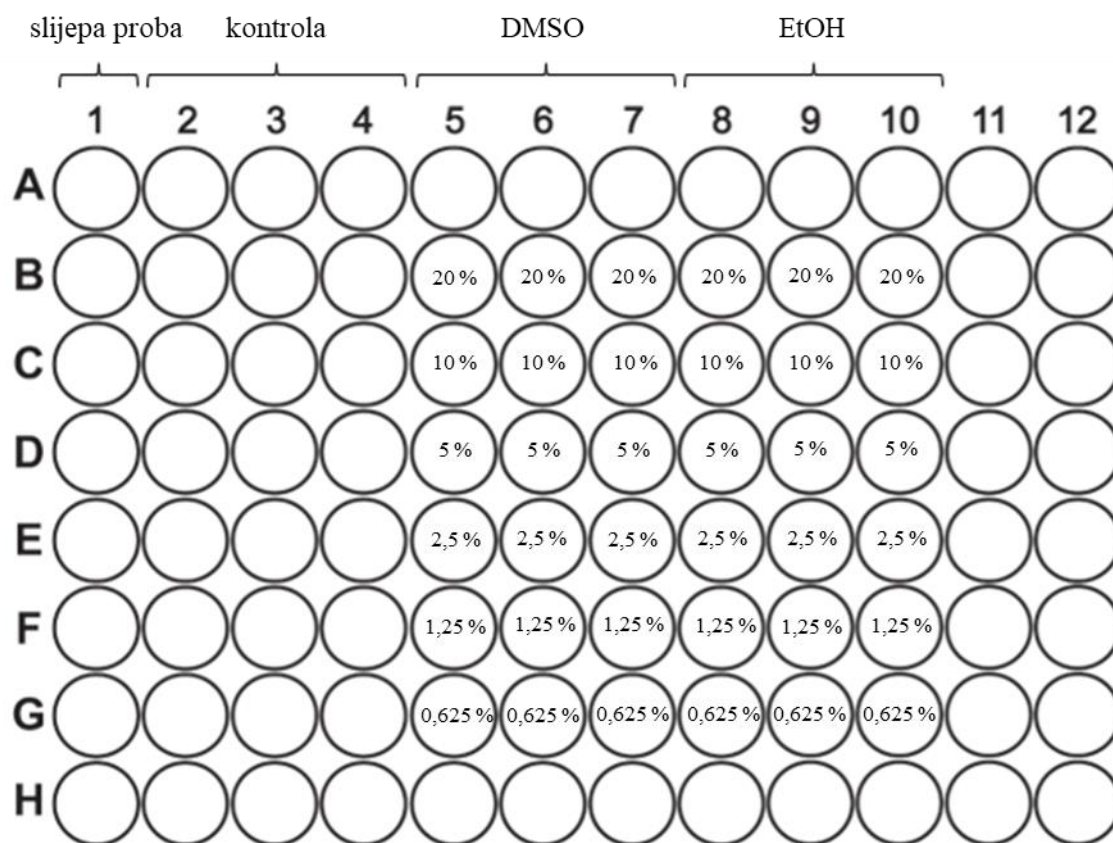
Tablica 5. Koncentracije DMSO za tretiranje PC-3 stanica raka prostate

| koncentracija DMSO | volumen DMSO | volumen medija |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 20 % | 40 µL izvorni (100 %) | 160 µL |
| 10 % | 100 µL (20 %) | 100 µL |
| 5 % | 100 µL (10 %) | 100 µL |
| 2,5 % | 100 µL (5 %) | 100 µL |
| 1,25 % | 100 µL (2,5 %) | 100 µL |
| 0,625 % | 100 µL (1,25 %) | 100 µL |

EtOH (izvorni) = 96 %

Tablica 6. Koncentracije EtOH za tretiranje PC-3 stanica raka prostate

| koncentracija EtOH | volumen EtOH | volumen medija |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| 20 % | 41,7 µL izvorni (96 %) | 158,3 µL |
| 10 % | 100 µL (20 %) | 100 µL |
| 5 % | 100 µL (10 %) | 100 µL |
| 2,5 % | 100 µL (5 %) | 100 µL |
| 1,25 % | 100 µL (2,5 %) | 100 µL |
| 0,625 % | 100 µL (1,25 %) | 100 µL |



Slika 6. Shematski prikaz tretmana PC-3 stanica raka prostate otapalima DMSO i EtOH na mikrotitarskoj pločici

Nakon tretmana otapalima 24 sata, stanicama je uklonjen medij te su dva puta isprane sa 100 μL 1x PBS-a. MTS reagens je prema uputama proizvođača pomiješan s medijem u omjeru 1:5 te je u jažice dodano 120 μL reagensa i stanice su inkubirane u mraku na 37 °C oko 30 minuta do razvoja boje.

Potreban volumen MTS reagensa:

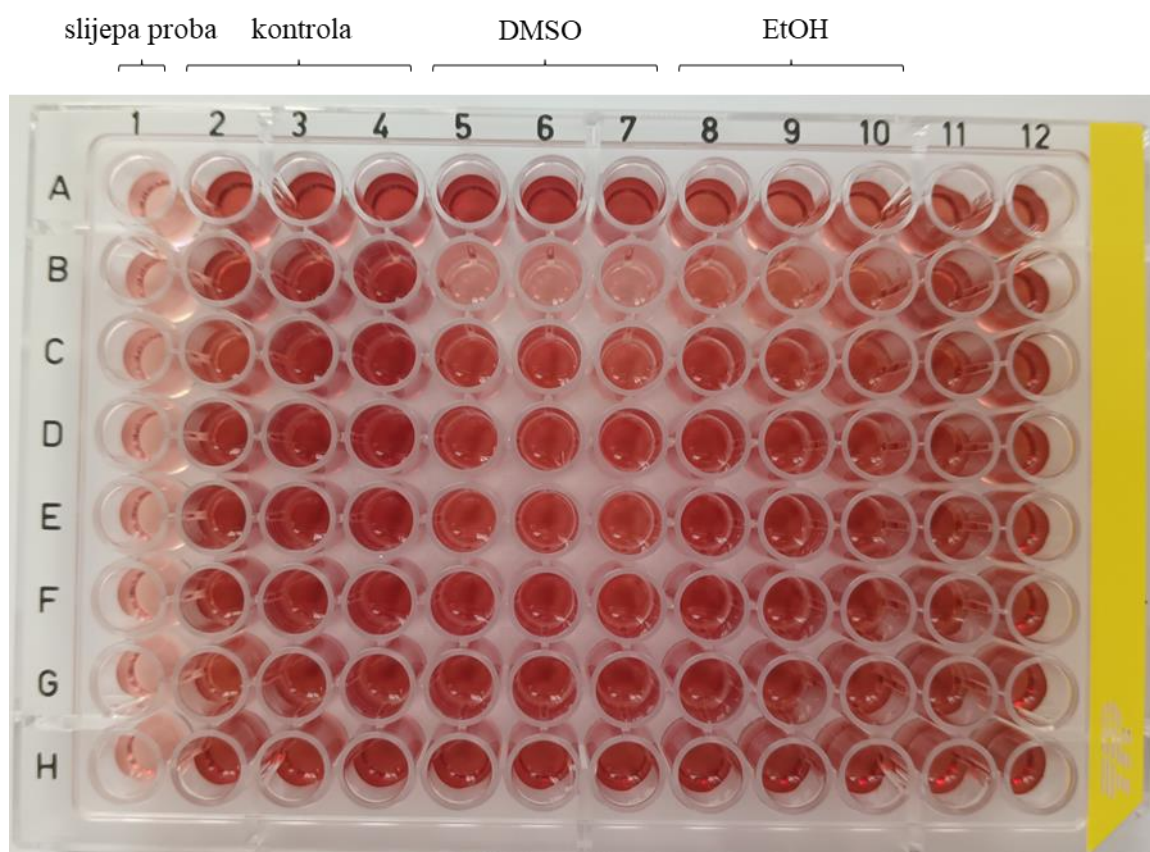
$$120 \mu\text{L reagensa po jažici} \cdot 96 \text{ jažica} \cdot 2 \text{ pločice} = 23,04 \text{ mL}$$

Pripremljeno je 24 mL MTS reagensa:

$$V (\text{One Solution MTS}) = 4 \text{ mL}$$

$$V (\text{medij}) = 20 \text{ mL}$$

Nakon inkubacije stanica s reagensom (Slika 7.), mjerenje apsorbancije proporcionalno vijabilnosti stanica je provedeno na Infinite M200PRO čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan Austria GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 490 nm. Rezultati su izraženi kao omjer apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice, odnosno kao postotak vijabilnosti stanica nakon tretmana otapalima.



Slika 7. Mikrotitarska pločica s nacjepljenim PC-3 stanicama raka prostate nakon provedene MTS metode (vlastita fotografija)

3.2.3. Statistička obrada rezultata

Sveukupni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost svih dobivenih mjerenja \pm standardna pogreška. Obrada rezultata i računi, kao i grafovi izrađeni su pomoću odgovarajućih statističkih paketa Microsoft Excel i GraphPad Prism programa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

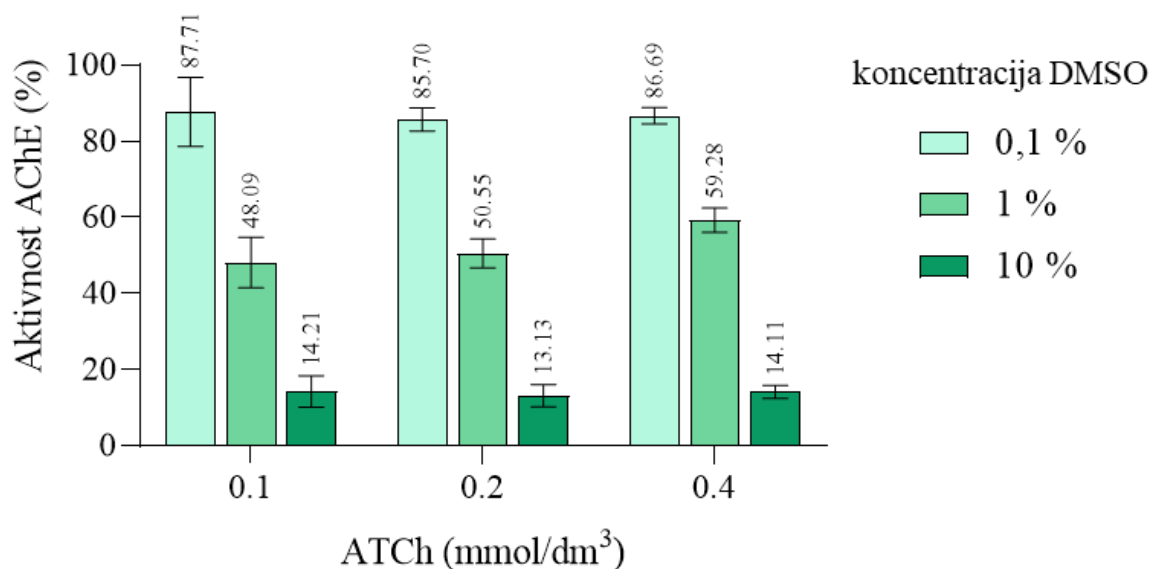
4.1. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze u prisutnosti otapala DMSO i EtOH

DMSO i etanol su otapala koja se najčešće koriste u farmaceutskoj industriji te u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima lijekova zbog svojih poželjnih svojstava, odnosno mogućnosti otapanja hidrofobnih molekula koje se ispituju kao potencijalni lijekovi (Camp i sur., 2020; Chan i sur., 2014). U tretmanu neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te mastenije gravis istražuju se potencijalni inhibitori acetilkolinesteraze jer uzrokuju smanjenje njezine aktivnosti što zaustavlja razgradnju acetilkolina (Bosak i sur., 2011). Prilikom ispitivanja aktivnih tvari važno je uzeti u obzir utjecaj samog otapala korištenog u ispitivanju na dobivene rezultate zbog moguće interakcije molekula otapala s molekulama ispitivane tvari ili ispitivanim biološkim metama kao što su enzimi (Camp i sur., 2020).

U ovom radu ispitivan je utjecaj otapala DMSO i EtOH na aktivnost acetilkolinesteraze kako bi se u daljnjim istraživanjima inhibitora ovog enzima, u slučaju korištenja jednog od ovih otapala, mogao uzeti u obzir utjecaj na aktivnost enzima koja se javlja zbog prisutnosti samog otapala te se točno odrediti konstanta inhibicije za ispitivanu molekulu inhibitora. Metodom po Ellmanu mjerila se aktivnost acetilkolinesteraze pri različitim koncentracijama supstrata, acetiltiokolina (ATCh) i različitim koncentracijama otapala DMSO i EtOH te su rezultati prikazani grafički (Slika 8., Slika 9.).

Iz rezultata određivanja aktivnosti acetilkolinesteraze u prisutnosti otapala DMSO (Slika 8.) vidljivo je kako aktivnost enzima opada povećanjem koncentracije otapala te nije primijećen izražen trend ovisnosti inhibicije u odnosu na koncentraciju supstrata što upućuje da se ne radi o mogućoj kompetitivnoj inhibiciji. Inhibicija aktivnosti otapalom pri koncentraciji DMSO od 10 % pri svim koncentracijama supstrata (ATCh) bila je najizraženija i iznosi oko 86 %, odnosno aktivnost acetilkolinesteraze pada na svega otprilike 14 %. Pri koncentraciji DMSO od 1 % aktivnost enzima pri različitim koncentracijama acetiltiokolina iznosi između 40 i 60 %, pri čemu je inhibicija bila nešto niža pri najvišoj koncentraciji supstrata. Aktivnost acetilkolinesteraze pri koncentraciji DMSO od 0,1 % pri svim koncentracijama supstrata bila je iznad 85 %. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako pri ispitivanju molekule inhibitora

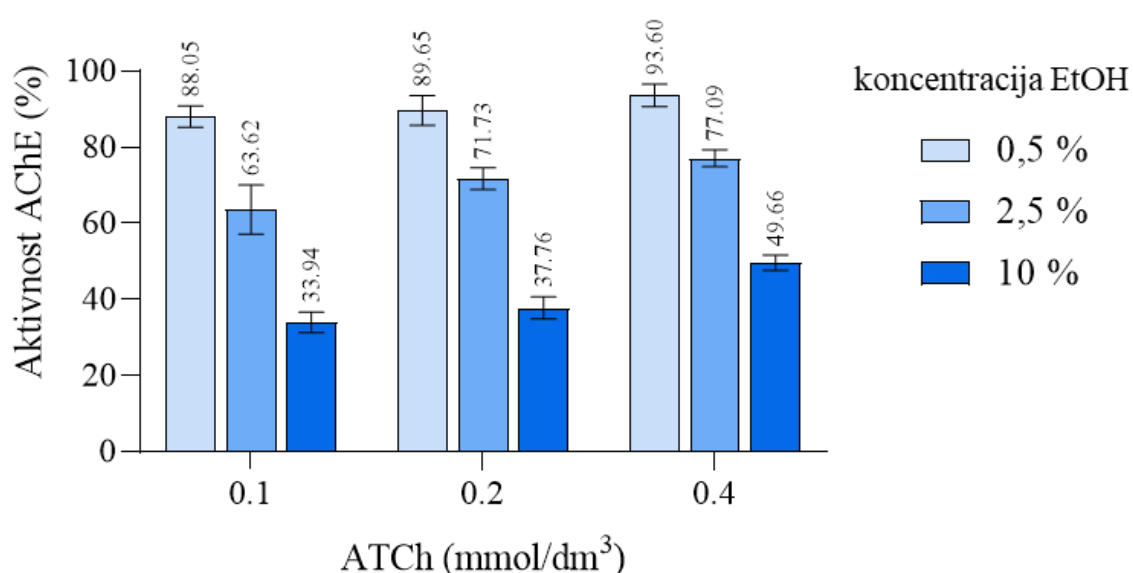
acetilkolinesteraze uz DMSO kao otapalo koncentracija DMSO ne bi smjela biti viša od 0,1 % da bi se mogla odrediti inhibicija acetilkolinesteraze ispitivanom molekulom, bez značajnog utjecaja otapala na rezultate.



Slika 8. Grafički prikaz dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja različitih koncentracija otapala DMSO (0,1 %, 1 % i 10 %) na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) pri različitim koncentracijama supstrata acetiltiokolina (ATCh - 0,1 mmol/dm³, 0,2 mmol/dm³ i 0,4 mmol/dm³)

Iz rezultata utjecaja otapala EtOH na aktivnost acetilkolinesteraze pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 9.) vidljivo je kako aktivnost enzima opada povećanjem koncentracije otapala, kao i kod ispitivanja utjecaja DMSO. No, za razliku od DMSO, u slučaju EtOH inhibicija pokazuje naznaku ovisnosti o koncentraciji supstrata, odnosno utjecaj EtOH se smanjuje njezinim povećanjem. Pri koncentraciji EtOH od 10 % aktivnost acetilkolesteraze iznosi između 30 i 50 %, pri čemu je inhibicija manja pri većim koncentracijama supstrata (ATCh). Aktivnost acetilkolinesteraze pri koncentraciji EtOH od 2,5 % iznosi između 60 i 80 % te je također vidljivo kako jakost inhibicije ovisi o koncentraciji supstrata. Najveća aktivnost acetilkolinesteraze je izmjerena pri koncentraciji EtOH od 0,5 % te iznosi između 85 i 95 %. Iz izmjerenih vrijednosti aktivnosti acetilkolinesteraze pri različitim koncentracijama supstrata u prisutnosti otapala EtOH, može se zaključiti kako se radi o kompetitivnoj inhibiciji, odnosno

inhibicija pri jednakoj koncentraciji otapala je manja, što je veća koncentracija supstrata. Moguće je zaključiti kako koncentracija EtOH od 0,5 % ne bi značajno utjecala na aktivnost acetilkolinesteraze pri ispitivanju molekule inhibitora, odnosno mogla bi se odrediti točna inhibicija acetilkolinesteraze ispitivanom molekulom. Također se može pretpostaviti kako i koncentracija EtOH od oko 1 %, pri višim koncentracijama supstrata imala dovoljno slab inhibicijski učinak na acetilkolinesterazu da ne bi značajno utjecala na rezultate ispitivanja inhibitora.



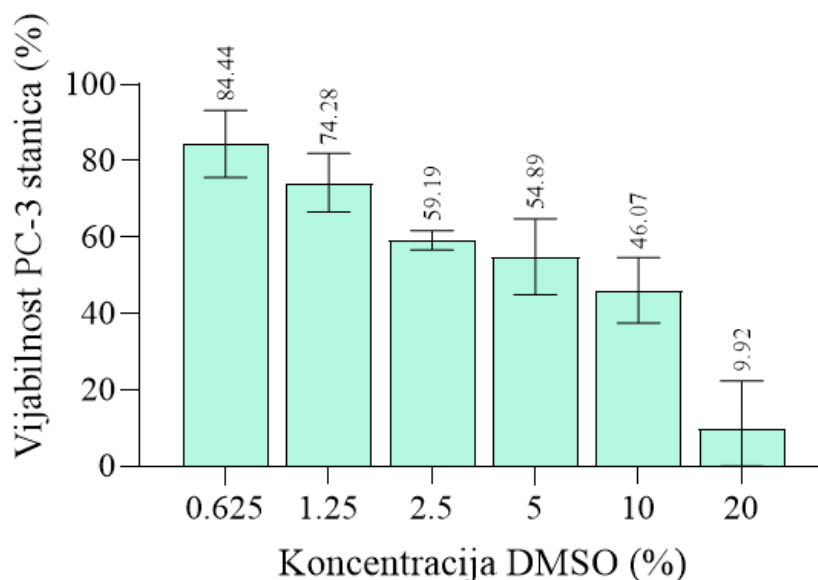
Slika 9. Grafički prikaz dobivenih rezultata utjecaja različitih koncentracija otapala EtOH (0,5 %, 2,5 % i 10 %) na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) pri različitim koncentracijama supstrata acetiltiokolina (ATCh - 0,1 mmol/dm³, 0,2 mmol/dm³ i 0,4 mmol/dm³)

Iz dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja otapala DMSO i EtOH na aktivnost acetilkolinesteraze (Slika 8., Slika 9.) moguće je zaključiti kako oba otapala uzrokuju značajnu inhibiciju enzima pri koncentracijama od 10 %, ali je potrebno uočiti kako DMSO uzrokuje jaču inhibiciju enzima pri jednakim koncentracijama otapala i supstrata.

4.2. Ispitivanje citotoksičnosti otapala DMSO i EtOH na PC-3 stanicama raka prostate

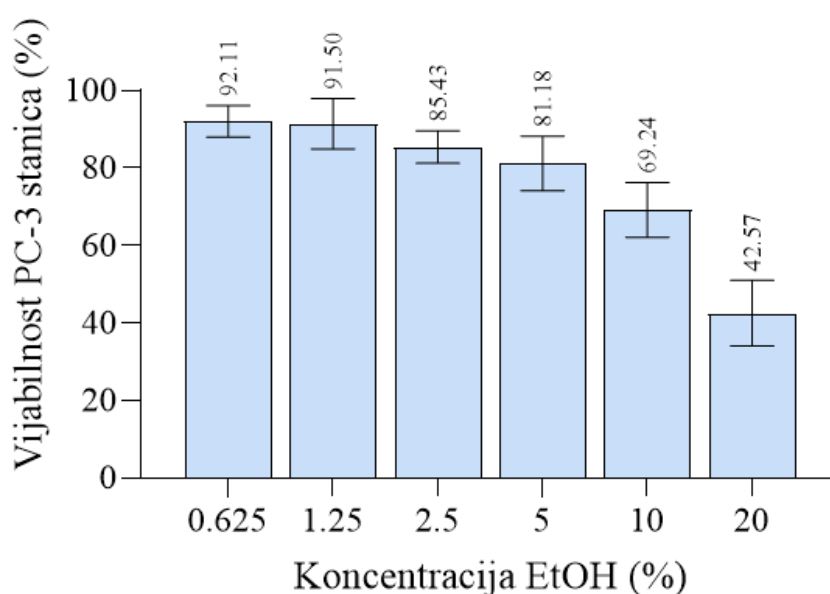
Kao što je već spomenuto, DMSO i EtOH su najčešće korištena otapala u razvijanju novih lijekova, zbog čega je potrebno ispitati i njihov utjecaj na stanice (Camp i sur., 2020). U ovom radu je ispitana citotoksičnost ovih otapala u različitim koncentracijama na PC-3 stanicama raka prostate MTS metodom koja je opisana ranije te su rezultati prikazani grafički (Slika 10., Slika 11.).

Iz rezultata ispitivanja citotoksičnosti DMSO otapala vidljivo je kako vijabilnost stanica opada s povećanjem koncentracije otapala, odnosno citotoksični učinak otapala je veći pri višim koncentracijama. Na grafičkom prikazu su prikazani rezultati dva provedena pokusa (svaki pokus je proveden u duplikatu), odnosno srednja vrijednost vijabilnosti stanica za svaku koncentraciju otapala (Slika 10.). Moguće je uočiti kako vijabilnost stanica značajno opada pri koncentraciji DMSO od 20 %, pri čemu ona iznosi svega 9,92 %. Otprilike 50 % vijabilnosti stanica je preostalo pri koncentraciji DMSO od 5 % (54,89 %), dok je najviša vijabilnost stanica (84,44 %) održana pri koncentraciji DMSO od 0,625 % te je moguće zaključiti kako bi pri toj ili nižoj koncentraciji otapala bilo moguće testirati potencijalne lijekove bez značajnog učinka citotoksičnosti za stanice i utjecaja na sam rezultat.



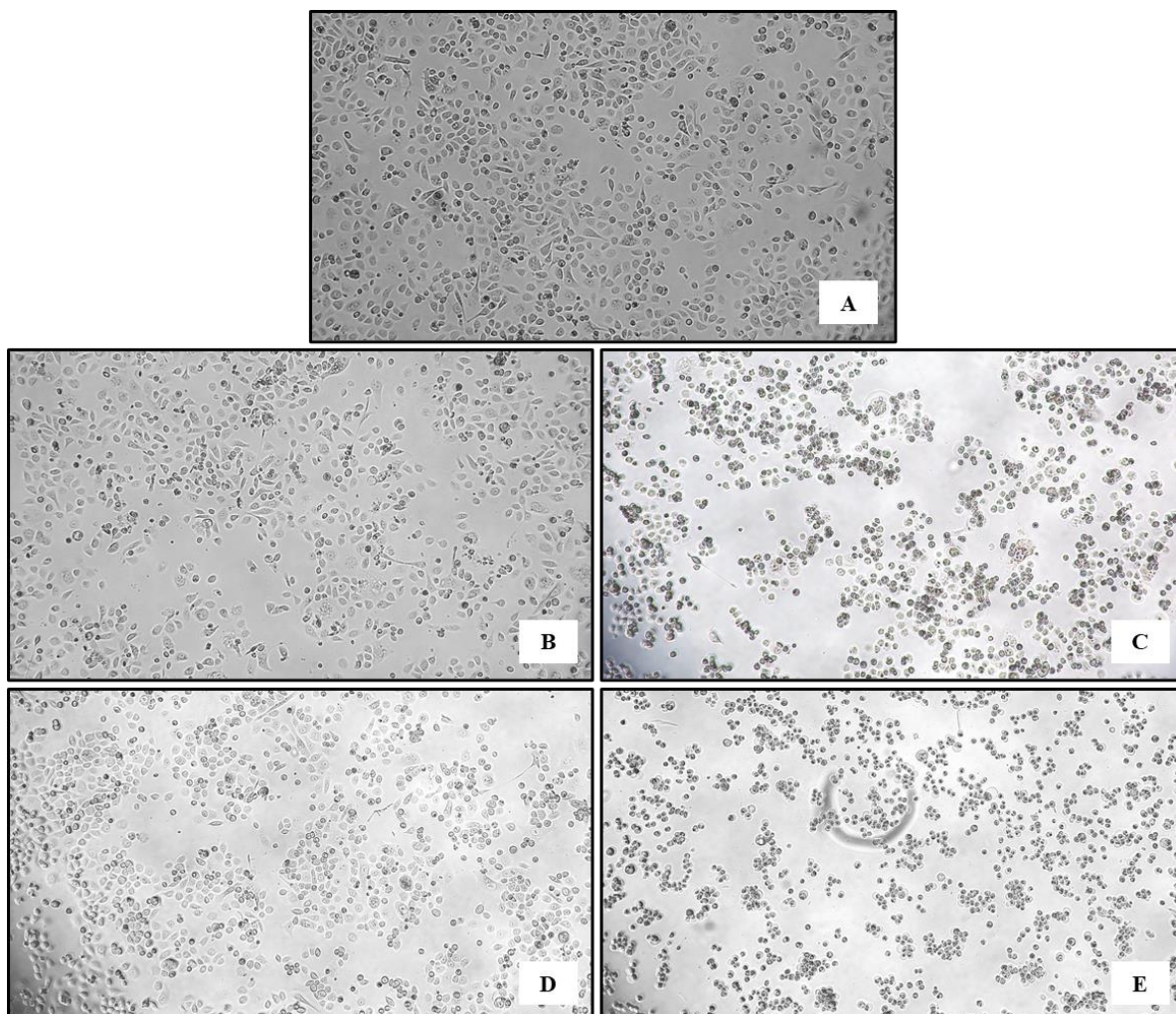
Slika 10. Grafički prikaz dobivenih rezultata vijabilnosti PC-3 stanica raka prostate u prisutnosti različitih koncentracija otapala DMSO

Iz rezultata ispitivanja citotoksičnosti otapala EtOH na PC-3 stanicama raka prostate može se uočiti, kao i za DMSO, da vijabilnost stanica opada povećanjem koncentracije otapala (Slika 11.). Pri koncentraciji EtOH od 20 % izmjerena je najniža vijabilnost stanica (42,57 %), dok već pri koncentraciji otapala od 5 % vijabilnost stanica iznosi preko 80 % te se može zaključiti kako bi pri toj ili nižoj koncentraciji EtOH bilo moguće provesti ispitivanje učinka lijeka bez značajnog utjecaja na rezultate. Također je vidljivo kako je citotoksični utjecaj DMSO na PC-3 stanice raka prostate, pri jednakim koncentracijama otapala, veći nego kod EtOH, zbog čega bi EtOH mogao biti bolji izbor pri ispitivanju lijekova (Slika 10., Slika 11.).



Slika 11. Grafički prikaz dobivenih rezultata vijabilnosti PC-3 stanica raka prostate u prisutnosti različitih koncentracija otapala EtOH

Utjecaj citotoksičnosti otapala praćen je i vizualno pomoću mikroskopa (Zeiss, Njemačka), ali nije bilo moguće kvantitativno odrediti postotak vijabilnih stanica. Stanice koje su nepravilnog oblika i pričvršćene za podlogu su žive, dok su okrugle stanice koje plutaju u mediju mrtve (Slika 12.).



Slika 12. Mikroskopska slika (povećanje 200x) rezultata tretiranja PC-3 stanica raka prostate: A – kontrolna jažica u koju nisu dodana otapala, B – jažica u koju je dodano 2,5 % EtOH, C – jažica u koju je dodano 20 % EtOH, D – jažica u koju je dodano 2,5 % DMSO, E – jažica u koju je dodano 20 % DMSO

5. ZAKLJUČCI

1. Pri ispitivanju utjecaja otapala dimetil sulfoksida (DMSO) i etanola (EtOH) na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze uočeno je kako oba otapala inhibiraju enzim, ali je inhibicijski učinak dimetil sulfoksida pri jednakoj koncentraciji otapala i supstrata veći nego utjecaj etanola. Također, utjecaj DMSO otapala ne ovisi značajno o koncentraciji supstrata, odnosno jednake koncentracije otapala imaju približno jednak utjecaj na aktivnost enzima pri različitim koncentracijama supstrata, dok se za EtOH može pretpostaviti kako se javlja kompetitivna inhibicija jer je pri jednakim koncentracijama otapala određena niža inhibicija za veće koncentracije supstrata. Rezultati ispitivanja doveli su do zaključka kako bi koncentracija DMSO do najviše 0,1 % bila dovoljno niska da inhibicijski učinak otapala ne utječe značajno na rezultate ispitivanja potencijalnog inhibitora acetilkolinesteraze, dok za EtOH ta koncentracija iznosi do 0,5 % za koncentracije supstrata acetiltiokolina od 0,1, 0,2 i 0,4 mmol/dm³.
2. Drugi dio istraživanja odnosio se na ispitivanje citotoksičnosti otapala DMSO i EtOH na PC-3 stanice raka prostate. Uočeno je kako je citotoksični učinak DMSO pri jednakim koncentracijama otapala jači nego za EtOH, odnosno vijabilnost stanica značajnije opada korištenjem DMSO. Za DMSO koncentracija pri kojoj bi se moglo provesti ispitivanje bez značajnog utjecaja na rezultate iznosi 0,652 %, pri čemu vijabilnost stanica iznosi 84,44 %, dok za EtOH već pri koncentraciji od 5 % vijabilnost stanica iznosi 81,18 % te bi se ispitivanje lijeka uz korištenje EtOH moglo provoditi pri toj koncentraciji i nižima, ovisno o topljivosti ispitivane molekule.
3. Iz sveukupno dobivenih rezultata može se zaključiti kako bi EtOH bio bolji izbor kao otapalo pri *in vitro* ispitivanju učinkovitosti djelovanja novih potencijalnih lijekova prema ciljanim metama u organizmu, a time i procjeni učinkovitosti u budućoj medicinskoj primjeni.

6. POPIS LITERATURE

Awan M, Buriak I, Fleck RA, Fuller BJ, Goltsev AM, Kerby JE, i sur. (2020) Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen. Med.* **15**: 1463-1491. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145>

Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z (2011) Cholinesterases: Structure, Role, and Inhibition. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62**: 175-90. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2107>

Camp JE, Nyamini SB, Scott FJ (2020) Cyrene™ is a green alternative to DMSO as a solvent for antibacterial drug discovery against ESKAPE pathogens. *RSC Med. Chem.* **11**: 111-117. <https://doi.org/10.1039/C9MD00341J>

Capriotti K, Capriotti JA (2012) Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J Clin. Aesthet. Dermatol.* **5**: 24-6. PMID: 23050031; PMCID: PMC3460663

Cardoso LM da F, Pinto MA, Henriques Pons A, Alves LA (2017) Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cell Transplant.* **78**: 15-21. <https://doi.org/10.1177/0963689717720050>

Chan RY, Lee KK, Wong W, Tang JC, Lam K, Cheng CH, i sur. (2014) The Puzzling Issue of ‘Vehicle-Treated Control’ when Using Ethanol as Drug Carrier for MCF-7 Cells. *Phytotherapy Research* **28**: 1735-1736. <https://doi.org/10.1002/ptr.5153>

Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM (2013) Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **11**: 315-335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>

Dunn MW, Kazer MW (2011) Prostate cancer overview. *Semin. Oncol. Nurs.* **27**: 241-50. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002>

Dym O, Unger T, Toker L, Silman I, Sussman JL (2015) Crystal Structure of Human Acetylcholinesterase – RCSB PDB. <https://www.rcsb.org/structure/4PQE>. Pristupljeno 2. kolovoza 2023.

Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr., Featherstone RM (1961) New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FDA (2018) The Drug Development Process. FDA- The United States *Food and Drug Administration*, <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>. Pristupljeno 7. lipnja 2023.

Fukui Y, Aburai K, Sakamoto K (2002) Process for producing dimethyl sulfoxide. Patent US6414193B

Hasin Y, Avidan N, Bercovich D, Korczyn AD, Silman I, Beckmann JS, Sussman JL (2005) Analysis of Genetic Polymorphisms in Acetylcholinesterase as Reflected in Different Populations. *Curr. Alzheimer Res.* **2**: 207-218. <https://doi.org/10.2174/1567205053585909>

Henriques C, Moreira TL, Maia-Brigagão C, Henriques-Pons A, Carvalho TM, Souza WD (2011) Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. *Anal. Methods* **3**: 2148-2155. <https://doi.org/10.1039/C1AY05219E>

Jansen ML, Bracher JM, Papapetridis I, Verhoeven MD, de Bruijn H, de Waal PP, i sur. (2017) *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res.* **17**, 044. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>

Khoury R, Rajamanickam J, Grossberg GT (2018) An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther. Adv. Drug Saf.* **9**: 171-178. <https://doi.org/10.1177/2042098617750555>

Kovarik Z, Kalisiak J, Hrvat NM, Katalinić M, Zorbaz T, Žunec S, i sur. (2019) Reversal of Tabun Toxicity Enabled by a Triazole-Annulated Oxime Library-Reactivators of Acetylcholinesterase. *Chemistry* **25**: 4100-4114. <https://doi.org/10.1002/chem.201805051>

Kumar VL, Majumder PK (2007) Prostate gland: Structure, functions and regulation. *Int. Urol. and Nephrol.* **27**: 231-243. <https://doi.org/10.1007/BF02564756>

Lazarević-Pašti TD, Leskovac AR, Momić T, Petrović SŽ, Vasić VM (2017) Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs. *Curr. Med. Chem.* **24**: 3283-3309. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170705123509>

Lee C, Lee RJ, Handrahan DL, Sause W (2005) Comparison of late rectal toxicity from conventional versus three-dimensional conformal radiotherapy for prostate cancer: analysis of clinical and dosimetric factors. *Urology* **65**: 114-9. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.08.037>

Lihtar G (2020) Utjecaj promjene strukture derivata nikotinamida na inhibiciju kolinesteraza i citotoksičnost (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* **110**: 627-39. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00613-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00613-3)

Nakamura RA, Monti CR, Castilho LN, Trevisan FA, Valim AC, Reinato JA (2007) Prognostic factors for late urinary toxicity grade 2-3 after conformal radiation therapy on patients with prostate cancer. *Int. Braz J Urol* **33**: 652-9; discussion 660-1. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382007000500006>

Oliveira JA, Passos MF, Conceição AC (2020) Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment of Açaí Seeds Waste (ASW) for Fermentable Sugars and Ethanol Production. *Int. J Advan. Engineer. Technol.* **13**: 49-56. <https://doi.org/10.7323/ijaet.2020.v13i2.003>

Taylor P, Radić Z (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**: 281-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001433>

Packer JR, Maitland NJ (2016) The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**: 1238-1260. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.016>

Parke SA, Birch GG (1999) Solution properties of ethanol in water. *Food Chem.* **67**: 241-246.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00124-7)

Perez-Vega SB, Ortega-Rivas E, Salmeron-Ochoa I, Sharratt PN (2013) A system view of solvent selection in the pharmaceutical industry: towards a sustainable choice. *Environ. Dev. Sustain.* **15**: 1-21. <https://doi.org/10.1007/s10668-012-9365-5>

Pohanka M, Hrabínova M, Kuca K, Simonato JP (2011) Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int J Mol Sci* **12**: 2631-40. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>

Rawla P (2019) Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* **10**: 63-89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>

Sit RK, Radić Z, Gerardi V, Zhang L, Garcia ES, Katalinić M, i sur. (2011) New Structural Scaffolds for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphorylated Cholinesterases. *J Biol. Chem.* **286**: 19422-19430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230656>

Song Z, Miao L, Li L, Zhu D, Gan L, Liu M (2021) A robust strategy of solvent choice to synthesize optimal nanostructured carbon for efficient energy storage. *Carbon* **180**: 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.04.078>

Sun J, Wang Y (2014) Recent Advances in Catalytic Conversion of Ethanol to Chemicals. *ACS Catal.* **4**: 1078-1090. <https://doi.org/10.1021/cs4011343>

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **71**: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Taherzadeh MJ, Karimi K (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* **2**: 707-738. <https://doi.org/10.15376/biores.2.4.707-738>

Tashrifí Z, Khanaposhtani MM, Larijani B, Mahdavi M (2020) Dimethyl Sulfoxide:

Yesterday's Solvent, Today's Reagent. *Adv. Synth. Catal.* **362**: 65-86.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201901021>

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* **339**: 1546-1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>

Yan X, Song Y, Wu X, Zhu C, Su X, Du D, Lin Y (2017) Oxidase-mimicking activity of ultrathin MnO₂ nanosheets in colorimetric assay of acetylcholinesterase activity. *Nanoscale* **9**: 2317-2323. <https://doi.org/10.1039/c6nr08473g>

Young A, Berry R, Holloway AF, Blackburn NB, Dickinson JL, Skala M, i sur. (2014) RNA-seq profiling of a radiation resistant and radiation sensitive prostate cancer cell line highlights opposing regulation of DNA repair and targets for radiosensitization. *BMC Cancer* **14**, 808. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-808>

Zandona A, Madunić J, Miš K, Maraković N, Dubois-Geoffroy P, Cavaco M, i sur. (2023) Biological response and cell death signaling pathways modulated by tetrahydroisoquinoline-based aldoximes in human cells. *Toxicology* **494**, 153588. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153588>

Izjava o izvornosti

Ja GABRIJELA ŽIBAR izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat
mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u
njemu navedeni.



Vlastoručni potpis