

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Stipe Mustać

**Toksičnost talija i protektivni učinak kalija na toksičnost
talija**

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku i Zavodu za biofiziku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i doc. dr. sc. Erima Bešića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

KRATICE

95% CI	95%-tni interval pouzdanosti (eng. 95% onfidence interval)
ANOVA	analiza varijance (eng. <i>analysis of variance</i>)
DMEM	eng. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> hranjivi medij
DMSO	dimetil sulfoksid
EC ₅₀	srednja učinkovita koncentracija (eng. <i>effective concentration 50%</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
IC ₅₀	koncentracija koja uzrokuje 50-% inhibiciju danoga parametra (eng. <i>inhibitory concetration 50%</i>)
ICH	Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove (eng. <i>International Conference on Harmonisation</i>)
LD ₅₀	Srednja letalna doza (eng. <i>lethal doze 50%</i>)
LDH	laktat-dehidrogenaza
MPTP	mitohondrijska propusna tranzicijska pora (eng. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijev bromid; boja kojom se provodi MTT test
OECD	organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. <i>Organization for Economical Cooperation and Development</i>)
PBS	puferirana otopina fosfatnih soli (eng. <i>phosphate buffer saline</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI 1640	eng. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> , vrsta hranjivog medija
RT-CES	eng. <i>real-time cell electronic sensing</i> , metoda mjerenja vijabilnosti stanica
UDP	postupak gore-dolje (eng. <i>up and down procedure</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Talij	1
1.1.1. Prisustvo talija u okolišu	1
1.1.2. Izloženost ljudi taliju	2
1.1.3. Primjena talija	3
1.2. Toksičnost talija	4
1.2.1. Toksikokinetika talija	4
1.2.2. Mehanizam toksičnosti talija	5
1.3. Ispitivanja toksičnosti na stanicama – <i>in vitro</i> modeli	8
1.3.1. Stanične linije	8
1.3.2. Prednosti i nedostaci staničnih linija	8
1.3.3. Područja uporabe staničnih linija	9
1.3.4. Određivanje toksičnosti na staničnim linijama	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Tehnička oprema	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Uzgoj staničnih linija	15
3.3. Biološki pokus	16
3.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti talij (I) acetata	16
3.3.2. Ispitivanje protektivne uloge kalija (I) acetata	16
3.3.3. Priprema otopina	16
3.3.4. Mjerenje metaboličke aktivnosti stanica MTT test	17
3.3.5. Praćenje morfologije stanica	18
3.4. Statistička analiza	18
3.4.1. Učinak talij (I) acetata na vijabilnost stanica	18

3.4.2. Analiza utjecaja dodatka kalijevog (I) acetata na toksičnost talijevo (I) acetata..	19
4. REZULTATI.....	20
4.1. Rezultati stanične vijabilnosti nakon tretmana s talij (I) acetatom	20
4.1.1. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 24-satnog tretmana s talij (I) acetatom	20
4.1.2. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 48-satnog tretmana s talij (I) acetatom	22
4.1.3. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 72-satnog tretmana s talij (I) acetatom	24
4.1.4. Rezultati stanične vijabilnosti ovisno o vremenu izloženosti talij (I) acetatu	26
4.2. Rezultati stanične vijabilnosti nakon zajedničkog tretmana s kalijevim (I) acetatom i talijevim (I) acetatom.....	27
4.3. Morfološke promjene stanica nakon tretmana s talij (I) acetatom i istovremenog tretmana s kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom	29
5. DISKUSIJA.....	33
5.1. Toksičnost talija	35
5.2. Prevencija toksičnosti talija s kalijem	39
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. ZAHVALE	42
8. POPIS LITERATURE	43
9. SAŽETAK	52
10. SUMMARY	54

1. UVOD

1.1. Talij

Talij je metal kemijskog simbola Tl, rednog broja 81 i atomske mase 204,38. Otkrio ga je William Crookes 1891. godine. Ime je dobio po grčkoj riječi *thallos*, što znači zelena grančica zbog karakteristične zelene linije koju pokazuje u atomskom spektru¹. Talij se smatra visoko toksičnim metalom te je stoga Agencija za zaštitu okoliša SAD-a (EPA, eng. *United States Environmental Protection Agency*) svrstala talij u prioritetne spojeve koji zagađuju okoliš². Zbog njegove velike gustoće od 11,85 g/cm³, talij se svrstava u skupinu teških metala. Tali se na 303,5 °C, a vrije na 1482 °C. Kada je izložen zraku i vlazi, zbog svoje velike reaktivnosti talij brzo oksidira na površini na način da formira prevlaku talij (I) oksida (Tl₂O). Zbog reaktivnosti sa zrakom u elementarnom stanju čuva se u petroleju. Na višim temperaturama formira se Tl³⁺ oksid (Tl₂O₃)³. Pojavljuje se u obliku monovalentnih talo- i trivalentnih talo-spojeva⁴. Talijski spojevi u oksidacijskom stanju 3+ imaju jak oksidacijski potencijal i polako prelaze u monovalentno stanje⁵.

1.1.1. Prisustvo talija u okolišu

Talij je sveprisutan u okolišu, ali u niskim koncentracijama^{6,7}. Koncentracije talija u tlu variraju ovisno o vrsti tla između 0,014 i 2,8 mg/kg, a prosjek u svijetu je 0,5 mg/kg. U tlu je talij najčešće vezan za matriks tla te se zbog toga sporije otpušta u okoliš. Najčešće se nalazi u sulfidnim rudama (ruda kod kojih je metal vezan sa sumporom) teških metala, poglavito olova, bakra ili cinka te u ugljenu⁶.

U morskoj vodi prosječna koncentracija talija je 15 ng/l, a u nezagađenim slatkim vodama ta je koncentracija od 5 do 10 ng/l⁸.

Iako postoje iskopišta i rudnici bogati talijem, primarni je izvor talija za komercijalnu eksploataciju njegov ostatak nakon taljenja ruda bakra, olova i cinka te ostalih sulfidnih ruda teških metala^{8,9}. Jedno od talijem najbogatijih iskopišta u svijetu je danas napušteni rudnik Alšar u južnoj Makedoniji. Procjenjuje se da je tamo ostalo još oko 500 tona talija, a rudnik Alšar je i izvor nekih rijetkih minerala talija, od kojih je najpoznatiji lorandit¹⁰.

Prosječnu koncentraciju talija u biljkama teško je odrediti, najvećim djelom zbog toga jer je biljno carstvo vrlo raznoliko. Bez obzira na to, skupina istraživača odredila je koncentraciju talija u tzv. „referentnoj biljci“ („referentna biljka“ pojam je analogan „referentnom čovjeku“ koji se koristi za istraživanja sigurnosti radijacije) koja iznosi 0,05 mg/kg suhe mase^{11,12} dok su na području Alšara pronađene vrste s koncentracijom talija čak do 17 g/kg suhe tvari. Talofilima se smatraju biljke porodice *Brassicaceae* s koncentracijom talija od oko 1,5 mg/kg svježih tvari, a više koncentracije talija zabilježene su i u biljaka iz porodice *Poaceae*.

Budući da mogu akumulirati veće koncentracije talija nego što je prisutno u tlu, te se biljke mogu koristiti i u svrhu fitoremedijacije tla onečišćenog talijem^{6,11}. Utvrđeno je da je nakupljanje talija u biljkama ovisno o pH tla. Koncentracija se talija u kupusu povećava kako se pH tla snizuje^{7,13}.

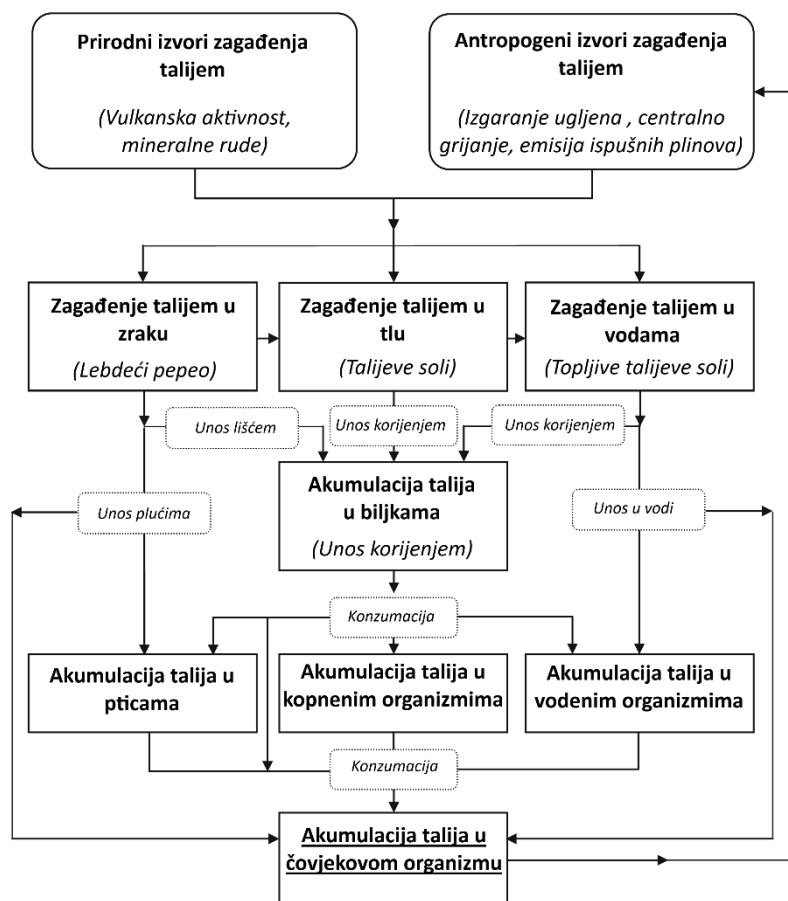
1.1.2. Izloženost ljudi taliju

Topljive se talijeve soli lako mogu isprati sa stijena te postati dio vodenog okoliša, doći do podzemnih voda i tako potencijalno povećati rizik od kronične izloženosti ljudi taliju. Drugi izvor izloženosti taliju je zagađeni zrak. Emisije plinova koji dovode do povećane koncentracije talija u zraku mogu biti prirodnog ili antropogenog porijekla. Zagađenje zraka koje je rezultat prevelike emisije talija može dovesti do širenja talija na velike udaljenosti te organizmi koji do tada nisu bili izloženi mogu talij unijeti udisanjem⁷.

Zagađenje okoliša talijem najviše se povezuje s industrijskom aktivnošću. Procjenjuje se da 5000 t talija završi u okolišu kao posljedica industrijske aktivnosti, od čega 1000 t potječe od izgaranja ugljena^{7,14}. Značajno veće koncentracije talija od prosjeka pronađene su u okolišu u blizini industrijskih postrojenja. Smatra se da je najveći zagađivač talijem industrija cementa. U česticama ispušnih plinova tih postrojenja pronađen je talij u koncentracijskom rasponu od 42 do 2379 mg/kg (srednja vrijednost 428 mg/kg). U tlu u blizini tvornica cementa koncentracija talija su u rasponu od 3 do 6 mg/kg, a maksimalna vrijednost koncentracije talija bila je 15 mg/kg. Značajno iznadprosječne koncentracije pronađene su i u blizini raznih rudnika i iskopišta. Povišena koncentracija talija u biljkama u tim područjima smatra se izravno povezanom s povećanom koncentracijom talija u tlu općenito^{11,15}.

Talij se najčešće unosi u ljudski organizam konzumacijom zagađene hrane i vode, a može ga se unijeti i udisanjem zagađenog zraka. Istraživanja pokazuju da se hranom najlakše intoksicirati konzumirajući upravo kelj ili kupus (biljke iz porodice *Brassicaceae*)¹⁶. Istraživanja pokazuju da osobe koje zloupotrebljavaju opioidne droge imaju čak do 21 puta veću koncentraciju talija u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije bila u doticaju s drogama, dok se za pušače procjenjuje da imaju dvostruko veće koncentracije talija u organizmu u odnosu na nepušače^{17,18}. Na slici 1 prikazan je prijenos talija u okolišu i mogući načini izloženosti ljudi taliju.

S obzirom na prisutnost talija u okolišu procijenjeni dnevni unos talija u svijetu je 2 µg po danu^{19,20}. Zbog utvrđene toksičnosti talija, američka EPA ograničila je maksimalnu dopuštenu koncentraciju talija u vodi na ispod 2 µg/l²¹.



Slika 1. Shematski prikaz prijenosa talijem u okolišu. Preuzeto i prilagođeno iz⁷

1.1.3. Primjena talija

U 19. i 20. stoljeću talij se koristio za liječenje sifilisa, reduciranje noćnog preznojavaanja kod oboljelih od tuberkuloze, u liječenju malarije i u postupku depilacije te liječenju dermatofitoza skalpa jer je uzrokovao brz gubitak kose što je omogućavalo učinkovite kontrole gljivičnih infekcija. Talij se koristio i kod odraslih i kod djece⁸. Od 1920. godine talij se koristio kao rodenticid⁵. U prvoj polovici 20. stoljeća, zbog lake dostupnosti talijevih soli, one su bile čest izbor u homicidalne svrhe⁵. Stoga su 1975. godine industrijski razvijene zemlje zabranile upotrebu talija kao rodenticida. Ipak, talij se još uvijek u nerazvijenim zemljama koristi kao rodenticid te se tamo i dalje bilježe slučajeve njegove upotrebe u suicidalne svrhe.

Danas se talij u medicini primjenjuje kao kontrastno sredstvo kod kardiovaskularne ili tumorske slikovne dijagnostike (scintigrafije)²². Kod scintigrafije koristi se radioaktivni ²⁰¹Tl izotop, koji se daje u koncentracijama od 0,07 do 0,15 ng/kg tjelesne mase, što je znatno manje od doze potrebne za simptome toksičnosti te dozvoljava i ponavljanje procesa dijagnostike po potrebi²³. Talijevi ioni imaju i izvrsna NMR svojstva te mogu imitirati svojstva iona alkalijskih metala (kalija i natrija) zbog čega talij ima primjenu i u biomedicinskim istraživanjima^{8,24}.

U industrijske svrhe talij se koristi u proizvodnji kristala, umjetnih dragulja, boja, pigmenata, električne opreme, poluvodiča, optičkih sustava, infracrvenih spektrometara, niskotemperaturnih termometara i optičkih kablova te su to sve mogući izvori izloženosti ljudi taliju^{5,24}.

1.2. Toksičnost talija

Talij i njegovi spojevi su visokopotentni otrovi. Istraživanja akutne toksičnosti talija pokazala su da je talij za sisavce nešto toksičniji od žive. U istraživanju provedenom na štakorima, doza koja je uzrokovala 50% smrtnosti, tzv. letalna doza (LD₅₀) bila je 13-19 mg/kg za talij, a LD₅₀ za živu bio je 27 mg/kg²⁵. Za ljude, letalna doza talija procijenjena je između 8 i 15 mg/kg^{23,26}.

Trovanje talijem jedno od najkompleksnijih i najozbiljnijih poznatih otrovanja²⁷. Kod ljudi akutna izloženost taliju izaziva simptome trovanja već pri ingestiji doza većih od 100 mg. Simptomi akutne intoksikacije su anoreksija, konstipacija, povraćanje, retrostenalna i abdominalna bol, nakon čega slijede motorni i senzorni polineuritis, insomnija, zatamnivanje korijena kose i gubitak kose. Pored toga, zabilježene su Meejeve linije na noktima (karakteristične kod otrovanja teškim metalima), alteracije u krvnom tlaku te ST i T promjene u elektrokardiogramu^{24,28}.

Pri kroničnoj izloženosti ljudi taliju simptomi variraju te su obično slabijeg intenziteta nego u slučajevima akutnog trovanja. Relativno dugačak period latencije koji može trajati do nekoliko tjedana može biti popraćen sa samo nekolicinom simptoma kao što su periferne senzorne smetnje, mentalne aberacije, gubitak tjelesne mase, nesanica, smetnje u vidu, gubitak kose, bol bez zamjećenog polineuritisa (kasnije se može razviti ozbiljan oblik polineuritisa). Kardiovaskularne smetnje uključuju hipertenziju, neregularan puls te bol nalik angini. Od ostalih simptoma zabilježeni su antacidno djelovanje na želudac, nedostatak apetita, albuminurea, hematurija, endokrini poremećaji, psihoze te encefalitis^{24,28}. Osim o duljini izloženosti, klinička slika ovisi i o dozi talija kojom je osoba izložena, kao i o dobi osobe²⁹.

Najboljim antidotom za trovanje talijem smatra se berlinsko (prusko) modrilo. Uobičajeni tretman prilikom intoksikacije talijem osim davanja pruskog modrila uključuje i terapiju suplementacije kalija i laksativima, a eliminacija se dodatno ubrzava i forsiranjem diureze i hemoperfuzijom^{8,17,25,30-33}.

1.2.1. Toksikokinetika talija

Istraživanja toksikokinetike talija pokazuju da se topljive talijeve soli nakon peroralnog unosa brzo apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta i distribuiraju po tijelu uzrokujući oštećenje tkiva. Osim gastrointestinalnim putem, talij se može apsorbirati i putem kože i sluznica. U

gastrointestinalnom sustavu puno se brže apsorbiraju talijeve soli topljive u vodi (sulfati, acetati, karbonati) od onih netopljivih (sulfidi i jodidi). Talij se iz ljudskog organizma izlučuje u manjoj količini urinom, a u većoj fecesom. Osim putem fecesa i urinom, talij se može iz organizma izlučivati u manjoj mjeri i znojem, slinom i suzama⁴. Nakon unosa talij sulfata, talij je moguće detektirati u urinu već nakon jednog sata, a u fecesu koncentracije talija tijekom 24 sata postupno rastu^{18,26,34}. Nakon apsorpcije i distribucije u organizmu talij se nakuplja u kostima i srži bubrega, te može prelaziti krvno-moždanu barijeru i ulaziti u centralni živčani sustav. Zbog mogućnosti ulaska u stanice, talij ima veliki volumen distribucije u organizmu ($V_d=4,23$ l/kg)³⁵. Biološko poluvrijeme u štakora procijenjeno je na 3-8 dana, dok se u čovjeka procjenjuje na oko 10 dana, no neka istraživanja upućuju da traje i gotovo 30 dana^{18,36}.

Postoje brojne metode za mjerenje koncentracije talija u uzorcima ljudskog tkiva, što omogućuje i praćenje talija u ljudskom organizmu¹⁸. Kod ljudi normalna koncentracija talija u urinu smatra se manjom od 1 $\mu\text{g/g}$ kreatinina. Talij se u mokraći može detektirati i do 2 mjeseca nakon unosa u organizam. Na osnovu izmjerene koncentracije talija u krvi i serumu na uzorku zdravih Talijana procijenjeno je da je koncentracija talija u krvi 0,15-0,63 $\mu\text{g/l}$, a u serumu 0,02-0,43 $\mu\text{g/l}$ ³⁷. Zbog afiniteta talija za odrađene organe i tkiva dolazi do njegovog nakupljanja u tim organima i njegovo je zadržavanje u krvotoku kratkotrajno. Zato se za dijagnozu otrovanja ne preporuča određivanje koncentracije talija u krvi ili serumu. Pokazano je da se u čovjeku nakon akutne intoksikacije talij nakuplja najviše (redom) u: bubrezima, kostima, želucu, crijevima, slezeni, jetri, skeletnim mišićima, jetri i mozgu^{4,38}. Izmjerene koncentracije talija u nekim od ljudskih organa iznosile su od 0,42-1,5 ng/g u mozgu, 1,5 ng/g u jetri, 6,1 ng/g u bubrezima, <6 $\mu\text{g/g}$ u kostima, 7-650 ng/g u kosi te 1,2 $\mu\text{g/g}$ u noktima, iz čega se može zaključiti da se talij akumulira (odlaže) u perifernim organima (nokti, kosa). Normalan raspon koncentracije talija u kosi procjenjuje se na 5-10 ng/g. Važno je napomenuti da mjerenje talija u kosi nije dobar pokazatelj sistemske intoksikacije jer je moguće egzogeno nakupljanje talija u kosi (iz čestica zagađenog zraka). Bolji je pokazatelj akutne intoksikacije talijem mjerenje koncentracija talija u urinu^{4,7,39-41}.

Korištenje pruskog modrila u slučajevima otrovanja talijem temelji se na apsorpciji talija u gastrointestinalnom traktu, budući da talij prolazi ekstenzivnu enterohepatičku cirkulaciju³³. Spomenuti veliki volumen distribucije, ulaženje u tkiva i stanice, kombinacija nespecifičnih simptoma, ali i laka dostupnost (koristio se kao rodenticid) glavni su razlozi zašto je talij bio popularan u prošlosti kao homicidalno sredstvo.

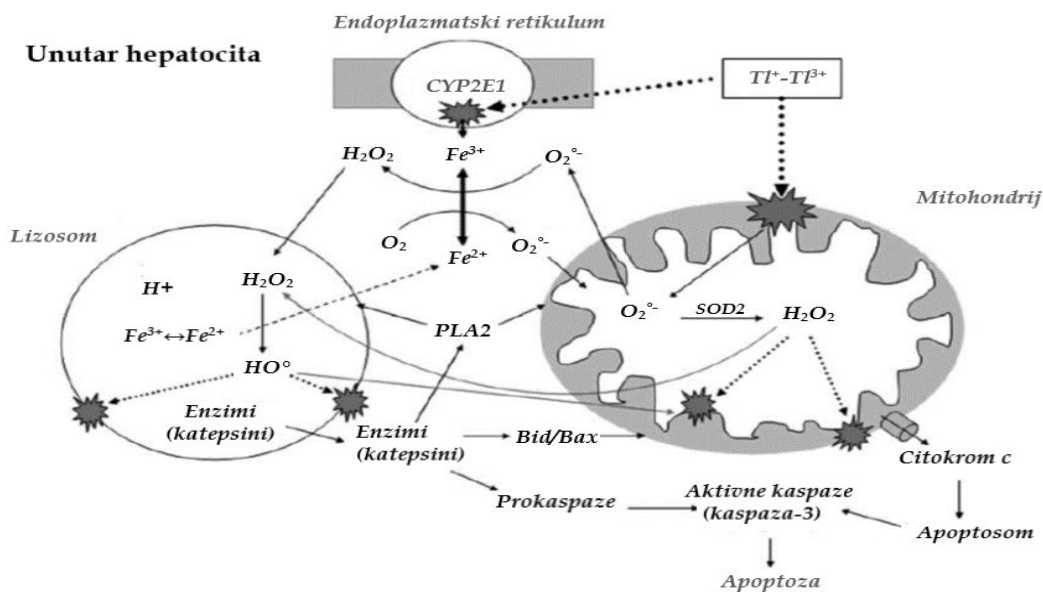
1.2.2. Mehanizam toksičnosti talija

Iako je poznato da oba oksidacijska stanja u kojima se talij javlja (TI^+ i TI^{3+}) djeluju toksično na ljudski organizam, točan mehanizam toksičnog djelovanja nije do kraja opisan.

Zabilježeno je više mehanizama toksičnosti talija⁴. Citotoksičnost Tl^+ i Tl^{3+} povezuje s formiranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*), lipidnom peroksidacijom, sniženjem mitohondrijskog membranskog potencijala, oštećenjem membrane lizosoma te staničnom proteolizom⁴².

Toksičnosti talija najviše doprinosi njegova sličnost s kalijem. Ionski radijus iona Tl^+ (1,49 pm) gotovo jednak ionskom radijusu iona K^+ (1,33 pm)⁴³. To onemogućuje stanici razlikovanje ta dva iona pa zbog toga Tl^+ može ući u stanicu pomoću K^+ kanala ili pumpi⁴. Zbog navedenih fizikalno-kemijskih sličnosti, talij može interferirati s metabolizmom kalija na više načina. Primjerice, Tl^+ može zamijeniti K^+ kao supstrat za Na^+/K^+ -ATPazu te jednom kad uđe u stanicu puno sporije izlazi izvan stanice u odnosu na K^+ ion⁴⁴. Istraživanja pokazuju da se Tl^+ veže za K^+ aktivno mjesto Na^+/K^+ -ATPaze s oko 10 puta većim afinitetom u odnosu na K^+ ion^{4,45}. Nadalje, talij se umjesto kalija može vezati i za piruvat kinazu, enzim metabolizma ugljikohidrata čija je aktivacija ovisna o kaliju. Ta interferencija uzrokuje smetnje u procesima katabolizma ugljikohidrata i oksidativne fosforilacije, što za posljedicu ima smanjene količine ATP-a u stanici^{29,46}.

Provedena istraživanja nedvojbeno pokazuju da talij uzrokuje oksidacijski stres. Tako su oba oksidacijska stanja talija Tl^+ i Tl^{3+} uzrokovala značajno povećanje koncentracije ROS, no Tl^{3+} je snažnije potaknuo stvaranje ROS-ova od Tl^+ iona^{12,42}. Citotoksičnost izazvana Tl^{3+} te nastanak ROS-ova i lipidna peroksidacija inhibirani su dodatkom glutationa (GSH) i stimulatora sinteze GSH, trifluoperazina. S druge strane, citotoksičnost izazvana Tl^+ , formiranje ROS-ova te lipidna peroksidacija bili su potaknuti dodatkom GSH i trifluoperazina⁴². Potonja činjenica iznenađuje uzme li se u obzir da GSH ima ulogu u zaštiti od oksidacijskog oštećenja⁴⁷. To upućuje na moguću interakciju Tl^+ sa sulfhidrilnim skupinama⁴². Interakcija sa sulfhidrilnim skupinama keratina smatra se i uzrokom alopecije koja je najkarakterističniji simptom trovanja talijem⁴⁸. Oba valentna stanja talija prouzročila su značajno sniženje membranskog potencijala mitohondrijske membrane što se izravno povezuje s nastankom ROS-ova i lipidnom peroksidacijom⁴².



Slika 2. Predloženi mehanizam toksičnosti talija u hepatocitima. Preuzeto i prilagođeno iz⁴².

Na slici 2 prikazan je predloženi mehanizam toksičnosti talija ispitivan na hepatocitima⁴². Prvi način toksičnog djelovanja talija je destruktivna interakcija TI⁺ i TI³⁺ iona s citokromom P450 2E1 (CYP2E1). Smatra se da talij uzrokuje odvajanje hema od citokroma P450 i oslobađanje katalitičkog željeza mehanizmom nalik onomu koji nastaje uslijed reakcije citokroma P450 i cisplatina⁴⁹. Rezultat te interakcije je otpuštanje katalitičkog željeza iz hema citokroma P450 2E1 te posljedična proizvodnja ROS-ova.

Drugi je način, prikazan na slici 2, taj da oba talijeva kationa direktno oštećuju mitohondrije hepatocita ometajući lanac prijenosa elektrona što ima za posljedicu otpuštanje ROS-ove koji dalje toksično djeluju na stanicu. Tada vodikov peroksid (H₂O₂) nastao ili u oštećenom mitohondriju ili kao posljedica interakcije talija i CYP2E1 difundira u lizosom čime započinje Fentonova reakcija u kojoj lizosomalni Fe²⁺ u redoks reakciji s peroksidom katalizira nastajanje hidroksilnih radikala (HO[•]). Ti bi hidroksilni radikali mogli destabilizirati membranu lizosoma i otpustiti katepsine, proteaze koje bi pak mogle ili direktno oštetiti membranu mitohondrija ili indirektno aktivirati neke litičke enzime (Bid, Bax, fosfolipaza A2) što bi dovelo do otvaranja mitohondrijskih propusnih tranzicijskih pora (MPTP, eng. *mitochondrial permeability transition pore*) te otpuštanja citokroma C, koji kada izađe iz mitohondrijske membrane započinje kaskadnu reakciju kaspaza i uzrokuje staničnu apoptozu^{22,42}.

1.3. Ispitivanja toksičnosti na stanicama – *in vitro* modeli

Razvoj *in vitro* modela seže još u 50-e godine prošlog stoljeća, kada je dr. George Gey izolirao prvu humanu staničnu liniju (HeLa), što je bila jedna od prekretnica u staničnoj biologiji. Njegova se stanična linija brzo proširila raznim institutima, sveučilištima, farmaceutskim kompanijama i njihovima laboratorijima te su tako istraživači počeli koristiti *in vitro* modele za testiranje citotoksičnosti raznih spojeva⁵⁰.

1.3.1. Stanične linije

Stanične linije razlikuju se od primarnih staničnih kultura. Primarne stanične kulture dobivaju se izravno iz normalnih ili malignih odraslih i embrionalnih tkiva te ih se primarnima smatra do prvog presađivanja. Stanične linije dobivene iz normalnih tkiva imaju ograničen rast i proliferaciju, dok se stanice iz tumorskog tkiva mogu neograničeno dijeliti^{50,51}.

Neke stanične linije pokazuju sposobnost da se mogu subkultivirati neograničen broj puta i takve stanične linije nazivamo kontinuiranim. Te stanične linije ne pokazuju senescenciju, tj. stabilan i stalan prestanak proliferacije stanica unatoč vijabilnosti i održanoj metaboličkoj aktivnosti⁵². Kontinuirane (nazvane još i immortaliziranim) stanične linije izvedene su iz zdravog embrionalnog ili tumornog tkiva ljudi ili životinja. Kontinuitane se stanične linije mogu pojaviti spontano ili ih se može proizvesti raznim metodama kao što su:

- Izlaganje normalnih stanica i tkiva radioaktivnom zračenju ili tretiranje kemijskim mutagenima ili karcinogenima
- Izolacija iz kultura inficiranih virusima (npr. Epstein-Barr virus)
- Genetska modifikacija stanica transfekcijom kloniranim genima
- Izolacija iz transgeničnih životinja

Dok se velik broj kontinuiranih staničnih linija smatra stabilnima kroz duže vremena, u pojedinim slučajevima može doći do ireverzibilnih promjena nekih kultura te je zbog toga potrebno ne izlagati stanične linije promjenjivim uvjetima kultivacije i presađivanja. Važno je uspostaviti zalihe krioprezerviranih stanica, što znači da ih je potrebno čuvati na vrlo niskim temperaturama kako bi ostale strukturno netaknute. Česta je laboratorijska praksa pohranjivati stanice u spremnicima tekućeg dušika, pri temperaturi od -196°C ^{50,53,54}.

1.3.2. Prednosti i nedostaci staničnih linija

Prednost istraživanja na staničnim linijama je jednostavnost rukovanja, što pojednostavljuje promjenu uvjeta testiranja. U većini slučajeva u kulturi ih se uzgaja unutar jednog sloja te do konfluencije dolazi unutar relativno kratkog vremena⁵¹. Stanične su linije komercijalno dostupne te ih njihova svojstva besmrtnosti i mogućnosti neograničenog presađivanja čine povoljnima i s ekonomske strane. S druge strane, tvari kojima izlažemo

stanične linije ne prolaze procese apsorpcije, distribucije po organizmu, metabolizma i eliminacije što uvelike utječe na relevantnost testova toksičnosti na staničnim linijama⁵⁵. Nadalje, u staničnim linijama se javljaju genetske aberacije s brojem presađivanja stanica, podložne su genotipskim i fenotipskim promjenama, okolina stanica razlikuje se od one u organizmu i gubi se prirodna heterogenost tkiva/tumora^{50,56,57}. Također, kontinuirane stanične linije po svojoj prirodi razlikuju se od primarnih staničnih kultura i normalnog tkiva i u raznim biokemijskim svojstvima. Razlika je i između primarne stanične kulture i kontinuirane stanične linije i to ponajviše u proteomu. Proteomi su im kvalitativno slični, no kvantitativna razlika prilično je velika.

1.3.3. Područja uporabe staničnih linija

Kemijska, farmaceutska, kozmetička industrija i regulatorne institucije danas rutinski koriste stanične linije za testove toksičnosti, na osnovu kojih se onda može procijeniti sigurnost i odrediti rizik korištenja nekog spoja. Izbor prikladnog *in vitro* pokusa uz to omogućuje i bolje predviđanje ishoda *in vivo* pokusa te pruža mogućnost dodatnog istraživanja mogućih događaja i rezultata pokusa⁵⁸. Tijekom procesa razvoja lijeka, nakon što se ustanovi da ispitivana molekula postiže željeni biološki učinak *in vitro*, ta molekula i njena farmakologija optimiziraju se prije nego se može nastaviti sa daljnjim stadijima razvoja lijeka⁵⁹. Naime, događaji na staničnoj i molekularnoj razini koji se odvijaju *in vitro* mogu biti u korelaciji s *in vivo* fiziološkim reakcijama, a mogu pomoći i u razumijevanju, primjerice, zašto se određena pojava *in vivo* može zamijetiti kod jedne vrste, dok kod druge ne može⁵⁸.

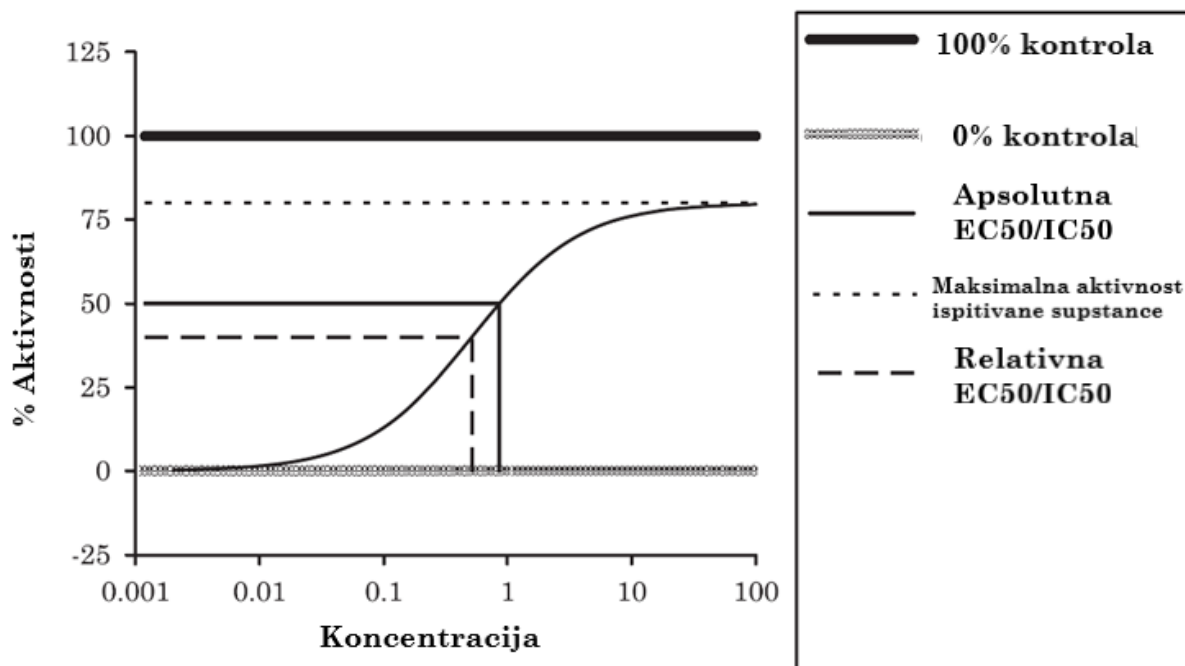
Stanični modeli revolucionarizirali su znanstvena istraživanja te ih se osim testova toksičnosti koristi i u proizvodnji cjepiva, ispitivanju metabolizma lijekova i funkcija gena, stvaranju umjetnih tkiva te sintezi bioloških spojeva (npr. terapijskih proteina⁶⁰).

Testiranje citotoksičnosti na staničnim modelima pridonijelo je smanjenju korištenja životinja u testiranjima *in vivo*. U odnosu na *in vivo* modele, *in vitro* modeli jednostavniji su za održavanje i razmnožavanje, a sam pokus etički je prihvatljiviji (uz neke i dalje etički dvojbene iznimke, kao što su npr. ljudske embrionalne matične stanice ili donacija ljudskog tkiva)⁵⁸. Na temelju IC₅₀ (IC, eng. *Inhibitory Concentration*) iznosa dobivenog *in vitro* ispitivanjem citotoksičnosti, korištenjem modela linearne regresije moguće je procijeniti početnu dozu za određivanje akutne oralne toksičnosti - LD₅₀ (LD eng. *Lethal Dose*, doza toksične tvari pri kojoj ugiba 50% testiranih životinja). Te metode određivanja početne doze za određivanje akutne toksičnosti prihvaćene su i na temelju toga napravljene su i smjernice o određivanju inicijalne doze pri procjeni LD₅₀ iz dobivenih IC₅₀ vrijednosti^{60,61}. Na taj je način moguće smanjiti smrtnost laboratorijskih životinja za čak 30% u testovima procjene LD₅₀ napravljenim UDP (eng. *Up and Down Procedure*) procedurom^{60,61}.

Osim što je time uspješno reduciran broj potrebnih životinja za testiranja, uporaba staničnih modela napredovala je do mjere da su u nekim slučajevima životinjski modeli za testiranje toksičnosti spojeva u potpunosti zamijenjeni staničnim. Danas su testiranja na životinjama strogo regulirana, a u nekim su granama industrije i u potpunosti zabranjena. Tako je testiranje kozmetičkih proizvoda na životinjama u Europskoj uniji zabranjeno. Vodeće međunarodne regulatorne organizacije, Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD, eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) i Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za farmaceutske proizvode za ljudsku upotrebu (ICH, eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) čije su članice najrazvijenije zemlje svijeta izdale su smjernice prema kojima se za testove određenih oblika toksičnosti zamjenjuju životinjski modeli (fototoksičnost, korozivnost na ljudsku kožu, embriotoksičnost, itd.) i koriste *in vitro* modeli⁶².

1.3.4. Određivanje toksičnosti na staničnim linijama

Kako bismo toksični učinan na neki način kvantificirali, uvedeni su određeni parametri kojima se računa i procjenjuje toksični učinak neke supstance. Najveći broj bioloških pokusa *in vitro* mjeri potencijal ispitivane supstance kao IC₅₀ (IC eng. *Inhibitory Concentration*) ili EC₅₀ (EC eng. *Effective Concentration*)⁶³. Iako su EC₅₀ i IC₅₀ slični pojmovi koji se dobivaju na gotovo identičan način, razlika između njih ipak postoji. EC₅₀ u prvom redu odnosi se na tvar koja postiže neki fiziološki učinak te definira dozu potrebnu da se postigne 50% maksimalnog učinka. Vrlo se često koristi u farmakologiji za evaluaciju učinka nekog lijeka. S druge strane, IC₅₀ predstavlja koncentraciju nekog inhibitora pri kojoj se postiže 50% maksimalne inhibitorne aktivnosti. I ovaj pojam se koristi u farmakologiji u slučaju procjene inhibitornog učinka antagonista nekih supstanci, ali česta je uporaba i u toksikologiji za izražavanje toksičnog učinka neke tvari. Razlikujemo apsolutnu i relativnu IC₅₀ i EC₅₀. Apsolutna EC₅₀ definirana je kao molarna koncentracija supstance koja uzrokuje 50% maksimalnog mogućeg agonističkog efekta u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu, dok je apsolutna IC₅₀ definirana kao molarna koncentracija inhibitora potrebna da se reakcija na testiranu supstancu (u većini slučajeva ta je reakcija vijabilnost stanica) smanji na 50%, tj. na pola između pozitivne i negativne kontrole⁶⁴.



Slika 3. Krivulja stupnjevitog odnosa doze i učinka (eng. *dose-response curve*). Preuzeto i prilagođeno iz⁴⁰.

Relativna EC_{50} je molarna koncentracija supstance koja daje 50% učinka u odnosu na maksimalni učinak te same supstance, dok je relativna IC_{50} molarna koncentracija koja ispitivane supstance ima 50% učinka maksimalne inhibicije tom supstancom. IC_{50} i EC_{50} računaju se iz sigmoidalne krivulje stupnjevitog odnosa doze i učinka (eng. *dose-response curve*). Da bismo izračunali IC_{50}/EC_{50} , potrebno je imati čitavu sigmoidalnu krivulju doze i učinka⁶⁵. Krivulju doze i učinka dobivamo matematičkim modelom dizajniranim na način da nam pomogne odrediti dozu pri kojoj je postignuto 50% učinka tako da je ta doza upravo i jedan od parametara tog modela. To je 4-parametarski logistički model, čija se formula može izraziti u obliku:

$$Y = \frac{a - d}{1 + (X/c)^b} + d$$

Gdje je Y učinak, X koncentracija (doza), donja asimptota (dno krivulje, minimum) je a, gornja asimptota (vrh krivulje, maksimum) je d, nagib linearnog dijela krivulje zadan je koeficijentom smjera b. Parametar c je koncentracija koja odgovara učinku na pola puta između a i d. Na slici 3 c je relativna IC_{50}/EC_{50} ⁶⁵.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Talij je teški metal koji je široko rasprostranjen u zemljinoj kori. Jedan je od najtoksičnijih teških metala. Ispitivanja pokazuju da je toksičniji od žive, bakra, olova i cinka^{8,25}. Njegovu toksičnost potvrđuju i namjerni ili nenamjerni slučajevi trovanja ljudi koji završavaju fatalnim ishodom. Opća populacija izložena je taliju zbog njegove prisutnosti i akumulacije u okolišu (voda, zrak, tlo). Primjerice, talij je nađen u povrću koje je uzgajano na tlu u kojem je prisutan talij⁴. Posebnu opasnost talij predstavlja za radnike koji su profesionalno izloženi taliju. Zbog sve veće upotrebe talija u novim, visokotehnološkim industrijskim granama raste i rizik izloženosti ljudi ovom teškom metalu pa time i potencijalna opasnost za ljudsko zdravlje^{4,42}.

U dostupnoj literaturi nedostaju podaci o toksičnosti talija i njegovom mehanizmu toksičnog djelovanja na ljudski organizam^{4,42}. Pretpostavlja se da talij djeluje na stanicu na više razina⁴, ali točan mehanizam toksičnog djelovanja nije do kraja istražen. Kao jedan od važnijih mehanizama toksičnosti Tl^+ navodi se njegova sličnost s K^+ ionom. K^+ i Tl^+ imaju isti naboj i približno sličan ionski radius pa se pretpostavlja da Tl^+ ulazi u stanicu pomoću kanala i/ili pumpi na staničnoj membrani koje su namijenjene za transport K^+ . Tl^+ može primjerice zamijeniti K^+ u Na^+/K^+ pumpi. Također, talij može interferirati u enzimatskim reakcijama i upletati se i u druge biološke procese u kojima sudjeluje kalij^{4,22,42}.

Opći cilj ovoga istraživanja je utvrditi toksičnost talija na više staničnih linija kako bi se dobio bolji uvid o toksičnosti talija za specifičnu staničnu liniju, a dobivene rezultate moglo povezati sa specifičnim učinkom talija na pojedine organe koje te stanice predstavljaju. Koristit će se stanične linije humanog tumora jetre (HepG2), imortalizirani humani keratinociti (HaCaT), epitelne stanice svinjskog bubrega (pk15), stanice humanog neuroblastoma (SH-SY5Y) te fibroblasti pluća kineskog hrčka (V79). Stanična linija HepG2 predstavlja jetru, HaCaT kožu, pk15 bubreg, SH-SY5Y predstavljaju živčano tkivo, a V79 pluća. Pored toga ispitat će se moguća prevencija toksičnosti talija upotrebom kalijeve soli kako bi se ispitao mehanizam ulaska talija u stanicu čime bi se utvrdilo u kojoj se mjeri toksičnost talija može pripisati njegovoj sličnosti s kalijem. Dobiveni rezultati trebali bi dati bolji uvid u toksičnost i mehanizme toksičnosti talija te dati smjernice regulatornim ustanovama za postavljanje graničnih koncentracija talija u okolišu.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Stanične linije HaCaT, HepG2, SH-SY5Y, pk15 i V79 tretirati će se s talij (I) acetatom u rasponu koncentracija od 3,9 do 500 $\mu\text{g/ml}$, u trajanju od 24, 48 i 72 sata te će se pomoću MTT testa odrediti vijabilnost stanica.

2. Na temelju rezultata vijabilnosti pojedinih staničnih linija ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti talij (I) acetatu procijenit će se IC_{50} korištenjem 4-parametarskog logističkog modela.
3. Kako bi se utvrdila razlika u toksičnosti talija za pojedine stanične linije, izračunate IC_{50} statistički će se usporediti te će se donijeti zaključci o toksičnosti talij (I) acetata ovisno o staničnoj liniji i vremenu izloženosti talij (I) acetatu.
4. Učinak talij (I) acetata u različitim koncentracijama i različite duljine izloženosti na ispitivanim staničnim linijama pratit će se i proučavanjem morfologije stanica.
5. Stanične linije (HaCaT, HepG2, SH-SY5Y, pk15 i V79) tretirat će se istovremeno s kalij (I) acetatom u koncentraciji 200 $\mu\text{g/ml}$ i talij (I) acetatom u koncentracijskom rasponu 15,6 – 125 $\mu\text{g/ml}$ kroz 24 sata te će se nakon tretmana pomoću MTT testa odrediti vijabilnost stanica.
6. Dobiveni rezultati će se statistički usporediti metodom mješovitih efekata ANOVA-e kako bi se utvrdilo može li kalij (I) acetat spriječiti toksičnost talij (I) acetata, odnosno može li se mehanizam toksičnosti talija povezati s kalijevim membranskim transportnim putevima.
7. Proučavanje morfologije stanica nakon istovremenog tretmana kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom trebalo bi potvrditi rezultate ispitivanja mehanizma toksičnosti talija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Talij (I) acetat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Kalij (I) acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- RPMI 1640 hranjivi medij (RPMI, eng. *Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Serum goveđeg fetusa, FBS (FBS, eng. *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- puferirana fiziološka otopina, Pufer PBS (PBS, eng. *Phosphate Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- tripsin-etilenaminoocetna kiselina, tripsin-EDTA otopina (Sigma-Aldrich, SAD)
- DMEM F-12 HAM (DMEM F-12 HAM, eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium Nutrient Mixture F-12 Ham*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- DMEM (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium Nutrient Mixture*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, SAD)
- Otopina neesencijalnih aminokiselina, koncentrirana 100x (Sigma-Aldrich, SAD)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, MTT (Sigma-Aldrich, SAD)
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- dimetil-sulfoksid, DMSO (Kemika, Hrvatska)
- 1% penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.2. Tehnička oprema

- Kabinet za rad u sterilnim uvjetima Jouan MSC 12 (Thermo Scientific, SAD)
- Inkubator za uzgoj stanica pri 37°C i 5% CO₂ Thermo 8000 (Thermo Scientific, SAD)
- Svjetlosni mikroskop s kamerom (Olympus, Japan)
- Invertni svjetlosni mikroskop (Olympus, Japan)
- Čitač mikrotitarskih pločica, Viktor 3 (PerkinElmer, Singapur)
- Vibracijska miješalica (Tehtnica, Slovenija)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Istraživanje je provedeno u uvjetima *in vitro* te je korišteno pet kontinuiranih staničnih linija: kulture ljudskih stanica hepatocelularnog karcinoma (HepG2), kulture svinjskih bubrežnih epitelnih stanica (pk15), kulture ljudskih neuroblastoma (SH-SY5Y), imortalizirani humani keratinociti (HaCaT) i stanice fibroblasti kineskog hrčka (V79). Stanične linije uzgajane su u inkubatoru pri optimalnim uvjetima za rast na 37 °C i pri 5% CO₂. Svaka 3 ili 4 dana tijekom presađivanja stanicama je mijenjan hranjivi medij. Rast stanica praćen je pomoću invertnog mikroskopa (povećanje 100x), a stanice su presađivane kada bi prekrile 70-80 % površine. Prilikom presađivanja, stanice su isprane PBS-om te izložene djelovanju 0,25% Tripsin-EDTA prilikom čega dolazi do formiranja kuglastih oblika i odljepljivanja od podloge. Koncentracija stanica određena je standardnom kvantitativnom metodom upotrebom hemocitometra i svjetlosnog mikroskopa (povećanje 200x). Broj stanica određen je prema standardnoj formuli koja uključuje broj izbrojanih stanica u komorici površine 1 mm² i dubine 0,1 mm⁶⁶.

Poštujući potrebe dobre laboratorijske prakse koja uključuje sigurnu provedbu i ponovljivost pokusa, osigurane su dodatne količine stanica trajnom pohranom u spremniku s tekućim dušikom na -196 °C. U tablici 1 prikazane su korištene stanične linije te hranjivi medij i dodaci hranjivom mediju koji su korišteni za njihov uzgoj.

Tablica 1. Načini uzgoja pojedinih staničnih linija

Stanična linija	Hranjivi medij	Dodatak hranjivom mediju
HaCaT	DMEM	4,5 g/l glukoza, 10% FBS, L-glutamin, 1% penicilin/streptomycin
HepG2	DMEM	10% FBS
SH-SY5Y	DMEM F-12	1% neesencijalne aminokiseline, 15% FBS, L-glutamin, 1% penicilin/streptomycin
pk15	RPMI 1640	10% FBS
V79	RPMI 1640	10% FBS, antibiotici (110 IU/ml penicilina i 0,1 mg/ml streptomicina)

3.3. Biološki pokus

3.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti talij (I) acetata

Svih pet staničnih linija nasađeno je na pločice s 96 bunarića te ostavljeno u periodu od 24 ili 48 sati, ovisno o staničnoj liniji na prilagodbu u inkubatoru u kontroliranim uvjetima temperature i vlage (37 °C i pri 5% CO₂).

Nakon perioda prilagodbe, stanice su tretirane talij (I) acetatom. Za ispitivanje citotoksičnosti stanice su tretirane talij (I) acetatom u koncentracijskom rasponu od 3,9 do 500 µg/ml te pohranjene u kontroliranim uvjetima u inkubatoru pri 37 °C i 5% CO₂. Citotoksičnost talij (I) acetata praćena je u vremenskom razdoblju od 24, 36 i 72 sata. Svaku staničnu liniju bilo je potrebno posebno uzgojiti za svako ispitivano vrijeme trajanja tretmana talij (I) acetatom. U pokus su uključeni još i odgovarajući kontrolni uzorci tretirani samo s PBS-om (negativna kontrola), DMSO (pozitivna kontrola) te s kalijevim (I) acetatom kao kontrola za acetat. Kako bi se utvrdilo uzrokuje li tretman talija morfološke promjene na stanicama, nakon tretmana stanica s talij (I) acetatom u vremenskim razdobljima 24, 48, i 72 sata stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom te slikane. Metabolička aktivnost stanica praćena je MTT testom.

3.3.2. Ispitivanje protektivne uloge kalija (I) acetata

Provedena je i serija pokusa u kojima je ispitana protektivna uloga kalija, odnosno može li kalij spriječiti toksičnost talija. U prethodnoj seriji pokusa utvrđena je toksičnost i IC₅₀ talij (I) acetata za pojedinu staničnu liniju te su za ova ispitivanja odabrane one koncentracije koje su bile oko vrijednosti IC₅₀ za svaku staničnu liniju. To su koncentracije talij (I) acetata: 15,6; 32,4; 62,5 i 125 µg/ml. Kako bi se utvrdila protektivna uloga kalija stanice su tretirane s talijem i kalijem istovremeno, odnosno stanice su tretirane talij (I) acetatom u koncentracijskom rasponu od 15,6 do 125 µg/ml i kalijevim (I) acetatom koncentracije 500 µg/ml istovremeno te pohranjene u kontroliranim uvjetima temperature i vlage (37 °C i 5% CO₂) u vremenu od 24 sata. Također u pokuse su uključene negativna kontrola (stanice tretirane s PBS-om) i pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Nakon zajedničkog tretmana stanica s talij (I) acetatom i kalij (I) acetatom u vremenskim razdoblju od 24 sata stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom te slikane. Metabolička aktivnost stanica praćena je MTT testom.

3.3.3. Priprema otopina

3.3.3.1. Priprema otopine talij (I) acetata

Matična otopina talijevog (I) acetata koncentracije 50 g/l pripravljena je u PBS puferu. Za sam tretman stanica otopina talijevog (I) acetata pripravljena je u hranjivom mediju metodom dvostrukog serijskog razrjeđenja u koncentracijskom rasponu od 500 do 3,9 µg/ml (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 7,8 i 3,9 µg/ml).

3.3.3.2. Priprema otopine kalij (I) acetata

Matična otopina kalijevog (I) acetata koncentracije 50 g/l pripravljena je PBS puferu. Za tretman stanica pripravljena je otopina kalijevog acetata koncentracije 500 µg/ml u hranjivom mediju.

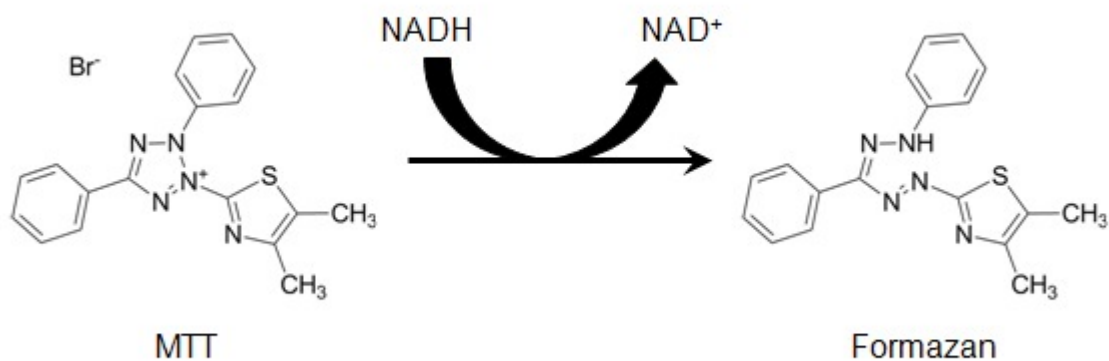
3.3.3.3. Priprema otopine MTT

Matična otopina MTT pripravljena je PBS-u koncentracije 5 mg/ml. Filtrirana otopina čuvana je u mraku na +4°C.

3.3.4. Mjerenje metaboličke aktivnosti stanica MTT test

3.3.4.1. Princip metode

MTT test je kolorimetrijski test čiji se rezultati koriste kao pokazatelji metaboličke aktivnosti stanica te stanične vijabilnosti i proliferacije. Temelji se na sposobnosti staničnih enzima da reduciraju žuti spoj MTT u netopljivi tamno ljubičasti formazan (slika 4). Stanična membrana je nepropusna za kristale formazana, pa se oni iz stanica oslobađaju i otapaju dodatkom organskog otapala, izopropanola. Intenzitet boje oslobođen otapanjem kristala formazana može se kvantificirati mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 570 nm⁶⁷.



Slika 4. reakcija redukcije MTT-a u formazan. Preuzeto iz⁶⁸

3.3.4.2. Postupak

Prema protokolu stanice su tripsinizirane, izbrojane i razrijeđene do koncentracije od 1x10⁵ stanica po mililitru hranjivog medija⁶⁹. Na mikrotitarske pločice od 96 bunarića nanešeno je po 100 µl stanične suspenzije, pri čemu se 3 bunarića ostave prazne za slijepu probu (medij bez stanica). Zatim slijedi period prilagodbe od 24 sata odnosno 48 sati, ovisno o staničnoj liniji. Potom se stanice tretiraju s talijevim (I) acetatom u koncentracijskom rasponu 3,9 do 500 µg/ml te pohrane u kontroliranim uvjetima kroz 24, 48 i 72 sata. U pokus su uključeni

odgovarajući kontrolni uzorci tretirani samo PBS-om (negativna kontrola), DMSO (pozitivna kontrola) te s kalijevim (I) acetatom kao kontrola za sam acetat. Nakon tretmana, sadržaj pločica se uklanja te se vijabilnost testira MTT testom. Postupak je napravljen na isti način i za drugi dio pokusa kojim smo ispitali protektivnu ulogu kalija, samo su tada uzorcima dodane otopine pomiješanih kalij (I) acetata u koncentraciji od 500 µg/ml i talij (I) acetata) u rasponu koncentracija 15,6 µg/ml do 125 µg/ml.

MTT test vijabilnosti provodimo korištenjem MTT matične otopine koji se razrijedi 10 puta sterilnim zagrijanim medijem te se dodaje 40 µl te razrijeđene MTT otopine po bunariću. Ploče se inkubiraju 3 sata na 37°C, a zatim se dodaje 170 µl DMSO po bunariću u digestoru. Nakon inkubacije 30-35 min, stanice su ostavljene na tresilici 15 min da se boja ravnomjerno rasporedi i da nestanu mjehurići zraka koji mogu povećati apsorbanciju. Zatim se očitava apsorbancija pri valnoj duljini od 570 nm, a od dobivene apsorbancije oduzme se slijepa proba. Dobiveni rezultati izražavaju se u obliku postotka inhibicije izračunatog prema formuli:

$$\left(1 - \frac{\text{dobivena apsorbancija} - \text{apsorbancija pozitivne kontrole}}{\text{apsorbancija negativne kontrole} - \text{apsorbancija pozitivne kontrole}}\right) * 100\%$$

3.3.5. Praćenje morfologije stanica

Nakon tretmana s talij (I) acetatom, nakon 24, 48 i 72 sata te nakon zajedničkog tretmana s kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom stanice su slikane svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 100x, a slike su pohranjene u programu za slikanje.

3.4. Statistička analiza

3.4.1. Učinak talij (I) acetata na vijabilnost stanica

Dobiveni IC₅₀ izračunat je korištenjem 4-parametarskog logističkog modela, koji zbog matematičke jednostavnosti i dobivanja preglednijih krivulja koje su jednostavne za usporedbu ima široku primjenu u istraživanjima na području biomedicine⁷⁰. Krivulja dobivena tim modelom, krivulja stupnjevitog odnosa doze i učinka (eng. *dose-response curve*) zadana je formulom:⁷¹,

$$f(x) = \frac{(d - c)}{(1 + e^{b * (\ln(x) - \ln(e))})}$$

u kojoj je $f(x)$ udio inhibicije, x je vrijednost koncentracije testirane substance, d je vrijednost funkcije na gornjem platou sigmoidalne krivulje, c je vrijednost funkcije na dnu krivulje, b je nagib krivulje, a e je IC₅₀. Iz te je jednadžbe procijenjen IC₅₀ i njegov 95%-tni interval pouzdanosti (95 %CI – engl. *Confidence Interval*). 95%-tni interval pouzdanosti procijenjen je „delta“ metodom.

Procjenjeni IC_{50} grupirani su prema dva faktora: staničnoj liniji i vremenu izloženosti. Dobivene skupine uspoređene su višestrukim t-testovima, te je korekcija p vrijednosti na višestruke usporedbe napravljena prema metodom Benjamini-Hochbergu.

3.4.2. Analiza utjecaja dodatka kalijevog (I) acetata na toksičnost talijevog (I) acetata

Utjecaj kalij (I) acetata na toksičnost talij (I) acetata procijenjen je modelom mješovitih efekata analize varijance (ANOVA-e).

Usporedbe između skupina napravljene su višestrukim t-testovima, a korekcija p vrijednosti na višestruke usporedbe napravljena je Benjamini-Hochberg metodom.

U rezultatima su prikazane samo p vrijednosti korigirane na višestruko testiranje i smatraju se značajnima ukoliko su manje od razine statističke značajnosti, $\alpha = 0,05$.

Za cjelokupnu izradu matematičkih modela, statističku obradu podataka i procjenu rezultata, kao i za grafičku obradu dobivenih podataka korišten je programski jezik R (verzija 4.0.2) uz pomoć njegovog integriranog razvojnog okruženja RStudio (verzija 1.3.1073) uz korištenje programskih paketa „drc“, „tidyverse“, „emmeans“, „lme4“ i „lmerTest“⁷²⁻⁷⁷.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati stanične vijabilnosti nakon tretmana s talij (I) acetatom

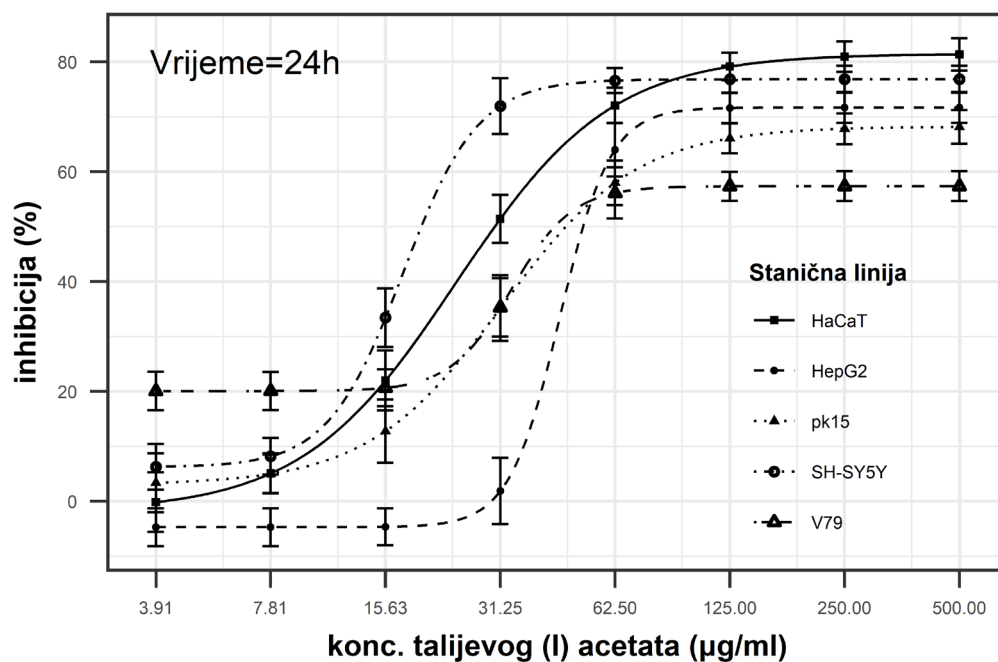
Kako bi se utvrdila citotoksičnost talij (I) acetata, pet staničnih linija, HaCaT, V79, pk15, HepG2, SH-SY5Y tretirano je talij (I) acetatom u koncentracijskom rasponu od 3,9 do 500 $\mu\text{g/ml}$ tijekom 24, 48 i 72 sata. Za ispitivanje stanične vijabilnosti korišten je MTT test. Rezultati su prikazani kao IC_{50} (koncentracija ispitivanog spoja koja uzrokuje 50% maksimalnog učinka). U ovom su radu uspoređivane apsolutne IC_{50} .

Na temelju vrijednosti vijabilnost stanica dobivenih MTT testom uz korištenje 4-parametarskog logističkog modela dobiven je graf ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji talijevog (I) acetata kojim su stanice tretirane. Na temelju toga grafa i matematičkog modela, izračunati su apsolutni IC_{50} uz 95%-tni interval pouzdanosti te su prikazani u tablicama ispod grafova. Ti su IC_{50} prikazani i u obliku stupčastih dijagrama te su međusobno uspoređeni, a rezultati te usporedbe prikazani su kao stupčasti dijagrami sa slovima iznad koja simboliziraju moguće postojeću statistički značajnu razliku.

4.1.1. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 24-satnog tretmana s talij (I) acetatom

Rezultati stanične vijabilnosti dobiveni MTT testom nakon 24-satnog tretmana s talij (I) acetatom svih staničnih linija (HaCaT, V79, pk15, HepG2, SH-SY5Y) prikazani su slikama 5 i 6 te tablicom 3. Nakon 24-satnog tretmana s talij (I) acetatom najviši apsolutni IC_{50} izračunat je za staničnu liniju HepG2 (51,52 $\mu\text{g/ml}$, 95%-tni interval pouzdanosti 46,61-56,95 $\mu\text{g/ml}$). Vrijednosti IC_{50} izračunate za stanične linije pk15 i V79 bile su nešto niže od HepG2 stanične linije (tablica 2). Najniže vrijednosti apsolutnog IC_{50} izračunate su za stanične linije HaCaT (30,19 $\mu\text{g/ml}$) i SH-SY5Y (19,39 $\mu\text{g/ml}$) (tablica 2). Statističkom obradom i međusobnom usporedbom izračunatih IC_{50} između staničnih linija, pokazano je da postoji statistički značajna razlika u IC_{50} vrijednosti SH-SY5Y stanica i svih ostalih staničnih linija, dok razlike u IC_{50} vrijednostima između HepG2 i pk15 nisu bile statistički značajne. IC_{50} dobiven za V79 staničnu liniju statistički se razlikovao samo u odnosu na IC_{50} dobivenu za SH-SY5Y stanice (slika 6).

**Ovisnost % inhibicije (u odnosu na pozitivnu kontrolu)
o koncentraciji talijevog (I) acetata (95% CI)**

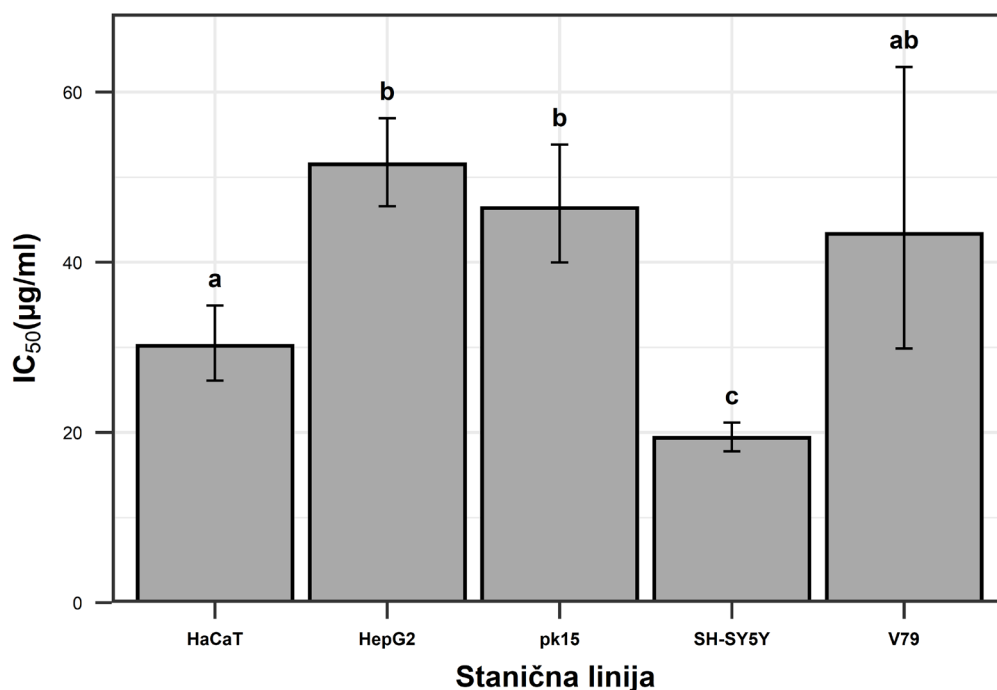


Slika 5. Grafički prikaz 4-parametarskog logističkog modela za odnos koncentracije talijevog (I) acetata i postotka inhibicije vijabilnosti stanica nakon 24 sata. Svaka linija odgovara procjeni za zasebnu staničnu liniju. Svaka je točka ucrtana na pravcu srednja vrijednost izmjenog postotka inhibicije za svaku od koncentracija kojima su tretirane stanične linije, a stupići koji se protežu ispod i iznad točaka na pravcu predstavljaju procijenjeni 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost.

Tablica 2. Izračunati IC_{50} uz pripadajući 95%-tni interval pouzdanosti za svaku od navedenih staničnih linija nakon izloženosti taliju (I) acetatu u trajanju od 24 sata. Intervali pouzdanosti procijenjeni su koristeći „delta“ metodu.

Stanična linija	IC_{50} (µg/ml)	95%-tni interval pouzdanosti (µg/ml)
HaCaT	30,19	26,09-34,93
HepG2	51,52	46,61-56,95
pk15	46,39	39,97-53,84
SH-SY5Y	19,39	17,78-21,15
V79	43,36	29,86-62,96

Izmjereni IC₅₀ za svaku ispitanu staničnu liniju (95% CI)

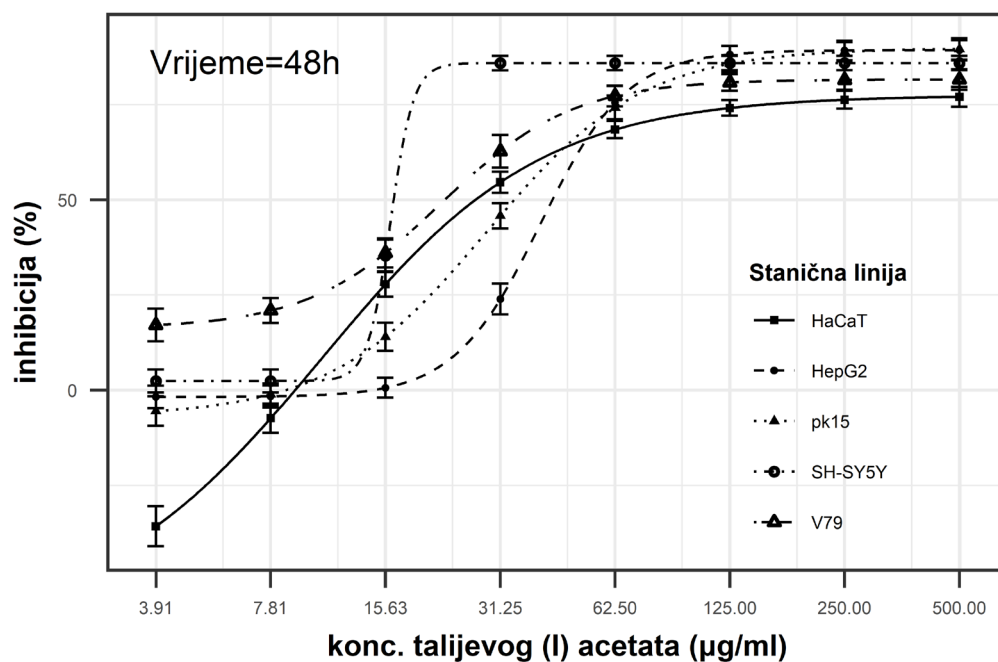


Slika 6. Međusobna usporedba izračunatih IC₅₀ za pojedine stanične linije nakon 24-satnog tretmana s talij (I) acetatom (uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti). Statističke razlike između skupina ispitanu su koristeći višestruke t-testove uz $p < 0,05$. Korekcija na višestruke usporedbe napravljena je metodom po Benjamini-Hochbergu. Skupine između kojih postoji statistička razlika ne dijele isto slovo iznad stupca.

4.1.2. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 48-satnog tretmana s talij (I) acetatom

Rezultati stanične vijabilnosti izmjereni MTT testom nakon 48-satnog tretmana s talij (I) acetatom (koncentracijski raspon 3,9 - 500 µg/ml) prikazani su slikama 7 i 8 te tablicom 3. Nakon 48-satnog tretmana, izračunati IC₅₀ bio je najviši za HepG2 staničnu liniju (42,82 µg/ml, 95%-tni interval pouzdanosti 40,05-45,79 µg/ml). Nešto niži IC₅₀ izračunati je za stanične linije pk15, HaCaT i V79. Najniža IC₅₀ nakon 48-satnog tretmana s talij (I) acetatom izračunata je za staničnu liniju SH-SY5Y (16,41 µg/ml, 95%-tni interval pouzdanosti 11,93-22,59 µg/ml; tablica 3). Međusobna usporedba izračunatih IC₅₀ ispitivanih staničnih linija nakon 48-satnog tretmana s talij (I) acetatom pokazala je da je izračunati IC₅₀ stanične linije HepG2 statistički značajno različit od svih ostalih staničnih linija (slika 8). Izračunati IC₅₀ i drugih staničnih linija (pk15, HaCaT i SH-SY5Y) međusobno su bili statistički značajno različiti (slika 8). Izuzetak je stanična linija V79 koja ima viši IC₅₀ od SH-SY5Y i niži od HaCaT, ali ne statistički značajno.

**Ovisnost % inhibicije (u odnosu na pozitivnu kontrolu)
o koncentraciji talijevog (I) acetata (95% CI)**

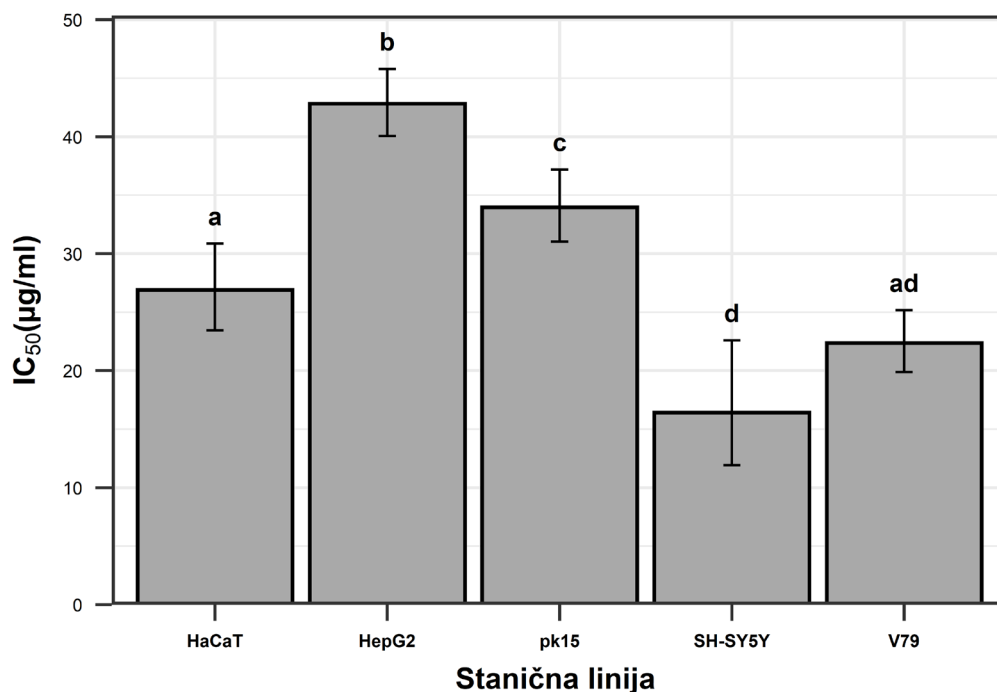


Slika 7. Grafički prikaz 4-parametarskog logističkog modela za odnos koncentracije talijevog (I) acetata i postotka inhibicije vijabilnosti stanica nakon 48 sati. Svaka linija odgovara procjeni za zasebnu staničnu liniju. Svaka je točka ucrtana na pravcu srednja vrijednost izmjenjenog postotka inhibicije za svaku od koncentracija kojima su tretirane stanične linije, a stupići koji se protežu ispod i iznad točaka na pravcu predstavljaju procijenjeni 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost.

Tablica 3. Izračunati IC_{50} uz pripadajući 95%-tni interval pouzdanosti za svaku od navedenih staničnih linija nakon izloženosti talij (I) acetatu (koncentracijski raspon 3,9-500 µg/ml) u trajanju od 48 sati. Intervali pouzdanosti procijenjeni su koristeći „delta“ metodu.

Stanična linija	IC_{50} (µg/ml)	95%-tni interval pouzdanosti (µg/ml)
HaCaT	26,90	23,45-30,86
HepG2	42,82	40,05-45,79
pk15	33,98	31,03-37,20
SH-SY5Y	16,41	11,93-22,59
V79	22,36	19,87-25,17

Izmjereni IC₅₀ za svaku ispitanu staničnu liniju (95% CI)

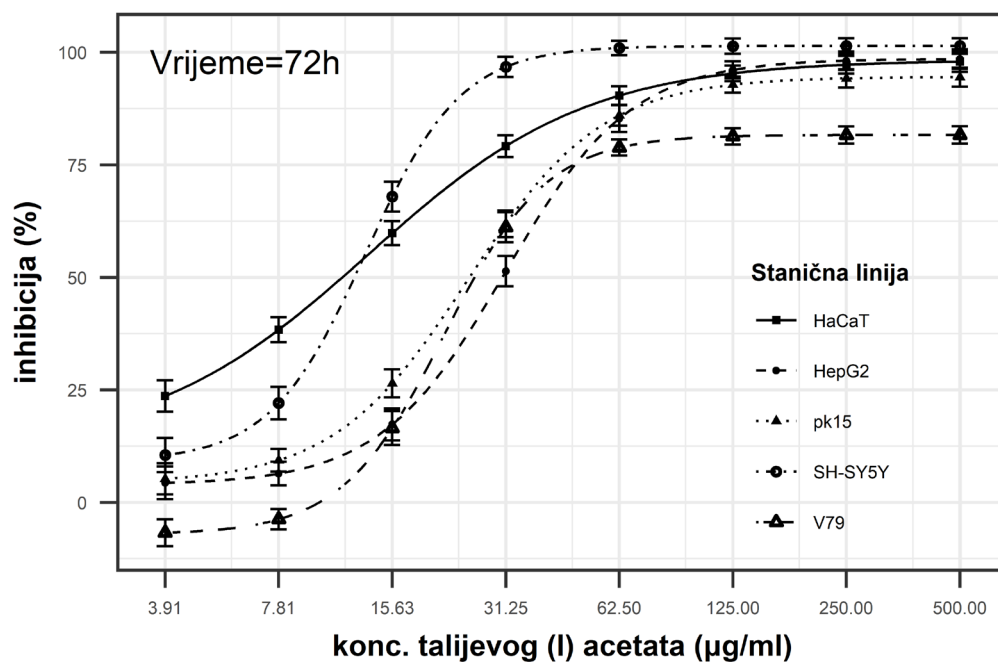


Slika 8. Međusobna usporedba izračunatih IC₅₀ korištenih staničnih linija nakon 48-satne izloženosti talij (I) acetatu (uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti). Statističke razlike između skupina ispitanu su koristeći višestruke t-testove uz $p < 0,05$. Korekcija na višestruke usporedbe napravljena je metodom po Benjamini-Hochbergu. Skupine između kojih postoji statistička razlika ne dijele isto slovo iznad stupca.

4.1.3. Rezultati stanične vijabilnosti nakon 72-satnog tretmana s talij (I) acetatom

Rezultati stanične vijabilnosti dobiveni MTT testom nakon 72-satnog tretmana s talij (I) acetatom (u koncentracijskom rasponu 3,9-500 µg/ml) prikazani su slikama 9 i 10 te tablicom 4. Nakon 72-satnog tretmana najviša izračunata IC₅₀ u odnosu na sve druge stanične linije bila je za staničnu liniju HepG2. Izračunate IC₅₀ za stanične linije V79 i pk15 su bile približno slične; za staničnu liniju V79 izračunati IC₅₀ iznosio je 25,80 µg/ml, a za staničnu liniju pk15 25,02 µg/ml. Nakon 72-satnog tretmana najniža izračunata IC₅₀ bila je za stanične linije SH-SY5Y i HaCaT (tablica 4). Međusobna usporedba izračunatih IC₅₀ ispitivanih staničnih linija pokazala je da se izračunati IC₅₀ stanične linije HepG2 statistički značajno razlikuje od preostalih staničnih linija. Statistički značajna razlika između izračunatih IC₅₀ staničnih linija V79 i pk15 te HaCaT i SH-SY5Y nije uočena (slika 10).

**Ovisnost % inhibicije (u odnosu na pozitivnu kontrolu)
o koncentraciji talijevog (I) acetata (95% CI)**

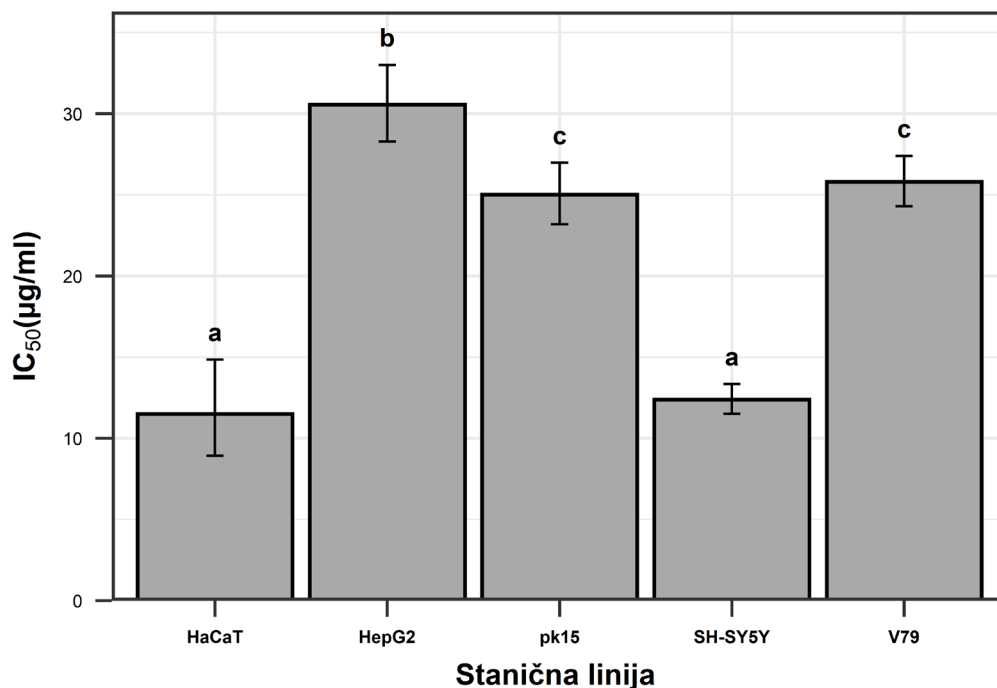


Slika 9. Grafički prikaz 4-parametarskog logističkog modela za odnos koncentracije talijevog (I) acetata i postotka inhibicije vijabilnosti stanica nakon 72 sata. Svaka linija odgovara procjeni za zasebnu staničnu liniju. Svaka je točka ucrtana na pravcu srednja vrijednost izmjenjenog postotka inhibicije za svaku od koncentracija kojima su tretirane stanične linije, a stupići koji se protežu ispod i iznad točaka na pravcu predstavljaju procijenjeni 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost.

Tablica 4. Izračunati IC_{50} za svaku od navedenih staničnih linija uz pripadajući 95%-tni interval pouzdanosti nakon izloženosti talij (I) acetatu (koncentracijski raspon 3,9-500 µg/ml) u trajanju od 72 sata. Intervali pouzdanosti procijenjeni su koristeći „delta“ metodu.

Stanična linija	IC_{50} (µg/ml)	95%-tni interval pouzdanosti (µg/ml)
HaCaT	11,51	8,92-14,85
HepG2	30,55	28,29-33,00
pk15	25,02	23,19-26,99
SH-SY5Y	12,40	11,51-13,36
V79	25,80	24,31-27,40

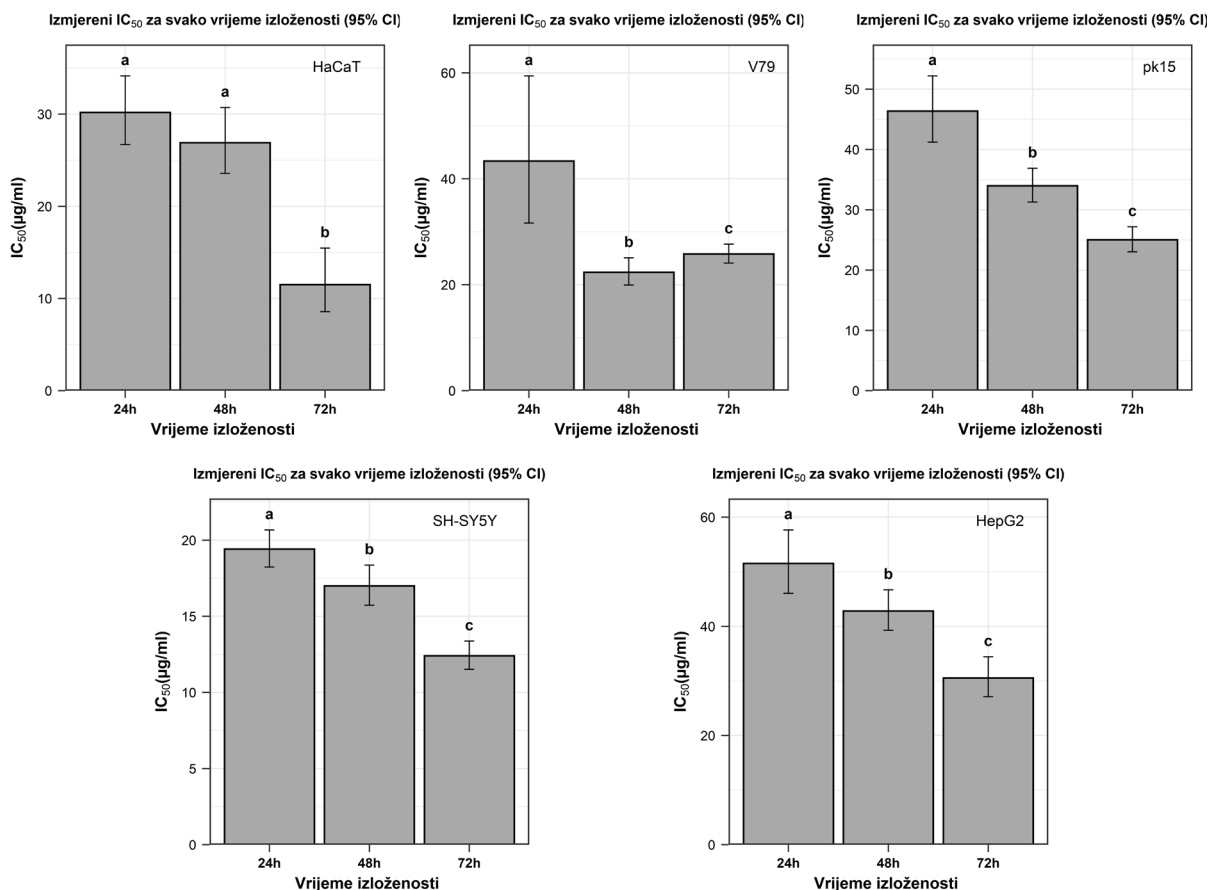
Izmjereni IC₅₀ za svaku ispitanu staničnu liniju (95% CI)



Slika 10. Međusobna usporedba izračunatih IC₅₀ za pojedine stanične linije nakon 72-satne izloženosti talij (I) acetatu (uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti). Statističke razlike između skupina ispitane su koristeći višestruke t-testove uz $p < 0,05$. Korekcija na višestruke usporedbe napravljena je metodom po Benjamini-Hochbergu. Skupine između kojih postoji statistička razlika ne dijele isto slovo iznad stupca.

4.1.4. Rezultati stanične vijabilnosti ovisno o vremenu izloženosti talij (I) acetatu

Kako bi se dobio bolji uvid u toksičnost talij (I) acetata u ovisnosti o vremenu, rezultati stanične vijabilnosti dobiveni MTT testom nakon tretmana stanica (stanične linije: HaCaT, HepG2, pk15, SH-SY5Y i V79) s talij (I) acetatom (koncentracijski raspon: 3,9-500 µg/ml) uspoređeni su unutar pojedine stanične linije u vremenima 24, 48 i 72 sata. Na slici 11 prikazana je promjena za svaku staničnu liniju kroz vrijeme. Vidljivo je da se vrijednost izračunatog IC₅₀ kod svake stanične linije snižuje s produljenjem trajanja izloženosti taliju (uz malu iznimku stanične linije V79 između 48 i 72 sata), što sugerira i da je pad stanične vijabilnosti proporcionalan s trajanjem izloženosti taliju, odnosno da dulja izloženost taliju povećava smrtnost stanica.

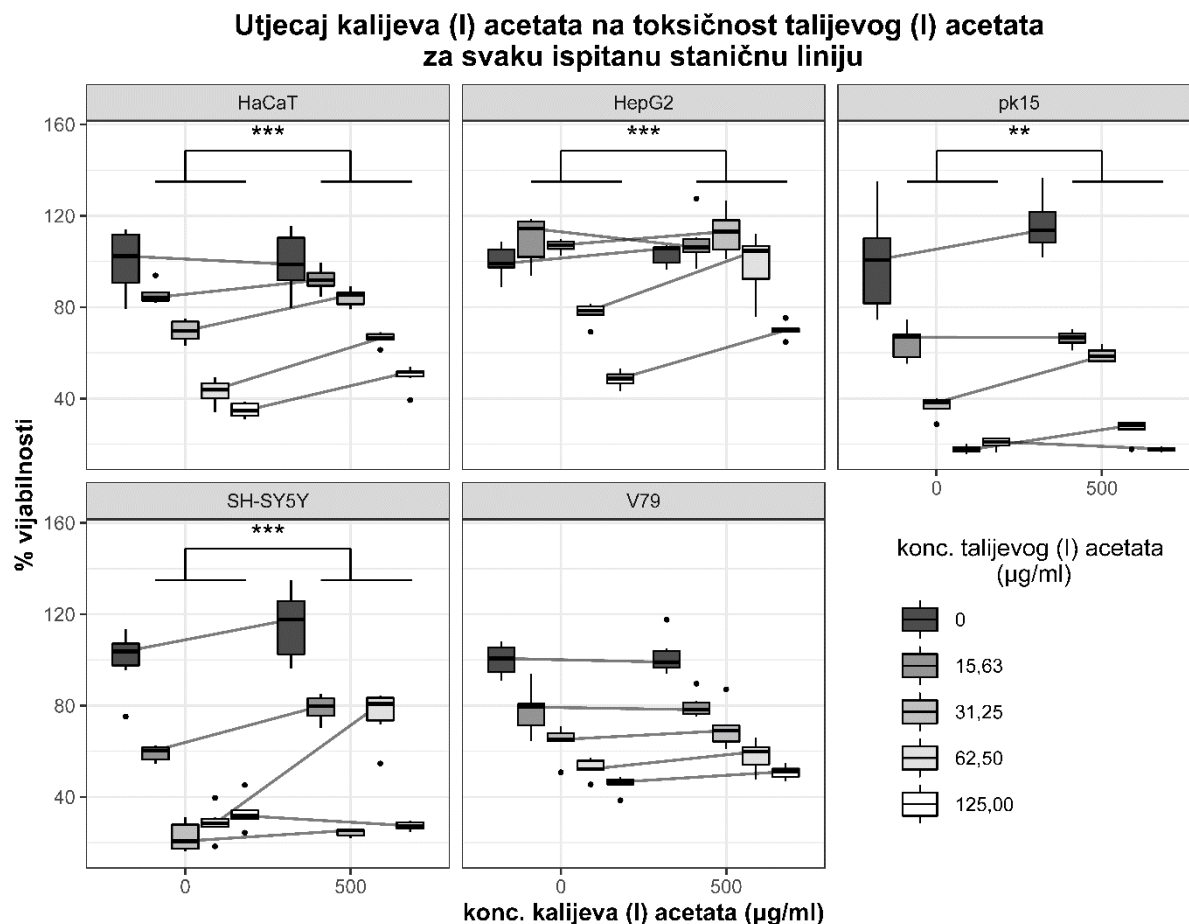


Slika 11. Međusobne usporedbe izračunatih IC₅₀ za svako vrijeme izloženosti talijevom (I) acetatu unutar svake stanične linije zasebno (uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti). Statističke razlike između skupina ispitane su koristeći višestruke t-testove uz $p < 0,05$. Korekcija na višestruke usporedbe napravljena je metodom po Benjamini-Hochbergu. Skupine između kojih postoji statistička razlika ne dijele isto slovo iznad stupca.

4.2. Rezultati stanične vijabilnosti nakon zajedničkog tretmana s kalijevim (I) acetatom i talijevim (I) acetatom

Nakon što je utvrđena citotoksičnost talija za HaCaT, HepG2, pk15, SH-SY5Y i V79 stanične linije, ispitana je mogućnost prevencije te toksičnosti s kalij (I) acetatom, a kako bi se utvrdio mogući mehanizam toksičnosti talij (I) acetata. Stanične linije HaCaT, HepG2, pk15, SH-SY5Y i V79 tretirane su samo s talij (I) acetatom (u koncentracijama 15,6; 32,25; 62,5 i 125 µg/ml) te istovremeno s talij (I) acetatom (koncentracije 15,6; 32,25; 62,5 i 125 µg/ml) i kalij (I) acetatom (u koncentraciji 500 µg/ml) kroz 24 sata. Stanična vijabilnost određena je pomoću MTT testa. Dobiveni rezultati stanične vijabilnosti nakon tretmana samo s talij (I) acetatom i zajedničkim tretmanom s talij (I) acetatom i kalij (I) acetatom međusobno su uspoređeni i statistički obrađeni. Rezultati su prikazani kao postotak vijabilnosti ± 95%-tni interval pouzdanosti (tablica 6). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je tretman s kalij (I)

acetatom smanjio citotoksičnost talij (I) acetata, odnosno kod staničnih linija HaCaT, HepG2, pk15 i SH-SY5Y zabilježen je značajan porast vijabilnosti nakon zajedničkog tretmana s talij (I) acetatom i kalij (I) acetatom u usporedbi s tretmanom samo s talij (I) acetatom. Značajan učinak nije zabilježen jedino za staničnu liniju V79.



Slika 12. Dijagram s pravokutnikom (eng. *boxplot*) za procjenu utjecaja kalijevog (I) acetata u koncentraciji od 500 µg/ml na toksičnost talijevog (I) acetata pri koncentracijama od 0 µg/ml (kontrola), 15,63 µg/ml, 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml i 125 µg/ml. Vodoravna crta u sredini pravokutnika predstavlja medijan, donja vodoravna linija koja označava kraj pravokutnika predstavlja donji kvantil, a gornja vodoravna linija koja označava kraj pravokutnika predstavlja gornji kvantil. Linije koje su okomite na pravokutnik s gornje i donje strane protežu se do maksimalne, odnosno minimalne vrijednosti u nizu podataka. Točke koje se nalaze izvan pravokutnika predstavljaju procijenjene netipične, stršeće vrijednosti (eng. *outlier*). Utjecaj kalija na postotak vijabilnosti za sve stanične linije procijenjen je modelom mješovitih efekata analize varijance, nakon čega su skupine sa i bez dodanog kalijevog (I) acetata unutar svake stanične linije jedna s drugom uspoređene višestrukim t-testovima uz korekciju na višestruka testiranja metodom po Benjamini-Hochbergu (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Kontrola, iako prikazana na grafu, nije uključena u statističku analizu efekta kalija.

Tablica 6. Izračunata srednja vrijednost postotka vijabilnosti za sve testirane koncentracije talijevog (I) acetata (15,63 µg/ml, 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml i 125 µg/ml) bez dodatka kalijevog (I) acetata i uz dodatak kalijevog (I) acetata u iznosu od 500 µg/ml. Utjecaj kalija na postotak vijabilnosti za sve stanične linije procijenjen je modelom mješovitih efekata analize varijance, nakon čega su skupine sa i bez dodanog kalijevog (I) acetata unutar svake stanične linije međusobno uspoređene višestrukim t-testovima uz korekciju na višestruka testiranja metodom po Benjamini-Hochbergu (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

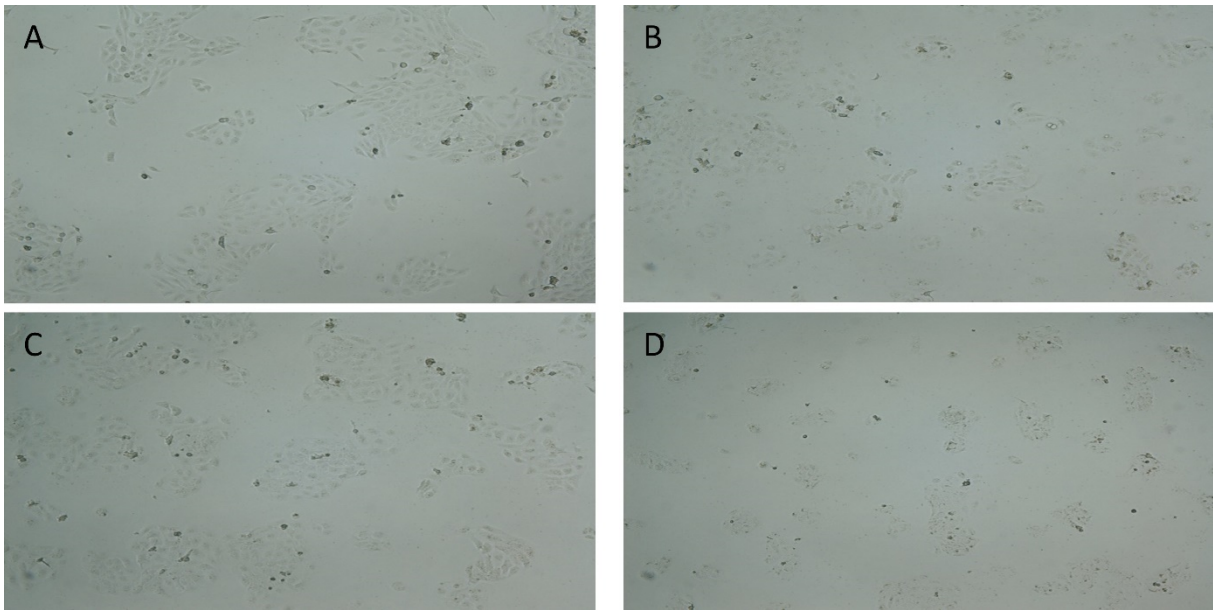
Stanična linija	Kalij (I) acetat (500 µg/ml)	Vijabilnosti (%)	95%-tni interval pouzdanosti (µg/ml)	p
HaCaT	-	58,29	32,09-84,49	***
HaCaT	+	73,10	46,90-99,30	
HepG2	-	85,64	59,44-111,84	***
HepG2	+	97,55	71,35-123,75	
pk15	-	34,94	8,74-61,14	**
pk15	+	42,50	16,30-68,70	
SH-SY5Y	-	35,88	9,68-62,08	***
SH-SY5Y	+	51,71	25,51-77,91	
V79	-	60,10	33,90-86,30	
V79	+	64,75	38,55-90,95	

4.3. Morfološke promjene stanica nakon tretmana s talij (I) acetatom i istovremenog tretmana s kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom

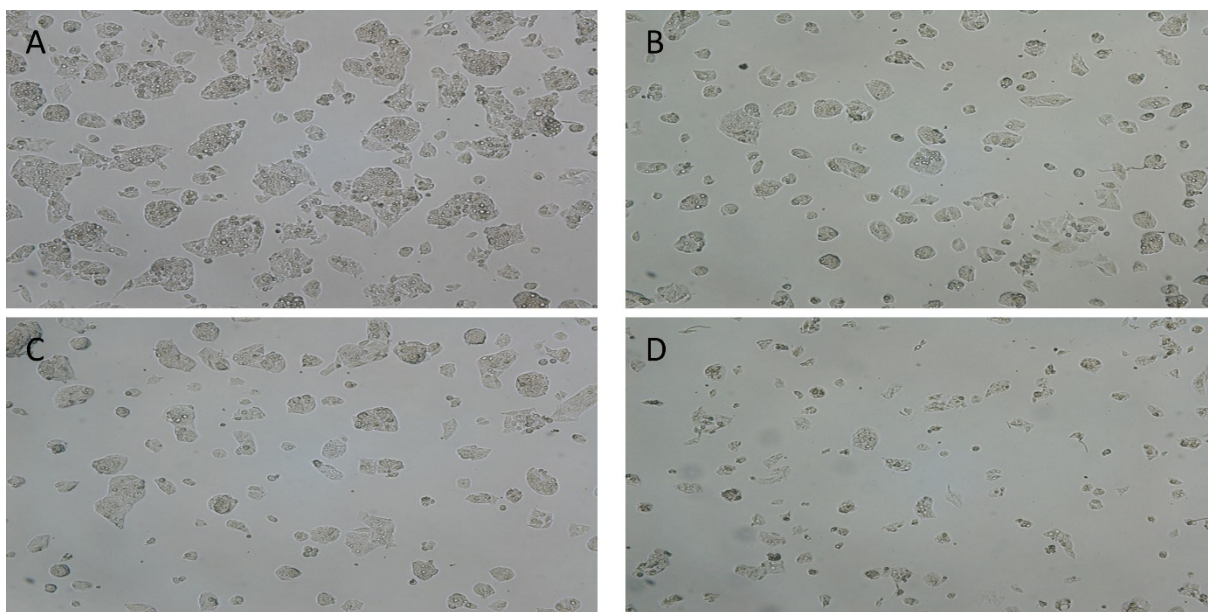
Nakon tretmana staničnih linija HaCaT, HepG2, pk15, SH-SY5Y i V79 samo s talij (I) acetatom (koncentracijski raspon 3,9 – 500 µg/ml) u razdoblju od 24, 48 i 72 sata stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom kako bi se zabilježile morfološke promijene (utjecaj tretmana talij (I) acetatom na izgled stanica). Kako je vidljivo i iz slika 13-17 (A i B) tretman s talij (I) acetatom uzrokovao je morfološke promjene stanica, a vidljivo je i smanjenje broja stanica koje je bio ovisno i o koncentraciji talij (I) acetata i o duljini izloženosti stanica talij (I) acetatu.

Morfološke promjene stanica promatrane su i nakon zajedničkog tretmana stanica s kalij (I) acetatom (koncentracija: 500 µg/ml) i talij (I) acetatom (koncentracije: 15,63 31,25; 62,5 i 125 µg/ml) stanice su promatrane pod svjetlosnim mikroskopom te su slikane. Nakon tretmana samo s talij (I) acetatom primijećen je manji broj stanica. Međutim, kada su stanice tretirane i s kalij (I) acetatom i s talij (I) acetatom u usporedbi sa stanicama tretiranim samo s talij (I) acetatom primijećen je veći broj stanica (slike 13-17 B-C), uz iznimku SH-SY5Y stanica koje su se pokazale najosjetljivijima na talij te dodatkom kalija kod njih nije vidljiv porast brojnosti.

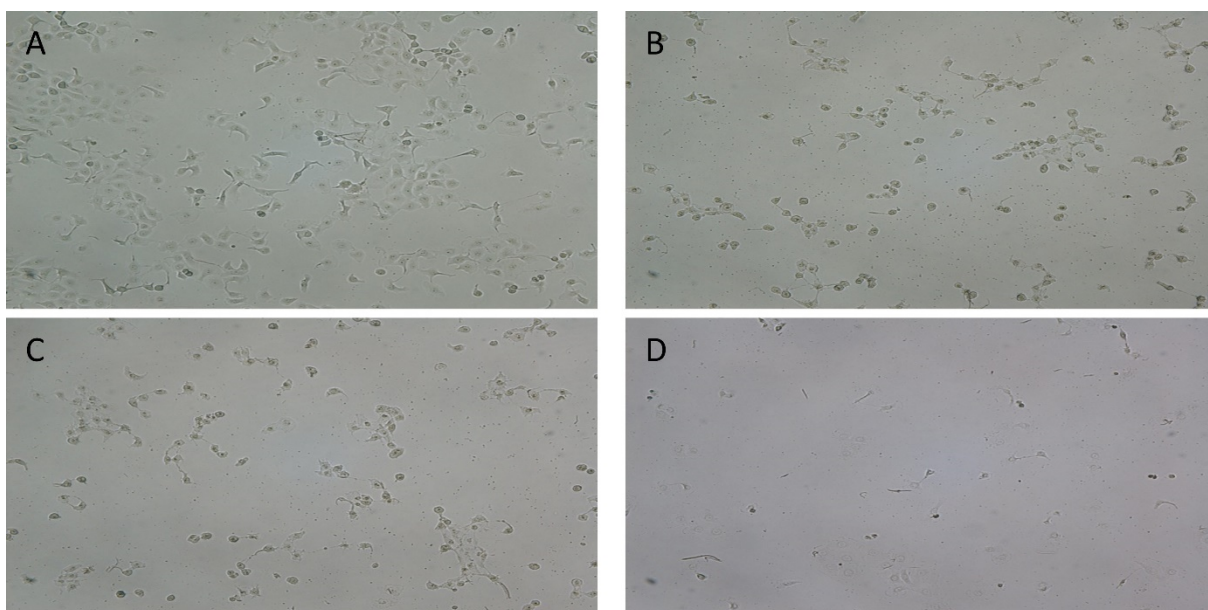
Prilikom prikazivanja morfoloških promjena stanica slikama 13-17 za usporedbu prikazane su i negativna kontrola (slike A, samo otapalo) i pozitivna kontrola (slike D, DMSO, potentni otrov), kod kojih možemo vidjeti izgled kulture bez dodatka talijeva ili kalijeva (I) acetata. Kao pozitivna kontrola korišten je DMSO kako bi se vidjele morfološke karakteristike i broj stanica u kulturi nakon dodatka potentnog otrova. Kako bi se uočio protektivni učinak kalija, prikazane su slike stanica bez dodatka 500 $\mu\text{g/ml}$ kalijeva (I) acetata i sa dodatkom kalijeva (I) acetata pri jednakoj koncentraciji talijeva (I) acetata.



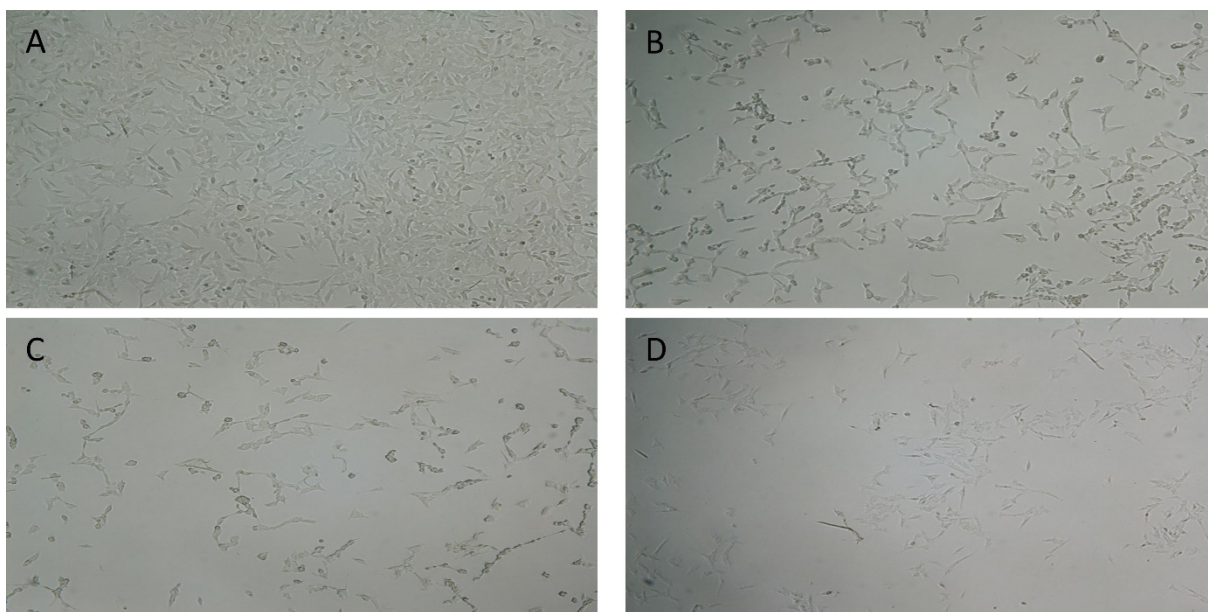
Slika 13. Morfologija stanica stanične linije HaCaT nakon 24-satnog tretmana. A) negativna kontrola (stanice tretirane samo s otapalom); B) stanice tretirane s 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata; C) stanice tretirane s 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata i 500 $\mu\text{g/ml}$ kalij (I) acetata; D) pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.



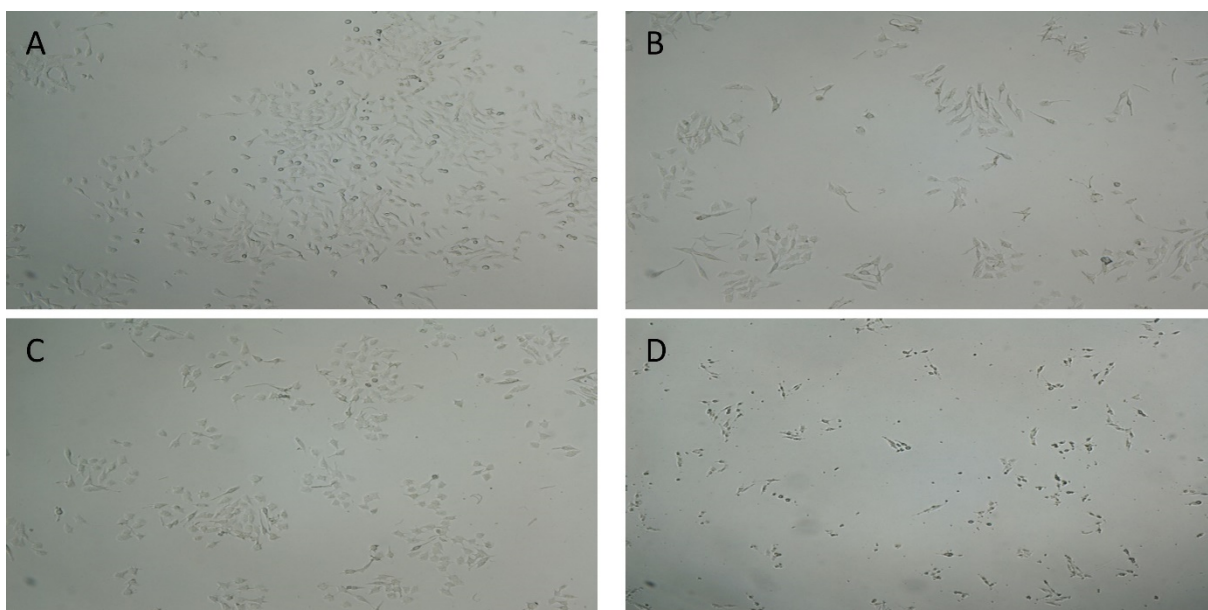
Slika 14. Morfologija stanica stanične linije HepG2 nakon 24-satnog tretmana. A) negativna kontrola (stanice tretirane samo s otapalom); B) stanice tretirane s 125 µg/ml talij (I) acetata; C) stanice tretirane s 125 µg/ml talij (I) acetata i 500 µg/ml kalij (I) acetata; D) pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.



Slika 15. Morfologija stanica stanične linije pk15 nakon 24-satnog tretmana. A) negativna kontrola (stanice tretirane samo s otapalom); B) stanice tretirane s 125 µg/ml talij (I) acetata; C) stanice tretirane 125 µg/ml talij (I) acetata i 500 µg/ml kalij (I) acetata; D) pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.



Slika 16. Morfologija stanica stanične linije SH-SY5Y nakon 24-satnog tretmana. A) negativna kontrola (stanice tretirane samo s otapalom); B) stanice tretirane s 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata; C) stanice tretirane 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata i 500 $\mu\text{g/ml}$ kalij (I) acetata; D) pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.



Slika 17. Morfologija stanica stanične linije V79 nakon 24-satnog tretmana. A) negativna kontrola (stanice tretirane samo s otapalom); B) stanice tretirane s 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata; C) stanice tretirane s 125 $\mu\text{g/ml}$ talij (I) acetata i 500 $\mu\text{g/ml}$ kalij (I) acetata; D) pozitivna kontrola (stanice tretirane s DMSO). Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.

5. DISKUSIJA

Ispitivanje toksičnosti na stanicama (citotoksičnost nekog spoja) spada među fundamentalne aspekte velikog broja biomedicinskih znanosti. U toksikologiji čini važan dio toksikoloških ispitivanja kako bi se utvrdila moguća toksičnost nekog spoja. S obzirom na lakši uzgoj stanica brže se dolazi do rezultata te se stoga može napraviti brzi pregled toksičnosti većeg broja spojeva. U farmakologiji ispitivanje na stanicama služi u pretkliničkim ispitivanjima potencijalno novih djelatnih supstanci^{66,78,79}.

Kod ispitivanja toksičnosti na staničnim linijama često nije moguće dati jednoznačne odgovore na pitanja poput „koji je spoj toksičniji?“ ili „na koje stanice neki spoj snažnije djeluje?“. Razlog je tomu što jedan spoj ima više mehanizama toksičnosti te toksični učinak nekog spoja nije moguće jednoznačno opisati.

Prilikom ispitivanja toksičnosti stanične linije se tretiraju rasponom koncentracije ispitivanog spoja. Iz dobivenih rezultata nakon ispitivanja vijabilnosti stanica u sustavu stanica u kulturi i otopine spoja izrađuje se krivulja stupnjevitog odnosa doze i učinka (*dose-response* krivulja). Krivulja ovisnosti doze i učinka zadana je funkcijom:

$$f(x) = \frac{(d - c)}{(1 + e^{b \cdot (\ln(x) - \ln(e))})}$$

Koja sadržava 4 parametra:

1. c-donja asimptota krivulje
2. d-gornja asimptota krivulje
3. b-nagib krivulje na sredini
4. e-IC₅₀

Prema dobivenoj krivulji toksični učinak ispitivanog spoja na neku staničnu liniju mogao bi se procijeniti pomoću tri parametra. Gornja asimptota krivulje koja predstavlja efikasnost nekog toksičnog (ispitivanog) spoja. Nagib krivulje predstavlja osjetljivost stanica na porast koncentracije toksičnog (ispitivanog) spoja. Nakon male promjene u koncentraciji dodanog ispitivanog spoja, sustav koji ima veći nagib krivulje rezultirao bi većom promjenom u razini učinka dodanog (ispitivanog) spoja od onog koji ima manji nagib krivulje. Treći parametar kojim bi se mogla opisati toksičnost nekog spoja je IC₅₀, koji predstavlja potentnost spoja koji se ispituje u određenom sustavu koji čine uzgojene stanice i taj spoj.

IC₅₀ se definira kao koncentraciju toksičnog spoja koja je potrebna da se postigne učinak koji iznosi 50% maksimalnog učinka. Iako ova definicija izgleda jednostavna te je pojam IC₅₀/EC₅₀ široko rasprostranjen u biomedicinskim znanostima (farmakologija, toksikologija,

mikrobiologija), tijekom postavljanja eksperimenta brzo se nailazi na nejasnoće koje tu definiciju prate. Kada se određuje 50% maksimalnog učinka, nužno je prije definirati što se misli pod tim „maksimalnim učinkom“. Stoga su uvedeni pojmovi apsolutne i relativne IC_{50} . Apsolutna IC_{50} predstavlja koncentraciju spoja koji se ispituje koja postiže 50% učinka pozitivne kontrole. Za izračunavanje apsolutne IC_{50} , potrebno je ispitivanim spojem postići učinak koji iznosi najmanje 50% učinka dobivenog u pozitivnoj kontroli. Korištenje apsolutne IC_{50} , definirane kao koncentracije lijeka potrebne da se postigne 50% maksimalnog efekta pozitivne kontrole, može se koristiti upravo u slučajevima kada tvar koju se ispituje inhibira rast stanica⁷¹. S druge strane, u farmakološkim ispitivanjima potentnost lijeka najčešće se izražava preko relativne EC_{50} , budući da prema farmakološkim definicijama potentnost nekog lijeka predstavlja koncentraciju pri kojoj on postiže 50% svog maksimalnog učinka^{80,81}.

Zamislimo li da ispitujemo dva spoja, lako je moguć ishod pokusa u kojemu prvi spoj koji se ispituje postiže 50% svoje maksimalne inhibicije pri nižim koncentracijama od drugog spoja, odnosno ima niži IC_{50} . S druge strane maksimalna inhibicija (gornja asimptota na krivulji) koju ima prvi spoj može biti niža od maksimalne inhibicije drugog spoja koji se ispituje, odnosno drugi spoj je efikasniji. Dakle, jedan je spoj potentniji (ima niži IC_{50}), a drugi efikasniji. U ovakvim slučajevima radi se o sustavima kod kojih nije moguće jednim parametrom usporediti toksičnost određenih spojeva na neku staničnu liniju (ili obrnuto, nekog spoja na više staničnih linija) te je potrebno koristiti najmanje dva parametra za uspoređivanje toksičnosti: gornji plato krivulje (maksimalna asimptota, efikasnost) te IC_{50} (potentnost). Uz ta dva, moguće je još dodati i nagib krivulje kojim bismo opisali osjetljivost sustava stanica u kulturi i neke toksične tvari.

Još jedan razlog zbog kojega je potrebno prilikom ispitivanja citotoksičnosti koristiti više parametara jesu i nedostaci izražavanja citotoksičnosti samo pomoću IC_{50} . Prije svega, veliki problem kod izražavanja citotoksičnosti samo s IC_{50} je nereproducibilnost dobivenih vrijednosti. Dobivene vrijednosti IC_{50} u nekom pokusu na staničnim linijama ovisi o nizu eksperimentalnih faktora kao što su broj prethodnih presađivanja stanica, volumen reakcijskih medija, instrument i proizvođač kemikalija, duljina inkubacije stanica te brojni drugi razlozi. To sve je razlog izrazito niske reproducibilnosti čak i unutar istog laboratorija, a različite vrijednosti IC_{50} nije moguće usporediti. Zbog toga neki autori predlažu i to da se toksičnost neke tvari izvještava relativno (npr. dobivena IC_{50} za staničnu liniju A iznosi 0,2 mmol/l a za staničnu liniju B 0,4 mmol/l zamijeniti sa stanična linija A je dvostruko podložnija toksičnom učinku neke tvari od stanične linije B), budući da vrijednosti IC_{50} ionako nije moguće reproducirati⁸². Osim toga, spoj kojeg ispitujemo može reagirati s reagensima koje koristimo u ispitivanju vijabilnosti pa se zbog toga preporuča korištenje više od jednog testa vijabilnosti (MTT, laktat-dehidrogenazni test (LDH), RT-CES) (eng. *real-time cell electronic sensing test*)⁸².

U ovom istraživanju kao mjera citotoksičnosti talij (I) acetata korištena je samo apsolutna IC_{50} . Razlog za to u prvom redu bio je taj što je kod svih staničnih linija tretiranje talij (I) acetatom rezultiralo relativno niskom razinom vijabilnosti (uvijek ispod 50% pozitivne kontrole). To se ponovilo kroz sva tri vremenska raspona trajanja izloženosti talijevom (I) acetatu, pa je stoga apsolutna IC_{50} dobar pokazatelj kojim se mogu međusobno usporediti inhibicije stanične vijabilnosti različitih staničnih linija i njihova osjetljivost na toksičnost talijeva (I) acetata. Budući da je talij (I) acetat bio efikasan u postizanju toksičnog učinka kod svih staničnih linija i u svim trajanjima izloženosti, uvođenje još jednog parametra za usporedbu (maksimalna inhibicija, odnosno efikasnost) ne bi u ovom slučaju značajno doprinijelo usporedbi postignute toksičnosti kod različitih staničnih linija.

5.1. Toksičnost talija

Talij je teški metal široko rasprostranjen u okolišu. Ljudi su izložni taliju ingestijom hrane koja sadrži talij, inhalacijom ili apsorpcijom putem kože. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati toksičnost talija i mehanizme toksičnosti talija. U istraživanju su korištene stanične linije tumora jetre (HepG2), imortalizirani humani keratinociti (HaCaT), epitelne stanice svinjskog bubrega (pk15), stanice humanog neuroblastoma (SH-SY5Y) i fibroblasti kineskog hrčka (V79) te je određena citotoksičnost talija za pojedinu staničnu liniju. Stanice su tretirane s talij (I) acetatom u rasponu koncentracija (3,9 do 500 $\mu\text{g/ml}$) kroz 24, 48 i 72 sati. Nakon završenog tretmana, stanice su slikane kako bi se utvrdile morfološke promjene i potom je proveden MTT test. Iz podataka koji su dobiveni kao rezultati MTT testa korištenjem 4-parametarskog modela konstruirane su krivulje doze i učinka za svaku staničnu liniju unutar različitih vremena izloženosti taliju. Pomoću istog modela izračunate su IC_{50} vrijednosti za svaku staničnu liniju i te su vrijednosti IC_{50} međusobno uspoređivane, iz čega su donešeni zaključci o osjetljivosti pojedinih staničnih linija na toksični učinak talijevog (I) acetata.

U organizmu organ koji je primarno zadužen za metabolizam ksenobiotika i detoksifikaciju je jetra⁸³. Produkti detoksifikacije enzimima metabolizma vrlo često su ROS-ovi. Upravo zbog toga jetra ima najsnažniju antioksidativnu aktivnost te je razina enzima zaduženih za borbu protiv ROS, kao što su superoksid dismutaza, katalaza ili glutation peroksidaza, najviša upravo u jetri^{84–90}. Većina je istraživačkih skupina suglasna u tome da se toksičnost talija temelji upravo na njegovom snažnom potencijalu stvaranja ROS-ova^{22,30,42,91}. To bi sugeriralo da će jetreno tkivo biti otpornije nego bilo koje drugo tkivo. U ovom istraživanju, najmanje se osjetljivom pokazala upravo stanična linija HepG2 jetrenih stanica humanog karcinoma jetre s apsolutnom IC_{50} od 51,52 $\mu\text{g/ml}$ nakon 24 h, 42,82 $\mu\text{g/ml}$ nakon 48 h te 30,55 $\mu\text{g/ml}$ nakon 72 h izloženosti talijevom (I) acetatu. Kako je i očekivano, duljom izloženošću taliju smanjila se i IC_{50} , što sugerira da je toksični učinak talija izraženiji što su dulje stanice izložene njegovu djelovanju. HepG2 stanice predstavljaju stanice jetre i smanjena osjetljivost

tih stanica na talij može se pripisati njihovoj pojačanoj metaboličkoj aktivnosti u odnosu na druge stanične linije, koja uključuje i antioksidativnu aktivnost. IC_{50} dobiven u ovom istraživanju nakon 24 h na stanicama HepG2 (51,52 $\mu\text{g/ml}$) znatno je niži od 639,11 $\mu\text{g/ml}$, što je IC_{50} dobiven na istoj staničnoj liniji od strane drugih istraživača⁹². Razlika u toksičnosti može se pripisati i razlici eksperimentalnih uvjeta između laboratorija, ali i različitim metodama uzgoja i inkubacije stanica. No, ovdje valja uzeti u obzir to da je u spomenutom istraživanju korišten talijev (I) sulfat, koji disocira na 2 talijeva (I) iona, dok talijev (I) acetat korišten u ovom istraživanju disocira na 1 talijev (I) ion te je to vjerojatno glavni razlog dobivene razlike u rezultatima. Znatna razlika u toksičnosti talija prema humanim jetrenim stanicama vidljiva je i za različita oksidacijska stanja talija. U istraživanju u kojem je uspoređena toksičnost Tl^+ i Tl^{3+} iona na jetrene stanice, Tl^{3+} se pokazao znatno učinkovitiji u razaranju membrane hepatocita te je EC_{50} za Tl^{3+} iznosio 50 μM , dok je za Tl^+ EC_{50} iznosio 200 μM ⁴². Interesantno je i da je zabilježeno da glutacion smanjuje toksični učinak Tl^{3+} iona, a povećava toksični učinak Tl^+ iona, što sugerira moguće razlike u mehanizmu kojim ova dva iona ostvaruju toksični učinak⁴². To bi možda upućivalo da će jetrene stanice biti podložnije toksičnom učinku talija jer je u jetri metabolizam glutaciona izraženiji i intenzivniji nego u drugim organima. Međutim, HepG2 koje su korištene u ovome istraživanju pokazale ipak znatnu razinu otpornosti na tretman talijem. U istraživanjima u kojima je uspoređivana aktivnost enzima zaduženih za borbu protiv ROS na HepG2 stanicama, kulturi imortaliziranih normalnih humanih hepatičkih stanica i primarnoj kulturi hepatocita, pokazana je izraženija aktivnost enzima za borbu protiv ROS u HepG2 u odnosu na imortalizirane normalne hepatocite ili primarne hepatocite s kojima su uspoređivane^{93,94}. Razlog za snažnu antioksidativnu aktivnost HepG2 može se objasniti potrebom za obrambenim mehanizmima u snažnim oksidativnim okruženjima kakvi su u tumoru. U slučaju HepG2 stanica, gašenje antioksidativnih sustava zaštite može biti snažan medijator apoptoze potaknute H_2O_2 ⁹⁵. To sve govori u prilog rezultatima ovog istraživanja i objašnjava otpornost HepG2 stanica na tretman talijeva (I) acetata i oksidativni stres uzrokovan tim spojem, naročito kad se usporedi sa drugim stanicama korištenim u ovom istraživanju.

Za ovo je istraživanje važno da metabolička bioaktivacija vjerojatno nije proces uključen u mehanizam toksičnosti talija⁴². Općenito, pojam bioaktivacije podrazumijeva procese u kojima enzimi ili druge biološki aktivne molekule stječu sposobnost izvršavanja svojih bioloških funkcija (pretvorba prolijekova u lijekove ili proenzima u enzime)⁹⁶. To može biti značajni eksperimentalni problem kada je bioaktivacija potrebna za postizanje učinka citotoksičnosti zato jer je utvrđeno da primarni hepatociti proizvode znatno više metaboličkih proteina, između ostalih i enzima za metabolizam lijekova u odnosu na staničnu liniju HepG2 koja je korištena u ovom istraživanju^{97,98}. U prethodnom istraživanju utvrđena je sličnost između IC_{50} dobivene

na humanim hepatocitima i na HepG2 što potvrđuje pretpostavku o neuključenosti bioaktivacije ili biotransformacije u mehanizam njegove toksičnosti⁹².

Bez obzira što se ne akumulira primarno u živčanom tkivu, neurotoksičnost je primjećena kao jedan od najizraženijih simptoma trovanja talijem. Primjećen je niz neuroloških simptoma, od kojih su najizraženiji progresivna periferalna neuropatija, parestezija, kasnije i hiperestezija. Periferna neuropatija zna biti izuzetno bolna, a neuropatija se motornih živaca očituje kao slabost u mišićima distalnih dijelova tijela. Uz to, nakon trovanja talijem zabilježeni su i psihički simptomi: anksioznost, halucinacije, psihoze, paranoja, depresija i brojni drugi^{4,30,38}. Razlog za tako intenzivne neurološke nuspojave moguće je objasniti većom toksičnošću talija na stanice živčanog tkiva. U ovome istraživanju IC_{50} dobiven na stanicama živčanog tkiva SH-SY5Y (19,39 $\mu\text{g/ml}$ nakon 24 h tretmana talijevim (I) acetatom) znatno je niža u odnosu na stanice pk15 ($IC_{50}=46,39$ $\mu\text{g/ml}$ nakon 24 h tretmana talijevim (I) acetatom), koje predstavljaju tkivo bubrega u kojem se talij primarno akumulira. U prethodnom istraživanju u kojem je proučavana toksičnosti talija na stanicama neuroblastoma miša (Neuro-2A stanična linija) utvrđena je relativna EC_{50} od 194 μM (39,65 $\mu\text{g/ml}$). U tom istraživanju inhibicija rasta stanica izmjerena je mjerenjem sadržaja proteina što se pokazalo manje osjetljivim nego mjerenje ostalim metodama. U tom istraživanju primijećen je čak i blagi porast u broju stanica pri malim koncentracijama. To bi se moglo pripisati učinku inhibicije katepsina, enzima zaduženih za degradaciju proteina, što posljedično uzrokuje porast sadržaja proteina unutar stanične kulture⁹⁹. U istom istraživanju, ispitivanjem vijabilnosti stanica mjerenjem razine otpuštene laktat-dehidrogenaze, za koju je apsolutna EC_{50} bila jednaka relativnoj jer je otpuštena LDH bila jednaka 100% kontrole, EC_{50} iznosila je 129 μM (26,37 $\mu\text{g/ml}$). Izmjerena je i relativna $EC_{50}=0,38$ μM (0,08 $\mu\text{g/ml}$) za inhibiciju acetilkolinesteraze, što je od velike važnosti jer smanjena razgradnja neurotransmitera acetilkolina može doprinijeti neurotoksičnosti talija, osobito u perifernom živčanom sustavu⁹⁹.

Unutar organizma, talij se prvenstveno akumulira u bubregu^{4,30,38}. To se može povezati jednim dijelom i s time što se talij eliminira bubregom. No najvećim dijelom se za akumulaciju talija u bubregu smatra odgovornim visok afinitet talija za Na^+/K^+ ATP-azu, u kombinaciji s visokom aktivnošću Na^+/K^+ ATP-aze u bubregu. Pokazano je da Tl^+ ion ima oko 10 puta veći afinitet za Na^+/K^+ ATP-azu u odnosu na K^+ ion, a smatra se da je aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze najizraženija upravo u bubregu^{100,101}. Razlog nakupljanja talija u tkivima sa većom aktivnošću Na^+/K^+ ATP-aze jedan je od glavnih razloga njegove uporabe u tumorskoj scintigrafiji, budući da je pokazano da je u određenim tumorima aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze znatno viša nego u zdravom tkivu¹⁰¹. Stanična linija pk15 koja je korištena u ovom istraživanju stanična je linija bubrega svinje te je u ovom pokusu imala ulogu modela kojim je simulirana toksičnost talija na bubrežno tkivo. Nakon 24 h IC_{50} za pk15 staničnu liniju iznosila je 46,39 $\mu\text{g/ml}$ te iako je bila

nešto niža od onog za HepG2 koje su pokazale najveću otpornost, ta razlika nije bila statistički značajna. Statistički značajno manja bila je nakon 48 h izloženosti taliju i iznosila je 33,98 µg/ml, a trend sniženja IC₅₀ nastavljen je daljnjim produljenjem vremena izloženosti i nakon 72 h IC₅₀ je iznosila 25,02 µg/ml. Otpornost staničnih linija pk15 na djelovanje talija moguće je povezati sa dobrom antioksidativnom aktivnošću koje je svojstvo stanica bubrega, iako to nije toliko izraženo kao kod stanica jetre. Aktivnost katalaze i superoksid dismutaze u bubrezima pokazala se manjom u odnosu na jetru, a aktivnost u mozgu bila je niža i od bubrega i jetre, ali i od svakog drugog tkiva s kojim su provedene usporedbe^{85,86,102,103}. Iako je pokazano u više istraživanja da talij ima visok afinitet za nakupljanje u bubregu, dvojbena je koliko je njegov afinitet za stanice bubrega mogao doći do izražaja u ovakvom *in vitro* pokusu u kojem su koncentracije talijeva (I) acetata kojima su inkubirane stanice bile unaprijed određene. Bez obzira na to, stanice bubrega pokazale su vrlo dobru otpornost na toksični učinak talijeva (I) acetata.

Što se tiče toksičnog učinka na staničnu liniju imortaliziranih humanih keratinocita HaCaT, i te su stanične linije pokazale veliku osjetljivost na toksični učinak talijeva (I) acetata. Nakon 24-satne izloženosti, IC₅₀ iznosila je 30,19 µg/ml, nakon 48 sati 26,90 µg/ml, dok je nakon 72 sata izloženosti taliju HaCaT stanična linija pokazala najnižu IC₅₀ u odnosu na sve druge stanične linije u iznosu od 11,51 µg/ml, no uz bitnu napomenu da ta IC₅₀ nakon 72 h nije bila statistički niža od one izračunate za SH-SY5Y staničnu liniju. Takvu osjetljivost može se objasniti vrlo slabom antioksidativnom aktivnošću HaCaT stanica u odnosu na HepG2 stanice. Ako se usporedi aktivnost superoksid dismutaze u istraživanju provedenom na HepG2 stanicama s onim provedenim na staničnoj liniji HaCaT, vidljivo je da je kod HaCaT stanica aktivnost superoksid dismutaze i katalaze znatno manje izražena. Iako se radilo o različitim istraživanjima u različitim laboratorijima i različitom vremenskom periodu, rezultati su usporedivi jer su korišteni isti protokoli za ispitivanje aktivnosti i jednog i drugog enzima^{104–107}. Na temelju prijašnjih dokaza o toksičnom učinku Tl⁺ iona posredovanog oksidativnim stresom može se zaključiti da slabija aktivnost enzima koji su primarno zaduženi za borbu protiv ROS-ova je uzrok veće osjetljivosti tih stanica i nižeg dobivenog IC₅₀ za tu staničnu liniju.

Najveće su fluktuacije u dobivenim rezultatima izračuna toksičnog učinka talijeva (I) acetata dobivene za staničnu liniju fibroblasta pluća kineskog hrčka V79. IC₅₀ kod te stanične linije nakon 24 sata iznosila 43,36 µg/ml, no 95%-tni interval pouzdanosti rasprostire se između 29,86-62,96 µg/ml, što ukazuje na vrlo nisku razinu pouzdanosti u dobivenim rezultatima. Nakon 48 h izračunati IC₅₀ bio je znatno niži, te je iznosio 22,36 µg/ml i nije bio niti statistički značajno viši od SH-SY5Y stanica, ali ni niži od HaCaT stanica. Nakon 72 h IC₅₀ je iznosio čak nešto više, 25,80 µg/ml, približno jednako kao i u pk15 stanica. Nakon 72 h izračunati IC₅₀ bio je znatno viši i od HaCaT i SH-SY5Y stanica, između kojih nije uočena značajna razlika. Iako

je pokazana statistički značajna razlika u IC_{50} izmjerenoj nakon 48 sati izloženosti talijevom (I) acetatu i nakon 72 sata, ta razlika i nije toliko velika (iznosi tek 3,44 $\mu\text{g/ml}$) što upućuje da je nakon 48h postignut svojevrsni plato toksičnog učinka talijem te da se daljnjim produljenjem izloženosti toksični učinak nije znatnije promijenio. To u isto vrijeme ukazuje i na izrazitu vremensku ovisnost toksičnosti talijeva (I) acetata kod ove stanične linije. Plućno tkivo općenito ni u drugim istraživanjima nije pokazalo značajnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostala tkiva^{108,109}. Zbog širokog intervala pouzdanosti nakon 24-satne izloženosti točan učinak talija na vijabilnost stanica bilo je teško procijeniti.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je talij toksičan za sve stanične linije koje su ispitane. Citotoksičnost talija je bila ovisna o koncentraciji i vremenu izloženosti. Najtoksičniji talij je bio za SH-SY5Y staničnu liniju, nešto manje toksičan za HaCaT, nešto otpornija od HaCaT je bila V79, dok su još otpornije bile pk15 i HepG2 stanične linije, te je HepG2 stanična linija pokazala ujedno i najveću otpornost.

Morfološka ispitivanja pokazala su smanjen broj stanica nakon tretmana s talij (I) acetatom. Iz slika stanica jasno je vidljivo da se pri koncentraciji talija od 125 $\mu\text{g/ml}$ kultura brojčano znatno prorijedila u odnosu na negativnu kontrolu, stanice su sitnije i u manjim klasterima, što nedvojbeno pokazuje proapoptotski učinak talija na stanice i daje dodatnu vizualnu potvrdu njegovog toksičnog učinka.

5.2. Prevencija toksičnosti talija s kalijem

U drugom djelu istraživanja ispitan je utjecaj djelovanja kalija (I) acetata na toksičnost talij (I) acetata, odnosno može li se toksičnost talija (I) acetata umanjiti djelovanjem kalija (I) acetata. Stanične linije tretirane su s talij (I) acetatom i s kalij (I) acetatom istovremeno, a metabolička se aktivnost pratila pomoću MTT testa. Korištene su acetatne soli i kalija i talija da se izbjegne potencijalni utjecaj na vijabilnost koji bi se onda mogao pripisati različitom anionu soli. Ispitivanja su napravljena pri koncentracijskom rasponu od 15,63 $\mu\text{g/ml}$ do 125 $\mu\text{g/ml}$ zato jer je to bio koncentracijski raspon u kojem se nalazio nagib sigmoidalne krivulje, odnosno koji nije obuhvaćao donji i gornji plato i raspon u kojem su stanice pokazivale različitu osjetljivost prema talij (I) acetatu u prethodnom dijelu pokusa. Stanice su talijem i kalijem tretirane samo u 24 satnom rasponu, budući da je toksičan učinak tijekom vremena očekivano rastao i nije bilo potrebe dulje tretirati stanice da bi se uočio protektivni učinak kalija.

U skladu s dizajnom eksperimenta, utjecaj kalija na vijabilnost pojedinih staničnih linija je procjenjena modelom mješovitih efekata pri čemu je vijabilnost modelirana kao zavisna varijabla; kalij, stanična linija i interakcija između kalija i stanične linije kao nezavisne varijable, te talij i stanična linija kao nasumični odječak zbog kontrole zavisnosti između mjerenja dobivenih od uzoraka koji su tretirani istom koncentracijom talija. Model mješovitih efekata

ANOVA-e predstavlja alternativan način usporedbe toksičnosti u slučajevima kada nije pokriven dovoljno širok koncentracijski raspon da bi se kvalitetno konstruirale krivulje doze i usporedili njihovi parametri, što se inače koristi kao „zlatni standard“ ispitivanja toksičnosti.

Za stanice HaCaT, HepG2, pk15 i SY5Y stanične linije uočen je statistički značajan porast vijabilnosti nakon tretmana s 500 µg/ml kalijevog (I) acetata. Za V79 staničnu liniju fibroblasta nije uočeno statistički značajno povećanje vijabilnosti, no vidljiv je trend povećanja vijabilnosti između kultura s dodanim kalij (I) acetatom u odnosu na one bez dodanog kalij (I) acetata. Na mikroskopskim slikama staničnih kultura vidljivo je povećanje broja stanica kod onih koje su tretirane i kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom istovremeno u odnosu na tretman samo s talij (I) acetatom. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u velikom dijelu se slažu i s rezultatima drugih istraživača koji su isto tako uočili smanjenje toksičnosti talija dodatkom kalija, ali na modelima koji su se razlikovali od našeg^{34,110,111}.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja ispitivanja toksičnosti talija na pet staničnih linija te moguće prevencije toksičnosti talija s kalijem može se zaključiti:

1. Talij je citotoksičan za svih pet ispitivanih staničnih linija, a toksičnost talija ovisna je o koncentraciji i vremenu izloženosti stanica taliju.
2. Statistička usporedba izračunatih IC_{50} za svaku pojedinu staničnu liniju u svim ispitivanim vremenima pokazala je da je IC_{50} talija za neuroblastome (SH-SY5Y stanična linija) značajno najniži u sva tri ispitivana vremena. Stoga se može zaključiti da su neuroblastomi, odnosno živčane stanice najosjetljiviji na tretman talijem, a što je u skladu s dosadašnjim opažanjima i zabilježenim neuropatijama u ljudi nakon izloženosti taliju.
3. Izračunati IC_{50} talija za jetrene stanice (HepG2 stanična linija) bio je značajno najviši u usporedbi s ostalim staničnim linijama u sva tri ispitivana vremena te se može zaključiti da su HepG2 stanice najmanje osjetljive na tretman talijem. Budući da jetrene stanice imaju razvijen mehanizam obrane od oksidacijskog stresa ti rezultati potvrđuju da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnosti talija.
4. Tretman stanica svih pet staničnih linija s kalijem i talijem istovremeno doveo je do smanjenja citotoksičnog učinka talija što dovodi do zaključka da kalij može spriječiti ulazak talija u stanicu, odnosno da talij koristi kalijeve membranske transportne proteine za ulazak u stanicu.
5. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju toksičnost talija i ukazuju na važnost praćenja njegove prisutnosti u okolišu kako bi se spriječila izloženost ljudi ovom teškom metalu.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se u prvom redu prof. dr. sc. Ani-Mariji Domijan na vodstvu, nebrojenim savjetima koje mi je dala te znanju koje mi je prenijela prilikom izrade ovoga rada. Posebno zahvaljujem dr. sc. Ani Mariji Marjanović Čermak s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na pomoći u radu sa stanicama. Zahvaljujem i doc. dr. sc. Erimu Bešiću na savjetima prilikom statističke obrade rezultata.

No, na kraju, ponajviše bih se htio zahvaliti asistentu Domagoju Kiferu na njegovoj ogromnoj podršci i neiscrpnom strpljenju i volji koje je morao uložiti da bi jednog farmaceuta podučio statistici.

8. POPIS LITERATURE

1. Ramsden, D. Thallium. in *Molecules of Death* 304–311 (2002).
2. EPA. Priority Pollutant List. in 2–3 (2014).
3. Frattini, P. Thallium Properties and Behaviour. 1–46 (2005).
4. Cvjetko, P., Cvjetko, I. & Pavlica, M. Thallium toxicity in humans. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **61**, 111–119 (2010).
5. DelValls, T. A., Sáenz, V., Arias, A. M. & Blasco, J. Thallium in the marine environment: First ecotoxicological assessments in the Guadalquivir estuary and its potential adverse effect on the Donana European natural reserve after the Aznalcollar mining spill (SW Spain). *Ciencias Mar.* **25**, 161–175 (1999).
6. Kazantzis, G. Thallium in the environment and health effects. *Environ. Geochem. Health* **22**, 275–280 (2000).
7. Karbowska, B. Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods. *Environ. Monit. Assess.* **188**, (2016).
8. Peter, A. L. J. & Viraraghavan, T. Thallium: A review of public health and environmental concerns. *Environ. Int.* **31**, 493–501 (2005).
9. Zitko, V., Carson, W. V. & Carson, W. G. Thallium: Occurrence in the environment and toxicity to fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **13**, 23–30 (1975).
10. Janković, S. The Allchar Tl-As-Sb Deposit, Yugoslavia and its specific metallogenic features. *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. A* **271**, 286 (1988).
11. Kabata-Pendias, A. *Trace elements in soils and plants: Fourth edition. Trace Elements in Soils and Plants, Fourth Edition* (2010).
12. Markert, B. Establishing of 'Reference Plant' for inorganic characterization of different plant species by chemical fingerprinting. *Water, Air, Soil Pollut.* **64**, 533–538 (1992).
13. Asami, T., Mizui, C., Shimada, T. & Kubota, M. Determination of thallium in soils by flame atomic absorption spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **356**, 348–351 (1996).
14. Querol, X., Fernández-Turiel, J. & López-Soler, A. Trace elements in coal and their behaviour during combustion in a large power station. *Fuel* **74**, 331–343 (1995).
15. Schoer, J. Thallium. in *The Handbook of Environmental Chemistry* 143–214 (1984).

16. Wallace, J. M. Kale and Thallium: Insights from Your Nutrition Team – Permaculture Solutions for Healing. *POSH (Permaculture Solutions for Healing)* (2015).
17. Ghaderi, A., Vahdati-Mashhadian, N., Oghabian, Z., Moradi, V., Afshari, R. & Mehrpour, O. Thallium exists in opioid poisoned patients. *DARU, J. Pharm. Sci.* **23**, 4–7 (2015).
18. ATSDR. Public Health Statement for Thallium. *Dep. Heal. Hum. Serv. CDC USA* 1–4 (1992).
19. Xiao, T. & Guha, J. Environmental exposure of thallium and potential health risk in the areas of high natural concentrations of thallium: Southwest Guizhou, China. *Chinese J. Geochemistry* **25**, 22–22 (2006).
20. Sabbioni, E., Goetz, L. & Bignoli, G. Health and environmental implications of trace metals released from coal-fired power plants: an assessment study of the situation in the European Community. *Sci. Total Environ.* **40**, 141–154 (1984).
21. USEPA. National Primary Drinking Water Regulations. *Drinking Water Contaminants* (2020).
22. Eskandari, M. R., Mashayekhi, V., Aslani, M. & Hosseini, M.-J. Toxicity of Thallium on Isolated Rat Liver Mitochondria: The Role of Oxidative Stress and MPT Pore Opening. *Toxicology* **273**, 10 (2013).
23. McKillop, J. H. Thallium 201 scintigraphy. *West. J. Med.* **133**, 26–43 (1980).
24. Kazantzis, G. Thallium. in *Handbook on the Toxicology of Metals* 827–837 (2005).
25. Zitko, V. Toxicity and pollution potential of thallium. *Sci. Total Environ.* **4**, 185–192 (1975).
26. Moeschlin, S. Thallium poisoning. *Clin. Toxicol.* **12**, 1–10 (1974).
27. Aoyama, H., Yoshida, M. & Yamamura, Y. Induction of lipid peroxidation in tissues of thallos malonate-treated hamster. *Toxicology* **53**, 11–18 (1988).
28. Saha, A. Thallium toxicity: A growing concern. *Indian J. Occup. Environ. Med.* **9**, 53–56 (2005).
29. Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A. & Rusyniak, D. E. Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology. *Clin. Lab. Med.* **26**, 67–97 (2006).
30. Galván-Arzate, S. & Santamaría, A. Thallium toxicity. *Toxicol. Lett.* **99**, 1–13 (1998).

31. Rodríguez-Mercado, J. J. & Altamirano-Lozano, M. A. Genetic toxicology of thallium: A review. *Drug Chem. Toxicol.* **36**, 369–383 (2013).
32. Lund, A. The Effect of various Substances on the Excretion and toxicity of Thallium in the Rat. 260–268 (1956).
33. LNG Malbrain, M., Lambrecht, G. L., Zandijk, E., Demedts, P. A., Neels, H. M., Lambert, W., De Leenheer, A. P., Lins, R. L. & Daelemans, R. Treatment of Severe Thallium Intoxication. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **35**, 97–100 (1997).
34. Lund, A. Distribution of thallium in the organism and its elimination. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **12**, 251–259 (1956).
35. Talas, A., Pretschner, D. P. & Wellhöner, H. H. Pharmacokinetic parameters for thallium (I)-ions in man. *Arch. Toxicol.* **53**, 1–7 (1983).
36. Thallium (EHC 182, 1996).
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc182.htm#SectionNumber:6.5>.
37. Minoia, C., Sabbioni, E., Apostoli, P., Pietra, R., Pozzoli, L., Gallorini, M., Nicolaou, G., Alessio, L. & Capodaglio, E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci. Total Environ.* **95**, 89–105 (1990).
38. Léonard, A. & Gerber, G. B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **387**, 47–53 (1997).
39. Engström, E., Stenberg, A., Senioukh, S., Edelbro, R., Baxter, D. C. & Rodushkin, I. Multi-elemental characterization of soft biological tissues by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **521**, 123–135 (2004).
40. Das, A. K., Chakraborty, R., Cervera, M. L. & De La Guardia, M. Determination of thallium in biological samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 665–670 (2006).
41. Małuszyński, M. J. . Thallium in environment. *Ochr. Środowiskai Zasobów Nat.* 31–38 (2009).
42. Jalal Pourahmad, Mohammad Reza Eskandari, B. D. & Faculty. A Comparison of Hepatocyte Cytotoxic Mechanisms for Thallium (I) and Thallium (III). **165**, 16 (2006).
43. Emsley, J. *The Elements*. (Oxford University Press, 1997).
44. Mulkey, J. P. & Oehme, F. W. Thallium Toxicity: The problem; An Analytical approach; An Antidotal Study. **298**,

45. Britten, J. S. & Blank, M. Thallium activation of the (Na⁺-K⁺)-activated ATPase of rabbit kidney. *BBA - Enzymol.* **159**, 160–166 (1968).
46. Melnick, R. L., Monti, L. G. & Motzkin, S. M. Uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation by thallium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 68–73 (1976).
47. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry. W.H. Freeman and Company* (2006).
48. Kanwar, A. J. & Narang, T. Anagen effluvium. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **79**, 604–612 (2013).
49. Liu, H. & Baliga, R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int.* **63**, 1687–1696 (2003).
50. Jedrzejczak-Silicka, M. History of Cell Culture. *New Insights into Cell Cult. Technol.* 1–42 (2017).
51. Sarmiento, B. Concepts and Models for Drug Permeability Studies. in *Concepts and Models for Drug Permeability Studies-Cell and Tissue Based in Vitro Culture Models* 16 (2015).
52. Jelušić, B. Telomere i njihove funkcije Telomeres and Their Functions Sadržaj. (2012).
53. Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R. & Han, J. Cryopreservation and its clinical application. *Integr. Med. Res. Integrativ*, 12–18 (2017).
54. Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hay, R., Merten, O., Price, A., Schechtman, L. & Stokes, W. Guidance on Good Cell Culture Practice. *Cell Technol. Cell Prod.* (2007).
55. Blaauboer, B. J., Hermens, J. & van Eijkeren, J. Estimating acute toxicity based on in vitro cytotoxicity: Role of biokinetic modelling. *Altex -Heidelberg-* **1**, 250–253 (2006).
56. Kaur, G. & Dufour, J. M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**, 1–5 (2012).
57. Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M. & Gaurina Srček, V. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **11**, 169–175 (2016).
58. Srivastava, S., Mishra, S., Dewangan, J., Divakar, A., Pandey, P. K. & Rath, S. K. *Principles for In Vitro Toxicology. In Vitro Toxicology* (Elsevier Inc., 2018).

59. Sausville, E. A. *Chapter 30 – Drug Discovery. Principles of Clinical Pharmacology* (Elsevier Inc., 2012).
60. Spielmann, H., Genschow, E., Liebsch, M. & Halle, W. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* **27**, 957–966 (1999).
61. NIH. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. *NIH Publ. No 01-4500* **2015**, (2015).
62. Spielmann, H. & Liebsch, M. Lessons learned from validation of in vitro toxicity test: From failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicol. Vitro.* **15**, 585–590 (2001).
63. Beck, B., Chen, Y.-F., Dere, W., Devanarayan, V., Eastwood, B. J., Farmen, M. W., Iturria, S. J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Moore, R. A., Sawyer, B. D. & Weidner, J. Assay Operations for SAR Support. *Assay Guid. Man.* 1–14 (2004).
64. Devanarayan, V., Sawyer, B. D., Montrose, C., Johnson, D., Greenen, D. P., Sittampalam, S., Riss, T. & Minor, L. Glossary of Quantitative Biology Terms. *Assay Guid. Man.* 1–10 (2004).
65. Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm. Stat.* **10**, 128–134 (2011).
66. Freshney, I. *Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique.* (2005).
67. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
68. Figure 1: [Structures of MTT and colored formazan product.]. - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/>.
69. Provost & Wallert. MTT Proliferation Assay Protocol. 1–2 (2019).
70. De Lean, A., Munson, P. J. & Rodbard, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* **4**, (1978).
71. EPA. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1150: Androgen Receptor Binding (Rat Prostate Cytosol). (2009).
72. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2020).
73. RStudio: Integrated development environment for R. (2020).

74. Wickham, H. Welcome to the tidyverse.
75. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.
76. Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. & Christensen, R. H. B. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software* (2017).
77. Lenth, R. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. (2020).
78. Niu, N. & Wang, L. Pharmacogenomics. **16**, 273–285 (2015).
79. Ekwall, B. Screening of Toxic Compounds in Mammalian Cell Cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **407**, 64–77 (1983).
80. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. & Christopoulos, A. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **55**, 597–606 (2003).
81. Lilly, E. & NIHGC. Guidance for Assay Development & HTS. (2007).
82. Bácskay, I., Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M. & Ujhelyi, Z. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. in *Cytotoxicity 13* (InTech, 2018).
83. Grant, D. M. Detoxification Pathways in the Liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* **14**, 421–430 (1991).
84. Katalinic, V., Modun, D., Music, I. & Boban, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **140**, 47–52 (2005).
85. Fukuhara, R. & Kageyama, T. Tissue distribution, molecular cloning, and gene expression of cytosolic glutathione peroxidase in Japanese monkey. *Zoolog. Sci.* **20**, 861–868 (2003).
86. Nandi, A. & Chatterjee, I. B. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *J. Biosci.* **13**, 305–315 (1988).
87. Boriskin, P., Deviatkin, A., Nikitin, A., Pavlova, O. & Toropovskiy, A. Relationship of catalase activity distribution in serum and tissues of small experimental animals. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **403**, (2019).
88. Marklund, S. L., Westman, N. G., Lundgren, E. & Roos, G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase,

- catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* **42**, 1955–1961 (1982).
89. Marklund, S. L. Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines All investigated tissues were found to contain extracellular-superoxide dismutase . There was a larger variation between tissues in the concentration of this enzyme than in CuZn su. 1398–1403.
 90. Marklund, S. L. *Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines.* *Biochem. J* vol. 266 (1990).
 91. Osorio-Rico, L., Santamaria, A. & Galván-Arzate, S. Thallium Toxicity: General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms. *Adv. Neurobiol.* **18**, 345–353 (2017).
 92. Ponsoda, X., Jover, R., Núñez, C., Royo, M., Castell, J. V. & Gómez-Lechón, M. J. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentration. *Toxicol. Vitr.* **9**, 959–966 (1995).
 93. Liu, P., Wang, W., Tang, J., Bowater, R. P. & Bao, Y. Antioxidant effects of sulforaphane in human HepG2 cells and immortalised hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **128**, 129–136 (2019).
 94. Yusof, Y., Harliansyah, A., Azian, M. & Zurinah, W. Effects of Zingiber officinale on superoxide dismutase glutathione peroxidase, catalase and glutathione content in HEPG2 cell line. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 133–133 (2004).
 95. Valdameri, G., Trombetta-Lima, M., Worfel, P. R., Pires, A. R. A., Martinez, G. R., Noleto, G. R., Cadena, S. M. S. C., Sogayar, M. C., Winnischofer, S. M. B. & Rocha, M. E. M. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* **193**, 180–189 (2011).
 96. Gupta, P. K. Environmental and Ecotoxicology. in *Illustrated Toxicology* 373–425 (2018).
 97. Westerink, W. M. A. & Schoonen, W. G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. Vitr.* **21**, 1581–1591 (2007).
 98. Hodgson, E. *Metabolic interactions of environmental toxicants in humans.* *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 112 (Elsevier Inc., 2012).

99. Repetto, G., Sanz, P. & Repetto, M. In Vitro Effects of Thallium on Mouse Neuroblastoma Cells. 609–611 (1994).
100. Gick, G. G., Hatala, M. A., Chon, D. & Ismail-Beigi, F. Na,K-ATPase in several tissues of the rat: Tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *J. Membr. Biol.* **131**, 229–236 (1993).
101. Sato, T., Indo, H., Kawabata, Y., Kobayashi, T., Suenaga, S., Iwashita, Y., Nitta, T., Sugihara, K. & Majima, H. J. Thallium-201 chloride (TI-201) accumulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in tumours of the head and neck. *Dentomaxillofacial Radiol.* **34**, 212–217 (2005).
102. Shukla, G. S., Hussain, T., Srivastava, R. S. & Chandra, S. V. Glutathione Peroxidase and Catalase in Liver, Kidney, Testis and Brain Regions of Rats Following Cadmium Exposure and Subsequent Withdrawal. *Ind. Health* **27**, 59–69 (1989).
103. Sani, M., Sebaï, H., Gadacha, W., Boughattas, N. A., Reinberg, A. & Mossadok, B. A. Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **145**, 331–337 (2006).
104. Gao, Y., Zhao, J., Zu, Y., Fu, Y., Liang, L., Luo, M., Wang, W. & Efferth, T. Antioxidant properties, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in HepG2 cells with a fungal endophyte producing apigenin from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Res. Int.* **49**, 147–152 (2012).
105. Hornig-Do, H. T., Von Kleist-Retzow, J. C., Lanz, K., Wickenhauser, C., Kudin, A. P., Kunz, W. S., Wiesner, R. J. & Schauen, M. Human epidermal keratinocytes accumulate superoxide due to low activity of Mn-SOD, leading to mitochondrial functional impairment. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1084–1093 (2007).
106. Im, A.-R., Hum Yeon, S., Seung Lee, J., An Um, K., -Joon Ahn, Y. & Chae, S. Protective effect of fermented *Cyclopia intermedia* against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes. (2016).
107. Lee, Y.-S., Cho, I. J., Kim, J. W., Lee, S.-K., Kwang Ku, S. & Lee, H.-J. Evaluation of in vitro anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean and Chinese *Lonicera caerulea*. *Nutr. Res. Pract.* **12**, 486–493 (2018).
108. Marklund, S. L., Westman, N. G., Lundgren, E. & Roos, G. *Copper-and Zinc-containing Superoxide Dismutase, Manganese-containing Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Normal and Neoplastic Human Cell Lines and Normal Human Tissues*¹. (1982).

109. Marklund, S. L. *Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines*.
110. Borgmann, U., Cheam, V., Norwood, W. P. & Lechner, J. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environ. Pollut.* **99**, 105–114 (1998).
111. Gehring, P. J. & Hammond, P. B. The Interrelationship Between Thallium and Potassium in Animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **155**, (1967).

9. SAŽETAK

Stipe Mustać

Toksičnost talija i protektivni učinak kalija na toksičnost talija

Talij je jedan od najtoksičnijih elemenata poznatih čovjeku. Iako je talij ljudima odavna poznat i postoji velik broj zabilježenih slučajeva trovanja, mehanizam kojim on uzrokuje toksični učinak nije u potpunosti razjašnjen. Stoga je cilj ovoga istraživanja bio ispitati toksičnost talija na pet staničnih linija kako bi se dobiveni rezultati mogli povezati sa specifičnom toksičnošću talija za pojedini organ. Pored toga ispitan je mogući protektivni učinak kalija na toksičnost talija. Stanične linije HepG2 (stanice hepatocelularnog karcinoma), HaCaT (keratinociti), pk15 (epitelne stanice bubrega), SH-SY5Y (stanice neuroblastoma) i V79 (plućni fibroblasti) tretirane su s talij (I) acetatom u koncentracijskom rasponu 3,9 – 500 µg/ml kroz 24, 48 i 72 sata te su morfološke promjene praćene svjetlosnim mikroskopom, a citotoksičnost MTT testom. U drugom dijelu istraživanja stanične linije HepG2, HaCaT, pk15, SH-SY5Y i V79 tretirane su istovremeno s kalij (I) acetatom (200 µg/ml) i talij (I) acetatom (u koncentracijskom rasponu 15,6 – 125 µg/ml) kroz 24 sata te su također praćene morfološke promjene i citotoksičnost. Rezultati citotoksičnosti obrađeni su korištenjem 4-parametarskog logističkog modela kojim su konstruirane krivulje doze i učinka i izračunate IC₅₀ svih pet staničnih linija. Izračunate IC₅₀ svih pet staničnih linija u svim ispitivanim vremenima statistički su uspoređene (višestruki t-testovi, korekcija na višestruka testiranja metodom po Benjamini-Hochbergu). Rezultati protektivnog učinka kalij (I) acetata na toksičnost talij (I) acetata obrađeni su modelom mješovitih efekata (ANOVA-e). Toksičnost talija zabilježena je u svih pet ispitivanih staničnih linija te je bila ovisna o koncentraciji i vremenu izloženosti stanica taliju. Nakon tretmana stanica s talij (I) acetatom u sva tri ispitivana vremena (24, 48 i 72 sata) IC₅₀ stanične linije SH-SY5Y bio je najniži (24-satni tretman: IC₅₀ 19,39 µg/ml, 95%-CI 17,78-21,15 µg/ml), dok je IC₅₀ za staničnu liniju HepG2 bio najviši (24-satni tretman: IC₅₀ 51,5 µg/ml, 95%-CI 46,61-56,95 µg/ml). Istovremeni tretman stanica s kalij (I) acetatom i talij (I) acetatom u većini staničnih linija rezultirao je manjom toksičnošću talija (I) acetata u odnosu na tretman stanica samo s talij (I) acetatom u istoj koncentraciji i u istom vremenu. Dobiveni rezultati u skladnosti su s morfološkim pregledom stanica. Rezultati pokazuju da je talij najtoksičniji za stanice živčanog podrijetla što je očekivano budući da talij *in vivo* najizraženije djeluje na živčano tkivo te su neuropatije jedno od glavnih obilježja intoksikacije s talijem. Najmanja toksičnost talija prema stanicama jetrenog podrijetla može se pripisati njihovom razvijenom obrambenom sustavu od oksidacijskog stresa s obzirom da je oksidacijski stres zabilježen mehanizam toksičnosti talija. Kalij je spriječio toksičnost talija što potvrđuje da talij koristi iste membranske transportere za ulazak u stanicu kao i kalij, odnosno potvrđuje njihovu kompeticiju za membranske

transportere. Ovo istraživanje potvrdilo je toksičnost talija i važnost istraživanja njegove toksičnosti i mehanizama toksičnosti kao i mogućnost korištenja kalija u ublažavanju toksičnog učinka talija. Također, rezultati istraživanja ukazuju na važnost praćenja koncentracije talija u okolišu kako bi se spriječila izloženost ljudi ovom teškom metalu.

Ključne riječi: talij, stanične linije, citotoksičnost, membranski transporteri, krivulja doze i učinka

10. SUMMARY

Stipe Mustać

Thallium toxicity and protective effect of potassium on thallium toxicity

Thallium is one of the most toxic elements known. Even though thallium has been known for a long time and despite there is a large number of reported cases of human poisoning, mechanisms which underlies its toxicity are still not completely understood. Therefore, the aim of this study was to examine thallium toxicity on five cell lines and relate the obtained results with its specific toxicity to a particular organ. In addition, possible protective effect of potassium on toxicity of thallium was also examined. HepG2 (human hepatocellular carcinoma), HaCaT (keratinocytes), pk15 (pig kidney epithelium), SH-SY5Y (neuroblastoma cells) and V79 (lung fibroblasts) cell lines were treated with thallium in concentration range 3.9 – 500 µg/ml for 24, 48 and 72 hours. Morphological changes were monitored using light microscope, and cytotoxicity was assessed using MTT test. In the second part of this study HepG2, HaCaT, pk15, SH-SY5Y cell lines were treated simultaneously with thallium (I) acetate (500 µg/ml) and potassium (I) acetate (in concentration range 15.6 – 125 µg/ml) for 24 hours. Morphological changes as well as cytotoxicity were followed. Cytotoxicity assay results were analysed using 4-parameter logistic model, dose-response curves were constructed and IC_{50} were calculated for each cell line. Thallium toxicity was observed for each cell line used in this experiment and toxicity was both, time- and dose-dependent. Calculated IC_{50} for each cell line in this experiment were statistically compared (multiple t-tests, Benjamini-Hochberg correction for multiple testing). After treatment with thallium (I) acetate in all three treatment times (24, 48 and 72 hours) IC_{50} obtained for SH-SY5Y cell line (24-hour treatment: IC_{50} 19.39 µg/ml, 95%-CI 17.78-21.15 µg/ml) was lower than for any other cell line. On the other side, IC_{50} obtained for HepG2 cell line (24-hour treatment: IC_{50} 51.5 µg/ml, 95%-CI 46.61-56.95 µg/ml) was higher than for any other cell line. Results on protective effect of potassium (I) acetate on toxicity of thallium (I) acetate were analysed using mixed effect ANOVA model. Simultaneous treatment with thallium (I) acetate and potassium (I) acetate in majority of the examined cell lines resulted with lower extent of thallium (I) acetate toxicity compared to cells treated with thallium (I) acetate alone. Taken together results of this study demonstrated thallium was the most toxic to cell line of neuronal origin. This was expected, since thallium causes severe neuropathies; neuropathies are one of the main symptoms of thallium poisoning. Thallium toxicity was shown to be the least on cells originated from liver, which can be attributed to their better antioxidant activity due to well developed defense systems against oxidative stress. Research has shown that potassium can prevent thallium toxicity, which also confirms that thallium and potassium share and compete for common transport systems through which they enter cells. The results

have confirmed the severity of thallium toxicity, as well as importance of further investigation on thallium toxicity and mechanisms of its toxicity. Obtained results confirmed that potassium reduces thallium toxicity, which implies that potassium can be used in treatment of thallotoxicosis. Altogether the level of thallium in the environment should be monitored in order to protect human health.

Key words: thallium, cell lines, cytotoxicity, membrane transporters, dose-response curve