Ispitivanje protutumorskih učinaka grožđanih polifenola in vitro

Gajdašić, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:032280

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Ivona Gajdašić

ISPITIVANJE PROTUTUMORSKIH UČINAKA GROŽĐANIH POLIFENOLA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Ivona Gajdašić

ISPITIVANJE PROTUTUMORSKIH UČINAKA GROŽĐANIH POLIFENOLA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu stanica Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskoga fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima: trideset jedan list (31) i pet slika (5).

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc.dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na velikoj pomoći, utrošenom vremenu i savjetima. Zahvaljujem i svim zaposlenima na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju.

Zahvaljujem svojim roditeljima, bližnjima i prijateljma na podršci i poticanju koje mi pružaju tijekom cijeloga moga obrazovanja.

POPIS KRATICA

CaCo-2	stanična linija kolorektalnog karcinoma
CRC	kolorektalni karcinom
DMEM	Dulbecco modificirani Eagle-ov medij
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
FBS	fetalni goveđi serum
HCT-8	stanična linija ilocekalnog kolorektalnog adenokarcinoma
HDL	lipoprotein visoke gustoće
Hepa-1c1c7	stanična linija hepatocelularnog karcinoma
HT29	stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma
LDL	lipoprotein niske gustoće
LoVo	stanična linija limfnog čvora kao metastaza karcinoma kolona
MTT	test citotoksičnosti *in vitro*
PBS	fosfatom puferirana otopina soli
PC	*Phanerochaete chrysosporium*
PP	čisti polifenoli
SW620	stanična linija limfnog čvora kao metastaza raka debelog crijeva
TG	*Trametes gibossa*
UV	ultraljubičasto zračenje

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Polifenoli 1
      1.1.1. Klasifikacija polifenola 1
      1.1.2. Prehrambeni izvori polifenola 4
      1.1.3. Biološki značaj polifenola 4
   1.2. Kultura stanica i uzgoj 5
      1.2.1. Kultura stanica 5
      1.2.2. Rast stanica in vitro 5
   1.3. Tumori 6
      1.3.1. Etiologija zloćudnog tumora 6
      1.3.2. Rak debelog crijeva 8
2. CILJ 9
3. MATERIJALI I METODE 10
   3.1. Materijali 10
      3.1.1. Ispitivani ekstrakti 10
      3.1.2. Kemikalije 10
      3.1.3. Stanične linije 11
   3.2. Metode 11
      3.2.1. Kultivacija stanica in vitro 11
      3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi 12
      3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT-testom 13
4. REZULTATI 15
5. RASPRAVA 17
6. ZAKLJUČAK 19
7. SAŽETAK 20
8. SUMMARY 22
9. LITERATURA 23
10. ŽIVOTOPIS 26

1. UVOD

1.1. Polifenoli

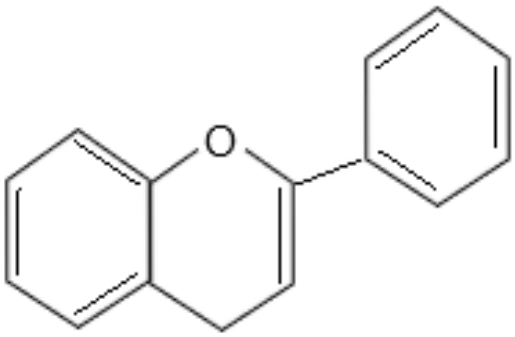
Polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih i sveprisutnijih skupina metabolita biljaka i sastavni su dio ljudske i životinjske prehrane. U rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva s molekulskim težinama većim od 30.000 Da, pojava ove kompleksne skupine tvari u biljnoj hrani iznimno je raznolika (1).

Oni su biološki aktivni nenutritivni sastojci, fitokemikalije nastale kao derivati fenilalanina s aromatskim prstenom i reaktivnom hidroksilnom skupinom. Biljke ih sintetiziraju s ciljem samozaštite od abiotskih i biotskih stresnih faktora, a fiziološki gledano, to su produkti sekundarnoga metabolizma koje biljka ne treba za primarne potrebe rasta i razmnožavanja (2).

1.1.1. Klasifikacija polifenola

Polifenoli su klasificirani na temelju nekoliko kriterija u skladu s njihovim izvorom, biološkim djelovanjem i kemijskom strukturom. Danas je poznato više od 8000 fenolnih struktura prema kojima se mogu razvrstati u različite klase (1). Prema najnovijoj klasifikaciji, temeljenoj na broju fenolnih prstenova, polifenoli se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: flavonoidi i neflavonoidi.

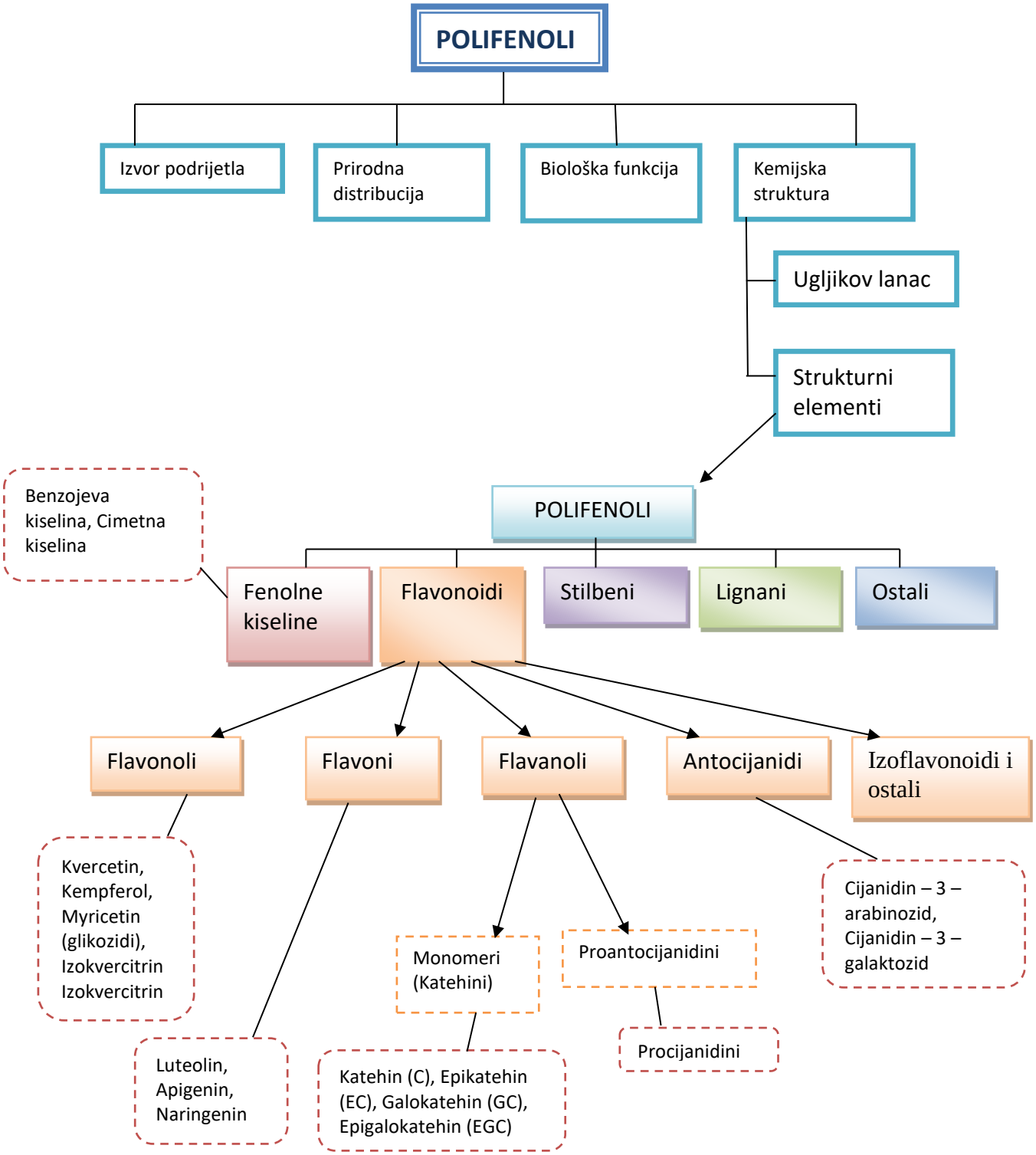
Najzastupljeniji su flavonoidi (Slika br. 1) koji su podijeljeni u podskupine: flavoni, flavononi, flavonoli, izoflavonoidi, flavani, izoflavani, flavanoli i antocijani. Osim što su najbrojniji, flavonoidi imaju i najznačajniji biološki utjecaj. Oni se sastoje od 15 ugljikovih atoma (C6-C3-C6) karakteriziranih s dva benzenska prstena povezana s tri lanca ugljika stvarajući oksigenirani heterociklički spoj (3). Unutar različitih klasa flavonoida, postoje mnoge strukturne varijacije prema stupnju hidrogenacije i hidroksilacije tri sustavna prstena tih spojeva. Flavonoidi se također pojavljuju kao sulfatirani i metilirani derivati, konjugirani s monosaharidima i disaharidima, stvaraju komplekse s oligosaharidima, lipidima, aminima, karboksilnim kiselinama i organskim kiselinama (4).



Slika br. 1. Osnova stuktura flavonoida

Neflavonoidi sadrže sljedeće glavne klase: fenolne kiseline (benzojeve kiseline i cimetne kiseline), stilbene, lignane, tanine i druge polifenole (uključujući kurkumin, gingerol itd.). Najzastupljenija klasa, fenolne kiseline, spojevi su karakterizirani s benzenskim prstenom, karboksilnim skupinama i jednom ili više hidroksilnih i/ili metoksilnih skupina u molekuli (5). Ti se spojevi mogu podijeliti u dvije skupine: benzojeve kiseline i cimetne kiseline i njihovi derivati.

Osim kemijske klasifikacije temeljene na broju fenolnih prstenova, polifenoli se mogu podijeliti i prema veličini njihovog ugljikovog lanca (Slika br. 2).



Slika br. 2. Shema klasifikacije biljnih polifenola; podjela polifenola temeljena na broju fenolnih prstenova i ostalih strukturnih elemenata.

1.1.2. Prehrambeni izvori polifenola

Hrana koja sadrži veliki udio polifenola je voće i povrće. Nekoliko stotina različitih polifenola identificirano je u hrani i važno je imati na umu da sadržaj polifenola u biljkama i hrani ovisi o mnogim ekološkim i kulinarskim čimbenicima, uključujući izlaganje suncu, količinu oborina, različite vrste kulture, prinos voća biljke, stupanj zrelosti, skladištenja i metode kulinarske pripreme (6). Istraživanja bobičastoga voća pokazala su kako bobičasto voće sadrži visok udio flavonoida i fenolnih kiselina u odnosu na druge vrste voća. Dokazano je da bobičasto voće tamnije boje sadrži višu koncentraciju polifenolnih spojeva od svjetlije obojenog te da visoki sadržaj polifenolnih spojeva korelira s dobrom antioksidacijskom aktivnošću navedenoga voća (2).

Grožđe je jedno od najekonomičnijih biljaka koje se koristi u proizvodnji vina, sokova i ostalih prehrambenih proizvoda te se navodi kao bogat izvor vrijednih fitonutrijenata s višestrukim pozitivnim učincima na zdravlje. Osim u različitim vrstama vina, polifenoli se nalaze i u nekim drugim pićima; kavi, kakau, običnom pivu, zelenom čaju i drugima.

1.1.3. Biološki značaj polifenola

Zanimanje za polifenole je vrlo veliko zbog njihove raznolike biološke aktivnosti; djeluju antioksidativno, protutumorski, protuupalno, anti-alergijski, djeluju kao antibiotici, atilipidemici, opuštaju krvne žile i sprječavaju stvaranje krvnih ugrušaka. Brojne studije pokazale su moguće zaštitne i preventivne čimbenike polifenola u raznim bolestima. Na primjer, za određene polifenolne spojeve u zelenom čaju pokazalo se kako smanjuju čimbenike rizika za razvoj koronarnih bolesti. Uz svakodnevnu konzumaciju 4 šalice zelenoga čaja, smanjuje se ukupni kolesterol, LDL kolesterol i triacilgliceridi, a povećava količina zaštitnoga HDL kolesterola. Istraživanja na flavonoidima pokazala su njihov potencijalni protutumorski učinak na rak debeloga crijeva (4).

Zbog svega navedenoga, intenzivno se istražuje antimutageno, antitumorsko i antioksidativno djelovanje fitokemikalija na staničnom nivou te njihovo djelovanje na različite sustave organa kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, živčani i imunološki. Međutim, mnogi mehanizmi djelovanja bioaktivnih tvari iz hrane te, posljedično, njihov utjecaj na zdravlje ljudi, još uvijek nisu dovoljno istraženi. Obzirom da biljno carstvo obiluje mnoštvom bioloških aktivnih tvari, alternativni *in vitro* testovi, primjenom kulture stanica, višestruko su korisni u ispitivanjima potencijalno aktivnih spojeva iz biljaka.

1.2. Kultura stanica i uzgoj

1.2.1. Kultura stanica

Kultura stanica podrazumijeva uzgoj stanica izvan njihova prirodnog okruženja, pod kontroliranim uvjetima *in vitro*. Prvi je korak uspostavljanje primarne kulture stanica, odnosno izolacija stanica iz željenoga organa/organizma i njihovo nacjepljivanje u hranjivom mediju te održavanje u optimalnim *in vitro* uvjetima. Primarne kulture dobivaju se kombinacijom ili samostalnom primjenom enzimatskih, mehaničkih ili kemijskih postupaka razdvajanja. Pasažiranjem ili subkultiviranjem primarne kulture dobiva se sekundarna kultura koja može biti konačna (ograničeni broj dioba) ili kontinuirana (7). Mediji (hranjiva podloga) za uzgajanje stanica sastoje se od soli i glukoze, različitih aminokiselina te vitamina koje stanice ne mogu same sintetizirati. Medij također mora sadržavati i serum koji predstavlja izvor polipeptidnih čimbenika rasta, nužnih za održavanje i diobu stanice (8). Stanične se kulture uobičajeno uzgajaju pri 37 °C, uz 5 % ugljikova (IV) oksida i 95 % atmosferskog zraka u atmosferi visoke vlažnosti (>80%).

Laboratorij za rad sa staničnim kulturama zahtijeva visoki stupanj čistoće, koja se osigurava aseptičnim tehnikama rada (UV lampa, 70% etilni alkohol) kako bi se spriječila kontaminacija staničnih kultura. Zaštita se postiže i nošenjem odgovarajuće laboratorijske odjeće (zaštitne naočale, jednokratne zaštitne rukavice, zaštitna maska, obuća koja se nosi samo u laboratoriju ili nazuvci, uniforma ili laboratorijska kuta). Rad sa staničnim kulturama većinom se obavlja u vertikalnom/horizontalnom kabinetu („hoodu“) sa sterilnom opremom (9).

1.2.2. Rast stanica *in vitro*

Uzgojem tumorskoga tkiva na hranjivoj podlozi mijenjaju se okolišni uvjeti. Takva stanična linija egzistira nekoliko mjeseci, godina ili desetljeća. Vrijeme i promjena okolišnih uvjeta preduvjeti su za prirodnu selekciju kojoj su stanične linije podložne. Kao i tumori *in vivo*, stanične linije *in vitro* prilagođavaju svoj fenotip pomoću genetičkih i epigenetičkih mehanizama u odnosu na uvjete kojima su izložene (10). Deoksiribonukleinska kiselina (DNK), od posljedica prilagodbe staničnih linija malignih tumora u kulturi, ima veću razliku u ekspresiji gena između staničnih linija i tumora kojeg predstavljaju, nego između tumora i normalnog tkiva (11).

Ljudske somatske stanice imaju ograničeni broj dioba kada rastu u *in vitro* uvjetima. To se pripisuje skraćivanju telomera prilikom svake diobe stanice. Telomere su kratki, ponavljajući sljedovi nukleotida. Sastoje se od TTAGGG sljedova baza koji se mogu ponoviti i do tisuću puta. Nalaze se na krajevima deoksiribonukleinske kiseline (DNK), molekule koju štite od oštećenja te održavaju njezinu stabilnost pri diobi stanica. Nakon svake diobe stanica, telomere se skraćuju tako da, nakon određenog broja dioba, DNK svake normalne stanice prestaje biti zaštićen. Stoga svaka normalna stanica, nakon određenog broja dioba, stari i umire. Kada jedna od telomera dosegne kritičnu minimalnu duljinu, mehanizmi kontrole staničnoga ciklusa prepoznaju je kao oštećenje DNK i zaustave daljnje diobe u G1 fazi staničnoga ciklusa. Ovaj prirodni proces umiranja i starenja imaju sve stanice, osim tumorskih i embrionalnih matičnih stanica (12). Naime, u 90 % uzoraka tumora detektirana je ekspresija ili prekomjerna ekspresija telomeraze. Telomeraza je enzim ključan za održavanje, odnosno replikaciju krajnjih sljedova linearnih eukariotskih kromosoma.

Osnovna razlika između stanica raka i normalnih stanica u kulturi jest u tome što u normalnim stanicama dolazi do inhibicije proliferacije stanica ovisno o gustoći. Normalne stanice proliferiraju dok ne dostignu odgovarajuću konfluentnost, koja dijelom ovisi i o raspoloživosti faktora rasta dodanih u medij (obično u obliku seruma). Kada stanice iskoriste sav slobodan prostor za rast i potroše hranjivi medij, prestaje proliferacija i stanice ulaze u fazu mirovanja (G_0). Suprotno tomu, tumorske stanice nastavljaju rasti u kulturi postižući visoku gustoću. Izrazita razlika između normalnih i stanica raka, u interakciji među stanicama, vidljiva je u fenomenu dodirne inhibicije. Normalni fibroblasti migriraju po površini posudice za kulturu dok ne dođu u dodir sa susjednom stanicom. Daljnja migracija tu staje i stanice adheriraju jedna za drugu stvarajući uredan monosloj na dnu posudice za kulturu. Za razliku od normalnih, tumorske stanice migriraju i, nakon što su došle u dodir sa susjednim stanicama, migriraju jedne preko drugih i rastu neuredno u više slojeva (8).

1.3. Tumori

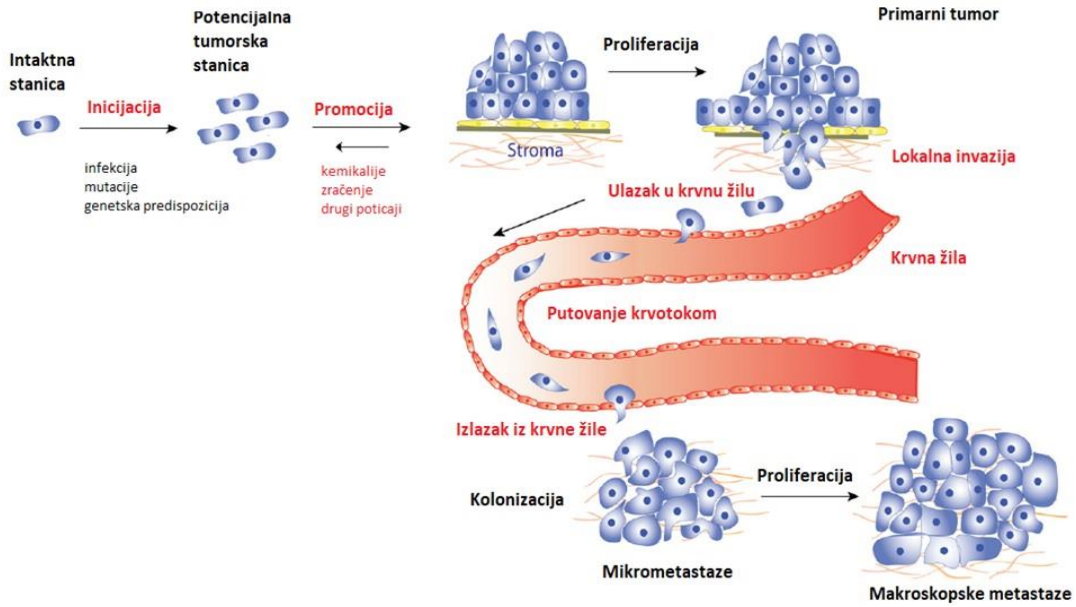
1.3.1. Etiologija zloćudnoga tumora

Tumor, neoplazma ili novotvorina označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Njihov rast je nesvrhovit, autonoman i nadmašuje rast

normalnoga tkiva (13). U pravilu, zloćudne stanice nekontrolirano rastu jer ne odgovaraju na regulacijske mehanizme za proliferaciju koji nastaju kao posljedica promjene u genima, raznim mutacijama, a koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje. One su slabije diferencirane od normalnih stranica, nezrele i primitivne i imaju svojstva slična fetalnim stanicama koje još nisu prošle proces diferenciranja i sazrijevanja (8).

Jedno od temeljnih svojstava raka je klonalnost. Klonalno podrijetlo tumora, međutim, ne govori da je ishodišna stanica u početku stekla sve značajke stanice raka. Naprotiv, za nastanak raka potrebno je više koraka u procesu tijekom kojih stanice, progresivnim promjenama, postaju zloćudne. Jedna od naznaka kako se radi o procesu, koji se sastoji od više koraka, jest činjenica da se većina slučajeva raka pojavljuje u kasnijoj životnoj dobi (8).

Karcinogeneza se razvija kroz četiri stadija; inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje (Slika br. 3). Inicijacija je ireverzibilan proces u kojem se od jedne preobražene stanice razvija klon. Nakon toga slijedi promocija, reverzibilan proces, koja najviše ovisi o utjecaju karcinogena na sami organizam (14). U karcinogene čimbenike ubrajaju se različite vrste zračenja, kemijski karcinogeni spojevi i onkogeni virusi. Oni djeluju tako da oštećuju DNK i induciraju mutacije. Druga vrsta karcinogena ne uzrokuje mutacije, već pridonosi nastanku raka stimulirajući proliferaciju stanica. Takve spojeve nazivamo promotori tumora. Hormoni su također važni promotori nastanka raka (8). Progresija je ireverzibilan proces u kojem se stvara primarni, lokalni tumor koji zatim može, ali i ne mora, probiti bazalnu membranu i proširiti se po cijelom organizmu te tvoriti metastaze (14).



Slika br. 3 Karcinogeneza. Prilagođeno iz (15)

1.3.2. Rak debeloga crijeva

Prema podacima „Registra za rak“ Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo, rak debeloga crijeva drugi je najčešći oblik raka kod muškaraca (poslije raka pluća) i kod žena (poslije raka dojke). Od ukupnoga broja dijagnosticiranih slučajeva raka u Hrvatskoj, na ovu zloćudnu bolest otpada 15-16% slučajeva kod muškaraca i 13-14% slučajeva kod žena (16).

Etiološki, kolorektalni karcinom (CRC) može biti nasljedni ili sporadični ili u pozadini ima upalne bolesti crijeva. U nasljedni kolorektalni karcinom, naslijeđene genetske mutacije pojavljuju se u kritičnim genima, kao što su tumori supresorski geni, geni povezani s popravkom DNK ili neki drugi geni. Većina sporadično uzrokovanih kolorektalnih karcinoma nastaje somatskim genetskim mutacijama kao posljedica izloženosti okolišnim čimbenicima, karcinogenim spojevima u prehrani. Kronična upalna bolest crijeva također je etiološki faktor u razvoju CRC-a jer visoki oksidativni stresni tlak, prisutan u upaljenoj sluznici, mijenja važne stanične funkcije (17).

Najraniji stupanj u nastanku raka jest povećana proliferacija epitelnih stanica debeloga crijeva. Od jedne stanice iz ove populacije koja proliferira nastaje mala dobroćudna novotovorina, adenom ili polip. Dodatnim klonskim selekcijama nastaju veći adenomi koji vremenom i mutacijama postaju zloćudni karcinomi karakterizirani širenjem tumorskih stanica kroz bazalnu laminu u susjedno vezivno tkivo (8).

Unatoč multifaktorskoj etiologiji, nastanak karcinoma debeloga crijeva povezuje se, kao i nastanak polipa, s prehranom koja sadrži velike količine kalorija i lipida. Masti uzrokuju pojačano izlučivanje žučnih kiselina koje se u prisutnosti crijevnih bakterija razgrađuju. Razgradni produkti mogu biti kancerogeni (16). Isto tako, aromatski policiklički ugljikovodici prisutni u ribi i mesu na žaru, alkohol i određene bolesti, poput pretilosti i dijabetesa povećavaju rizik incidencije CRC-a (17). S druge strane, prehrana bogata vlaknima - povrće, voće i slično, ne izaziva izlučivanje žučnih kiselina, veća je masa stolice, a pokreti crijeva su brži zbog čega se moguće kancerogene tvari razrjeđuju, njihov dodir sa sluznicom crijeva je kraći i brža je eliminacija sadržaja iz crijeva. Zaštitno djelovanje imaju vitamini A, C, E, te kalcij i selen u hrani (16).

2. CILJ

Cilj je ovoga istraživanja:

ispitati antitumorsku, odnosno antiproliferativnu aktivnost polifenolnih spojeva izoliranih iz grožđanog tropa prije i nakon djelovanja mikroorganizama koji potiču razgradnju grožđanog tropa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani ekstrakti

Spojevi koji su se koristili u istraživanju jesu polifenoli izolirani iz grožđanog tropa vinske sorte *Cabarnet Sauvignon*. Korištena su tri polifenolna ekstrakta: ekstrakt čistih polifenolnih komponenti bez dodatne obrade (PP) i ekstrakti polifenolnih spojeva dobiveni nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochate chrysosporium* (PC) i *Trametes gibosa* (TG). Ova dva mikroorganizma, TG i PC, potiču razgradnju grožđanoga tropa te se u ovom istraživanju promatra utječu li navedeni mikroorganizmi na antiproliferativnu aktivnost polifenolnih komponenti.

Ekstrakti su pripremljeni u stock koncentraciji od 25 mg/ml u smjesi etanola i vode u omjeru 1:1. Radna razrjeđenja su pripremljena u vodi pri čemu su finalne koncentracije bile kako slijedi: 2,5; 1,75; 1,0; 0,25 mg/ml. Udio etanola je opadao od 5% prema 0,005%.

Uzorci su, prije pripreme razrjeđenja, profiltrirani kroz filter veličine pora 0,22 μm.

3.1.2. Kemikalije

- DMEM s povišenim udjelom glukoze (4,5 g/l) (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka)
- fetalni goveđi serum – FBS (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija)
- L-glutamin (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija)
- Antibiotik- antimikotik (100 U/0,1 mg) (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija)
- 0,25 % tripsin /EDTA (PAN-Biotech GmbH; Aidenbach, Njemačka)
- Tripan plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)
- pufer PBS (eng. Phosphate Buffered Saline, smjesaNaCl-a, KCl-a, Na_2HPO_4 x 2 H_2O, KH_2PO_4; pH 7.4)
- dimetil sulfoksid (DMSO) (Acros organics; New Jersey, SAD)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) BioChemica, AppliChem (Darmstadt, Njemačka)

- Tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1Mm EDTA-Na4 u HBSS, sadrži fenol red, Panbiotech GmbH (Aidenbach, Njemačka)

3.1.3. Stanične linije

Stanična linija je definirana populacija stanica dobivena iz početne kulture prilagođena rastu u kulturi. U pokusu su upotrjebljene dvije stanične linije:

- SW620 (ATCC® CCL-227™) stanična je linija epitelne morfologije i predstavlja metastazu debeloga crijeva izoliranu iz limfnog čvora. Ova linija služi za promatranje genetskih promjena u progresiji raka debeloga crijeva i model je za apsorpciju različitih hranjivih tvari (18).
- CaCo-2 (ATCC® HTB-37™), stanična linija izolirana iz kolorektalnog adenokarcinoma i također je epitelne morfologije. Iako je stanična linija tumorigenična, pri određenim uvjetima uzgoja, pri postizanju konfluencije, stanice se spontano diferenciraju u enterocite. Ova je stanična linija stoga značajan *in vitro* model za proučavanje diferencijacije enterocita i model za apsorpciju hranjivih tvari (19).

3.2. Metode

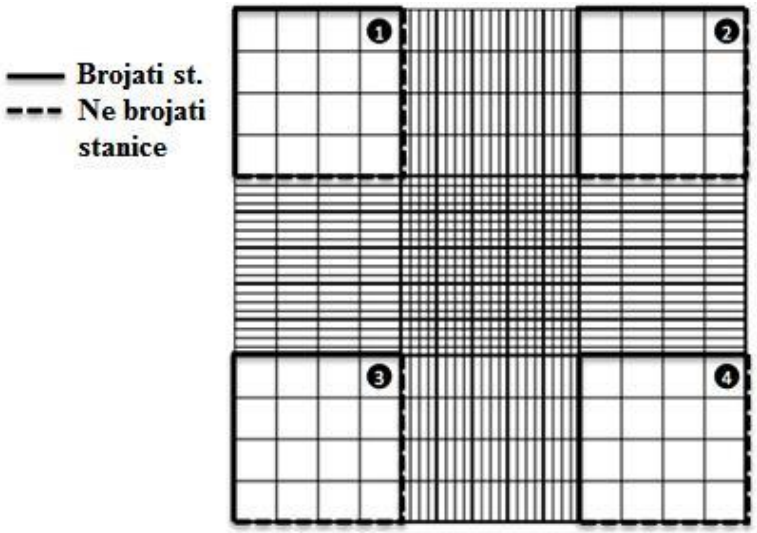
3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Stanice su uzgojene u plastičnim bocama aktivne površine rasta 25 cm^2 (BD Falcon, Njemačka) u DMEM hranjivom mediju uz dodatak 10% FBS-a, L-glutamina (2mM), i kombinacije antibiotika-antimikotika (100 U/0,1 mg). Kulture su uzgojene u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELL life TM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u atmosferi od 5 % CO_2 i temperaturi od 37 °C, oponašajući uvjete koji su prisutni *in vivo.* DMEM sadrži potrebne aminokiseline, vitamine, soli za održavanje osmotske ravnoteže, glukozu kao izvor ugljikohidrata, natrij bikarbonat kao pufer, koji je u ravnoteži s 5% -im CO_2 u inkubatoru i tako održava stalan pH oko 7.4. Sadrži i fenolno crvenilo kao pH indikator - crven je kod pH 7.4, mijenja boju u žuto kad pH padne ispod 6.8, a u alkalnom

mediju postaje ljubičast. Kulture se održavaju presađivanjem primjenom enzima tripsina. Tripsin je serinska proteaza gušterače koja najčešće cijepa peptidni lanac na karboksilnom kraju lizina ili arginina. Tripsin omogućava odvajanje stanica jedne od druge i od podloge, razgrađujući adhezijske proteine u stanica-stanica i stanica-podloga interakciji pri čemu se stanice odvajaju od podloge. Tako tretirane stanice ostave se 5 do 6 minuta u inkubatoru da tripsin djeluje. Zatim se laganim protresanjem boce potpomogne odvajanje stanica i dodaje se kompletirani svježi medij da se inhibira daljnje djelovanje tripsina i oštećenje stanica. Nakon djelovanja tripsina, odvojene stanice su pravilnog, kružnog oblika te plutaju u njemu. Pričvršćene (adherirane) stanice imaju specifičan izgled, karakterističan za staničnu liniju i histologiju. Uzgoj se svakodnevno prati pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Nakon što su se stanice odvojile, uzima se dio stanične suspenzije i miješa s tripanskim plavilom u omjeru 1:3. Uzima se 50 µL stanične suspenzije i dodaje se 100 µL tripan plavila te se dobro resuspendira. Tripansko plavilo služi u razlikovanju mrtvih od živih stanica. Mrtve se stanice boje plavo jer imaju oštećenu staničnu membranu koja lako propušta boju dok žive stanice ostaju neobojene. Za određivanje broja stanica koristi se Bürker-Türkova komorica ili hemocitometar (Slika br. 4). Brojimo stanice unutar 4 vanjska kvadrata te one u gornjem i jednom od postranih bridova kvadrata.



Slika br. 4 Bürker-Türkova komorica (20)

Broj vijabilnih stanica određuje se formulom:

$N/4 * 3 = X * 10^4$ stanica/cm^3

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT-testom

MTT, test citotoksičnosti *in vitro,* jedna je od metoda za kvantitativnu procjenu metaboličke aktivnosti stanica mjerenjem aktivnosti sukcinat dehidrogenaze, mitohondrijskog enzima. Glavne karakteristike ove metode jesu njena jednostavnost, točnost i brza detekcija citotoksičnosti i proliferacije stanica. Kolorimetrijska metoda je uz bojanje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid bojom. Naime, dehidrogenaza reducira žute tetrazonijeve soli u ljubičaste kristale formazana, netopljive u vodi. Formazanske kristale potrebno je otopiti u organskom otapalu kako bi se mogao odrediti intenzitet razvijene boje. Rezultirajuća ljubičasta otopina spektrofotometrijski se mjeri na čitaču mikrotitarskih pločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) pri valnoj duljini od 540 do 570 nm. Intenzitet obojenja izravno je proporcionalan broju živih stanica.

Postupak:

Na 96 jažica mikrotitarske ploče nasađene su stanične suspenzije SW620 i CaCo-2 stanice (180 µl). Tako nasađene stanične linije u koncentraciji od 2 x 10^4 st/mL, nakon 24 sata inkubacije u CO_2 inkubatoru, tretirane su polifenolnim ekstraktima (20 µl) u finalnim masenim koncentracijama od 2,5, 1,75, 1,0 i 0,25 mg/mL tijekom sljedeća 72 sata u CO_2 inkubatoru..

Nakon inkubacije, sa stanica se uklanja medij i dodaje MTT/PBS-om u omjeru 1:10 (5 mg/ml). Nakon toga stanice se ponovno inkubiraju tijekom 4 sata. Za otapanje formazanskih kristala korišten je dimetil sulfoksid (DMSO). Proces otapanja ubrzan je

stavljanjem ploče na tresilicu (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia) kroz 20 minuta na sobnoj temperaturi.

Intenzitet razvijene boje izmjeren je pri valnoj duljini od 595 nm. Nakon dobivenih rezultata apsorbancije za uzorke, kontrolu i blank (background; blank = MTT + DMSO) određen je udio preživjelih stanica u Microsoft Excelu.

Formula za računanje preživljenih stanica:

$$\%\ preživljenja = \frac{A_{tretman} - A_{background}}{A_{kontrola} - A_{background}} x\ 100$$

STATISTIKA:

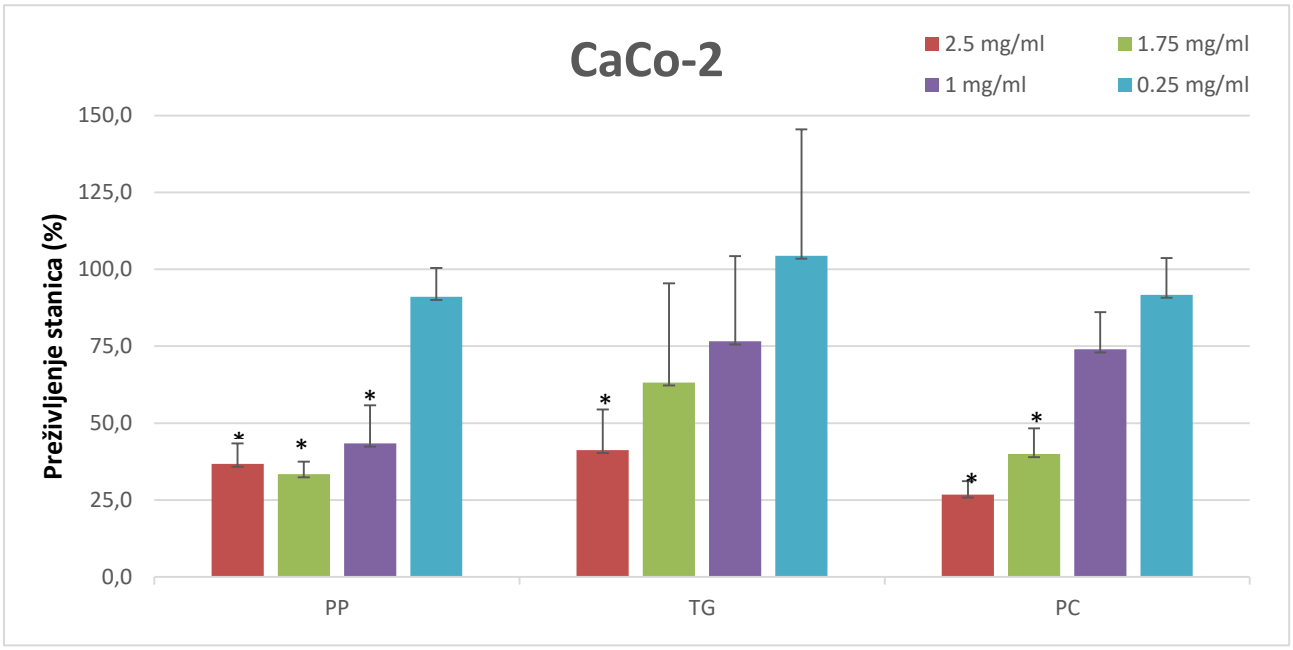
Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu Statistica 13.1. Podatci su analizirati primjenom Deskriptivne statistike za određivanje normalnosti razdiobe podataka i neparametrijskim Mann-Whitney U-testom usporedbe dvije nezavisne grupe podataka uz granicu statističke značajnosti $p<0,05$.

4. REZULTATI

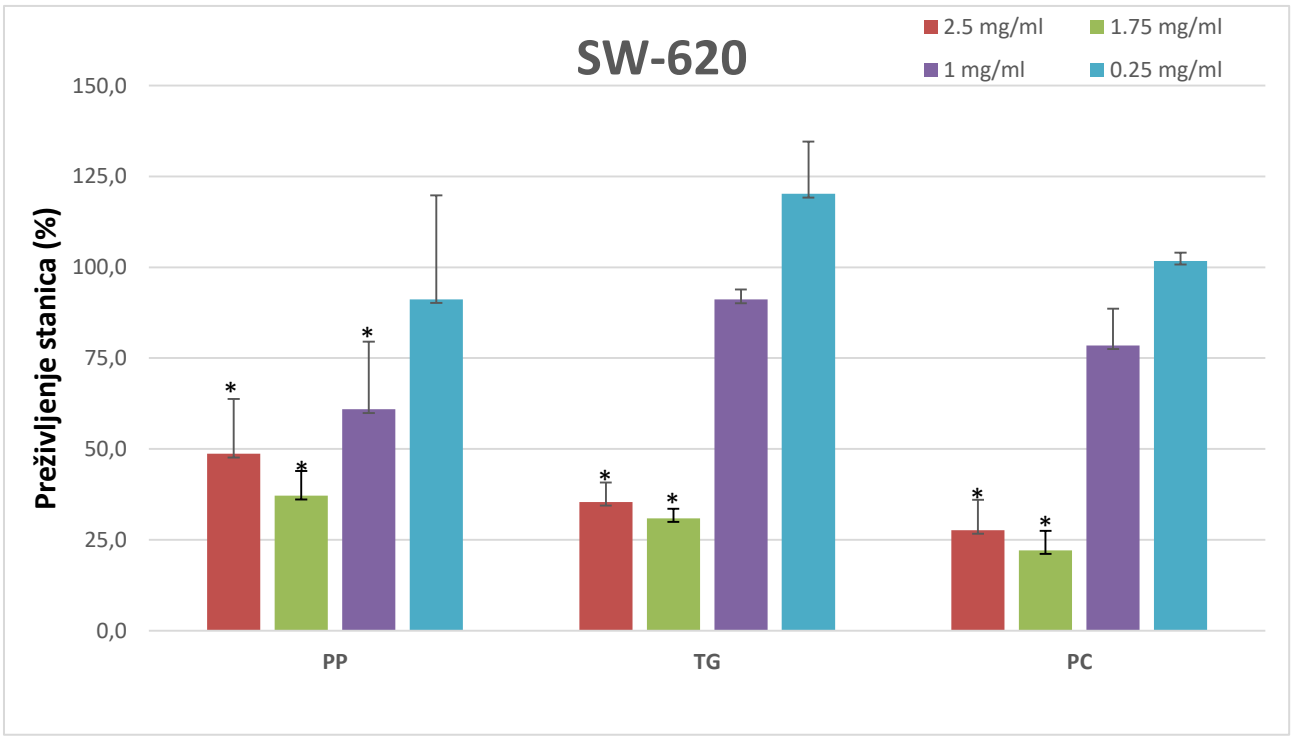
Citotoksično djelovanje ekstrakta sirovih polifenola (PP) i dva ekstrakta polifenola, nakon djelovanja mikroorganizama *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG), ispitano je na dvije tumorske stanične linije: CaCo-2 i SW 620 (Slika br. 4)

CaCo-2 stanična linija pokazala je najveću osjetljivost na PP ekstrakt i najmanju na TG ekstrakt čak i na najvišoj koncentraciji (2,5 mg/ml). Pri najvišim ispitivanim koncentracijama (2,5 mg/ml i 1,75 mg/ml) ekstrakti PP i PC pokazuju slično inhibitorno, odnosno antiproliferativno djelovanje. Pri koncentraciji od 2,5 mg/ml PP-a preživljenje CaCo-2 stanica se smanjuje na 36,8%, dok je, uslijed djelovanja PC ekstrakta, preživljenje još niže i iznosi 26,8%. Značajniji učinak ekstrakta polifenola tretiranog s TG-om uočava se samo pri koncentraciji od 2,5 mg/ml kod kojeg je preživljenje tumorskih stanica 41,2%. Najniže primijenjene koncentracije (1 mg/ml i 0,25 mg/ml) ekstrakta PC i TG nemaju značajan učinak za razliku od PP ekstrakta koji pri koncentraciji od 1,0 mg/ml dovodi do inhibicije staničnoga rasta za 56,6% ($p<0,05$) (Slika br. 5 a).

Na SW-620 staničnu liniju najjači učinak ima ekstrakt PC, slijedi TG i posljednji je PP po učinkovitosti na preživljenje SW620 stanica. Specifično je da pri koncentraciji od 1,75 mg/ml sva tri ekstrakta pokazuju najveće inhibitorno djelovanje na rast stanica od 62,9-77,9% u nizu kako slijedi: PP > TG > PC što upućuje da je ovo koncentracija pri koji se ostvaruje najjače citotoksično djelovanje. Pri koncentraciji od 1,0 mg/ml i 0,25 mg/ml niti jedan ekstrakt ne pokazuje osobito antiproliferatvno djelovanje (Slika br. 5 b).



a)



b)

Slika br. 5 Citotoksični utjecaj polifenolnih ekstrakta tropa grožđa na stanične linije: a) CaCo-2; b) SW620. Stanice su izložene djelovanju polifenolnih ekstrakata u koncentracijama od 0,25 mg/ml do 2,5 mg/ml. Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (Δ±SD) tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*) označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne stanice.

5. RASPRAVA

Svakodnevni ubrzani ritam života modernoga svijeta, stres u kombinaciji s neredovitim prehrambenim ritmom povezuje se s problemom značajne pojavnosti malignih oboljenja. Prirodni proizvodi poput voća, povrća, žitarica i njihove prerađevine sadrže brojne biološki aktivne komponente koje imaju povoljne učinke na zdravlje čovjeka. Odlikuje ih sposobnost smanjenja ili potpunog uklanjanja štetnih tvari iz organizma. Navedeni spojevi, uneseni i prisutni u organizmu u odgovarajućim količinama, mogu povoljno utjecati na različite organske sustave kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, živčani, imunološki i drugi (6). Dosadašnja istraživanja, koja su usmjerena na antitumorsku i antioksidacijsku aktivnost ispitivanu *in vitro*, upućuju na mogućnosti razvoja novih lijekova na osnovi farmakološki aktivnih spojeva biljnoga podrijetla.

Fiziološki gledano, fitokemikalije (fitonutrijenti) su produkti sekundarnog metabolizma biljaka koje ih sintetiziraju s ciljem samozaštite od abiotskih i biotskih stresnih faktora. Najveće zanimanje znanstvenika usmjereno je na skupinu polifenolnih spojeva koji su sveprisutni u biljnom carstvu, pa tako i u svakodnevnoj prehrani i životu čovjeka. Grožđe je sveprisutna biljka koja se koristi na različite načine u prehrambenoj industriji. Najviše se koristi u proizvodnji vina, sokova te se navodi kao bogat izvor različitih polifenola s višestrukim pozitivnim učincima na zdravlje.

Najčešće promatrani polifenoli pojedine su podvrste flavonoida poput flavanola u koje ubrajamo epigalokatehine i procijanidine, kojima se najvećim dijelom pripisuju antitumorski učinci. Prema nekim znanstvenim istraživanjima na tumorskim stanicama, epigalokatehini i procijanidini dijele značajna pro-apoptotička i antiproliferacijska svojstva. Nekoliko studija je analiziralo pojedinačni i kombinirani učinak imenovanih grupa spojeva. Tako su znanstvenici s Odjela eksperimentalne medicine iz Italije promatrali učinke epigalokatehina i procijanidina te njihove kombinacije na CaCo-2 i HCT-8 staničnim linijama. Rezultati, njihove analitičke studije, pokazali su da je sastav polifenola vrlo složen i upravo je ta kompleksnost vjerojatno odgovorna za antitumorsku aktivnost, a ne samo sadržaj epigalokatehina i procijanidina (22). U prilog njihovom zaključku govori dokazani pozitivan sinergistički učinak epigalokatehina u kombinaciji s drugim flavan–3-olima, npr. s katehinom (17), procijanidinom (22). Shimizu i sur. uočili su isti sinergistički učinak epigalokatehina u kombinaciji s terapeutskim lijekovima, nesteroidnim protuupalnim lijekovima (23). Stoga, umjesto pojedinoga spoja, kombinacije polifenola povećavaju učinkovitost i jačinu

kemopreventivnog učinka koji se povezuje s njihovim protuupalnim djelovanjem (23,24). Pozitivni inhibitorni učinci polifenola na rast stanica zabilježeni su i na drugim tumorskim staničnim linijama kao što su Hepa-1c1c7 (hepatocelularni karcinom), HCT-8 (ilocekalni kolorektalni adenokarcinom), HT29 i LoVo (kolorektalni karcinomi) (25).

Istraživanje Kaura i sur. na LoVo i HT29 staničnim linijama pokazala su da grožđani spojevi sadrže 89% procijanidina koji dovode do inhibicije staničnoga rasta pri koncentraciji od 25-50 μg/mL (26). Najveći broj *in vitro* studija upućuje na protutumorski učinak polifenola na rak dojke i debeloga crijeva, što se slaže i s našim istraživanjem. Rezultati su pokazali kako ispitivani ekstrakti u najvišim koncentracijama imaju najbolji citotoksični učinak, odnosno najbolji antiproliferativan učinak na tumorske stanice debeloga crijeva (CaCo-2) i njegovih metastaza (SW620). Pri nižim koncentracijama ispitivanih ekstrakta, primijećena je veća stopa staničnoga preživljenja, čime smo još jednom potvrdili prijašnja istraživanja kako citotoksični učinak znatno ovisi o koncentraciji ispitivanih ekstrakta kojima djelujemo na stanične linije. S druge strane, učinkovitost ne ovisi samo o primijenjenoj koncentraciji već i o osjetljivosti stanične linije. Tako je metastatska SW620 stanična linija pokazala veću osjetljivost od izvornoga kolorektalnog karcinoma (CaCo-2).

Mikroorganizmi *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG) neznatno povećavaju antiproliferativno djelovanje polifenolnih ekstrakata u odnosu na PP ekstrakt dobiven bez prethodne obrade mikroorganizmima. Povećana učinkovitost je uočena samo pri najvišoj koncentraciji (2,5 mg/ml) koja dovodi do 10-15% manjeg preživljenja i to samo na SW620 staničnoj liniji. Sličan učinak nije zamijećen kod CaCo-2 stanica. Cjelokupni učinak mikroorganizama je neznatan i potrebno je detaljnije istražiti djelovanje samih mikroorganizama na polifenole.

6. ZAKLJUČAK

- U ovome je radu prikazana pozitivna korelacija između polifenolnih spojeva i citotoksičnosti spram tumorskih stanica *in vitro* čime je još jednom potvrđena protutumorska aktivnost polifenola iz grožđa.
- Najjači inhibitorni učinak na CaCo-2 stanice ima PP ekstrakt u koncentraciji 1,0 mg/ml koji inhibira stanični rast za 56,6% ($p<0,05$).
- Učinak polifenolnih ekstrakata na SW620 stanice je najizražajniji pri koncentraciji 1,75 mg/ml koja dovodi do inhibicije staničnoga rasta za 62,9-77,9% u nizu kako slijedi:
  PP > TG > PC ($p<0,05$).
- Postotak inhibicije ovisi o koncentraciji spoja te vrsti stanične linije.
- Polifenoli dobiveni nakon djelovanja mikoorganizama: *Phanerochaete chrysosporium* (PC) i *Trametes gibbosa* (TG) pokazuju veću antiprolifertivnu moć na SW620 stanice, u odnosu na CaCo-2
- Aktivnost mikroorganizama TG i PC na razgradnju grožđanog tropa i skupinu polifenolnih spojeva nisu pokazala očekivano povećanje polifenolne aktivnosti. Potrebno je dodatno ispitati mehanizam djelovanja polifenolnih ekstrakata na SW620 i CaCo-2 stanice, kao i mehanizme razgradnje mikroorganizama u cilju dodatnog razlučivanja dobivenih rezultata *in vitro* studije

7. SAŽETAK

Uvod: Polifenoli su biološki aktivni nenutritivni sastojci, sekundarni metaboliti biljnog metabolizma – fitokemikalije. Nastaju kao derivati fenilalanina s aromatskim prstenom i reaktivnom hidroksilnom grupom. Interes za polifenolima je vrlo velik zbog njihove raznolike biološke aktivnosti; djeluju antioksidativo, protutumorski, protuupalno, anti-alergijski, djeluju kao antibiotici, antilipidemici, opuštaju krvne žile i sprječavaju stvaranje krvnih ugrušaka.

Cilj: Cilj ovog istraživanja je ispitati antiproliferativnu aktivnost polifenolnih spojeva izoliranih iz grožđanog tropa prije i nakon djelovanja mikroorganizama, koji potiču razgradnju grožđanog tropa, na kolorektalnim tumorskim stanicama *in vitro*.

Materijali i metode: U istraživanju je upotrijebljen ekstrakt čistih polifenola (PP) i ekstrakti polifenola dobiveni nakon djelovanja mikroorganizma: *Phanerochate chrysosporium* (PC) i *Trametes gibosa* (TG). Korištene su dvije tumorske stanične kulture; CaCo-2 i SW 620. Stanice su uzgojene u CO2 inkubatoru (5% CO2/37°C) u DMEM HG mediju. Proliferativni učinak ekstrakta polifenola ispitan je primjenom kolorimetrijskog MTT testa.. Rezultati su obrađeni u Excelu i Statistika 13.1 programu primjenom Mann-Whitney U-testom ($p<0,05$).

Rezultati: CaCo-2 stanice su pokazale najveću osjetljivost na djelovanje PP ekstrakta pri nižoj koncnentraciji (1,0 mg/ml) uz inhibiciju staničnog rasta od 56,6% ($p<0,05$), dok je pri koncentraciji od 2,5 mg/ml preživljenje 26,8% (PC), 36,8% (PP), 41,2% (TG). Učinak polifenolnih ekstrakata na SW620 stanice je najizražajniji pri koncentraciji 1,75 mg/ml i inhibiciju od 62,9-77,9% u nizu kako slijedi: PP > TG > PC ($p<0,05$)

Zaključak: SW620 stanična linija je osjetljivija od CaCo-2 stanične linije na djelovanje polifenolnih ekstrakata. Razgradnja grožđanog tropa posredstvom mikroorganizama (TG, PC) nije značajno doprinijela antiproliferativnoj polifenolnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka.

Ključne riječi: polifenoli; citotoksični učinak; kultura stanica; karcinom debelog crijeva

8. SUMMARY

Introduction: Polyphenols are biologically active non-nutritive ingredients, secondary metabolites of plant metabolism - phytochemicals. They are formed as phenylalanine derivatives with an aromatic ring and a reactive hydroxyl group. The interest in polyphenols is very high due to their diverse biological activity; they have antioxidative, antitumor, anti-inflammatory, anti-allergic properties, they act as antibiotics and antilipidemics, they relax the blood vessels and prevent blood clots.

Objective: The aim of this study is to investigate antiproliferative activity of polyphenolic compounds isolated from grape trope before and after the action of microorganisms, which promote the degradation of grape trout, on colorectal tumor cells *in vitro.*

Materials and Methods: An extract of pure polyphenolic components and extracts of polyphenols obtained after the action of the *Phanerochate chrysosporium* (PC) and *Trametes gibosa* (TG) microorganisms were used in the study. Two tumor cell lines were used; CaCo-2 and SW 620. The cells were cultured in a CO2 incubator (5% CO2 / 37 ° C) in DMEM HG medium. The proliferative effect of the polyphenolic extracts was tested using a colorimetric MTT assay. The results were processed in Excel and Statistics 13.1 using the Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$).

Results: Caco-2 cells showed the highest susceptibility to the effect of PP extract at lower concentrations (1.0 mg / ml) with 56.6% ($p < 0.05$) cellular inhibition, while at a concentration of 2.5 mg / ml survival was 26.8% (PC), 36.8% (PP), 41.2% (TG). The effect of polyphenolic extracts on SW620 cells is most pronounced at 1.75 mg / ml and inhibition of 62.9-77.9% in the sequence as follows: PP> TG> PC ($p < 0.05$).

Conclusion: The SW620 cell line is more sensitive than Caco-2 to polyphenolic extracts. The degradation of grape trope by microorganisms (TG, PC) did not significantly contribute to the antiproliferative activity of the investigated samples.

Key words: polyphenols; cytotoxic effect; cell culture; colorectal cancer

9. LITERATURA

1. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutr Rev. 1998;56:217-33.

2. Redovniković IR, Bubalo MC, Srček VG, Radošević K. The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition. 2016;3(4):169-75.

3. Mocanu M-M, Nagy P, Szöllosi J. Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. Molecules. 2015;20:22578-620.

4. Galanakis CM. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. 1. izdanje. New York: Elsevier; 2018.

5. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr. 2001;21:381-406.

6. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. Polyphenols in human health and disease. 1. izdanje. New York: Elsevier; 2014.

7. Cell cuture. [Online] https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture. Pristup: 21.7.2018.

8. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5 Izd. s.l. : Medicinska naklada Zagreb, 2009., p. 725-45.

9. Freshny RI. Culture of animala cells. A manual of basic techinque. New York, Alan R. Liss Inc 1987.,796 pp.

10. Olivotto M i Sbarba PD. Environmental restrictions within tumor ecosystems 19 select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. Cell Cycle. 2008., p. 176-87.

11. Ertel A. i sur. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. Mol cancer. Velika Britanija: BioMed Central Ltd. 2006.

12. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer. 2004. Apr 12;23(16):2919-33.

13. Novotvorina. [Online] https://hr.wikipedia.org/wiki/Novotvorina. Pristup: 22.7.2018.

14. Čepelak I, Čvorišćec D, Štrausova Medicinska biokemija. Medicinska naklada: Zagreb. 2009., p. 517-520.

15. Kemijska karcinogeneza. [Online] https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/6._predavanje.ppt. Pristup: 30.8.2018.

16. Hrvatska liga protiv raka, Rak debelog crijeva [Online] http://hlpr.hr/rak/vijest/rak-debelog-crijeva. Pristup: 22.7.2018.

17. Araújo J R, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. s.l.: Nutr Res. 2011;31:77-87.

18. ATCC: The Global Bioresource Center. SW620 [SW-620] (ATCC® CCL-227™). [Online] https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-227.aspx#generalinformation. Pristup:19.8.2018.

19. ATCC: The Global Bioresource Center. CaCo-2 (ATCC® HTB-37™). [Online] https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#generalinformation. Pristup:19.8.2018.

20. Bürker-Türkova komorica. [Online] https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/ Pristup: 19.8.2018.

21. Georgiev V., Ananga A., Tsolova V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. Nutr. 2014 Jan; 6(1):391–415.

22. Dinicola S i sur. Antiproliferative and Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus Epigallocatechin and Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. s.l. : Int J Mol Sci. 2012;13:651-64. 1422-0067.

23. Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. s.l.: Clin Cancer Res, 2005.

24. Zhou K, Raffoul JJ. Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. s.l. : J Oncol. 2012.

25. Leifert WR, Abeywardena MY. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. s.l. : Nutr Res. 2008.

26. Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma. s.l. : Clin Cancer Res, 2006.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Ivona Gajdašić

Datum i mjesto rođenja: 10.12.1996., Virovitica

OBRAZOVANJE

2003. – 2011. – Osnovna škola Josipa Kozarca, Slatina

2011. – 2015. – Srednja škola Marka Marulića, Opća gimnazija, Slatina

2015. – 2018. – Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike