Utjecaj cigaretnog dima na epitelne stanice pluća: poli(ADP)ribozilacija

Mauzer, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:622428

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski znanstveni studij biologije

Ivana Mauzer

UTJECAJ CIGARETNOG DIMA NA EPITELNE STANICE PLUĆA: POLI(ADP)RIBOZILACIJA

Diplomski rad

Osijek, 2012.

I. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj cigaretnog dima na epitelne stanice pluća: poli(ADP)ribozilacija

Ivana Mauzer

Rad je izrađen u Laboratoriju za oksidativni stres i poli(ADP)ribozilaciju, Sveučilište u Debrecenu, Mađarska
Mentor: dr.sc. Elizabeta Has-Schön, izv.prof.
Neposredni voditelj: dr.sc. László Virág, prof.

Kratak sažetak rada:
Cigaretni dim kompleksna je mješavina koja se sastoji od preko 4700 kemijskih komponenti što uključuje i slobodne radikale. Neravnoteža oksidansa i antioksidansa uzrokovana cigaretnim dimom može rezultirati oštećenjem stanica pluća. Među raznolikim stanicama koje grade pluća epitelne stanice alveolarnih struktura glavna su meta oksidativnog stresa uzrokovanog cigaretnim dimom. Potiskivanje proliferacije stanica, jednolančani lomovi na molekuli DNA, poremećaji u aktivnosti enzima odgovornih za popravak molekule DNA (kao što je na primjer poli (ADP-riboza) polimeraza) samo su neke od posljedica oksidativnog stresa uzrokovanog cigaretnim dimom.

Broj stranica: 36
Broj slika: 10
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 15
Broj priloga: 1
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: cigaretni dim, oksidativni stres, PARP, proliferacija stanica, oštećenje molekule DNA
Datum obrane: 18.07.2012.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
2. izv.prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön
3. doc.dr.sc. Ivna Štolfa

Rad je pohranjen u:
knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

II. BASIC DOCUMENTATION CARD

MS thesis

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Department of Biology
Graduate Study of Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

Effects of cigarette smoke on epithelial lung cells: poly(ADP)ribosilation

Ivana Mauzer

Thesis performed at laboratory of oxidative stress and poly(ADP)ribosilation, University of Debrecen, Hungary
Supervisor: dr.sc. Elizabeta Has-Schön, izv.prof.
Assistant in charge: dr.sc. László Virág, prof.

Short abstract:
Cigarette smoke is a complex mixture of more than 4700 chemical components, which include free radicals. Inbalance of oxidants and antioxidants caused by cigarette smoke can result in lung cells damage. Among different types of cells the lungs consists of alveolar epithelial lung cells that are the main target of oxidative stress caused by cigarette smoke. Decrease in cell proliferation, single strand DNA breaks, impared enzyme function (such as poly (ADP – ribose) polymeraze) are only some of the effects of oxidative stress induced by cigarette smoke.

Number of pages: 36
Number of figures: 10
Number of tables: 1
Number of references: 15
Original in: Croatian
Key words: cigarette smoke, oxidative stress, PARP, cell proliferation, DNA damage
Date of the thesis defense: 18.07.2012.

Reviewers:
1. doc.dr.sc. Ljiljana Krstin
2. izv.prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön
3. doc.dr.sc. Ivna Štolfa

Thesis deposited in:
Library of Department of Biology, University of J.J.Strossmayer in Osijek

Željela bih se zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Elizabeti Has-Schön na pomoći u odabiru i obradi teme.

Također hvala profesoru László Virág-u što mi je omogućio odlazak u njegov laboratorij (Laboratorij za oksidativni stres i poli(ADP)ribozilaciju, Sveučilište u Debrecenu, Mađarska), gdje sam i napravila ovaj rad.

Posebno bih se zahvalila svojoj obitelji koja mi je uvijek bila velika podrška u svemu što radim.

SADRŽAJ RADA

1. Uvod....1
1.1. Oksidativni stres....1
1.2. Stvaranje slobodnih radikala u normalnim biološkim uvijetima *in vivo*....2
1.3. Oštećenja tkiva posredovana slobodnim radikalima....4
1.3.1. Oštećenja molekule DNA....4
1.3.2. Lipidna peroksidacija....5
1.3.3. Oksidacija proteina....5
1.4. Zaštita organizma od oksidativnih oštećenja (antoksidansi)....5
1.5. Oksidansi u cigaretnom dimu....6
1.5.1. Radikali plinovite faze....7
1.5.2. Radikali čestične faze....8
1.6. Poli (ADP – riboza) polimeraza (PARP)....8
1.7. Cilj rada....10
2. Materijali i metode....11
2.1. Materijali....11
2.1.1. Priprema otopina....12
2.2. Metode....14
2.2.1. Stanična kultura A549....14
2.2.2. Ekstrakt cigaretnog dima....14
2.2.3. MTT test vijabilnosti stanica....15
2.2.4. Klonogenični esej....16
2.2.5. Komet test....17
2.2.6. Imunocitokemija....19
2.2.7. Western blot....21
3. Rezultati....24
3.1. Test vijabilnosti stanica (MTT test)....24
3.2. Klonogenični esej....26
3.3. Komet test....28
3.4. Imunocitokemija....30
3.5. Western blot....31
4. Rasprava....33
5. Zaključak....35

Literatura.....36
Popis skraćenica.....38

1. UVOD

1.1. OKSIDATIVNI STRES

Reakcije oksidacije i redukcije u biološkim sustavima predstavljaju osnovu za mnoge biokemijske mehanizme. Stanice su neprestano izložene različitim oksidansima koji potječu iz normalnih fizioloških procesa u organizmu, kao što je to na primjer mitohondrijska respiracija (J.Toro i R.Rodrigo, 2009). U normalnim uvjetima respiracije, 2% udahnutog kisika pojavljuje se u organizmu kao reaktivne kisikove čestice (ROS), od čega se smatra da polovica uzrokuje oštećenja na proteinima, te ¼ uzrokuje na molekuli DNA (A.E. Aust, 2004). U slučaju neravnoteže između produkcije ROS-a u organizmu te nesposobnosti organizma da neutralizira ROS, ili da u kratkom vremenu popravi nastalu štetu, govorimo o oksidativnom stresu. ROS su obitelj visoko reaktivnih čestica koje mogu biti korisne u organizmu, budući da ih imunološki sustav koristi kao sredstvo za ubijanje patogena (J.Toro i R.Rodrigo, 2009). Povećana produkcija ROS-a može rezultirati raznim oštećenjima u stanici, bilo direktno ili indirektno, ako se uključe kao intermedijeri u različitim signalnim putovima. Do povećane koncentracije ROS-a može doći u slučajevima izlaganja organizma povećanoj koncentraciji kisika ili izlaganju kemikalijama koje u organizmu produciraju ROS (A.E. Aust, 2004). Reaktivne dušikove čestice (RNS) mogu se slično ponašati kao reaktivne kisikove čestice. Na primjer, dušikov 1 oksid (NO) ima vazorelaksirajuća svojstva, ali kada reagira sa superoksidom ($\bullet O_2^-$) dolazi do stvaranja visoko oksidirajućeg spoja, peroksinitrata ($ONOO^-$), koji povećava koncentraciju unutarstaničnog ROS-a, što može biti vrlo nepovoljno za stanicu (J.Toro i R.Rodrigo, 2009). Kod sisavaca, u fiziološkim uvijetima, stanice metaboliziraju 95% kisika u vodu, bez stvaranja bilo kakvih toksičnih međuprodukata. Istraživanja u posljednjih 30 godina, dokazala su, da se ostalih 5% kisika metabolizira pomoću četiri različite oksido-redukcijske reakcije:

$$O_2 + e^- \rightarrow \bullet O_2^- \quad (1)$$

$$\bullet O_2^- + e^- \rightarrow H_2O_2 \quad (2)$$

$$H_2O_2 + e^- \rightarrow \bullet OH \quad (3)$$

$$\bullet OH + e^- \rightarrow H_2O \quad (4)$$

Završni produkt još je uvijek voda, ali tijekom te četiri reakcije, nastaju tri visoko reaktivna spoja, koje svrstavamo u ROS, od kojih su dva slobodni radikali, $\bullet O_2^-$ i •OH, dok je treći visoko reaktivni spoj, H_2O_2. Slobodni radikal je bilo koja čestica koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj orbitali, a sposobna je opstati samostalno (A.E. Aust, 2004). Model četiri stadija generalizirano objašnjava proizvodnju ROS-a u normalnom staničnom metabolizmu, gdje međuprodukti ne napuštaju kompleks prije nego je proces završen, osim u nekim patofiziološkim stanjima (J.Toro i R.Rodrigo, 2009).

1.2. STVARANJE SLOBODNIH RADIKALA U NORMALNIM BIOLOŠKIM UVJETIMA *in vivo*

Slobodni radikali uključeni su u nekoliko normalnih bioloških procesa *in vivo*. Superoksidni radikali i druge reaktivne kisikove čestice produkti su reakcija kataliziranih enzimima kao što su ksantin-oksidaza, NADPH-oksidaza i drugih, te se stvaraju u različitim tipovima stanica kako bi vršili razne korisne funkcije u tijelu. Na primjer, ROS su dio kaskade događaja u borbi fagocitnih, neutrofilnih, monocitnih i drugih stanica protiv mikroba, kroz NADPH-oksidaznu aktivnost. Kada fagocitne stanice dođu u kontakt sa stranim česticama u tijelu, one bivaju aktivirane te prolaze kroz respiratornu eksploziju. Stanica pluta oko bakterije ili neke druge strane čestice, te ju uvlači pomoću vezikula načinjenih od stanične membrane ili pomoću fagosoma. Unos kisika u neutrofilima i makrofagima rezultat je reakcija NADPH-oksidaznog kompleksa pridruženog plazma membrani, koji je odgovoran za redukciju kisika u superoksidni radikal. Uvučene čestice unutar vezikula su na taj način izložene velikoj količini superoksidnih radikala u citoplazmi fagocita. Reakcijski produkti superoksidnih iona djelomično su odgovorni za uklanjanje i uništavanje bakterija i oštećenih stanica. Zbog njegove slabe reaktivnosti, malo je vjerojatno da je sam superoksidni radikal odgovoran za ubijanje stranih čestica, ali zato se smatra da vodikov peroksid (H_2O_2), koji se formira dismutacijom pomoću superoksid-dismutaze (SOD), može ubiti neke sojeve bakterija. Jednom kad se fagocitna vakuola formira, fuzija sa drugim granulama u citoplazmi neutrofila dovodi do otpuštanja mijeloperoksidaza koje koriste vodikov peroksid kao ko-supstrat sa kloridom, stvarajući na taj način hipoklornu kiselinu. Potonja može oksidirati mnoge biološke molekule, pogotovo reducirane tiolne skupine i metioninske ostatke. Sljedeće jednadžbe pokazuju slijed kemijskih događaja koji doprinose ubijanju bakterija i drugih stranih čestica:

Djelovanje NADPH-oksidaze:

$$O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow \cdot O_2^- + NADP^+, \quad (5)$$

Djelovanje superoksid-dismutaze:

$$2H^+ + 2 \cdot O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2, \quad (6)$$

Djelovanje mijeloperoksidaza:

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-. \quad (7)$$

Na nekim kiselijim mjestima u stanici, kao što je vakuola fagocita ili mikrookoliš stanične membrane, superoksid može biti protoniran u perhidroksilni radikal:

$$\cdot O_2^- + H^+ \rightarrow \cdot HO_2. \quad (8)$$

Perhidroksilni radikal reaktivniji je od superoksida, a također je i citotoksičan. Slobodni radikali mogu se ponašati kao regulatorne molekule u biokemijskim procesima, kao na primjer u limfocitima i fibroblastima gdje se konstantno stvaraju male količine superoksidnog radikala kao faktora rasta. Druge nefagocitne stanice također mogu biti stimulirane tako da počnu proizvoditi superoksid kao i druge reaktivne kisikove čestice, na primjer endotelne stanice ili stanice glatkog mišićja (C.A. Rice-Evans, 1994.). Većina reaktivnih kisikovih čestica proizvedenih u stanici (smatra se oko 90 %) proizvedena je u mitohondrijima. Produkcija reaktivnih kisikovih čestica u mitohondrijima posljedica je oksidativne fosforilacije, procesa koji kontrolirano oksidira reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) i reducirani flavin-adenin-dinukleotid (FADH), kako bi proizvodio potencijalnu energiju za protone, uzduž mithondrijske unutarnje membrane. Na nekoliko mjesta uzduž citokromskog lanca, elektroni koji potječu od NADH ili FADH, mogu direktno raegirati sa kisikom, ili drugim akceptorima elektrona te stvarati slobodne radikale, posebice superoksid ($\cdot O_2^-$) (R. Balaban i sur., 2005.). Reaktivne kisikove čestice koje nastaju različitim procesima u organizmu, nisu same po sebi jako reaktivne, već u prisutnosti hem proteina (na primjer hemoglobina, mioglobina ili citokroma) ili u prisutnosti dostupnih metala željeza ili bakra, postaju reaktivnije. Redukcija vodikovog peroksida (H_2O_2) *in vitro*, u prisutnosti prijelaznih metala bakra i željeza slobodnih i nevezanih za proteine, inducira stvaranje hidroksilnog radikala ($\cdot OH$, Fentonova reakcija). Interakcija hem proteina sa vodikovim peroksidom (H_2O_2) inducira njegovu aktivaciju u reaktivnu česticu, koja je selektivnija od hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) *in vivo* (C.A. Rice-Evans, 1994.). Željezo u hemoglobinu i mioglobinu u reduciranom je stanju Fe(II) te molekularni kisik (O_2) u 3% slučajeva, nakon vezanja kisika za željezo biva reduciran u superoksid ($\cdot O_2^-$), ostavljajući oksidirano željezo Fe(III) (A.E. Aust, 2004). Dušikov oksid (NO) iz endotelnih

stanica, poznat još i kao relaksirajući faktor, uključen je u regulaciju vaskularnog signala, inducirajući relaksaciju stanica glatkog mišićja. Također se sintetizira u mnogim drugim tipovima stanica i tkivima pomoću NO-sintetaze ovisne o L-argininu. Dušikov oksid koji potječe iz makrofaga, vjerojatno je odgovoran za ubijanje tumorskih stanica i bakterija. Interakcijom superoksida i dušikovog oksida nastaje visoko reaktivni peroksinitrat ($ONOO^-$).

$$\cdot O_2^- + NO \rightarrow ONOO^- \quad (9)$$

Iako su slobodni radikali uključeni u mnogim biološkim procesima *in vivo*, oni mogu postati jako reaktivni ako se ne kontroliraju dobro (C.A. Rice-Evans,1994.).

1.3. OŠTEĆENJA TKIVA POSREDOVANA SLOBODNIM RADIKALIMA

Studije sa modelnim sustavima, kao i sa biološkim materijalom *in vitro*, jasno su pokazale da su reaktivni slobodni radikali sposobni producirati kemijske modifikacije i oštećenja na proteinima, lipidima, ugljikohidratima i nukleotidima. To znači da ako se takvi slobodni radikali stvore *in vivo*, ili u stanicama *in vitro*, u dovoljnim količinama da izbjegnu zaštitne mehanizme stanice, možemo očekivati metaboličke i stanične poremećaje (T. Slater, 1984.).

1.3.1. OŠTEĆENJA MOLEKULE DNA

Modifikacije DNA oksidacijom česta su pojava kod sisavaca te su predložene kao važan mehanizam koji utječe na pojavu raznih bolesti, kao na primjer raka, dijabetesa, pojave starenja i mnogih drugih. Oštećenja DNA smatraju se najozbiljnijim ROS-induciranim staničnim modifikacijama, budući da se DNA ne sintetizira *de novo*, već se kopira. Na taj način dolazi do induciranja mutacija te genetske nestabilnosti (J.Toro i R.Rodrigo, 2009.). Pri oštećenju molekule DNA stanica se najčešće brani tako da se aktivira programirana stanična smrt ili apoptoza. Apoptoza epitelnih stanica pluća može djelovati zaštitno u slučaju da sprječava opstanak stanica sa izmjenjenim genomom, dok prekomjerna apoptoza može rezultirati u gubitku veće količine stanica te može doprinijeti različitim bolestima (X. Liu i sur., 2005.). Glavni slobodni radikal odgovoran za oštećenja DNA je hidroksilni radikal ($\cdot OH$), koji reagira sa svim komponentama DNA molekule, purinskim i pirimidinskim bazama, te sa deoksiriboznom okosnicom. Na bazama može doći do dodavanja ili oduzimanja vodika što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Daljnje reakcije baza i šećernih radikala stvaraju različite modifikacije, mjesta bez baza, puknuća DNA te unakrsna spajanja DNA i proteina. RNS, kao na primjer $ONOO^-$ i $\cdot NO$, također su umješani u oštećenja DNA kroz mehanizme endogene formacije karcinogenih N-nitrozamin molekula, deaminacijom i oksidacijom baza te

mutacijama (J.Toro i R.Rodrigo, 2009.).

1.3.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Kao rezultat lokalnih obrambenih mehanizama u stanicama dolazi do stvaranja viška ROS-a što će rezultirati peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina. Lipidna peroksidacija je proces posredovan slobodnim radikalima u kojem primarni slobodni radikal reagira sa polinezasićenom masnom kiselinom i potiče seriju reakcija koje rezultiraju u različitim degradacijskim produktima (T. Slater, 1984.), kao što su na primjer malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), akrolein i F_2 izoprostan. Proces lipidne peroksidacije može dovesti do smanjene funkcije membrane, inaktivacije receptora i enzima vezanih za membranu, te do povećanja permeabilnosti tkiva, a svi su povezani sa patogenezom mnogih plućnih bolesti (I. Rahman, 2004.).

1.3.3. OKSIDACIJA PROTEINA

Svi ogranci aminokiselina u proteinima podložni su napadu oksidansa i slobodnih radikala, ali su neke podložnije oštećenjima od drugih. Izlaganje proteina slobodnim radikalima može dovesti do promjena u tercijarnoj strukturi proteina, kao posljedica modifikacija pojedinačnih aminokiselinskih ogranaka. Budući da je sekundarna struktura proteina stabilizirana pomoću vodikovih veza između peptidnih grupa, interakcija slobodnih radikala sa polipeptidnom okosnicom, te ometanja sa funkcionalnim grupama polipeptidnih lanaca, mogu uzrokovati modifikacije u sekundarnoj strukturi proteina (C.A. Rice-Evans, 1994.). Koncentracija karbonilne skupine proteina, nastala djelovanjem ROS-a u različitim mehanizmima, dobar je pokazatelj stupnja oksidativnog oštećenja proteina. Oksidacija proteina povezana je sa starenjem i mnogim drugim bolestima vezanim za starenje (J.Toro i R.Rodrigo, 2009.).

1.4. ZAŠTITA ORGANIZMA OD OKSIDATIVNIH OŠTEĆENJA (ANTIOKSIDANSI)

Svi oblici života održavaju reducirajući okoliš unutar stanica. Održavanje takvog statusa postiže se pomoću antioksidativnog obrambenog sustava, koji reagira na stvaranje reaktivnih kisikovih čestica koje se stvaraju normalnim procesima u stanicama kao i u različitim patofiziološkim stanjima u organizmu. Sustav antioksidansa očuvan je zahvaljujući antioksidativnim supstancama koje održavaju reducirano stanje, tako da neprekidno dodaju metaboličku energiju. Antioksidativne supstance male su molekule koje mogu konstantno skupljati slobodne radikale, tako da primaju ili daju elektrone kako bi eliminirale nespareno stanje. U većini slučajeva to znači da antioksidativna supstanca u tom procesu postaje stabilniji i manje reaktivni slobodni radikal. Najčešće se radi o hidroksilnom radikalu (·OH),

kojeg antioksidativne supstance doniraju slobodnom radikalu. Posljedica toga je da nastaje radikal koji ima duže vrijeme života, te je sposoban reagirati sa još jednim slobodnim radikalom, što znači da jedna antioksidativna supstanca može eliminirati dva slobodna radikala. Antioksidativne molekule mogu biti proizvedene unutar organizma, endogeno ili mogu biti unešene u organizam hranom ili antioksidativnim dopunama, egzogeno. Glavni endogeni antioksidativni enzimi su superoksid-dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza. Superoksid-dismutaza pretvara superoksidni anion u vodikov peroksid, koji je ujedno i supstrat za katalazu i glutation-peroksidazu. Katalaza će metabolizirati vodikov peroksid u vodu i kisik, dok će glutation-peroksidaza, u reakciji sa glutationom, kojeg u stanicama ima u velikim koncentracijama, reducirati i vodikov peroksid i organske hidroperokside. Antioksidansi poput vitamina E i C nalaze se na brojnim mjestima uglavnom na staničnoj membrani, intracelularno ili ekstracelularno, te reagiraju sa reaktivnim kisikovim česticama bilo da ih uklanjaju ili inhibiraju. Vitamin C koji je topljiv u vodi važan je pri sintezi kolagena, te je jedan od jakih reducensa u organizmu. Hidrofobna unutrašnjost membrane zahtijeva antioksidans, koji je topljiv u mastima i pomaže održanju membranskog integriteta, a to su osobine vitamina E. Antioksidansi koji su topljivi u mastima također su važni u spriječavanju lipidne peroksidacije. Glutation uklanja već producirane reaktivne kisikove čestice. Ako nema reaktivnih čestica polinezasićene masne kiseline ne mogu biti napadnute i oksidirane. Na taj način se štiti membrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama od reaktivnih kisikovih čestica. Mnoge druge antioksidativne molekule prirodno su prisutne u plazmi, kao na primjer mokraćna kiselina i bilirubin. Nedavno je otkriveno da riba, riblje masti i neko povrće sadrže furan masne kiseline, koje su također sakupljači slobodnih radikala, čime doprinose efikasnosti ribljih dijeta (J.Toro i R.Rodrigo, 2009.).

1.5. OKSIDANSI U CIGARETNOM DIMU

Cigaretni dim kompleksna je mješavina koja se sastoji od više od 4700 kemijskih komponenti, te 10^{14}-10^{16} slobodnih radikala po jednom udahu dima, a uključuje reaktivne aldehide, kinone i benzo[a]pirene (A. Kode i sur., 2006). Mnogi od tih spojeva su dugoživući kao na primjer semikinon, koji je citotoksičan, te stvara oštećenja na proteinima i molekuli DNA (S. Banerjee i sur., 2008.). Cigaretni dim dijeli se u dvije faze, plinovitu fazu ili dim te u čestičnu fazu ili katran. Pušač udiše plinovitu fazu kao i dio čestične faze, koji prođe kroz filter. Budući da su obje faze bogate slobodnim radikalima, izrazito su oksidirajuće, uzrokujući na taj način oksidativni stres pluća, kao i cjelog organizma (W. Pryor, 1997.). Kod pušača taj oksidativni

stres može biti posljedica samog cigaretnog dima, ali i posljedica oksidansa koje ispuštaju upalne stanice kao odgovor na oštećenja uzrokovana cigaretnim dimom (F. Luppi i sur., 2005.). Među raznolikim stanicama koje grade pluća, epitelne stanice alveolarnih struktura glavna su meta oksidativnog stresa uzrokovanog cigaretnim dimom. Popravak oštećenih alveolarnih površina ovisi o mogućnosti stanica tipa II da se brzo repliciraju tj. da proizvedu dovoljnu količinu novih stanica, koje imaju potencijal proliferacije u stanice tipa I, što stanice tipa II čini matičnim stanicama alveolarnog epitela. Nakon oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom, brzina inicijacije stanica tipa II ključna je za pravilan oporavak (Z.X. Jiao i sur., 2006). Stanice zračnog epitela pluća stvaraju površinski aktivne tvari (surfaktante) kako bi smanjile tenzije te zaštitile građevne jedinice pluća od vanjskih stimulansa. Također otpuštaju citokine[1] i hormone rasta u svrhu regulacije upale i staničnog rasta. Oštećenja na ovim stanicama dovode do povećanja epitelne permeabilnosti i smanjenja u sintezi površinski aktivnih tvari, što rezultira stvaranjem plućnog edema. Cigaretni dim dokazano oštećuje stanice zračnog epitela pluća tako da suzbija proliferaciju stanica, uzrokuje jednolančane lomove u molekuli DNA, suzbija stvaranje površinski aktivnih tvari i produkciju kolagena (Y. Hoshino i sur., 2001.).

1.5.1. RADIKALI PLINOVITE FAZE

U plinovitoj fazi nalazi se oko 10^{15} reaktivnih organskih komponenti po jednom udahu dima, kao na primjer ugljični monoksid (CO), amonijak (NH_3), formaldehid (CH_2O), N-nitrozamini, benzo[a]piren ($C_{20}H_{12}$), benzen (C_6H_6), izopren (C_5H_8), etan (C_2H_6), pentan (C_5H_{12}), nikotin, akrolein (prop-2-enal), acetaldehid (C_2H_4O) te druge genotoksične i karcinogene organske komponente (I. Rahman, 2004). Brza reakcija NO sa superoksidom rezultira u stvaranju visoko reaktivnog peroksinitrata ($ONOO^-$), dok reakcija sa peroksilnim radikalima daje alkilne peroksinitrate. Plinovita faza cigaretnog dima također sadrži organske dušične i kisikove radikale, koji su kratko živući (manje od 1s). Također, postoje reakcije koje mogu produljiti djelovanje takvih radikala, kao što je na primjer spora oksidacija duškovog oksida (NO). Dušikov oksid će reagirati sa nezasićenim komponentama, kao na primjer izoprenom u cigaretnom dimu i stvoriti organske radikale, čija je struktura bazirana na ugljiku. Oni pak mogu brzo reagirati sa kisikom i stvoriti peroksilne radikale koji se pretvaraju u alkoksilne radikale reakcijom sa NO, koji kao takav može ponovno ući u reakciju i producirati još radikala (W. MacNee i I. Rahman, 2004.). Plinovita faza, osim što sadrži više od 10^{14} slobodnih

1 Citokini – niskomolekularni glikoproteini koje izlučuju jedne stanice, a djeluju na druge stanice vežući se za površinske receptore

radikala na bazi dušika i kisika, sadrži i 500 ppm dušičnog monoksida, koji polako oksidira u dušični dioksid (W. Pryor, 1997.).

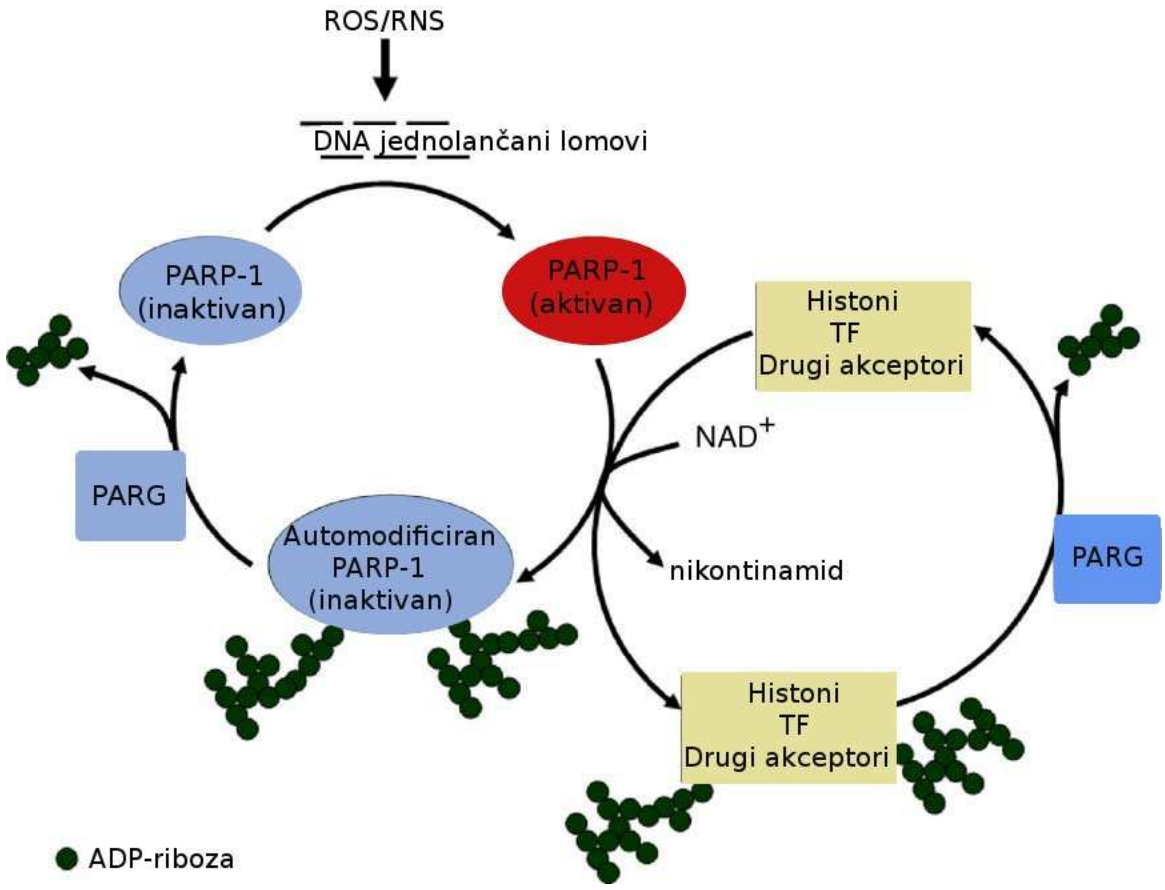
1.5.2. RADIKALI ČESTIČNE FAZE

Radikali prisutni u ovoj fazi stabilniji su od onih u plinovitoj fazi cigaretnog dima. Primjer za to je semikinonski radikal, koji može reducirati kisik te time proizvoditi superoksidni anion i hidroksilni radikal. Čestična faza također sadži reaktivne kisikove čestice koje nisu radikali, kao na primjer vodikov peroksid (W. MacNee i I. Rahman, 2004.). Mnogi od navedenih radikala su relativno dugoživeći u organizmu, te pomoću Fentonove reakcije mogu stvarati hidroksilne radikale (·OH) i vodikov peroksid (H_2O_2) koji će poremetiti ravnotežu u organizmu između oksidansa i antioksidansa, te uzrokovati oksidativni stres, koji u konačnici može rezultirati u oštećenju stanica pluća (Z.X. Jiao i sur, 2006).

1.6. POLI (ADP-RIBOZA) POLIMERAZA (PARP)

Poli (ADP-riboza)-polimeraza-1 (PARP-1) je nuklearni enzim prisutan u eukariota. PARP-1 je enzim veličine od 116 kDa, te se sastoji od tri glavne domene: N-terminalna DNA-vezujuća domena koja sadrži dva cink prsta, automodificirajuća domena i C-terminalna katalitička domena. PARP-1 fukcionira kao senzor za DNA oštećenja te kao signalna molekula koja veže jedno- i dvo- lančane DNA lomove. Nakon vezanja za oštećenu DNA, uglavnom preko druge cink prst domene, PARP-1 formira homodimere i katalizira rastavljanje NAD^+ u nikontinamid i ADP-ribozu, te potonju koristi za sintezu polimera poli (ADP-riboze), koji je kovalentno vezan za nuklearne akceptorske proteine (Slika 1.). Osim što je važan u regulaciji popravka DNA i održavanja genomskog integriteta, PARP-1 također regulira ekspresiju različitih proteina na razini transkripcije, regulira replikaciju i diferencijaciju, te telomeraznu aktivnost. Njegova aktivacija predstavlja put stanične eliminacije, može služiti kao izvor energije u hitnim slučajevima, može služiti kao signal za razgradnju proteina u stanicama oštećenim oksidativnim stresom itd. Istraživanja su pokazala kako stanice koje nemaju PARP-1, ipak imaju nešto zaostale aktivnosti PARP-a. Homolozi PARP-a zaslužni su za tu aktivnost, te su u zadnje dvije godine identificirani mnogi, kao na primjer PARP-2 i tankiraza – 1, 2 i 3. Poli (ADP) ribozilacija je dinamičan proces zbog toga što poli (ADP-riboza)-glikohidraza (PARG) brzo razgrađuje polimer poli (ADP-riboza). Budući da je K_m vrijednost PARG-a puno niža za veće polimere $(ADP\text{-}riboza)_n$, enzim najvjerojatnije prvo uklanja i katabolizira veće fragmente, nakon čega počinje uklanjati ADP-ribozne jedinice jednu po jednu. U slučaju iznimno velikog

oksidativnog stresa dolazi do prevelike aktivacije PARP-a koji konzumira sav NAD^+ a time i ATP, što konačno dovodi do disfunkcije stanice ili nekroze, te može biti uzrok srčanom i moždanom udaru, dijabetesu te mnogim drugim bolestima (L.Virág i C.Szabo, 2002).



Slika 1. Ciklus poli (ADP) ribozilacije

Jednolančani lomovi na molekuli DNA aktiviraju PARP-1, koji rastavlja NAD^+ u nikotinamid i ADP ribozu. Potonja se nakon toga polimerizira pomoću PARP-1, koji je kovalentno vezan za akceptorske proteine. Polimer se brzo razgrađuje pomoću PARG-a, dopuštajući na taj način da PARP-1 ponovno uđe u novi ciklus; TF - transkripcijski faktori (Virág, 2005.).

1.7. **CILJ RADA**

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj cigaretnog dima na kulturu stanica A549 (ljudske epitelne stanice adenokarcinoma pluća, alveolarne stanice tipa II), prateći proliferacije stanica, oštećenja molekule DNA te aktivnosti enzima PARP, koji sudjeluje u popravku molekule DNA.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

Pri uzgoju stanične linije A549 korištene su sljedeće kemikalije i oprema: medij RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Co., UK), tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, Co., UK), FBS (BioWhittaker, Lonza, Belgium), penicilin i streptomicin (BioWhittaker, Lonza, Belgium), L-glutamin (BioWhittaker, Lonza, Belgium), laminar (Telstar, model Bio-II-A, Spain), inkubator (Forma Scientific, Inc., model 311, USA), invertni mikroskop (Carl Zeiss, model Axiovert 40C, Germany), vodena kupelj (Memmert), posude za uzgoj stanica (TPP, Zellkultur und Labortechnologie, Switzerland).

Za pripremanje ekstrakta cigaretnog dima korištene su sljedeće kemikalije i oprema: medij RPMI 1640 bez seruma (Sigma-Aldrich, Co., UK), FBS (BioWhittaker, Lonza, Belgium), vodena kupelj (Memmert), digestor sa vakumom (Hohenloher), mikrofilter (Millex GB Filter Unit 0.22 μm, Carrigtwohill, Co., Ireland), injekcija (BD Discardit II, Becton Dickinson SA, Spain).

Pri izvedbi MTT testa korištene su sljedeće kemikalije i oprema: PBS, tripsin/EDTA, FBS, medij RPMI 1640, medij RPMI 1640 bez seruma, MTT (Sigma-Aldrich, Co., UK), DMSO(Sigma-Aldrich, Co., UK), pločice sa 96 bunarčića (TPP, Zellkultur und Labortechnologie, Switzerland), inkubator, fotometar (Labsystems Multiskan MS, Tip-352, Finland), računalni program za fotometar (Ascent Softwere fot Multiscan, Version 2.6).

Pri izvedbi klonogeničnog testa korištene su sljedeće kemikalije i oprema: tripsin/EDTA, FBS, RPMI 1640 medij, PBS, formaldehid (Molar Chemicals Kft., Hungary), hematoksilin (Sigma-Aldrich, Co., UK), pločice sa 6 bunarčića (TPP, Zellkultur und Labortechnologie, Switzerland), laminar, incubator, vodena kupelj.

U izvedbi komet testa korištene su sljedeće kemikalije i oprema: tripsin/EDTA, FBS, agaroza (Invitrogen Ltd., Scotland, UK), EDTA (Sharlau Chemie S.A., EU), DMSO, HBSS, triton X-100(Sigma-Aldrich, Co., UK), NaOH (Spectrum 3D, Hungary), PBS, EtBr (Serva, 10 mg/ml), fluorescentni mikroskop (Carl Zeiss Axioskop 20), kamera (AxioCam Carl Zeiss), računalni program (AxioVision 3.0).

U izvedbi imunocitokemije korištene su sljedeće kemikalije i oprema: tripsin/EDTA, FBS, PBS, metanol (Scharlab, Hungary), 30% H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Co., UK), BSA (Sigma-Aldrich, Co., UK), triton X-100, 10H antitijelo, Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Inc., USA), DAB (Sigma-Aldrich, Co., UK), $NiSO_4$ (Reanal, Hungary), NaCl (Sigma-Aldrich, Co., UK), Na-

acetat (Spectrum 3D, Hungary), tris-HCl (Reanal, Hungary), tris-Co, moviol.

U izvedbi Western blot metode korištene su sljedeće kemikalije i oprema: tripsin/EDTA, FBS, PJ34 inhibitor PARP-a (Inotek), PIC (Sigma-Aldrich, Co., UK), PMSF (Sigma-Aldrich, Co., UK), izopropanol (VWR International S.A.S., France), β-merkaptoetanol (Reanal, Hungary), SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), bromfenol blue (Sigma-Aldrich, Co., UK), 30% akrilamid, 0.8% bisakrilamid (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), tris-HCl, pH=8.8(), amonij persulfat (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), TEMED (Sigma-Aldrich, Co., UK), tris-HCl 0.1M, pH=6.8, 0.4% SDS(),1% Ponceu (Sigma-Aldrich, Co., UK), standard (Standard Fermentas Page Ruler, Prestained Protein Ledder) kadice za elektroforezu, oprema za transfer, dotok struje (Electrophoresis power supply EPS601, Sweden), sonikator (Branson Sonifier 450, Amersham pharmacia biotech), kuhač i magnetna mješalica (ARE Heating magnetic stirrer, Italy).

2.1.1. PRIPREMA OTOPINA

PBS

PBS pufer sadrži, 1.98g 26.67 mM KCl, 2g 14.71 mM KH_2PO_4, 80.6g 1.379 M N_2Cl te 14.34g 80.6 mM Na_2HPO_4. Nakon otapanja u jednoj litri destilirane vode, potrebno je pH vrijednost podesiti na 7.4.

MEDIJ RPMI 1640

Kupljeni medij ne sadrži sve što je stanicama potrebno za rast, te se u njega mora dodati FBS (10%), penicilin i streptomicin (1%) te L-glutamin (1%), kako bi stanice imale optimalne uvjete za rast. Tako se u bočicu novog medija, koja sadrži 500 ml, mora dodati 50 ml FBS-a, 5 ml antibiotika te 5 ml L-glutamina, nakon čega je medij spreman za upotrebu u uzgoju stanica.

HBSS BEZ Ca i Mg

Pet litara otopine sadrži, 2 g KCl, 0.3 g KH_2PO_4, 1.75 g $NaHCO_3$, 40 g NaCl, 0.625 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O te 5 g D-glukoze.

“MINCING” OTOPINA (Komet test)

“Mincing” otopina (otopina za usitnjavanje) sadrži, 3.5 ml destilirane vode, 0.5 ml 200 mM EDTA, 0.5 ml DMSO te 0.5 ml 10x HBSS. Nakon dodadavanja svih sastojaka, otopinu je potrebno dobro promješati pomoću Vortex-a.

OSNOVNI PUFER ZA LIZU (Komet test)

Pufer za lizu sadrži 146.1 g 2.5 M NaCl, 37.5 g 100 mM EDTA, 1.2 g 10 mM Tris, te 1 l destilirane vode. Potrebno je podestiti pH vrijednost na 10.

ZAVRŠNI PUFER ZA LIZU (Komet test)

Ukoliko pripremamo 400 ml pufera za lizu, ovisno o količini uzoraka koje imamo, dodajemo 36 ml destilirane vode, 40 ml 10% DMSO, 4 ml 1% Triton X-100, te do 400 ml dodajemo prethodno pripremljen pufer za lizu.

PUFER ZA ELEKTROFOREZU (Komet test)

Pufer za elektroforezu sadrži 30 ml 10 M NaOH, 5 ml EDTA te 1 litru vode.

PUFER ZA NEUTRALIZACIJU (Komet test)

Pufer za neutralizaciju sadrži 48.5g 0.4M Tris koji se otopi u 800 ml destilirane vode, te se pH vrijednost podesi na 7.5. Nakon što je željena pH vrijednost namještena, dodaje se ostatak destilirane vode do jedne litre.

PUFER ZA LIZU (Western blot)

Za pripremu 1 ml pufera potrebno je, 10 µl koktela za inhibiciju proteaza (PIC), 10 µl 100 mM PMSF otopljenog u izopropanolu, te prethodno ugrijanog u vodenoj kupelji, 50 µl β-merkaptoetanola te se do 1 ml dodaje SDS-pufer za lizu.

PUFER ZA ELEKTROFOREZU (Western blot)

Pufer za elektroforezu priprema se pomoću, 288.2 g glicina, 66 g Tris-a te 20 g SDS-a. Smjesa se otapa u dvije litre destilirane vode, te se pH vrijednost namješta na 8.3. Ovaj recept je za 10x koncentrirani pufer, te ga je prije upotrebe potrebno razrjediti 10 puta.

PUFER ZA PRIJENOS (Western blot)

Pufer za prijenos također se priprema koncentriraniji nego što je potrebno za ekperiment, ovaj puta 5x koncentriran. Sastoji se od 30.28 g Tris-a te 144 g glicina, koji se otapaju u dvije litre destilirane vode. Prije korištenja pufera za prijenos, potrebno ga je razrijediti i dodati metanol u omjeru, 1/5 5x pufer za prijenos, 1/5 metanola te 3/5 destilirane vode.

PRIPREMANJE GELOVA ZA ELEKTROFOREZU (Western blot)

Poliakrilamidni gel za elektroforezu priprema se tako da se u stakalca za gel nasipa otopina donjeg gela koja se sastoji od 4.6 ml destilirane vode, 2.7 ml 30% akrilamida,0.8% bisakrilamida, 2.5 ml 1.5M Tris-HCl (pH=8.8), 100 µl amonij persulfata (AMPER) otopljenog u vodi, te 16 µl TEMED-a. AMPER i TEMED dodaju se istovremeno, te je važno što prije naliti gel, kako se ne bi polimerizirao. Kada je dovoljna količina otopine između stakalaca, na otopinu se dodaje voda, kako bi gel bio ravan nakon polimerizacije. Donjem gelu potrebno je oko 20 minuta da polimerizira, nakon čega se voda uklanja, te se dodaje otopina za gornji gel koja sadrži 2.1 ml destilirane vode, 0.5 ml 30% akrilamid, 0.8% bisakrilamid, 0.38 ml 0.1M Tris-HCl (pH=6.8),0.4% SDS, 30 µl AMPER-a, otopljenog u vodi, i 3 µl TEMED-a. Gornji gel je

također potrebno naliti što brže. Na kraju se stavlja češljić, koji će načiniti jažice u gelu za dodavanje uzoraka. Kada je gornji gel također polimeriziran, češljić se uklanja, te se gel ispire u destiliranoj vodi.

2.2. METODE

2.2.1. STANIČNA KULTURA A549

Stanice A549 ljudske su epitelne stanice adenokarcinoma pluća, te pripadaju alveolarnom staničnom tipu II. Postoje dva tipa stanica koje se uzgajaju u kulturi, tip stanica koje rastu u suspenziji i tip stanica koje prijanjaju uz podlogu. Stanična kultura A549 pripada stanicama koje prijanjaju uz podlogu, te su uzgajane u mediju RPMI 1640, pri temperaturi od 37°C, sa 5% CO_2. Svakih tri do četiri dana, kulturu stanica potrebno je precijepiti u novu posudu za uzgoj (T75), kako bi stanice mogle nastaviti rasti. Nakon što stanice isperemo sa PBS-om, dodamo 2 ml tripsina/EDTA, te stanice vratimo na nekoliko minuta u inkubator. Tripsin dodajemo kako bi odvojili stanice od podloge, a njegovo djelovanje zaustavljamo medijem za uzgoj stanica, tako nakon što su se stanice odvojile od podloge, dodamo oko 20 ml svježeg medija za uzgoj, te dobro suspendiramo. U novu posudu za uzgoj stanica dodamo oko 15 ml svježeg medija za uzgoj i 1-2 ml stanične suspenzije, nakon čega posudu možemo vratiti u inkubator, gdje će stanice rasti sljedeća tri do četiri dana. Ostatak stanične suspenzije može se iskoristiti za eksperiment.

2.2.2. EKSRTAKT CIGARETNOG DIMA

Za pripremanje ekstrakta cigaretnog dima korištene su cigarete dužine 100 mm, sa sadržajem katrana od 10 mg po cigareti, nikotina od 0.8 mg po cigareti te ugljikovog monoksida (CO) od 10 mg po cigareti. Jedna cigareta, bez filtera, spojena je na staklenu posudu koja sa jedne strane ima izlaz za vakuum, a sa druge za cigaretu (Slika 2.).



Slika 2. Staklena posuda za pripravu ekstrakta cigaretnog dima (Fotografirala Ivana Mauzer)

Unutar posude stavljeno je 6.5 ml prethodno zagrijanog RPMI 1640 medija za uzgajanje stanica, koji ne sadrži serum. Prilikom pravljenja ekstrakta cigaretnog dima, važno je da cigareta izgori u manje od pet minuta. Jakim mješanjem, dolazi do kondenziranja dima u medij. Nakon što je sav dim u mediju, ekstrakt se filtrira kroz mikrofilter (0.22 μm), pomoću injekcije, te se dodaje

oko 600 µl FBS-a. Ekstrakt cigaretnog dima stabilan je samo oko 30 min, stoga je prije svakog tretmana potrebno pripremiti svježi ekstrakt.

2.2.3. MTT TEST VIJABILNOSTI STANICA

MTT test baziran je na sposobnosti flavoenzima da reduciraju MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid), koji je žute boje, u formazan, koji je ljubičaste boje i netopljiv u vodi. Temelj testa vijabilnosti stanica je pretvorba tetrazolijevih soli, koje ulaze u vijabilne stanice, pomoću mitohondrijskih sukcinat-dehidrogenaza. Budući da je produkt reakcije, formazan, netopljiv u vodi, potrebno ga je otopiti u nekom organskom otapalu, čiji odabir ovisi o vrsti stanica, nakon čega se mjeri apsorbancija na 540 nm pomoću fotometra.

Stanice su nacijepljene u pločice sa 96 bunarčića (na način opisan gore) sa gustoćom od 10^4 stanica po bunarčiću, u četiri replike po koncentraciji, te su ostavljene u inkubatoru na 37°C preko noći. Nakon pripremanja svježeg ekstrakta cigaretnog dima, stanice su tretirane tako da se za željenu koncentraciju dodao odgovarajući volumen 100%-tnog ekstrakta cigaretnog dima i to, 25 µl za 20%, 11.2 µl za 10 %, 5.27 µl za 5%, 2.56 µl za 2.5%, 1.27 µl za 1.25% te u kontrolu nije stavljen ekstrakt cigaretnog dima. Stanice su ostavljene 24h u inkubatoru na 37°C sa 5% CO_2. Poslije 24h tretmana, u stanice je dodano 10 µl MTT-a, te su ostavljene još 1h u inkubatoru. Nakon inkubacije, medij je uklonjen iz bunarčića pomoću sisaljke, te je dodano 50 µl DMSO-a u svaki bunarčić sa uzorcima, kao i u četiri prazna, kako bi se mogla oduzeti vrijednost otapala od pokusnih podataka.

Vrijednosti su izmjerene pomoću fotometra sa filterom valne duljine od 540 nm. Dobivene vrijednosti su unesene u Microsoft Office Excel dokument, te je od svake oduzeta vrijendost dobivena od samo DMSO. Nakon toga izračunava se srednja vrijednost od četiri replike, kao i standardna devijacija. Podatci su prikazani pomoću grafičkog prikaza u računalnom programu SigmaPlot 11.0.

Također je izvedena statistička analiza dobivenih podataka pomoću Microsoft Office Excel programa. Uzete su vrijednosti dobivene mjerenjem vijabilnosti te je izveden dvosmjerni Studentov t-test. P - vrijednosti ispod 0,05 smatraju se statistički značajnima. Rezultati su prikazani u tablici.

2.2.4. KLONOGENIČNI ESEJ

Klonogenični esej koristi se za mjerenje preživljavanja stanica nakon tretmana nekom tvari, a procjenjuje se sposobnošću stanica da formiraju kolonije. Stanice u eksponencijalnoj fazi rasta bivaju izložene nekoj citotoksičnoj tvari, te su nacijepljene pri jako maloj gustoći, stoga se smatra da je svaka formirana kolonija potekla od samo jedne stanice. Broj kolonija procjena je stanica koje su preživjele tretman.

Stanice su tretirane u šest Eppendorff posuda od 1.5 ml. Nakon što su stanice iz kulture izbrojane i napravljenja stanična suspenzija od 17.5×10^4 stanica u 7 ml, stavljeno je po 1 ml stanične suspenzije u svaku od posuda. Svježe pripremljen ekstrakt cigaretnog dima nakon toga dodan je u posude u sljedećim volumenima: 250 µl za 20%, 112 µl za 10%, 52.7 µl za 5%, 25.65 µl za 2.5% i 12.7 µl za 1.25%. U kontrolu nije dodan ekstrakt cigaretnog dima. Tretman je trajao 30 min, te su za vrijeme tretmana stanice držane u inkubatoru. Nakon tretmana stanice su centrifugirane na 1500 rpm, pet minuta. Uklonjena je gornja faza nakon centrifugiranja te je dodan 1 ml svježeg medija.

Stanice je potrebno nacijepiti u dvije različite koncentracije, jedna za slikanje i jedna za brojanje kolonija. Stanice koje su namjenjene za slikanje potrebno je nacijepiti u koncentraciji od 2500 stanica po bunarčiću, dok je one za brojanje potrebno nacijepiti u koncentraciji od 500 stanica po bunarčiću. Pripremljene i tretirane stanice već su u potrebnoj koncentraciji od 2500 stanica po bunarčiću, te ih je za drugu koncentraciju potrebno samo razrijediti. Razrijeđenja su napravljena tako da je u nove Eppendorf posude dodano 400 µl sviježeg medija te 100 µl stanične suspezije iz prijašnjih posuda. Za svaku koncentraciju napravljene su po tri replike. Prije dodatka stanica u pločice sa šest bunarčića, potrebno je u njih dodati 1.5 ml svježeg medija, te je dodano 100 µl tretiranih stanica, nakon čega su ostavljene 7-10 dana u inkubatoru. Za to vrijeme jedan put je promjenjen medij.

Nakon što je prošlo 7-10 dana, pločice su izvađene iz inkubatora i medij je uklonjen. Stanice su isprane sa PBS-om tri puta, te su fiksirane sa 4%-tnim formaldehidom. 15 minuta nakon toga uklonjen je formaldehid, te su stanice ponovno isprane sa PBS-om i jedanput sa destiliranom vodom. Prije nego se stanice obojaju sa hematoksilinom, njega je potrebno filtrirati, budući da, dok se ne koristi, hematoksilin stvara kristale, koji će ometati eksperiment. Filtriranje je obavljeno pomoću običnog lijevka i filter papira. Hematoksilin je dodan u bunarčiće te ostavljen pet minuta. Nakon 5 minuta hematoksilin je uklonjen, te je stanice potrebno isprati sa vodom. Pločice su ostavljene na zraku kako bi sva tekućina isparila. Obojene stanične kolonije moguće je prebrojati, tako da se pločica okrene naopako te se

jednostavno pomoću markera označe prebrojane kolonije na zadnjoj strani pločice. Nakon što su kolonije prebrojane izračunava se srednja vrijednost od tri replike, kao i standarnda devijacija, te su vrijednosti prikazane pomoću grafičkog prikaza u računalnom programu SigmaPlot 11.0.

2.2.5. KOMET TEST

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu metoda je kojom je moguće djelotvorno i brzo otkriti oštećenja u molekuli DNA. Nakon uklapanja stanica u mikrogel agaroze, potrebno je lizirati stanice i stanične strukture pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i deterđenta, kako bi se oslobodila ukupna DNA. Pomoću alkalnog ili neutralnog pufera, ovisno o tipu komet testa kojeg primjenjujemo, denaturiramo DNA, te ju podvrgavamo elektroforezi, tijekom koje će se kraći fragmenti, nastali oštećenjem, odvojiti od ostatka DNA, koja zbog velike molekularne mase nema sposobnost putovanja ka anodi. Kraći fragmenti putuju kroz agarozu brže, te se odvajaju prema veličini. Nakon bojanja fluorescentnim bojama (DAPI, etidij bromid) te strukture su vidljive kao kometi. Za analizu kometa koristimo fluorescentni mikroskop i računalni program za analizu slike ili specijalizirani program za analizu kometa. Potrebno je izmjeriti minimalno 50 kometa za svaki uzorak, te se na svakom od njih utvrđuju tri osnovna parametra, dužina repa kometa, intenzitet repa te repni moment. Dužina repa kometa predstavlja udaljenost na koju su doputovali najkraći odlomljeni fragmeti, a obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave kometa, te se izražava u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment definira se kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu a izračunava ga računalni program. Najčešće korišten tip komet testa je alkalni komet test, pomoću kojeg možemo otkriti jednolančane lomove i druga mjesta koja su osjetljiva na lužine (apurinska i apirimidinska mjesta), nastala kao posljedica oštećenja DNA.

Izbrojano je 10^6 stanica, te je stanična suspenzija raspoređena u tri Eppendorf posude u svakoj po 1.7 ml, od kojih je jedna za kontrolu, jedna za 10% i jedna za 20% tretmana. Pripremljen je svježi ekstrakt cigaretnog dima, te su stanice tretirane sa 10 i 20% ekstrakta, tj. dodano je 425 µl ekstrakta u 1.7 ml stanične suspenzije za 20%, dok je 212.5 µl dodano za 10%. Stanice su tretirane 30 minuta i za to vrijeme su ostavljene u inkubatoru. Nakon 30 minuta stanice je potrebno centrifugirati na 1500 rpm, pet minuta. Uklonjena je gornja faza, te je dodano 200 µl „mincing“ otopine u svaki uzorak, nakon čega ih je potrebno pažljivo

suspendirati.

Pripremljena je 1%-tna otopina agaroze, na način da se izvagalo 1 g agaroze, koji je otopljen u 100 ml PBS-a. Agarozu je potrebno otopiti pomoću mikrovalne pećnice, dok otopina ne postane prozirna. Mikroskopske predmetnice s jedne su strane hrapave kako bi zadržale agarozu za vrijeme eksperimenta, te su očišćene pomoću etanola prije korištenja. Također je pripremljena posuda s ledom koja je prekrivena sa aluminijskom folijom, kako bi imali hladnu, ali ne i mokru površinu za hlađenje mikroskopskih predmetnica. Nakon što je agaroza u potpunosti otopljena, stavljena je u vodenu kupelj na 60 - 70℃, radi održavanja nepolimeriziranog stanja agaroze.

Mikroskopske predmetnice umočene su u agarozu, te je na nju što brže stavljeno pokrovno stakalce veličine 24 × 40 mm, nakon čega su stavljene na prethodno pripremljenu hladnu površinu. Pripremljena je nova otopina agaroze od 0.5%, na način da se izvagalo 0.5 g agaroze, koja je otopljena u 100 ml PBS-a, te je također otopljena u mikrovalnoj pećnici i stavljena u vodenu kupelj.

Nakon što se agaroza polimerizirala na mikroskopskim predmetnicama, uklonjeno je pokrovno stakalce, te su predmetnice spremne za dodavanje uzoraka. Uzorci su dodavani tako da se u jednu pipetu, pipetira 10 µl uzorka, te u drugu 100 µl 0.5% agaroze. Oboje je dodano u Eppendorf posudu, dobro izmješano te dodano na mikroskopske predmetnice na kojima je 1%-tna agaroza. Na svaku od predmetnica moguće je dodati po dva uzorka, koji su odmah nakon dodavanja prekriveni sa pokrovnicama veličine 18 × 18 mm. Gotove predmetnice stavljene su u hladnjak na 4℃. Sviježe pripremljeni pufer za lizu (završni), usipamo u plastične posude u kojima su mikroskopske predmetnice sa uzorcima i uklonjenim pokrovnicama, nakon čega se ostavljaju u hladnjaku na 4° C, najmanje jedan sat. Mikroskopske predmetnice izvade se iz pufera za lizu i poslažu u kadicu za elektroforezu. Na krajeve kadice potrebno je staviti prazne predmetnice, zbog jačine struje, koja može utijecati na stanice u uzorcima. Kada su sve predmetnice postavljene, usipa se pufer za elektroforezu, koji je prethodno svježe pripremljen, do razine kada prekriva sve predmetnice. Dotok struje je namješten na 25V, 380 mA, te na trajanje od 30 minuta. Budući da se radi o alkalnom komet testu, nakon elektroforeze potrebno je uzorke staviti u pufer za neutralizaciju, ranije pripremljen, na pet minuta.

Uzorke je potrebno obojati sa otopinom etidij bromida u PBS-u, koncentracije 1% (5 ml PBS + 50 µl EtBr). Na uzorke se doda po 100 µl EtBr, i ostavi se pet minuta. Kako bi pozadinski šum

bio što manji, potrebno je isprati EtBr destiliranom vodom prije slikanja. Isprani uzorci spremni su za slikanje pomoću fluorescentnog mikroskopa i kamere. Nakon slikanja komete je potrebno obraditi u računalnom programu, kako bi dobili točne podatke o dužini repa, intenzitetu repa te repnom momentu. Podatci su obrađeni u računalnom programu Microsoft Excel, te prikazani grafičkim prikazom u programu SigmaPlot 11.0.

2.2.6. IMUNOCITOKEMIJA

Imunocitokemija je tehnika koja se koristi za procjenu prisutnosti specifičnog proteina ili antigena u stanicama, koristeći specifična antitijela koja se za njih vežu, te tako omogućuje vizualizaciju i pregled pod mikroskopom. Može se koristiti na različitim uzorcima stanica koje prijanjaju uz podlogu, stanica koje rastu u suspenziji, krvnim razmazima, različitim brisevima itd. Vrlo je važno da stanice budu u jednom sloju radi boljeg vezanja antitijela i vizualizacije. Također stanice je potrebno fiksirati radi lakšeg rukovanja tijekom eksperimenta. Budući da se mogu koristiti različiti uzorci, metoda ima mnogo različitih protokola, ali se svaki sastoji od nekoliko ključnih koraka: nacijepljivanje stanica na nekakvu podlogu (najčešće pokrovno stakalce), fiksacija stanica, pomoću formalina, metanola, acetona ili etanola (ovisno o tipu uzoraka), blokiranje endogenih peroksidaza kako bi spriječili lažno pozitivno tj. nespecifično obojenje tkiva, blokiranje nespecifičnih veznih mjesta (najčešće pomoću BSA), dodavanje primarnog i sekundarnog antitijela, te bojanje. Pomoću ove metode možemo vizualizirati traženi protein te odrediti njegovu točnu lokaciju u stanici.

Stanice su nacjepljene na okrugla pokrovna stakalca koja su postavljena u pločice sa 24 bunarčića. Za eksperiment su potrebne četiri pločice, za tretmane od 10, 30, 60 i 120 minuta. U svaku od pločica postavljeno je po šest okruglih pokrovnica u sterilnim uvijetima, te su na njih nacjepljene stanice u koncentraciji od 7.5×10^4 stanica po bunarčiću. Nakon pripreme svježeg ekstrakta cigaretnog dima, stanice su tretirane tako da se u bunarčiće za odgovajarujuću koncentraciju cigaretnog dima dodavao pripadajući volumen 100%-tnog ekstrakta i to 250 µl za 20%, 112 µl za 10%, 52.7 µl za 5%, 25,65 µl za 2.5%, 12.7 µl za 1.25%, te se u kontrolu nije dodao ekstrakt cigaretnog dima. Pločice su ostavljene u inkubatoru za vrijeme tretmana. Po završetku pojedinog tretmana, pločice su izvađene iz inkubatora, te isprane sa PBS-om. U svaki bunarčić dodano je 400 µl ledeno hladnog metanola, te ostavljeno 20 minuta na -20℃. Metanol je nakon 20 minuta uklonjen te su pločice ostavljene na zraku, kako bi sav metanol ispario. Bunarčići su ponovno isprani sa PBS-om.

Blokiranje endogenih peroksidaza vrši se pomoću otopine vodikovog peroksida (H_2O_2) u metanolu. Otopina je pripremljena od 30%-tne stock otopine vodikovog peroksida i metanola, a završna koncentracija peroksida u otopini je 0.5%. U svaki bunarčić je dodano 300 µl otopine, koja je ostavljena 15 minuta na sobnoj temperaturi. Otopina je nakon toga uklonjena te su bunarčići isprani sa PBS-om. Nespecifična vezna mjesta blokiraju se pomoću otopine BSA i PBS/Tx, sa završnom koncentracijom BSA u otopini od 1%. U svaki bunarčić dodano je 300 µl otopine za blokiranje, te je stavljena sat vremena na sobnoj temperaturi. Kada je blokiranje završeno, otopina za blokiranje je uklonjena, te je dodano primarno antitijelo, 10H (anti-PAR; iz miša), koje je otopljeno u ostatku otopine za blokiranje u omjeru 1:500. Ostavljeno je preko noći na 4℃.

Pločice je potrebno ostaviti neko vrijeme na sobnoj temperaturi, nakon čega je potrebno ukloniti primarno antitijelo, te isprati sa PBS/Tx tri puta. Potom je dodano sekundarno antitijelo, anti-mouse IgG konjugirano sa biotinom (iz kita), razrjeđeno u otopini za blokiranje u omjeru 1:500. Ostavljeno je jedan do dva sata na sobnoj temperaturi. Supstrat je pripremljen pomoću ABC otopine iz Vectastain ABC kita, koja sadrži kompleks enzima sa avidinom i biotinom. U 2.5 ml PBS-a dodaje se po jedna kap otopine A i B. Kompleks je potrebno ostaviti 30 minuta u hladnjaku na 4℃ kako bi stvorio stabilnu otopinu. U svaki bunarčić dodano je 300 µl, te je ostavljeno pet minuta na sobnoj temperaturi. ABC otopina je uklonjena iz bunarčića, te su isprani dva do tri puta sa PBS-om. Nakon toga dodan je 0.1 M Na-acetat, pH=6.6, na pet minuta. Poslije pet minuta, pufer je uklonjen, te je dodan isti pufer, ali sa pH=6.0, također na pet minuta. Otopina za bojanje sadrži 0.1 g $NiSO_4$, 0.08 g NaCl, 0.0047 g DAB, 1.25 ul 30% H_2O_2 u 10 ml Na-acetata, pH=6.0. U svaki bunarčić dodano je 300 µl otopine za bojanje na pet minuta. Otopina je uklonjena, te su bunarčići isprani sa 0.2 M tris-HCl, pH=7.2, nakon čega i sa tris-Co otpinom. Po završetku ispiranja, u bunarčiće je dodana destilirana voda. Na obične mikroskopske predmetnice stavljene su po četiri kapi moviola, te su pokrovnice iz bunarčića izvađene i stavljene na moviol tako, da se stanice nalaze između moviola i pokrovnice. Pomoću svjetlosnog mikroskopa i kamere, načinjene su slike svakog uzorka.

2.2.7. WESTERN BLOT

Western blot je analitička metoda pomoću koje prenosimo proteine prethodno odjeljene elektroforezom (najčešće pomoću SDS-PAGE elektroforeze), na nitroceluloznu membranu. Prenešeni proteini mogu se detektirati pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitjela, te suspstratom. Uzorci se prvo podvrgavaju SDS-PAGE elektroforezi, kako bi se razdvojili prema veličini, tj. molekularnoj masi. Nakon toga se prenose na nitroceluloznu membranu, tako da uz pomoć struje budu premješteni iz poliakrilamidnog gela u membranu. Nitrocelulozna membrana tada se blokira pomoću otopine mlijeka u prahu, kako bi se blokirala nespecifična vezna mjesta prije dodatka antitjela. Nakon dodatka primarnog i sekundarnog antitjela, specifičnog za protein od interesa, dodaje se supstrat, koji daje signal kojeg možemo zabilježiti pomoću rendgenskog filma ili posebne kamere predodređene za takvo slikanje. Ova metoda nam omogućuje daljnji rad sa proteinom, nakon same elektroforeze, te nam može otkriti da li je protein prisutan u određenim uvijetima koje postavljamo eksperimentom.

Dan prije eksperimenta, potrebno je nacjepiti stanice na pločice sa šest bunarčića. Stanice su nacjepljene u tri različite pločice, jedna za kontrolu, druga za jedan sat tretmana i treća za dva sata tretmana. U svaki bunarčić nacjepljeno je 5×10^5 stanica, te su ostavljene u inkubatoru preko noći. Na pločicama od jedan i dva sata tretmana, zadnji bunarčić predstavlja tretman sa 20% ekstrakta cigaretnog dima i sa inhibitorom PARP-a, PJ34. Prije tretmana potrebno je predtretirati bunarčiće u kojima će biti tretman od 20% sa dodatkom PJ34. Prije predtretmana, potrebno je ukloniti medij iz bunarčića, te staviti svježi. Nakon toga u bunarčiće predviđene za tretman sa PJ34 dodaje se PJ34 u završnoj koncentraciji od 10 μM, te se pločice vraćaju u inkubator na 30 minuta.

Svježe pripremljeni ekstrakt cigaretnog dima se, nakon isteklih 30 minuta, dodaje u bunarčiće i to 500 μl za 20%, 230 μl za 10%, 107 μl za 5%, 52 μl za 2.5%, 25.35 μl za 1.25% te se u kontrolu ne dodaje ekstrakt cigaretnog dima. Pločice se ostavljaju u inkubatoru na jedan i dva sata. Nakon isteka vremena tretmana, pločice je potrebno držati na ledu, te se bunarčići ispiru sa PBS-om tri puta. Dodaje se po 100 μl pufera za lizu u svaki od bunarčića, te se pomoću plastične spatule, sastružu stanice sa dna bunarčića. Stanice su zatim prenesene u Eppendorf posude od 1.5 ml i stavljene na led.

Traženi protein, PARP, nalazi se u jezgri, stoga je potrebno stanice podvrgnut razbijanju ultrazvukom (sonikaciji) kako bi se membrana stanične jezgre razbila. Sonikacija se vrši pomoću sonikatora i to po 20 sekundi za svaki uzorak, koji je cijelo vrijeme potrebno držati na ledu. Nakon sonikacije, uzorke je potrebno centrifugirati 20 minuta sa 150 000 rpm, na 4℃.

Supernatant se odvoji i stavi u nove Eppendorf posude. U uzorke se doda po 3 µl bromfenol plavila te dobro promješa pomoću Vortex-a. Zatim je uzorke potrebno skuhati, 10 minuta na 100℃, te su tada spremni za dodavanje na gel za elektroforezu.

Nakon toga gel se postavlja u kadicu za elektroforezu, zajedno sa puferom za elektroforezu, te se u jažice dodaju uzorci i standard (3 µl), pomoću Hamilton igle. Kada je postupak završen, dodaje se, ako je potrebno, još pufera za elektroforezu, te se cijeli kompleks spaja na dotok struje. Optimalni uvijeti elektroforeze su 100 V, 380 mA, dok uzorci ne „izađu“ iz gela, što je otprilike jedan do dva sata. Kada su svi uzorci i standard „izašli“, dotok struje se gasi, te se pravi sendvič, koji sadrži spužve, filter papire, gel i membranu. Sve je natopljeno u puferu za prijenos, te se slaže ovim redosljedom, spužva, filter papir, gel, membrana, filter papir, te ponovno spužva. Budući da se pufer za prijenos grije, potrebno je cijeli kompleks staviti na led. Dotok struje ne smije biti veći od 100 V, te je potrebno jedan do dva sata da se proteini prenesu na membranu.

Nakon što je prijenos gotov, membrana se vadi iz kompleksa, te se boja pomoću 1% PONCEU na pet minuta. Nakon bojanja slijedi ispiranje u PBS/Tw, sve dok membrana nije potpuno bijela. Blokiranje membrane vrši se pomoću 5% mlijeka u prahu niske masnoće, otopljenog u PBS/Tw. Kako bi dobili 5%-tno mlijeko, važe se 1 g mlijeka u prahu, te se otapa u 20 ml PBS/Tw. Membrana se blokira jedan sat na sobnoj temperaturi.

Kao primarno antitijelo za PAR, koristi se 10H antitijelo, proizvedeno u mišu, razrjeđeno u 1%mlijeku/PBS/Tw. Omjer antitjela i mlijeka je 1:500. Posudu s membranom potrebno je prekriti sa aluminijskom folijom, kako bi se spriječilo isparavanje. Memebrana se ostavlja dva sata na sobnoj temperaturi. Poslije dva sata, membranu je potrebno tri puta isprati sa PBS/Tw po pet minuta, prije dodatka sekundarnog antitjela.

Kao sekundarno antitijelo koristi se goat-anti mouse IgG-POD, također razrjeđen u 1%mlijeku/PBS/Tw. Omjer antitjela i mlijeka je 1:5000. Membrana se ostavlja jedan sat na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena, potrebno je membranu tri puta isprati sa PBS/Tw po pet minuta, te jednom sa PBS-om, kako bi uklonili Tween koji će, u protivnom, dati velik pozadinski šum na slici. Supstrat se sastoji od jednakog omjera peroksida i luminola, te se na membranu dodaje, nakon što se postavi na keramičku pločicu, te se ostavi pet minuta. Višak peroksida i luminola se uklanja, te se membrana prekriva sa prozirnom folijom, nakon čega je spremna za slikanje.

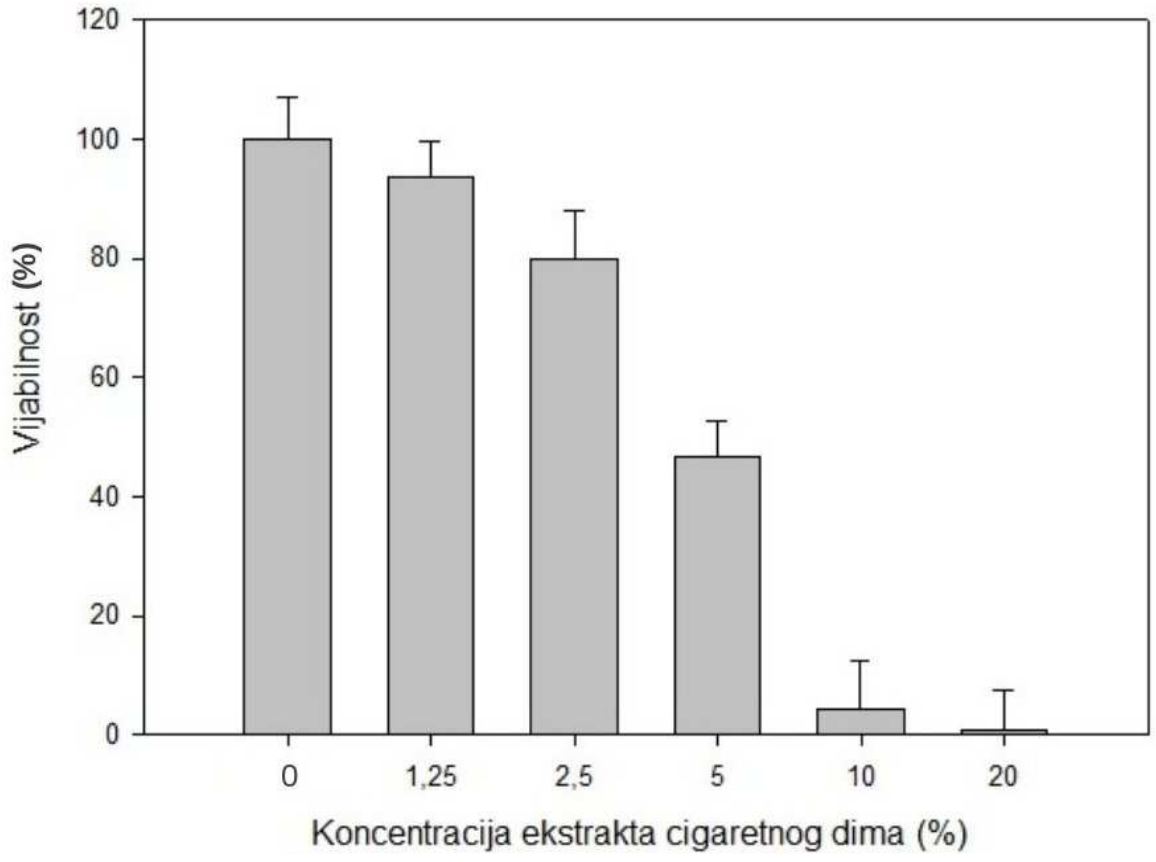
Slikanje se vrši pomoću Multiimage light Cabinet (Alpha Innotech), te sa računalnim programom Alpha View. Standard se slika pomoću reflektivnog bijelog svjetla, dok se za

uzorke koristi opcija Chemiluminescent. Kako bi saznali da li je ista količina proteina u svakom uzorku, te da razlika u rezultatima nije uzrokovana nejednakom količinom proteina, ponavljamo cijeli postupak, osim što ovaj put kao primarno antitijelo koristimo anti-aktin, u istom omjeru, 1:500. Sekundarno antitijelo, supstrat i slikanje, rade se na isti inačin kao i za anti-PAR.

3. REZULTATI

3.1. TEST VIJABILNOSTI STANICA (MTT TEST)

Stanična kultura A549 tretirana je sa različitim koncentracijama cigaretnog dima, i to sa 1.25, 2.5, 5, 10 i 20%, u trajanju od 24 sata. Povećanje koncentracije cigaretnog dima dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolne stanice. Najveće smanjenje vijabilnosti očituje se pri tretmanima od 10 i 20%., te se njihova vijabilnost smanjila za 95.84 i 99.17%. Ostali tretmani također su doveli do smanjenja vijabilnosti i to 1.25% za 6.25%, 2.5% za 20.21% i 5% za 53.34%. Na Slici 3. prikazane su srednje vrijednosti od četiri replike zajedno sa standardnom devijacijom.



Slika 3. Vijabilnost stanične kulture A549 mjerene MTT testom nakon izlaganja ekstraktu cigaretnog dima (0 – 20%) kroz 24 sata.

Također je izvedena i statistička analiza MTT testa čija je svrha dokazati da li postoji statistički značajna razlika između 0 % cigaretnog dima i tretmana. Napravljen je dvosmjerni t-test gdje su uspoređene vrijednosti kontrole u sve četiri replike sa vrijednostima tretmana, te su dobivene P vrijednosti. Za P vrijednost manju od 0.05 smatra se da postoji statistički značajna razlika. Tablica 1. prikazuje rezutate t-testa izrađenog u Microsoft Office Excel-u, te pokazuje da u usporedbi sa kontrolom, tretman od 1.25% nema statistički značajnu razliku, dok svi ostali tretmani imaju.

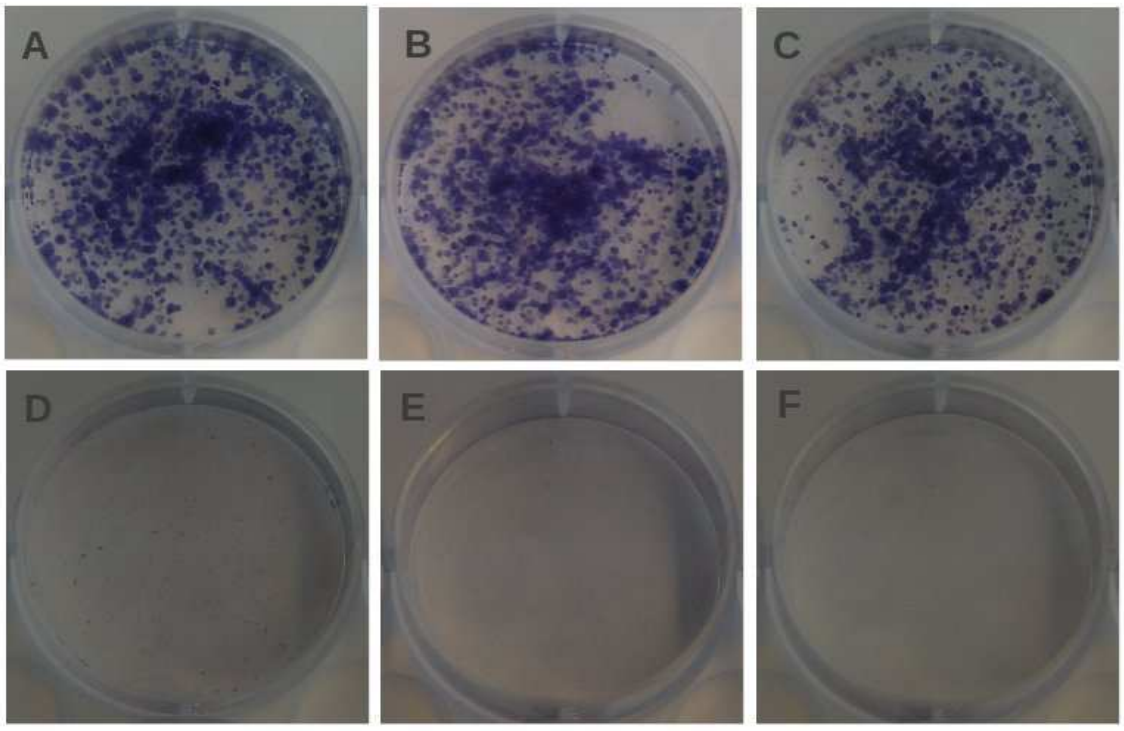
Tablica 1. Statistička analiza MTT testa, dvosmjerni t-test.

	Koncentracija cigaretnog dima				
Kontrola	1.25%	2.5%	5%	10%	20%
95.4166666666667	94.5833333333333	79.5833333333333	43.75	-1.25	-2.08333333333334
100.416666666667	92.0833333333333	72.0833333333333	44.5833333333333	2.91666666666666	0.416666666666667
109.583333333333	101.25	91.25	55.4166666666667	16.25	10.4166666666667
94.5833333333333	87.0833333333333	76.25	42.9166666666667	-1.25	-5.41666666666667
P vrijednost	0.217121	0.00934*	0.0000226*	0.00000203*	0.000000887*

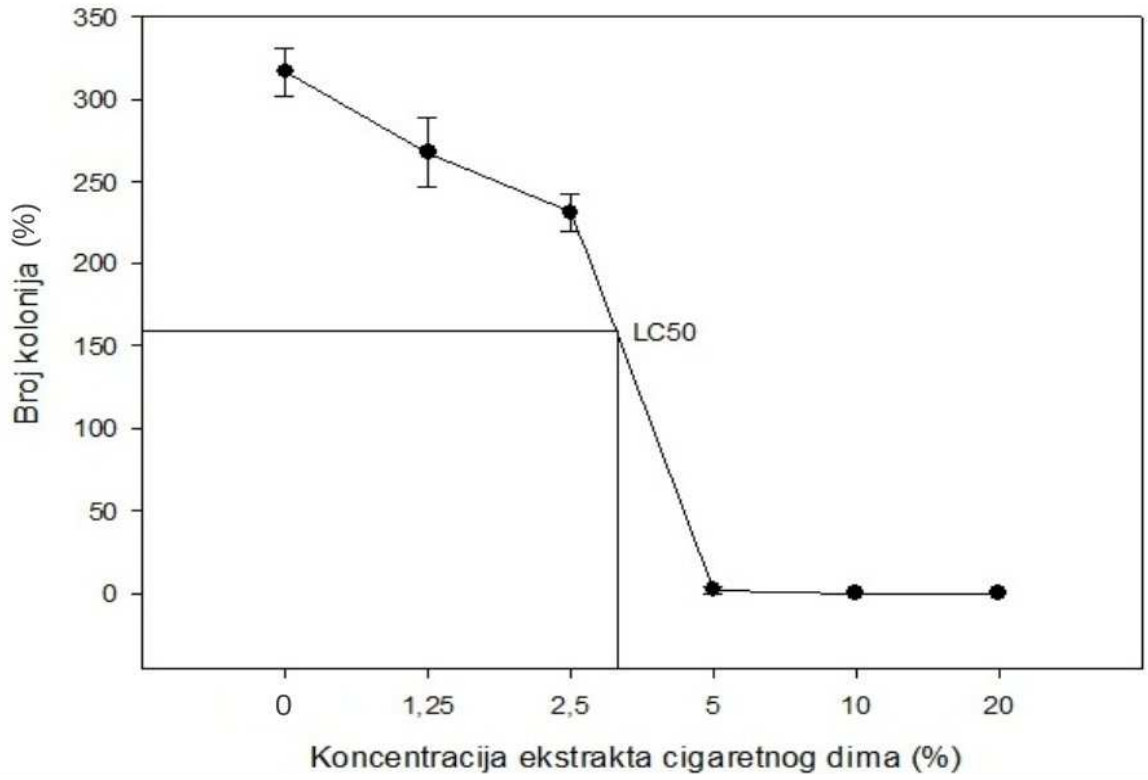
* značajna razlika

3.2. KLONOGENIČNI ESEJ

U svrhu daljnjeg proučavanja utjecaja cigaretnog dima na staničnu kulturu A549, načinjen je klonogenični esej. Kao i kod vijabilnosti stanica došlo je do smanjenja broja staničnih kolonija povećanjem koncentracije ekstrakta cigaretnog dima. Stanice tretirane sa 10 i 20% ekstrakta cigaretnog dima nisu preživjele u vremenu tretmana, dok je samo nekoliko stanica tretiranih sa 5% ekstrakta cigaretnog dima uspjelo preživjeti tretman tj. u odnosu na kontrolu, došlo je do smanjenja od 99.27%. Ostali tretmani, od 1.25 i 2.5% također su doveli do smanjenja staničnih kolonija u odnosu na kontrolu i to za 15.46 i 26.92%. Na Slici 4. prikazani su po jedan reprezentativni primjer, od tri replike, svakog pojedinog tretmana. Također stanične kolonije su izbrojane u svakom bunarčiću, te je načinjen grafički prikaz (Slika 5.) koji prikazuje srednje vrijednosti svakog tretmana, standardnu devijaciju kao i letalnu koncentraciju za 50% staničnih kolonija (LC50).



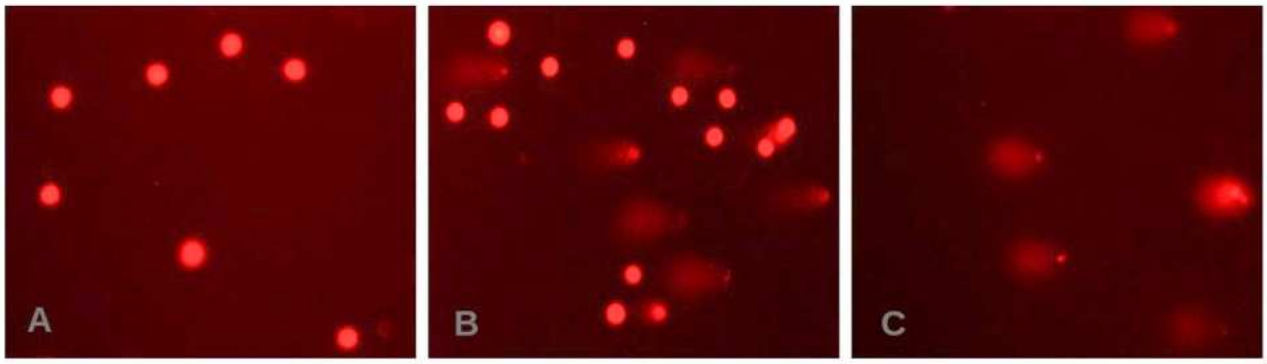
Slika 4. Klonogenični esej. Tretmani ekstraktom cigaretnog dima: A – 0%, B – 1.25%, C – 2.5%, D – 5%, E – 10%, F – 20%. (Fotografirala Ivana Mauzer)



Slika 5. Klonogenični esej. Prikazani su brojevi preživjelih kolonija stanične kulture A549 pri tretmanom različitim koncentracijama ekstrakta cigaretnog dima (0 – 20%). Letalna koncentracija (LC50) ekstrakta cigaretnog dima iznosi oko 3%.

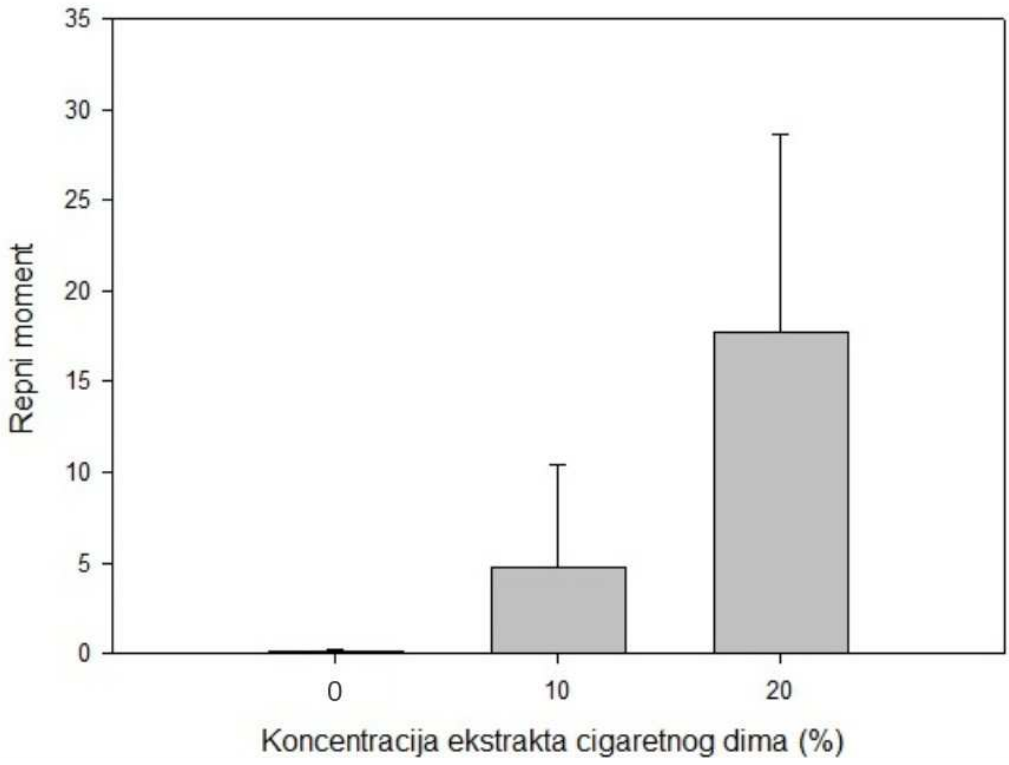
3.3. KOMET TEST

Pomoću testa vijabilnosti stanica i klonogeničnog eseja, pokazano je da su najveća oštećenja stanica pri tretmanima od 10 i 20%. Stoga je načinjen komet test samo sa ove dvije koncentracije ekstrakta cigaretnog dima. U kontrolnom uzorku sve su stanice normalnog kružnog oblika, dok su u uzorcima tretiranim sa 10 i 20% ekstrakta cigaretnog dima, neke ili sve stanice u obliku kometa (Slika 6.), što znači da je molekula DNA oštećena, te su se pod utjecajem električne struje fragmenti odvojili od jezgre, te na slikama izledaju kao "rep" kometa.



Slika 6. Komet test. Tretmani ekstraktom cigaretnog dima: A – 0%, B – 10%, C – 20%. (Fotografirala Ivana Mauzer)

Sa slika načinjenih pod mikroskopom, izmjereno je po 50 kometa za svaki uzorak, te je izračunata srednja vrijednost repnog momenta kao i standardna devijacija (Slika 7.). Repni moment izražava se pomoću dužine repa kometa i postotka DNA fragmenata koji se nalaze u repu, tj. veći repni moment označava veća oštećenja na molekuli DNA. Povećanjem koncentracije ekstrakta cigaretnog dima dolazi do povećanja repnog momenta, tj. veća količina molekule DNA biva fragmentirana.

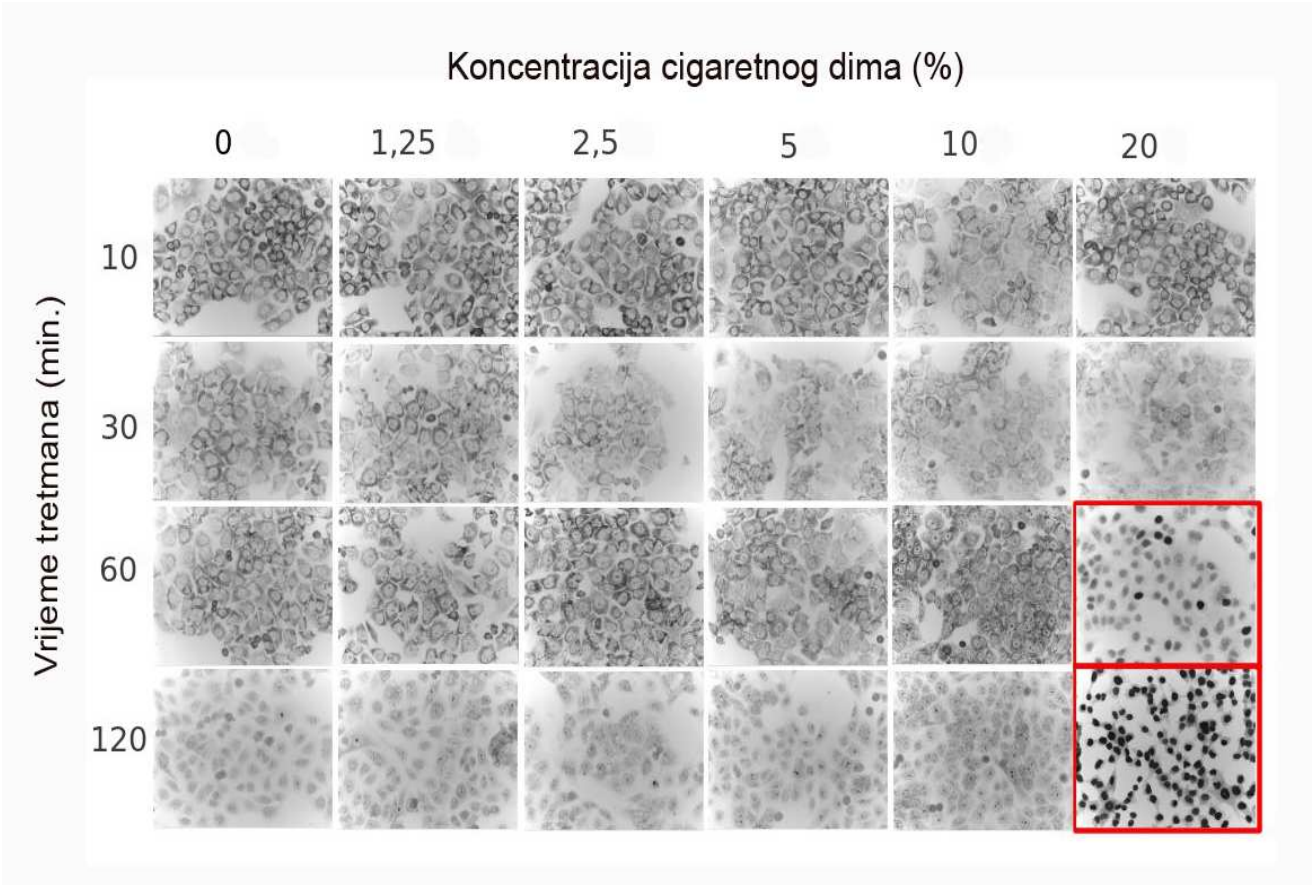


Slika 7. Komet test izražen repnim momentom uz različite koncentracije ekstrakta cigaretnog dima (0, 10 i 20%).

3.4. IMUNOCITOKEMIJA

PARP je nuklearni enzim koji se aktivira pri oštećenju stanica, te su stanice tretirane različitim koncentracijama ekstrakta cigaretnog dima u različitim vremenskim periodima kako bi se odredilo pri kojoj koncentraciji i vremenu tretmana dolazi do aktivacije enzima PARP.

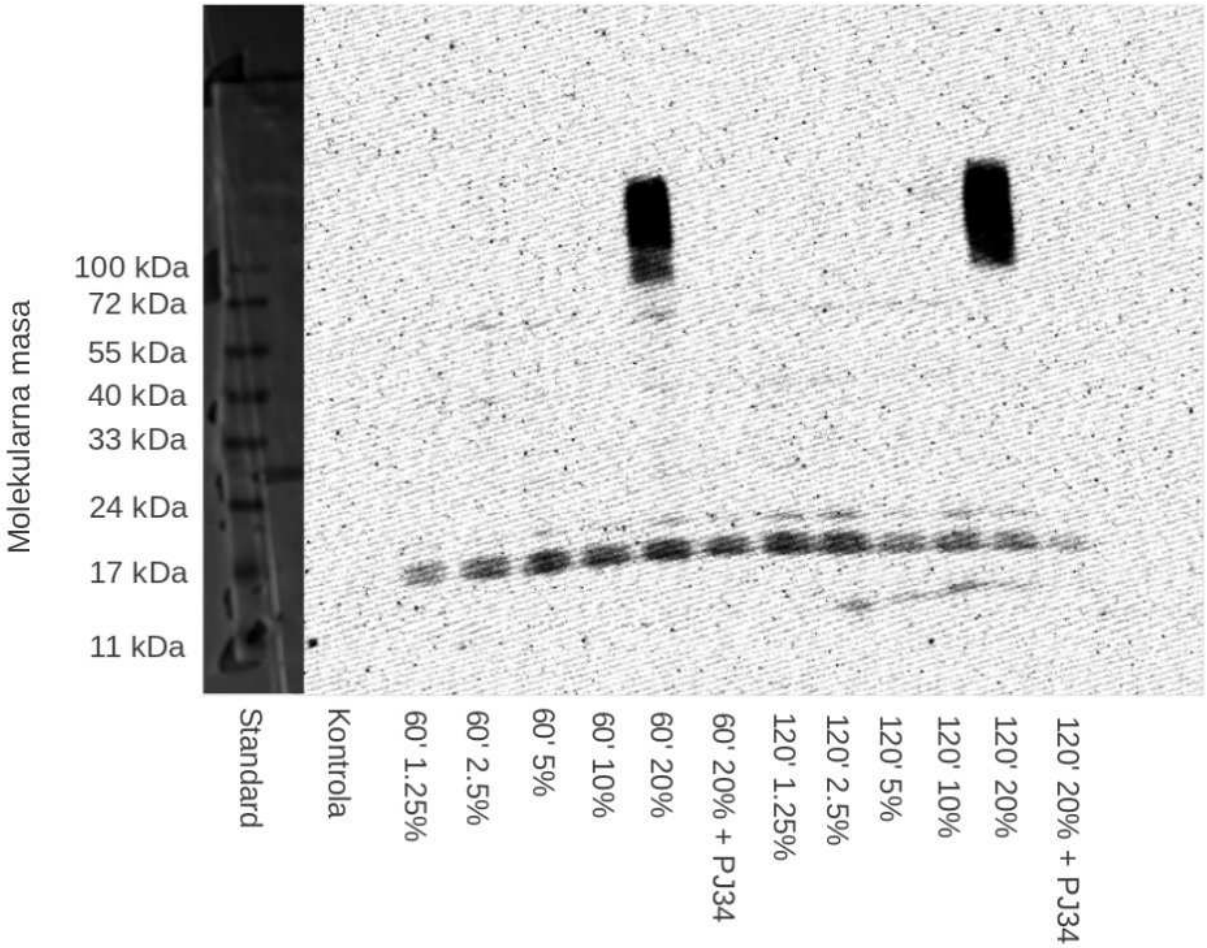
Stanice su tretirane koncentracijama od 1.25, 2.5, 5, 10 i 20%, te na 10, 30, 60 i 120 minuta. Najviša aktivacija PARP nuklearnog enzima uočena je pri tretmanu od 20% ekstrakta cigaretnog dima u vremenskom trajanju od 120 minuta (Slika 8.). Područja u jezgri obojena crno označavaju aktivirani PARP. Do obojenja je također došlo i u tretmanu od 20% ekstrakta cigaretnog dima u vremenskom trajanju od 60 minuta, ali je manjeg intenziteta. Kod ostalih tretmana nije došlo do aktivacije enzima PARP.



Slika 8. Imunocitokemijska analiza stanica tretiranih ekstraktom cigaretnog dima (0 – 20%) u različitim vremenskim periodima.

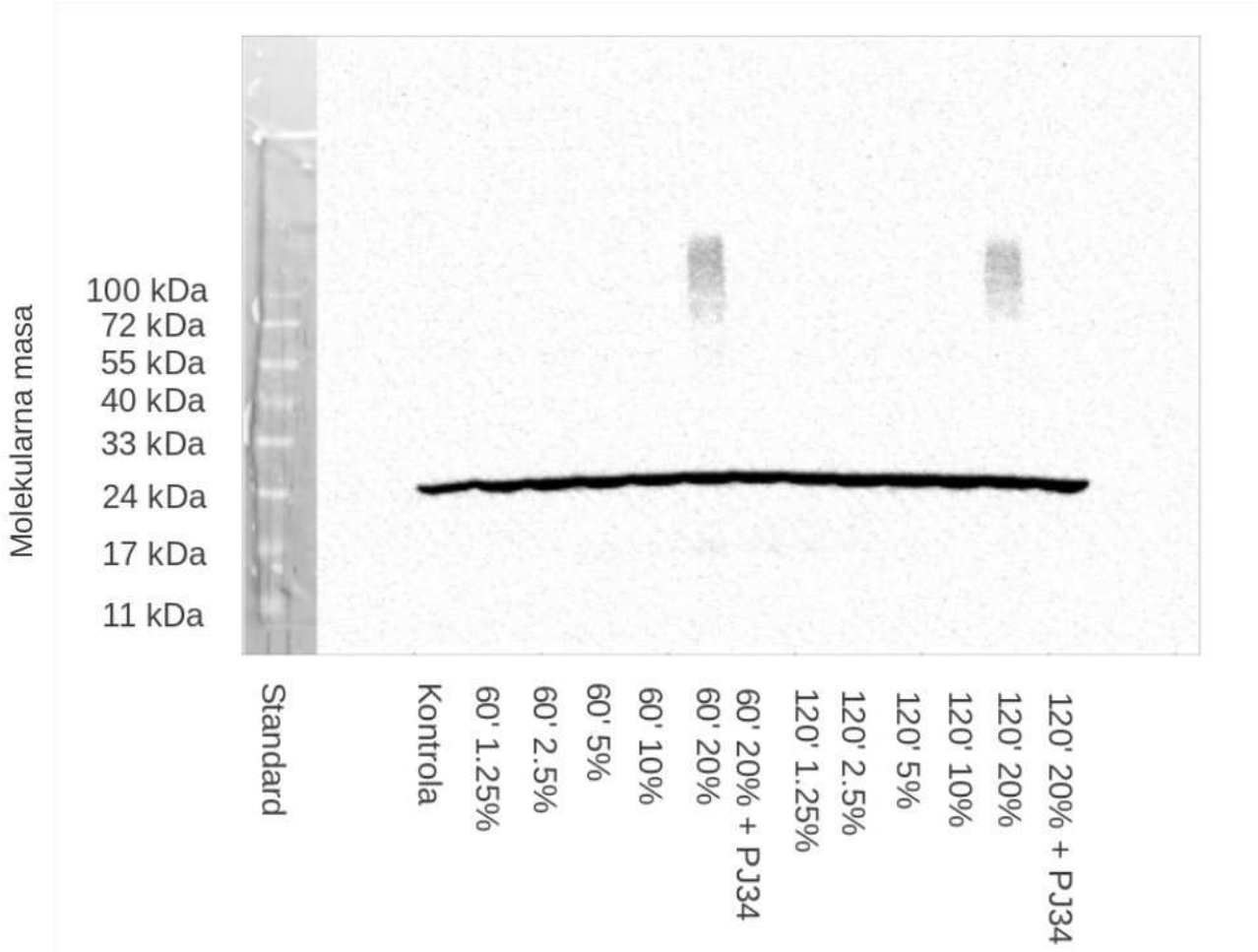
3.5. WESTERN BLOT

Pomoću imunocitokemijske analize aktivacije PARP enzima, dokazano je da se isti aktivira pri tretmanu od 20% ekstrakta cigaretnog dima, stoga je izvedena detaljnija analiza pomoću Western blot metode. Stanice su tretirane ekstraktom cigaretnog dima u koncentracijama od 1.25, 2.5, 5, 10 i 20%, u vremenskom trajanju od 60 i 120 minuta. Također su dodatne stanice predtretirane sa inhibitorom PARP enzima, PJ34, kao i sa 20% ekstrakta cigaretnog dima. Rezultati su prikazani na slici 9, te se na području iznad 100 kDa i pri tretmanu od 20% vidi crno obojeno područje koje predstavlja aktivaciju PARP enzima. Nadalje, područja desno od toga predstavljaju stanice predtretirane sa inhibitorom enzima PARP, te se na tim područjima ne vidi nikakvo obojenje.



Slika 9. Western blot stanica tretiranih ekstraktom cigaretnog dima (0 – 20%, 20%+PJ34) u vremenskim razdobljima od 60 i 120 minuta. PARP enzim identificiran je 10H protutjelom. Nakon elektroforeze vidljiv je na području molekularne mase približno 100kDa (usporedba sa standardom). PJ34 - inhibitor PARP-a.

Na istu membranu dodan je i aktin pomoću kojeg dokazujemo da se u svakom uzorku nalazi ista količina proteina. Dokazuje se intenzitetom crnog obojenja na membrani, te se na slici 10 jasno vidi kako svaki uzorak ima istu količinu proteina.



Slika 10. Western blot stanica tretiranih ekstraktom cigaretnog dima (0 – 20%, 20%+PJ34) sa dodatkom aktina u vremenskim razdobljima od 60 i 120 minuta. Aktin se vidi kao crno obojenje. PJ34 – inhibitor PARP-a.

4. RASPRAVA

Pušenje se smatra glavnim uzrokom plućnih bolesti (95%), kao što je na primjer emfizem pluća, no točni mehanizmi nastanka ovakvih oboljenja još nisu poznati (S. Banerjee i sur., 2008). U ovom radu istražen je utjecaj cigaretnog dima na vijabilnost, proliferaciju, oštećenja molekule DNA te aktivaciju PARP enzima, stanica adenokarcinoma pluća tipa II, A549.

Kao i kod *Z.X. Jiao i sur.*, MTT test je pokazao da tretman sa ekstraktom cigaretnog dima dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica, ovisno o dodanoj dozi. Povećanjem doze dolazi do smanjenja vijabilnosti tretiranih stanica. Pri tretmanima od 10 i 20% dolazi do najznačajnijeg smanjenja vijabilnosti, vjerojatno zbog citotoksičnog utjecaja nekih komponenti cigaretnog dima.

Isti tretmani pokazali su se kao štetni i u klonogeničnom eseju, gdje je procjenjeno preživljavanje stanica nakon tretmana cigaretnim dimom. Pri tretmanima od 10 i 20% nije preživjela niti jedna stanica, dok ih je pri tretmanu od 5% preživjelo samo nekoliko. Pomoću ovog eseja procjenjena je i letalna koncentracija za 50% tretiranih stanica (LC50) koja iznosi oko 3% cigaretnog dima. Isti esej korišten je u radu *X. Liu i sur.* gdje stanice stanične kulture HBEC tretirane ekstraktom cigaretnog dima od 5% i 10%. Kao i u našem radu došlo je do smanjena broja staničnih kolonija, ali u manjoj mjeri, vjerojatno zbog razlike u kulturi stanica.

Cigaretni dim dokazano oštećuje molekulu DNA, što se vrlo jednostavno može pokazati pomoću komet testa. Stanice su tretirane koncentracijama cigaretnog dima koje su se u prijašnjim testovima pokazale kao one koje stvaraju najveća oštećenja. Pri tretmanu od 20% gotovo svaka stanica ima značajna oštećenja DNA, što potvrđuje visok repni moment. Budući da cigaretni dim sadrži više od 4 000 kemijskih komponenti, ne uzrokuje ujednačena oštećenja, poput na primjer vodikovog peroksida (H_2O_2), već uzrokuje "nejednaka" oštećenja, što pri izražavanju repnog momenta daje visoku standardnu devijaciju. Zbog toga se smatra da ako standardna devijacija nije visoka nešto u postupku izrade metode nije u redu. *S. Carnevali i sur.* tretirali su staničnu kulturu HFL-1 sa 10% ekstrakta cigaretnog dima te su također dobili povećanje fragmentacije molekule DNA koje je dokazano komet testom.

Do aktivacije PARP-a, kao što je prije napomenuto, dolazi, između ostalog, i zbog oštećenja na molekuli DNA. Komet testom dokazano je da tretiranjem stanica cigaretnim dimom dolazi do oštećenja na molekuli DNA, stoga su provedeni testovi kojima se može dokazati aktivacija PARP-a. Western blot analizom i imunocitokemijom dokazivan je PARP iz razloga što se on aktivira pri raznim oštećenjima u stanici. Za njegovo djelovanje potreban je NAD^+, čiji je

nedostatak u stanici vrlo nepovoljan a preaktivacija PARP-a također ima loše posljedice za stanicu. Iz rezultata imunocitokemije i Western blota, jasno se vidi da je do aktivacije PARP-a došlo tek pri visokim koncentracijama te pri dugom izlaganju stanica cigaretnom dimu. Imunocitokemijom dokazana je prisutnost PARP-a u ovisnosti o koncentraciji i vremenu tretmana, i to također pri visokim koncentracijama ekstrakta cigaretnog dima, od 10 i 20% u vremenu od 60 i 120 minuta, gdje je PARP prikazan crnim obojenjem u jezgri. Ostali tretmani također pokazuju crna obojenja, ali van jezgre, te njihov uzrok nije poznat. Western blot analizom dokazana je prisutnost PARP-a i to pri tretmanu od 20% nakon 60 minuta, te pri tretmanu od 20% nakon 120 minuta. Istraživanja su pokazala da je PARP uključen i u mehanizme apoptoze i nekroze. U slučaju manjih oštećenja DNA, dolazi do aktivacije PARP-a koji pokreće mehanizam popravka DNA. Ako popravak nije uspješan, pokreće se mehanizam p53 enzima i stanica odlazi u apoptozu. Međutim, ako su oštećenja na DNA prekomjerna, dolazi do preaktivacije PARP-a koji će svojom aktivnošću potrošiti sav NAD^+ i ATP, a to će pokrenuti nekrozu, doći će do izlaska staničnog materijala, što može potaknuti i upalu (L. Virag i C. Szabo, 2002). Kada bi se preaktivacija PARP-a mogla inhibirati moglo bi se spriječiti mnoge bolesti. Iz tog razloga je pri Western blot analizi korišten i inhibitor PARP-a, PJ34, koji je uspješno inhibirao aktivaciju PARP-a pri tretmanu od 20% u 60 i 120 minuta. Ovakva saznanja mogu pomoći u daljnjem istraživanju PARP ezima, te u traženju ljekova za bolesti vezane s oštećenjima na molekuli DNA.

5. ZAKLJUČAK

Analizom utjecaja cigaretnog dima na staničnu kulturu A549 dokazana je njegova štetnost jer uzrokuje:

- Smanjenje vijabilnosti stanica
- Smanjenje proliferacije stanica
- Oštećenje molekule DNA
- Aktivacija enzima PARP

Također je pokazano je da preaktivacija PARP enzima nepovoljna za stanicu, budući da se u tom slučaju potroši sav NAD^+, te stanica podliježe nekrozi.

LITERATURA

Aust A.E. 2004. Reactive oxygen/nitrogen species. Generation and reactions in the lung. In: Oxygen/Nitrogen Radicals. Lung Injury and disease. C. Lenfant, 2004. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 529 pp.

Balaban R. i sur. 2005. Mitochondria, Oxidants, and Aging. Cell. Vol. 120, 483 – 495.

Banerjee S. i sur. 2008. Cellular and molecular mechanisms of cigarette smoke – induced lung damage and prevention by vitamin C. Journal of Inflammation. 5:21.

Carnevali S. i sur. 2003. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 284: 955 – 963.

Hoshino Y. i sur. 2001. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 281: L509 – L516.

Jiao Z-X. i sur. 2006. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. Acta Physiologica Sinica. 58(3): 244-254.

Kode A. i sur. 2006. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. Respiratory Reaserch. 7:132

Liu X. i sur. 2005. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol Vol 33.pp 121-129.

Luppi F. i sur. 2005. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathion. Respiratory Reaserch. 6:140

MacNee W. i Rahman I. 2004. Oxidative stress in cronic obsrtuctive pulmonary disease. In: Oxygen/Nitrogen Radicals. Lung Injury and disease. C. Lenfant, 2004. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 529 pp.

Pryor W. 1997. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environmental Health Perspectives. 105:4.

Rahman I. 2004. Smoking – Induced Inflammation, Injury, and Disease. Molecular Mechanisms. In: Oxygen/Nitrogen Radicals. Lung Injury and disease. C. Lenfant, 2004. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 529 pp.

Rice-Evans C.A. 1994. Formation of free radicals and mechanisms of actiona in normal biochemical processes and pathological states. In: Free radical damage and its control. C.A. Rice-Evans.1994. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Nizozemska. 392 pp.

Slater T. 1984. Free-Radical mechanisms in tissue injury. Biochem J. 222, 1-15.

Toro J. i Rodrigo R. 2009. Oxidative stress: Basic Overview. In: Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease. R. Rodrigo. Nova Biomedical Books, Inc. New York, USA. 358 pp.

Virag L. i Szabo C. 2002. The Therapeutic potential of Poly (ADP – ribose) Polimerase inhibitors. Pharmacol Rev 54: 375 – 429.

TABLICA SKRAĆENICA

ROS	Reactive oxigen species (reaktivne kisikove čestice
RNS	Reacitve nitrogen species (reaktivne dušikove čestice
NADPH	Nikontinamid adenin dinukleotid fosfat reducirani
SOD	Superoksid dismutaza
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid reducirani
FADH	Flavin adenin dinukleotid reducirani
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
4-HNE	4 - hidroksinonenal
MDA	Malondialdehid
PARP	Poli (ADP – riboza) polimeraza
PARG	Poli (ADP – riboza) glikohidraza
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffered saline
HBSS	Hank's buffered salt solution
DMSO	Dimetil sulfoksid
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
PMSF	Fenilmetansulfonil florid
TEMED	Tetrametiletilendiamin
AMPER	Amonij persulfat
SDS	Natrijev dodecil sulfat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid
DAPI	4',6 - diamino-2-fenilindol
BSA	Bovine serum albumine (Goveđi serumski albumin
ATP	Adenin tri fosfat
HBEC	Ljudske bronhialne endotelne stanice
HFL-1	Ljudski fetalni plućni fibroblasti
PJ34	Inhibitor PARP-a