Utjecaj ekstrakata biljaka Moltkia petraea i Micromeria croatica na zaštitu telomera, stanično starenje i proliferaciju stanica MJ90

Cedilak, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:232942

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Matea Cedilak

Utjecaj ekstrakata biljaka *Moltkia petraea* i *Micromeria croatica* na zaštitu telomera, stanično starenje i proliferaciju stanica MJ90

Diplomski rad

Zagreb, 2015

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Institut „Ruđer Bošković“, pod vodstvom Prof. dr. sc. Ivice Rubelja, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Veliko hvala mojem mentoru Prof. dr. sc. Ivici Rubelju na znanju i vremenu koje je uložio u mene te na svim savjetima i razgovorima koji su mi omogućili da što bolje pristupim svojem prvom pravom eksperimentalnom radu. Uistinu sam zahvalna i na iskazanom povjerenju te ugodnom okruženju svih članova Laboratorija za molekularnu i staničnu biologiju.

Također veliko hvala dr. sc. Nikolini Škrobot Vidaček na pomoći, savjetima, prenesenom znanju te svakako na strpljenju i razgovorima.

Posebno hvala dr. sc. Branki Salopek Sondi i dr. sc. Dunji Šamec, te ostalim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju, na iskustvu i znanju koje su podijelili samnom, te što su mi omogućili izradu dijela diplomskog rada u svom laboratoriju.

Hvala i dr. sc. Maji Matulić na podršci i vremenu uloženom u ovaj diplomski rad.

Također želim zahvaliti dr. sc. Dariju Kremeru na identifikaciji i prikupljanju biljnog materijala korištenog u ovom diplomskom radu.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri, koji su uvijek bili uz mene i podržavali sve moje odluke te mi omogućili da budem ono što želim biti.

Hvala svim mojim prijateljima na lijepim trenucima provedenim zajedno, jer samo takve i pamtim. Zbog vas se ovo studiranje činilo puno kraćim, prekratkim zapravo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj ekstrakata biljaka *Moltkia petraea* i *Micromeria croatica* na zaštitu telomera, stanično starenje i proliferaciju stanica MJ90

MATEA CEDILAK

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Telomere imaju glavnu ulogu u zaštiti strukture kromosoma. Također štite krajeve kromosoma od međusobnih fuzija te imaju ulogu „brojača dioba“ jer se sa svakom diobom stanice one skraćuju. Kada telomere dostignu kritičnu duljinu, stanica ulazi u permanentni zastoj staničnog ciklusa (senescencija), stoga su telomere najbitniji regulator staničnog starenja. Zaštitom telomera od oštećenja može se spriječiti naglo skraćivanje telomera, kao i odgoditi ulazak stanice u senescenciju. U ovom sam radu istražila utjecaj ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na zaštitu telomera te time i na stanični rast i starenje. Stanice su tretirane ekstraktima kroz dulji period rasta u staničnoj kulturi te je za određivanje udjela starih stanica korištena metoda bojanja *SA-β-gal*, a za određivanje udjela stanica u proliferaciji obilježavanje DNA s BrdU. Stanicama je također izmjerena duljina telomera metodom hibridizacije po Southernu. Stanice tretirane ekstraktima pokazale su manji udio starih stanica kao i dulje telomere u odnosu na kontrolne stanice te sam zaključila da ekstrakti ovih biljaka usporavaju stanično starenje, vjerojatno putem zaštite proteina ili DNA stanice.

(54 stranice, 15 slika, 5 tablica, 59 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: skraćenje telomera, senescencija, ekstrakti *M. croatica* i *M. petraea*
Voditelj: Dr. sc. Ivica Rubelj, viši znanstveni suradnik
Suvoditelj: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
Dr. sc. Renata Šoštarić, doc.
Dr. sc. Ivančica Ternjej, izv. prof.
Rad prihvaćen: 05.02.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

MATEA CEDILAK

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Moltkia petraea and _Micromeria croatica_ plant extracts influence on protection of telomeres, senescence and proliferation of MJ90 cells

The main role of telomeres is the protection of the chromosome structure. They also protect the chromosome ends from fusions, and since they shorten with every cell division they serve as counters of population doublings. Once the telomeres reach their critical length, the cell enters permanent and irreversible cell cycle arrest called senescence which makes them the most important regulators of the cellular ageing. By protecting the telomeres we could prevent their abrrupt shortening and also postpone the cell senescence. Effect of the plant extracts *Micromeria croatica* and *Moltkia petraea* on the protection of telomeres and therefore on the cell growth and ageing, was the main goal of this research. Cells were treated with the extracts for a longer period of time in the cell culture. SA-β-gal staining was used to evaluate the cell senescence, and BrdU labelling to examine cell proliferation. The telomere length was measured using Southern blot analysis. Cells treated with plant extracts exibited lower number of senesced cells and slightly longer telomeres compared to the non-treated control cells. This supports the conclusion that the extracts inhibit cellular aging, probably through the protection of the cell DNA and protein structures.

(54 pages, 15 figures, 5 tables, 59 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library
Key words: telomere shortening, senescence, *M. croatica* and *M. petraea* extracts
Supervisor: Dr. Ivica Rubelj, Senior Research Associate
Cosupervisor: Dr. Maja Matulić, Associate Prof.
Reviewers: Dr. Maja Matulić, Associate Prof.
Dr. Renata Šoštarić, Assistant Prof.
Dr. Ivančica Ternjej, Associate Prof.
Thesis accepted: 05.02.2015.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 *Micromeria croatica* 2

1.2 *Moltkia petraea* 3

1.3 Reaktivni radikali kisika 4

1.3.1 Nastanak reaktivnih radikala kisika 4

1.3.2 Oštećenja bioloških molekula 5

1.4 Antioksidansi 6

1.5 Telomere 7

1.5.1 Struktura telomera 7

1.5.2 Telomerni proteini 8

1.5.3 Senescencija i telomere 10

1.5.4 Naglo skraćivanje telomera 11

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 13

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1 Priprava biljnih ekstrakata 16

3.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata 16

3.3 Kultura stanica 17

3.3.1 Odmrzavanje stanica 18

3.3.2 Presađivanje stanica i određivanje broja dioba 18

3.4 Određivanje starih stanica metodom bojanja pomoću SA-β-gal 19

3.5 Obilježavanje stanica s BrdU 21

3.6 Hibridizacija po Southernu 22

3.6.1 Izolacija DNA 22

3.6.2 Mjerenje koncentracije izolirane DNA 23

3.6.3 Uparavanje DNA uzoraka 23

3.6.4 Elektroforeza i prijenos DNA na membranu 24

3.6.5 Hibridizacija 25

3.6.6 Razvijanje filma 26

4. REZULTATI 27

4.1 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* 28

4.2 Djelovanje ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* na staničnu proliferaciju 29

4.3 Djelovanje ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na stanično starenje 30

4.4 Djelovanje ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na proliferaciju stanica 34

4.5 Analiza duljine telomera 36

5. RASPRAVA 39
6. ZAKLJUČCI 44
7. LITERATURA 46
8. ŽIVOTOPIS 53

1. UVOD

1.1 *Micromeria croatica*

Biljke roda *Micromeria* pripadaju porodici Lamiaceae i obuhvaćaju 70-ak vrsta od čega se njih 9 nalazi na području Hrvatske (Kremer i sur. 2011). Rasprostranjene su na makronezijskom i mediteranskom području, u sjevernoj Africi, Indiji i Kini (Bräuchler i sur. 2008). Biljke ovog roda imaju tradicionalno široku primjenu u kuhinji te kao insekticidi i herbicidi. Smatra se da imaju pozitivan učinak kod liječenja bolesti srca, glavobolje, prehlade, rana te kožnih infekcija (Duru i sur. 2004; Stojanović i Palić 2008). Najpoznatiji predstavnici ovog roda u Hrvatskoj su svakako endemske *M. croatica* (Pers.) Schott i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch dok je *M. juliana* (L.) Bentham ex Reichenb karakteristična za cijelo mediteransko područje.

Micromeria croatica (hrvatska bresina) nađena je na području Kleka, Velebita, Poštaka, Dinare, Like, Krbave, donjeg dijela kanjona Cetine te u susjednim zemljama alpskog i subalpskog područja (Šamec 2013). Raste na visini od 150 do 2000 m. To je višegodišnja biljka veličine od 5 do 30 cm ružičasto-ljubičastih cvjetova i dlakavih listova bez peteljke (Kremer i sur. 2011).



Slika 1. ***Micromeria croatica*** (Nikolić i sur., 2001).

M. croatica, kao i ostale vrste tog roda, imaju dokazano jako antioksidacijsko djelovanje povezano s udjelom polifenolnih spojeva (Nikolić i Rešetnik 2007; Šamec 2013). U biljci *M. croatica* identificirano je nekoliko polifenolnih spojeva, a to su flavonoidi, fenolne kiseline ružmarinska i klorogenska te tanini. Ružmarinska kiselina je najzastupljeniji spoj, a ukupni udio fenolnih kiselina iznosi 6,84%, iza čega slijede tanini s udjelom od 6,08% te flavonoidi s 0,01% (Nikolić i Rešetnik 2007). Polifenoli se danas sve više istražuju zbog svoje velike potencijalne primjene u medicini (Šamec 2013).

1.2 *Moltkia petraea*

Rod *Moltkia* pripada porodici Boraginaceae. U Hrvatskoj nalazimo samo jednu vrstu roda *Moltkia* (lasinje) a to je *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. dok u svijetu postoji 5 vrsta rasprostranjenih kroz istočni Mediteran. U Hrvatskoj je *M. petraea* rasprostranjena duž obale središnje Dalmacije, prema jugu te na otocima Korčula, Mljet i Šipan (Šamec 2013). Ova vrsta spada u ilirsko-balkanske endemične vrste jer ju, osim u Hrvatskoj, nalazimo i u Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Albaniji, Makedoniji i Grčkoj gdje se očuvala zahvaljujući zaštićenosti unutar klanaca tih područja tokom zadnjeg ledenog doba (Georgiou i sur. 1999). Raste na vapnenačkoj podlozi na stijenama i liticama od 10 m nadmorske visine sve do 2000 m nadmorske visine. Preferira osunčane i tople položaje, a raste kao gusti grm visine do 40 cm. Listovi su zavrnutih rubova, a cvjeta u kasno proljeće i ljeti ljubičasto-plavim cjevastim cvijetovima (Zovko Končić i sur. 2010).



Slika 2. *Moltkia petraea* (Nikolić i sur., 2001).

Moltkia sadrži različite polifenolne spojeve. Njihov udio znatno varira u različitim organima biljke, a također ovisi i o lokalitetu na kojem se biljka nalazi. Najveći udio ukupnih polifenolnih spojeva pronađen je u listovima *M. petraea*, stoga sam upravo taj dio koristila za svoje eksperimente. Kava kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u cvjetovima biljke, s koncentracijom od 110,8 do 192,2 μg/g, dok je u listovima najzastupljenija 4-hidroksibenzojeva kiselina s koncentracijama koje variraju od 25,5 do 126,4 μg/g. Ostale zastupljenije fenolne kiseline kod *M. petraea* su protokatehinska, salicilna, gentistična, ferulinska, vanilinska, 4-kumarinska, sinapinska... U najmanjim koncentracijama u oba organa biljke prisutna je siringična kiselina s koncentracijama od 1 do 3,1 μg/g (Zovko Končić i sur. 2010). Sinapinska kiselina nije pronađena u slobodnom obliku već samo u glikozidno vezanoj formi zbog visokog stupnja glikozilacije *in vivo*.

1.3 Reaktivni radikali kisika

Reaktivni radikali kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) su molekule s nesparenim elektronom zbog kojeg mogu sudjelovati u brojnim kemijskim reakcijama, a najpoznatiji su superoksid ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil ($OH^{\bullet}$), peroksil ($RO_2^{\bullet}$), alkoksil ($RO^{\bullet}$) te vodikov peroksid (H_2O_2) (Wiseman i Halliwell 1996). Reaktivni kisikovi radikali mogu biti veoma opasni ukoliko reagiraju s biološkim molekulama kao što su DNA, proteini ili lipidi jer im pri tome mijenjaju strukturu te ih tako oštećuju narušavajući njihovu funkciju.

1.3.1 Nastanak reaktivnih radikala kisika

Ionizirajuće zračenje dovoljno je velike energije da može uzrokovati razmještanje elektrona unutar atoma, a ako se to dogodi na molekuli vode nastanu slobodni kisikovi radikali procesom koji nazivamo radioliza. Iz vode najprije nastane hidroksil, zatim vodikov peroksid te superoksid, pri čemu se u svakom koraku izgubi po jedan elektron. Vodikov peroksid može revertirati u hidroksil primanjem elektrona s iona željeza Fentonovom reakcijom, a željezo se nakon toga obnavlja primanjem elektrona sa superoksidnog radikala (Pecorino 2012).

Slobodni radikali kisika također nastaju i prirodno u stanici njenim aerobnim metabolizmom, odnosno na mitohondrijskim membranama za transport elektrona (Ambrosio i sur. 1993). Ti slobodni radikali češće oštećuju mitohondrijsku DNA koja je puno bliže mjestu njihova nastanka nego jezgrena DNA, a također i zato što ne sadrži zaštitne histone i ima manje efikasne mehanizme popravka. Oštećenja mitohondrijske DNA često su povezana s neurodegenerativnim bolestima. Kada se količina ROS-a u stanici znatno poveća te premašuje mogućnosti obrambenih mehanizama, kažemo da je stanica u stanju oksidativnog stresa (Sharma i sur. 2012).

1.3.2 Oštećenja bioloških molekula

Najčešća oštećenja DNA koja nastaju reakcijom s ROS su točkaste mutacije, pregradnje, delecije, insercije, amplifikacije česte u tumorskim stanicama, te se stoga ROS-evi smatraju i karcinogenima. ROS-evi također mogu mijenjati aktivnost proteina i gena odgovornih za proliferaciju stanica, diferencijaciju i apoptozu čime dolazi do deregulacije ovih procesa (Cerutti 1994). Konvertiraju guanin u 8-hidroksiguanin što može uzrokovati promijenjenu metilaciju citozina, koja je inače veoma bitan mehanizam genske regulacije (Weitzman i sur. 1994). Bitno je naglasiti da različiti ROS-evi uzrokuju drugačija oštećenja, npr. hidroksil može promijeniti strukturu sve četiri dušične baze, dok superoksid i vodikov peroksid uopće ne reagiraju s bazama (Wiseman i Halliwell 1996). Reakcijom hidroksila sa šećerom u DNA nastaju jednolančani lomovi. Hidroksil je jedan od najreaktivnijih kisikovih radikala, ali zato i manje opasan za DNA jer ne stigne ući u jezgru stanice i oštetiti DNA u svom reaktivnom obliku. Iz tog razloga vodikov peroksid puno češće oštećuje DNA budući da, kako nema nesparenih elektrona, ima dovoljno vremena difundirati kroz membranu i ući u jezgru (Pecorino 2012).

ROS-evi oštećuju lipide napadom na dvostruku vezu između dva ugljikova atoma ili estersku vezu između glicerola i masne kiseline te dolazi do peroksidacije lipida. Na taj se način narušava normalna funkcija membranskih i topivih lipida u stanici. Kvantifikacija peroksidacije lipida se često koristi kao indikator oštećenosti staničnih membrana ROS-evima.

Oštećenja na proteinima dijelimo na direktna kao što su nitrozilacija, karbonilacija, stvaranje disulfidnih veza, glutationizacija te indirektna oštećenja konjugacijom s produktima peroksidacije masnih kiselina (Yamauchi i sur. 2008). Posljedica ovakvih oštećenja su modifikacije specifičnih aminokiselina, fragmentacije peptidnog lanca, promijenjen električni naboj proteina te pojačana sklonost proteolizi. Spomenuta karbonilacija proteina koristi se kao indikator opće oštećenosti proteina stanice ROS-evima (Møller i Kristensen 2004). Za oštećenu DNA postoje mnogi mehanizmi popravka, npr. glikozilaze za oksidirane baze. Oštećeni proteini se pak uklanjaju proteazama, a peroksidirani lipidi glutation peroksidazom (Ames i sur. 1993).

1.4 Antioksidansi

Antioksidansi imaju veoma bitnu ulogu u redukciji slobodnih radikala kisika čime se sprječava oksidacija nizvodnih molekula. Antioksidansi imaju posebnu strukturu koja im omogućuje da ostaju nepromijenjeni čak i kada prime nespareni elektron s molekule ROS-a i time ju neutraliziraju. Međutim, moguće je da neka od nastalih oštećenja ostanu nepopravljena, što zatim dovodi do narušavanja raznih funkcija unutar stanice, spomenutih u prethodnom poglavlju. To se posebno događa pri oksidativnom stresu kada razina ROS-a poraste te mehanizmi popravka ne mogu efikasno uklanjati sva nastala oštećenja. Veoma je bitno održavati ravnotežu antioksidansa u tijelu, stoga je potrebno uz endogene antioksidanse, unositi dodatne zdravom prehranom (Ames i sur. 1993). Antioksidansa najviše ima u voću, povrću, žitaricama, tamnoj čokoladi...

Antioksidanse dijelimo na enzimatske i neenzimatske. Neki od najznačajnijih enzimatskih antioksidansa su superoksid dismutaza, katalaza, askorbat peroksidaza i glutation reduktaza. Superoksid dismutaza je metaloenzim zaslužan za dismutaciju $O_2^{\bullet -}$ u H_2O_2 i O_2; nalazi se u citosolu, mitohondrijima, peroksisomima, a kod biljnih stanica i u kloroplastima. Katalaza pak sudjeluje u dismutaciji dvije molekule H_2O_2 u vodu i kisik. To je tetrameran enzim koji sadrži molekulu hema, a najviše ga nalazimo u peroksisomima gdje H_2O_2 nastaje tijekom β-oksidacije masnih kiselina (Del Río i sur. 2006). Askorbat, glutation, karotenoidi i polifenoli su neki od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa. Askorbat je najzastupljeniji antioksidans pronađen u svim tipovima biljnih stanica i veoma je bitan za

zaštitu membrana jer reagira direktno s $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2. Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka sa snažnim antioksidativnim svojstvima zahvaljujući mogućnosti da doniraju elektron ili vodikov atom slobodnim radikalima. Građeni su od aromatskog prstena s –OH ili -OCH_3 supstituentima koji su veoma bitni za njihovu funkciju. Polifenolno zaštitno djelovanje očituje se na nekoliko razina. Mogu kelirati metalne ione, inhibirati peroksidaciju lipida, modificiraju lipidne membrane kako bi bile manje propusne za ROS-eve (Arora i sur. 2000). Polifenoli se danas istražuju zbog velike potencijalne primjene u medicini i farmaciji.

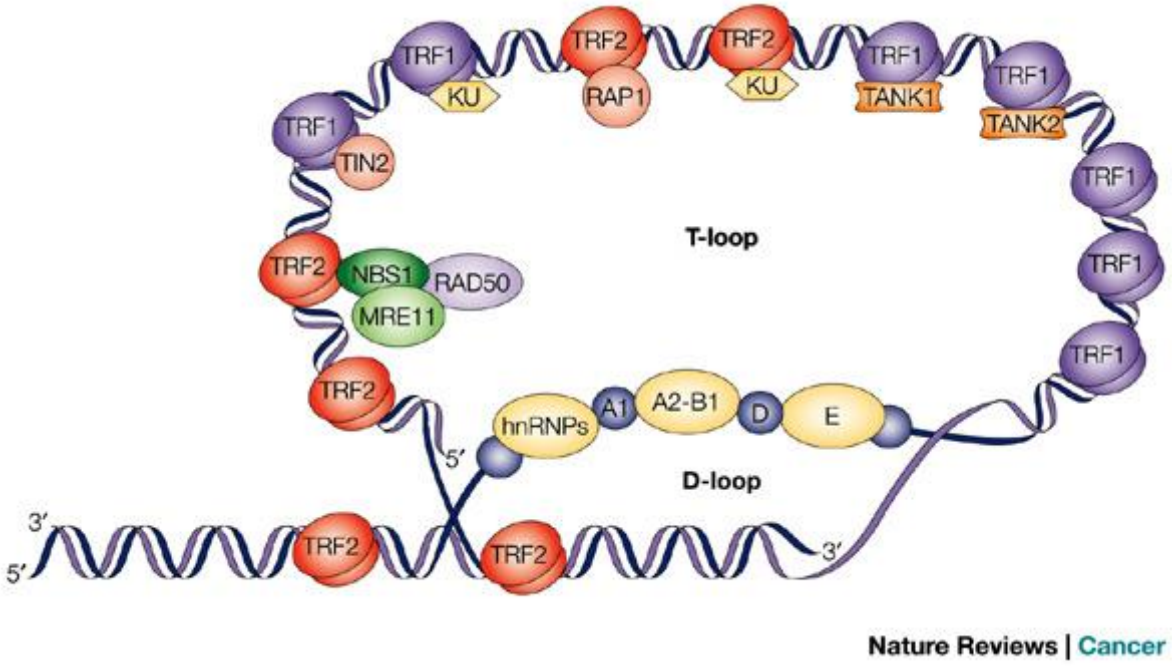
1.5 Telomere

1.5.1 Struktura telomera

Telomere su nukleoproteinske strukture na krajevima linearnih kromosoma čija je uloga prvenstveno očuvanje integriteta i strukture kromosoma. Sastoje se od velikog broja uzastopno ponavljajuće sekvence DNA. Velik udio nukleotida G u ponavljajućoj sekvenci DNA karakterističan je za telomere, međutim sama sekvenca nije univerzalna i razlikuje se među skupinama eukariota. Kod kralješnjaka telomere čine ponavljajući sljedovi heksanukleotida $(TTAGGG)_n$, a slične pravilne sljedove nalazimo i kod biljaka, nekih sluznjača (Myxomycetes) i Protozoa, dok kvasci imaju nepravilne sljedove poput $G_{1\text{-}3}T/C_{1\text{-}3}A$ kod *Saccharomyces cerevisiae* (Blackburn 2001). Broj ponavljanja telomerne sekvence određuje duljinu telomere, a značajno se razlikuje između vrsta, kao i među jedinkama iste vrste. Kod ljudi u prosjeku iznosi oko 15 kb u spolnim stanicama te od 3 do 10 kb u somatskim stanicama (De Lange i sur. 1990). Bitno je napomenuti da duljina telomera znatno varira i među različitim staničnim tipovima unutar iste jedinke (Kappei i Londono-Vallejo 2007).

Nadalje, kod bičaša, kvasaca, sluznjača, gljiva i sisavaca telomere imaju 3' jednolančani kraj. Duljina 3' jednolančanog kraja kod *S. cerevisiae* regulirana je staničnim ciklusom i povećava se tijekom S faze. Kod ljudi 3' jednolančani kraj telomere radi invaziju na dvolančani dio telomere i spari se s komplementarnim lancem na graničnom području subtelomerne i telomerne regije. Nastala struktura nalik je Hollidayevoj strukturi prilikom rekombinacije te se naziva D-petlja (engl. *displacement loop*), a ostatak 3' jednolančanog kraja čini karakterističnu telomernu petlju (T-petlju) (Greider 1999). Na ovaj način su krajevi

linearnih kromosoma zaštićeni od mehanizama dvolančanog popravka koji bi krajeve kromosoma prepoznali kao lomove te ih pokušali popraviti fuzijom kromosoma (McClintock 1942).



Slika 3. Struktura telomere s prikazanim T- i D-petljom te nekim od telomernih proteina (Neumann i Reddel 2002).

1.5.2 Telomerni proteini

Telomernu petlju stabiliziraju brojni specifični proteini koji tako čine kompleks tzv. telosom sastavljen ponajviše od šesteročlanih proteinskih kompleksa tzv. šelterina (engl. *Shelterin complex*). Šelterin sisavaca čine proteini TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 i RAP1 koji stupaju u interakciju i s drugim signalnim proteinima ili kompleksima te na taj način štite kromosomske krajeve i reguliraju duljinu telomera.

Proteini TRF1 i TRF2 (engl. *telomere repeat binding factor*) se vežu na dvolančane krajeve telomera, a unatoč sličnim biokemijskim svojstvima imaju značajno različite funkcije održavanja strukture telomera. DNA vežu kao homodimeri pomoću svoje vezne domene srodne domeni Myb koja se nalazi na C-kraju proteina (Iwano i sur. 2004). TRF1 nalazi se vezan po cijeloj duljini telomere, a djeluje kao glavni negativni regulator duljine telomera

(van Steensel i de Lange 1997). Prekomjernom ekspresijom proteina TRF1 u stanicama s aktivnom telomerazom dolazi do skraćivanja telomera, obzirom da TRF1 inhibira enzim telomerazu zaslužan za održavanje duljine telomera. TRF1 asocira s proteinima tankirazom 1 i 2 koje uzrokuju disocijaciju TRF1 s telomere. Tankiraze su poli-ADP-riboza-polimeraze te uzrokuju progresivno povećanje duljine telomera (Smith i de Lange 2000; Cook i sur. 2002). Osim s tankirazama, TRF1 asocira i s mnogim drugim proteinima i molekulama, kao što su TIN2, KU70/80 i PINX1 koji mogu modulirati njegove funkcije (Kim i sur. 1999). Druga bitna uloga proteina TRF1 je stvaranje i stabilizacija telomernih suprastruktura zahvaljujući njihovoj sposobnosti da se međusobno povezuju i tako premošćuju međusobno udaljene dijelove telomere.

Protein TRF2 lokaliziran je specifično na području gdje jednolančani 3' kraj telomere stvara već spomenutu D-petlju. Smatra se da TRF2 ima bitnu ulogu kod stvaranja T-petlje zbog svoje sposobnosti da savija DNA vezanjem na nju (Bianchi i sur. 1997). Prekomjernom ekspresijom proteina TRF2 aktiviraju se putevi ATM/p53 ili p16/RB koji vode stanicu u starenje ili apoptozu. Inhibicijom TRF2 pak, dolazi do kromosomske nestabilnosti fuzijom krajeva kromosoma (D'Alcontres i sur. 2007).

Protein POT1 (engl. *protection of telomeres*) veže se na 3' jednolančani kraj telomere. Pronađen je i kod *Schizosaccharomyces pombe* (Baumann i Cech 2001). Jedna od glavnih funkcija je zaštita krajeva kromosoma zbog čega se često naziva i proteinom ''*end capping*''. Delecijom proteina POT1 ipak ne dolazi do očekivanih fuzija krajeva kromosoma već do ubrzane elongacije telomera enzimom telomerazom (Loayza i de Lange 2003). Iz toga se može zaključiti da POT1 ima bitnu ulogu i u regulaciji duljine telomera. Prekomjernom ekspresijom POT1 u stanicama s aktivnom telomerazom dolazi do elongacije telomera, dok kod stanica bez aktivne telomeraze ne dolazi do elongacije (Colgin i sur. 2003). Protein POT1 privlači telomerazu, ali može i onemogućavati njeno vezanje za telomeru, stoga kažemo da ima dvostruku ulogu u održavanju telomera.

Protein RAP1 se ne veže direktno na telomernu DNA već čini dio šelterina interakcijom s proteinom TRF2 (Li i sur. 2000). Na sličan su način povezani i proteini TIN2 i TPP1 koji su u interakciji s drugim telomernim proteinima, a ne sa samom telomerom. TIN2 (engl. *TRF-interacting nuclear factor*) povezuje proteine TRF1 i TRF2, stabilizira TRF2 na

telomeri te veže i TPP1 stoga ima centralnu ulogu u održavanju telomernih proteina na okupu. TIN2, poput proteina RAP1 i TPP1, negativni je regulator duljine telomera. Protein TPP1 svojom C-terminalnom domenom veže TIN2, dok centralna domena omogućuje vezanje proteina POT1 (Chen i sur. 2008).

1.5.3 Senescencija i telomere

Senescencija ili stanično starenje permanentan je i ireverzibilan zastoj staničnog ciklusa popraćen karakterističnim morfološkim i funkcionalnim promjenama, i posljedica je ograničenog diobenog potencijala stanice (Ben-Porath i Weinberg 2004). Sve somatske stanice *in vivo* i *in vitro* nakon određenog broja dioba ulaze u senescenciju, za razliku od spolnih, matičnih te tumorskih stanica koje se mogu trajno dijeliti. Nakupljanje senescentnih stanica *in vivo* u organizmu se povećava s godinama te na poslijetku dovodi do starenja organizma. Prvi model koji objašnjava povezanost senescencije stanica sa starenjem organizma zasniva se na činjenici da senescencija progenitorskih matičnih stanica dovodi do smanjenog potencijala obnavljanja tkiva. Drugi model objašnjava kako senescentne stanice izlučuju proteaze te ostale faktore kao što su metaloproteinaze matriksa, epitelni faktor rasta te upalne citokine koji narušavaju samu funkciju tkiva (Krtolica i Campisi 2002; Pelicci 2004).

Telomere imaju nezamjenjivu ulogu u regulaciji ulaska stanice u senescenciju te se nazivaju ''brojači dioba''. Naime, prilikom svake diobe somatske stanice udvostručuje se i njena DNA pomoću enzima DNA polimeraze koji zbog svog mehanizma replikacije ne može u potpunosti replicirati krajeve linearnih kromosoma, odnosno 3' kraj DNA lanca. Nepotpuna replikacija se događa zbog toga što DNA polimeraza zahtijeva RNA početnicu kako bi započela replikaciju u smjeru 5'→ 3', a ta se početnica nakon što je replikacija završena uklanja i zamjenjuje DNA slijedom. Na samom kraju linearne DNA više se ne može replicirati dio gdje je početnica uklonjena te je novnonastali lanac nešto kraći na svom 3' kraju (Olovnikov 1973). Ovakvom nepotpunom replikacijom kromosomi bi se skraćivali prilikom svake diobe pri čemu bi dolazilo do gubitka genetičke informacije, a to bi bilo veoma štetno i letalno za stanicu. Kako se ovaj scenarij ipak ne bi dogodio, telomere koje se nalaze na

krajevima kromosoma su te koje se svakom diobom stanice skraćuju. Kod ljudskih fibroblasta je stopa skraćivanja telomera 30-200 bp po diobi (Harley i sur. 1990).

Kada se telomere skrate na kritičnu duljinu stanica ulazi u senescenciju i više nije moguća replikacija. Kod ljudi je ta kritična duljina 6-8 kb (Herbig i sur. 2004) pri kojoj dolazi do uklanjanja proteina TRF2 s telomere te se otvara t-petlja (engl. *uncapping*). To se prepoznaje kao oštećenje dvolančane DNA i aktivira se signalni put popravka DNA (Takai i sur. 2003). Najvažniji pokretač ovog signalnog puta je kinaza ATM (engl. *ataxia-telangiectasia mutated*), koja se i inače aktivira kao odgovor na dvolančane lomove DNA. Osim kinaze ATM, pokretači su i kinaze ATR (engl. *ATM and Rad3-realted*) te DNA-PK (engl. *DNA-dependent protein kinase*), dok sekundarne kinaze Chk1 i Chk2 dalje prenose signale (Shiloh 2003). ATR se aktivira kada je aktivnost kinaze ATM smanjena ili je uopće nema. Ove kinaze imaju mnogo zajedničkih molekula u svojim uzvodnim i nizvodnim signalnim putevima. ATR se inače aktivira kod oštećenja izazvanih UV zračenjem te kod zastoja replikacijskih rašlji. ATM i ATR nizvodno aktiviraju p53 i p21 te dolazi do zastoja staničnog ciklusa u fazi G1 ili G2.

1.5.4 Naglo skraćivanje telomera

Osim skraćivanja telomera tijekom svake diobe, poznat je i fenomen naglog skraćivanja telomera (engl. *abrupt telomere shortening*) kojim se skrati velik dio telomere odjednom. Naglo skraćivanje telomera prvi put je primijećno u staničnoj kulturi gdje dolazi do značajnih razlika u diobenom potencijalu (engl. *population doubling*) kod stanica kćeri nastalih u istoj mitozi. Ova interklonalna varijacija posljedica je naglog skraćivanja telomera (Rubelj i Vondraček 1998). Telomerna D-petlja je iste strukture kao Holliday-eva petlja tijekom homologne rekombinacije te ukoliko dođe do razriješenja D-petlje odcijepit će se cijela T-petlja. Ovaj model naglog skraćivanja telomera naziva se intra-alelnom homolognom rekombinacijom. Model je dokazan pronalaskom ekstrakromosomske kružne telomerne DNA koja nastaje kao produkt odcjepljivanja T-petlje (Rubelj i Vondraček 1998; Škrobot Vidaček i sur. 2010; Wang 2004). Jednolančani lomovi telomera uzrokovani slobodnim radikalima predstavljaju drugi model naglog skraćivanja telomera. Zbog kompleksne strukture telomera, oštećenja se popravljaju manje učinkovito nego drugdje u genomu (Richter i sur. 2007).

Prisutnost nepopravljenih jednolančanih lomova telomerne DNA tijekom replikacije dovodi do naglog skraćivanja telomera. Oksidativna oštećenja telomera najbitniji su čimbenik regulacije duljine telomera (Richter i Zglinicki 2007), a bitno je naglasiti da su telomere zbog velikog udjela guanina posebno izložene oksidativnim oštećenjma.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ekstrakti biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* imaju dokazano antioksidacijsko djelovanje, stoga je u ovom istraživanju ispitano na koji način ti ekstrakti djeluju na žive stanice u kulturi.

Ciljevi mojeg diplomskog rada su:

i. Provjeriti utjecaj ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na rast stanica MJ90 u kulturi kroz dulje vrijeme rasta
ii. Odrediti njihov utjecaj na vijabilnost i proliferaciju stanica koristeći metodu obilježavanja BrdU
iii. Ustanoviti kako ekstrakti utječu na stanično starenje koristeći se metodom bojanja *SA-β-gal*
iv. Provjeriti utjecaj ekstrakata na dinamiku skraćivanja telomera

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Priprava biljnih ekstrakata

Za pripravu ekstrakata korišteni su osušeni i usitnjeni listovi biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea*. *M. croatica* je prikupljena na lokalitetu Bačić kuk, a *M. petraea* na Dinari. Obje su biljke determinirane u Botaničkom vrtu ''Fran Kušan'' Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz pomoć dr. sc. Darija Kremera.

Analitičkom vagom je izvagano 60 mg svake biljke te je dodano po 2 ml 80%-tnog metanola (Kemika) u svaku epruvetu. Nakon kratkog miješanja na vorteksu, epruvete s biljnim materijalom i metanolom stavljene su u ultrazvučnu kupelj na 15 min. Potom je uslijedila ekstrakcija na rotacijskom homogenizatoru tijekom jednog sata pri 15 okretaja/min. Zatim su epruvete centrifugirane 10 min pri 12000 okretaja/min uslijed čega su odvojeni supernatant i talog. Pipetom je oprezno odvojen supernatant i prebačen u nove epruvete, prethodno izvagane na analitičkoj vagi zbog tariranja. Dobiveni supernatant podvrgnut je uparavanju strujom dušika. Uparavanje je pomognuto povišenom temperaturom od +40°C. Postupak je trajao nekoliko sati, sve dok sav metanol nije u potpunosti ishlapio te je dobiven ekstrakt u volumenu od otprilike < 0,5 ml po epruveti. Epruvete su spremljene u zamrzivač na -20°C. Nakon zamrzavanja, ekstrakti su stavljeni u liofilizator kako bi se uklonila voda. Kada je liofilizacija završena, masa svake epruvete je ponovno izvagana analitičkom vagom kako bi se odredila konačna masa izoliranog ekstrakta prema formuli: m_1 (epruvete s ekstraktom) – m_2 (prazne epruvete). Na kraju je dodan 100% metanol u svaku epruvetu tako da konačna koncentracija ekstrakta bude 10 mg/ml. Ovako pripremljeni ekstrakti čuvaju se na temperaturi -20°C.

3.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata korištena je modificirana metoda Brand-Williams (Brand-Williams i sur. 1995). Metoda se zasniva na redukciji slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidansom (AH) ili nekim drugim slobodnim radikalom (R•).

Prikaz navedenih reakcija:

a) DPPH• + AH → DPPH-H + A•
b) DPPH• + R• → DPPH-R

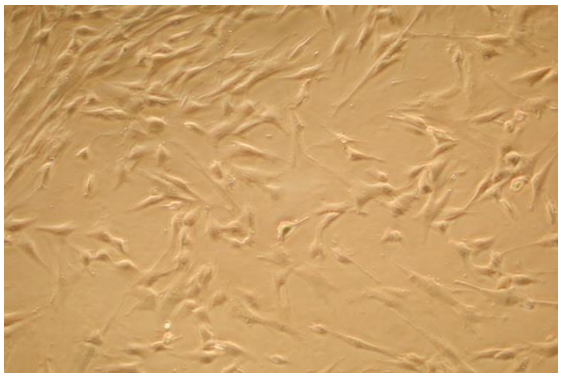
U reakciji a) je redukcijom nastali DPPH-H neutraliziran, te ne sudjeluje u daljnjim lančanim reakcijama kojima se mogu oštetiti molekule u stanici. Ishod je isti ukoliko se DPPH• reducira nekim drugim slobodnim radikalom kao što je prikazano u reakciji b). Obje reakcije prate se spektrofotometrijski jer DPPH• apsorbira na valnoj duljini od 515 nm te je otopina s navedenim slobodnim radikalom ljubičaste boje. Reducirani oblik DPPH• (DPPH-H ili DPPH-R) ne apsorbira pri valnoj duljini od 515 nm te otopina postaje žute boje.

Najprije je pripremljena 0,094 mM otopina DPPH od 1,84 mg DPPH praha (Sigma) i 50 ml 100% metanola (Kemika). Otopina je zaštićena od svjetla aluminijskom folijom i stavljena na miješanje dok sav DPPH nije u potpunosti otopljen.

U međuvremenu su pripremljena razrijeđenja ekstrakata od 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml i 40 µg/ml čija se antioksidacijska aktivnost mjerila. Zatim je pomiješano 980 µl DPPH i 20 µl ekstrakta pojedine koncentracije i inkubirano na sobnoj temperaturi 30 min prije početka mjerenja na spektrofotometru. Kontrolni uzorak je pripremljen s 980 µl DPPH i 20 µl 100% metanola. Mjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 515 nm.

3.3 Kultura stanica

Stanična linija MJ90 izolirana iz ljudskih fibroblasta kože muškarca (XY). MJ 90 stanice dobivene su iz laboratorija prof. Jamesa Smitha, *Sam and Ann Barshop Center on Longevity and Aging Studies, UTHSCSA*, San Antonio, SAD.



Slika 4. MJ90 fibroblasti. Fotografija mlade stanične kulture (povećanje 100x)

3.3.1 Odmrzavanje stanica

Epruveta za zamrzavanje s $1x10^6$ stanica je na kratko uronjena u vodu zagrijanu na 37°C zbog što bržeg odmrzavanja. Nakon odmrzavanja stanice su resuspendirane i prebačene u konusnu epruvetu s 9 ml svježeg medija DMEM (Sigma) s 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS) (Gibco). Stanice su istaložene centrifugiranjem 5 min na 1000 rpm kako bi se uklonio supernatant s dimetilsulfoksidom (DMSO) u kojem su stanice bile smrznute, a stanice u talogu su resuspendirane u 5 ml novog medija s 10% FCS i prebačene u kultivacijsku bočicu. Stanice su uzgajane u inkubatoru na +37°C pri 5% CO_2 i 95% vlažnosti. Kada su dostigle konfluentnost od otprilike 90%, stanice su presađene u 9 kultivacijskih bočica površine 25 cm^2. Kultivacijske bočice su zatim raspodjeljene na kontrolnu skupinu, skupinu tretiranu ekstraktom biljke *Micromeria croatica* i skupinu tretiranu ekstraktom biljke *Moltkia petraea*. Svi eksperimenti, kontrole i tretirane stanice, su rađeni u triplikatu. Sve stanice uzgajane su u istim uvjetima, a medij je mijenjan svakih 24 sata te je dodavan svježi ekstrakt u konačnoj koncentraciji 10 µg/ml. Kontrolnim stanicama dodavan je 100% metanol kako bi njegova koncentracija bila ista kao i u tretiranim stanicama.

3.3.2 Presađivanje stanica i određivanje broja dioba

Kada su stanice dostigle konfluentnost od otprilike 90%, presađene su u nove kultivacijske bočice. Stari medij je uklonjen, stanice su isprane s 5 ml fiziološke otopine

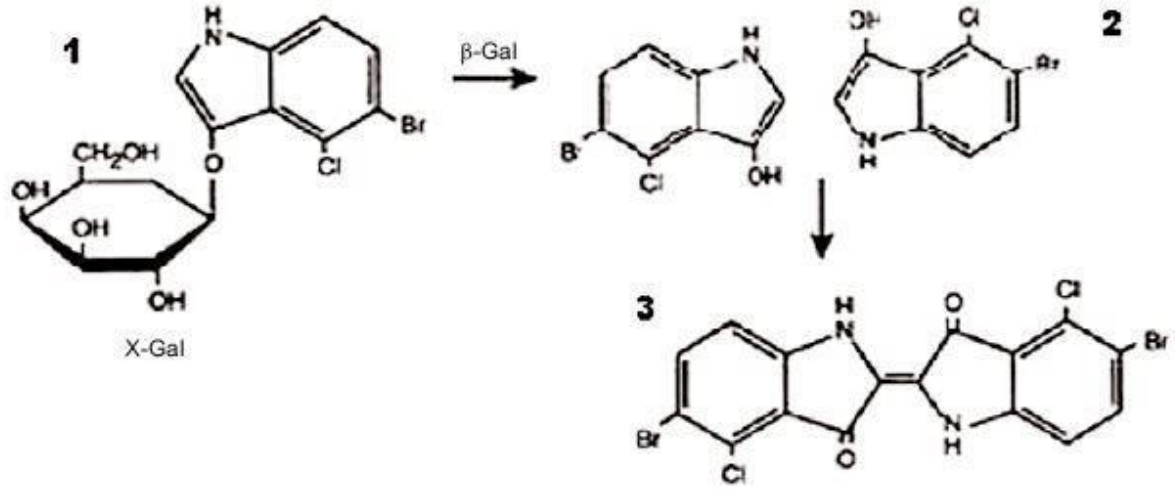
(0,9%-tna otopina NaCl), dodano im je 0,5 ml 0,25%-tnog tripsina (Gibco) te su inkubirane 10 min na +37°C. Kada su se stanice odvojile od podloge, dodano je 4,5 ml novog medija, a agregati stanica su razbijeni višestrukim provlačenjem kroz pipetu. Odvojeno je 250 µl stanične suspenzije u 750 µl PBS-a za brojanje. Stanice su brojane brojačem *Scepter Handheld Automated Cell Counter* (Milipore). Dobiveni broj stanica koristi se za računanje broja dioba prema formuli:

$$PD = log\left(\frac{ukupni\ br.st.}{br.nasađenih\ st.}\right) \times 3{,}323$$

Ukupni broj dioba stanične kulture dobiva se zbrojem dioba nakon svakog presađivanja. Stanice su uzgajane u kulturi pod utjecajem ekstrakata tijekom otprilike 15 presađivanja pri čemu su napravile oko 30 dioba.

3.4 Određivanje starih stanica metodom bojanja pomoću SA-β-gal

Metoda bojanja stanica zasniva se na sposobnosti enzima β-galaktozidaze da cijepa supstrat X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid). β-galaktozidaza je enzim inače prisutan u lizosomima stanica, no starenjem stanica izlazi i u citoplazmu, pa je lokalizacija ovog enzima široko prihvaćen način detekcije starih stanica. Naime, dodatkom supstrata X-gal stanicama, β galaktozidaza ga pocijepa te nastanu galaktoza te 5-bromo-4-kloro-3-hidroksiindol. 5-bromo-4-kloro-3-hidroksiindol dimerizira te nastaje plavo obojenje. Ovaj plavi produkt vidljiv je pod svjetlosnim mikroskopom kao plavo obojenje u citoplazmama starih stanica.



Slika 5. Prikaz reakcije β-galaktozidaze s X-gal supstratom te nastanak plavog obojenja (preuzeto iz *Product Datasheet-beta Galactosidase Kit*, Novusbio).

Za bojanje *SA-β-Gal*, stanice su u triplikatu nasađene na pločicu s 24 bunarića, tako da je iz svake kultivacijske bočice nasađeno po 30000 stanica po bunariću. Konačni volumen medija u svakom bunariću je bio 0,5 ml. Stanicama je potom dodan ekstrakt u istoj koncentraciji kao i prilikom rasta. Stanice su uzgajane u inkubatoru na +37°C pri 5% CO_2 i 95% vlažnosti tijekom dva dana.

Pripremljene su otopine za bojanje *SA β-gal*: limunska kiselina (0,2M)/natrij fosfatni pufer (pH 6), kalij ferocijanid x $3H_2O$ (100mM), kalij fericijanid x H_2O (100 mM),

Ove otopine su korištene u pripremi svježe reakcijske smjese neposredno prije bojanja kako je prikazano u tablici.

Tablica 1. Priprema reakcijske smjese za bojanje pomoću SA-β-gal

Komponenta	Volumen
20 mg/ml X-gal u dimetil formamidu	0,5 ml
Limunska kiselina / natrij fosfatni pufer	2 ml
K ferocijanid	0,5 ml
K fericijanid	0,5 ml
NaCl (5M)	0,3 ml
$MgCl_2$ (1M)	20 µl
dH_2O	do 10 ml

Stanice su isprane tri puta u PBS-u (fosfatni pufer pH 7,4 od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) te fiksirane 10 min na sobnoj temperaturi u 1%-tnom glutaraldehidu (Sigma) u mediju DMEM. Nakon fiksacije, stanice su ponovno isprane tri puta u PBS-u te je dodan 1 ml otopine za bojanje *SA-β-Gal* u svaki bunarić. Stanice su inkubirane 16 h na +37°C bez CO_2. Nakon inkubacije, otopina za bojanje je uklonjena i stanice su isprane tri puta u PBS-u. Stanice su ostavljene u PBS-u te kao takve mogu neko vrijeme biti pohranjene na +4°C.

Nakon što su stanice obojane, promatrane su svjetlosnim mikroskopom Zeiss na povećanju 200x te su prebrojane za statističku analizu. Plava boja jasno je vidljiva u citoplazmama stanica pozitivnih na SA-β-Gal .

3.5 Obilježavanje stanica s BrdU

Za obilježavanje stanica s BrdU korišten je komplet reagencija (Labeling and Detection Kit II, Roche) prema uputama proizvođača.

Stanice tretirane ekstraktima nasađene su na pločicu s 24 bunarića, po 20000 stanica u pojedini bunarić. Sljedeći dan pripremljene su otopine potrebne za obilježavanje s BrdU, te je stanicama dodan novi medij s BrdU. U 10 ml medija DMEM s 10% FCS je dodano 5 µl 20 mM BrdU (Roche). Stanice su rasle u ovakvom mediju 18 h kako bi se tijekom diobe ugradio BrdU u genomsku DNA.

Pripremljene su otopine za BrdU obilježavanje supstratni pufer (1 M TrisHCl pH 9,5, 1 M $MgCl_2$, 5 M NaCl) i fiksativ s etanolom (50 mM glicin pH 2, 96% etanol) koje se čuvaju na +4°C.

Nakon 18 h, stanice su isprane 3 puta u PBS-u te fiksirane fiksativom etanolom 20 min pri temperaturi -20°C. U svaki bunarić je dodan 1 ml fiksativa. Zatim su stanice ponovno isprane 3 puta u PBS-u te je dodano antitijelo anti-BrdU (Roche) i inkubirano 1 h na +37°C. Nakon toga je uslijedilo ispiranje 3 x u PBS-u te inkubacija s anti-mouse Ig-alkalna fosfataza antitijelom (Roche), također 1 h na +37°C. Nakon inkubacije stanice su isprane 3 x u PBS-u te je dodan 1 ml otopine za bojanje u svaki bunarić. Inkubirano je 15 min na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla aluminijskom folijom. Otopina za bojanje pripremljena je dodatkom 39 µl NBT (*nitroblue tetrazolium salt* u 70% dimetilformamidu; Roche) i 30 µl BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, toluidin u dimetilformamidu; Roche) u 9 ml unaprijed pripremljenog supstratnog pufera. Otopina za bojanje je nakon inkubacije isprana u PBS-u te su stanice ostavljene u PBS-u i čuvane na +4°C sve do brojanja obilježenih stanica svjetlosnim mikroskopom.

3.6 Hibridizacija po Southernu

3.6.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA je napravljena pomoću kompleta *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača.

Stanice resuspendirane u PBS-u (pH 7,4) su najprije inkubirane 2 min s 4 µl RNaze A (Qiagen) koncentracije 100 mg/ml kako bi se uklonila RNA iz uzorka. Nakon toga je dodano 20 µl proteinaze K (Qiagen) za razgradnju proteina. Uslijedila je inkubacija s 200 µl lizacijskog

pufera 10 min na +56°C. Nakon inkubacije dodano je 200 µl 96%-tnog etanola te je sve promiješano. Smjesa je prebačena na kolonu *DNeasy Mini Spin* i centrifugirana 90 sec na 8000 okretaja/min. Kolona je prebačena u novu epruvetu te je dodano 500 µl pufera za ispiranje AW1 (Qiagen), centrifugirano 90 sec na 8000 okretaja/min i zatim opet prebačeno u novu epruvetu. Dodano je 500 µl pufera za ispiranje AW2 (Qiagen) i centrifugirano 4 min na 13500 okretaja/min. Kolona je prebačena u novu epruvetu i inkubirana 1 min u 200 µl pufera za eluiranje (pufer AE) nakon čega je uslijedila elucija centrifugiranjem 90 sec na 8000 okretaja/min. Korak elucije ponovljen je još jednom radi povećanja prinosa DNA. Ovako izolirana DNA može biti pohranjena na +4°C.

3.6.2 Mjerenje koncentracije izolirane DNA

Za mjerenje koncentracije DNA korišten je uređaj *NanoVue* koji koncentraciju DNA mjeri spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 260 i 280 nm. Uređaj je prije mjerenja normaliziran puferom AE (Qiagen), a zatim je stavljano po 2 µl uzorka DNA na uređaj za mjerenje.

3.6.3 Uparavanje DNA uzoraka

Za daljnje korake u hibridiziranju po Southernu bila je potrebna masa od 4 µg svakog DNA uzorka, stoga je, ovisno o izmjerenoj koncentraciji svakog uzorka, izračunat volumen koji sadrži zadanu masu. Uparavanjem koje je uslijedilo volumen svih uzoraka je sveden na 100 µl te su na taj način svi uzorci DNA podešeni na isti zadani volumen i masu DNA. Ukoliko je neki od uzoraka bio uparen do volumena manjeg od 100 µl tada je dodana reH_2O do zadanog volumena.

Uzorci DNA pociijepani su restrikcijskim enzimi Rsa I i Hinf I (BioLabs) razrjeđeni u 10x puferu za restrikciju 2 (NEB) te je uslijedila inkubacija preko noći na +37°C prema uputama proizvođača (tablica 2).

Tablica 2. Priprema smjese restrikcijskih enzima i uzoraka DNA

Komponenta	Volumen
Rsa I	1,5 µl
Hinf I	1,5 µl
Pufer za restrikciju 2	15 µl
DNA	100 µl
reH_2O	Do 150 µl

Pripremljeni su otopina za depurinaciju (0,2 M HCl), otopina za denaturaciju (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCL), otopina za neutralizaciju (1 M TrisHCl pH 7,5, 3 M NaCl), 20x SSC pufer (NaCl, Na-citrat dihidrat) i 2x SSC pufer koji će se koristiti u sljedećim koracima.

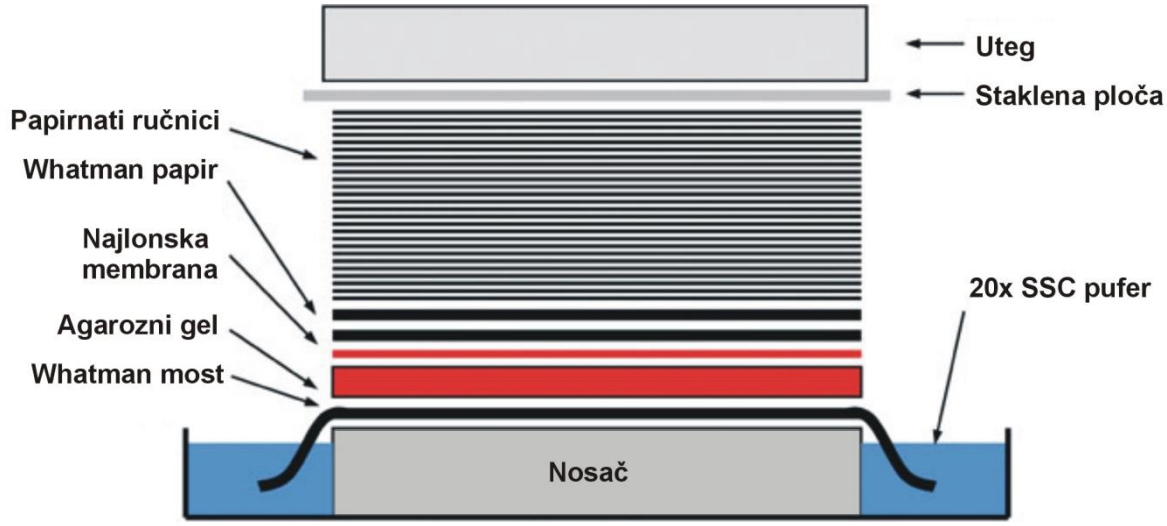
3.6.4 Elektroforeza i prijenos DNA na membranu

Nakon razgradnje restrikcijskim enzimima, uzorci DNA su ponovno upareni kako bi se dobio volumen od 20 µl. Zatim je u svaki uzorak dodano 4 µl 6x pufera za bojanje uzoraka LB (*Loading Buffer*), pripremljen je 0,8% agarozni gel s etidij bromidom konačne koncentracije 0,5 µg/ml te je pokrenuta elektroforeza 30 min na 120 V, a nakon toga 2 h na 140 V. Gel je nakon elektroforeze pregledan pod UV svjetlom te izrezan na odgovarajuću veličinu. Zatim je uslijedila depurinacija otopinom za depurinaciju 5 min uz lagano miješanje, ispiranje s dH_2O, 2 x 15 min denaturacija, ispiranje s dH_2O, 2 x 15 min neutralizacija, jedno ispiranje u 2x SSC.

Nakon toga DNA iz gela je prenesena na najlonsku membranu. Preko kadice napunjene s 20x SSC puferom stavljeno je staklo te preko stakla Whatman-papir (BioRad) namočen i uronjen u 20x SSC. Na Whatman papir stavljen je gel okrenut stranom s DNA uzorcima prema gore, na njega najlonska membrana (Roche) iste veličine kao gel, a sav zrak između gela i membrane istisnut staklenom pipetom. Na membranu je položen drugi

Whatman-papir, također prethodno namočen u 20x SSC. Gel je obrubljen parafilmom kako bi se spriječila difuzija s gela na donji Whatman-papir. Na ovako pripremljen gel za transfer stavljeno je još adekvatno izrezanih slojeva upijajućeg papira, a na vrh staklo s utegom (~500 g) koje jednoliko pritišće papire. Transfer DNA s gela na membranu tekao je preko noći.

Sutradan je membrana odvojena od gela i isprana jednom u 2x SSC te osušena pri sobnoj temperaturi na suhom Whatman-papiru. Nakon 10 min premještena je na 120°C 30 min da bi se DNA kovalentno vezala na membranu. Time je DNA stabilno fiksirana na membrani te se može hibridizirati obilježenom sondom.



Slika 6. Shematski prikaz transfera DNA na membranu kapilarnom elektroforezom (Prilagođeno prema Streit i sur. 2008).

3.6.5 Hibridizacija

Membrana je stavljena u stakleni tubus s uzorcima DNA okrenutim prema unutrašnjoj strani tubusa te je uliveno oko 25 ml predhibridizacijske otopine (0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,2, 0,1M EDTA pH 8,0, 20% SDS, 0,5% blokirajući reagens) zagrijane na +65°C. Tubus s membranom stavljen je u hibridizator na 2 h pri temperaturi +68°C. Neposredno prije završetka predhibridizacije otopina telomerne sonde koncentracije 10 ng/ml u predhibridizacijskom puferu stavljena je na denaturaciju 10 min na +100°C. Nakon završetka

predhibridizacije, još uvijek zagrijana otopina sonde je stavljena u tubus umjesto predhibridizacijske otopine te je hibridizacija tekla pri +68°C preko noći.

Pripremljeni su pufer za ispiranje I (20 mM Na_2HPO_4, 1% SDS, 1 mM EDTA), pufer za ispiranje II pH 8 (3 M NaCl, 0,1 M maleinska kiselina, 0,3% Tween), pufer za blokiranje (0,5% Blocking reagens, pufer za ispiranje II) i supstratni pufer (1 M TrisHCl pH 9,5, 1 M NaCl).

Sutradan je otopina sonde izvađena iz tubusa te je membrana isprana u puferu za ispiranje I pri +65°C 20 min. Postupak je ponovljen tri puta. Nakon toga je membrana izvađena iz tubusa i stavljena u kadicu s puferom za ispiranje II na 5 min na nagibnoj mješalici, a zatim u pufer za blokiranje na 1 h. Zatim je pufer za blokiranje zamijenjen sa 60 ml novog pufera za blokiranje s 3 µl antitijela Anti-DIG-AP (Roche) i inkubirano na klackalici 30 min. Nevezana protutijela su ispirana 5 puta po 10 min u puferu za ispiranje II, te 2 puta po 5 min u supstratnom puferu.

3.6.6 Razvijanje filma

Signal dobiven hibridizacijom sonde s DNA na membrani detektiran je metodom kemiluminiscencije. U tamnoj komori membrana je stavljena u plastičnu vrećicu zataljenu s tri strane te je dodano 4 µl boje CDP Star (Roche) razrijeđene u 400 µl supstratnog pufera. Boja je dobro raspoređena po cijeloj membrani i zatim je plastična vrećica zataljena i s četvrte strane. Nakon 10 min inkubacije, membrana je stavljena u kazetu za razvijanje te je na nju stavljen rendgenski film (AGFA). Eksponirana je 5, 10 i 15 min. Film je zatim inkubiran u razvijaču (Kodak) sve do pojave signala nakon čega je razvijanje prekinuto ispiranjem u vodi te fiksirano u fiksiru (Kodak). Film je ispran u destiliranoj vodi i osušen. Dobiveni film obrađen je programom Image Master VDS Software kako bi se analizirale duljine telomera.

4. REZULTATI

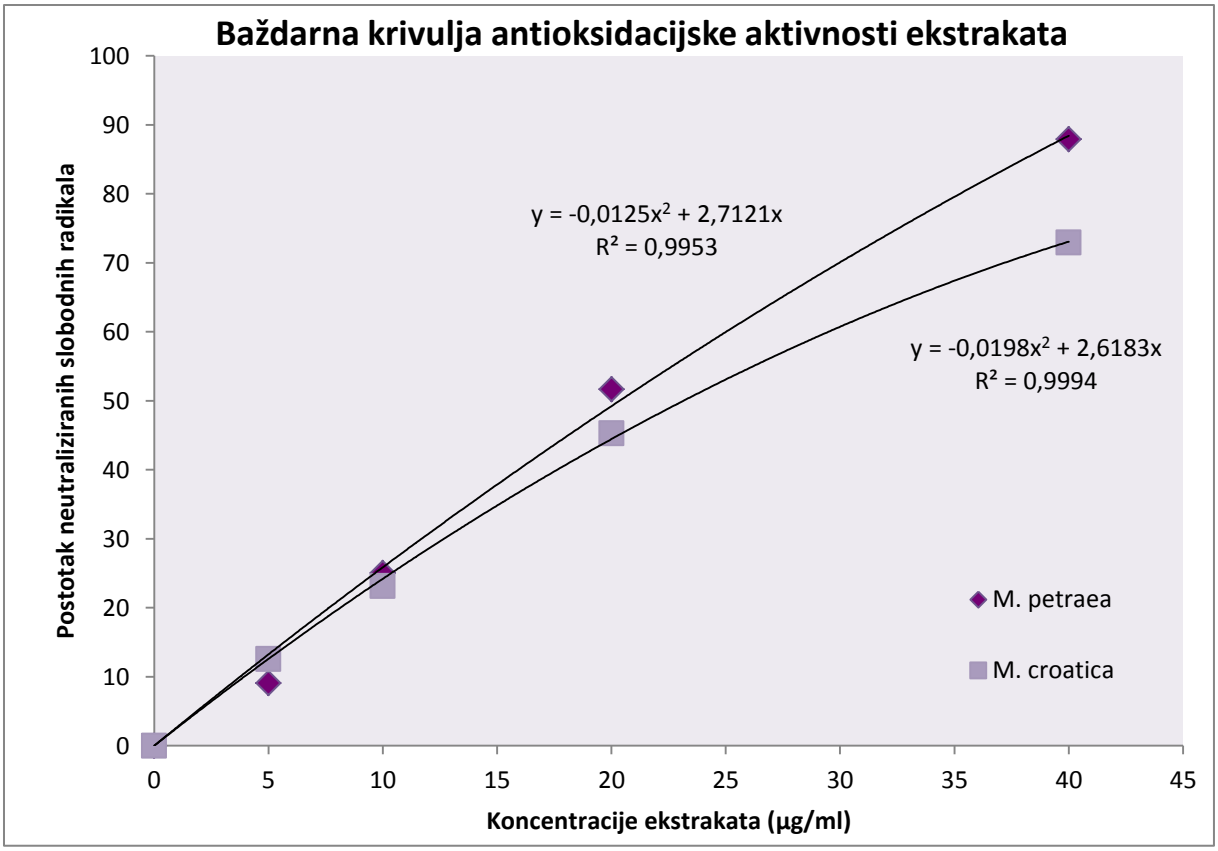
4.1 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea*

Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* dobiveni su metodom DPPH koja se zasniva na sposobnosti neutraliziranja DPPH• slobodnih radikala. Antioksidacijska aktivnost izmjerena je za svaki ekstrakt u nekoliko koncentracija kako bi se mogla odrediti ona koncentracija pri kojoj je 50% slobodnih radikala neutralizirano. Neutralizacija slobodnih radikala praćena je smanjenjem apsorpcije pri valnoj duljini od 515 nm.

Tablica 3. spektrofotometrijske analize smjese slobodnih radikala DPPH• i biljnih ekstrakata pri različitim koncentracijama.

	Apsorbancija (λ=515 nm)			
	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	Prosjek
Slijepa proba	1,03	1,02	1,03	1,03
Koncentracije *M. petraea*				
5 µg/ml	0,93	0,99	0,91	0,94
10 µg/ml	0,81	0,78	0,77	0,78
20 µg/ml	0,47	0,55	0,53	0,52
40 µg/ml	0,13	0,18	0,15	0,15
Koncentracije *M. croatica*				
5 µg/ml	0,92	0,90	0,91	0,91
10 µg/ml	0,79	0,80	0,81	0,80
20 µg/ml	0,59	0,57	0,59	0,58
40 µg/ml	0,30	0,33	0,29	0,31

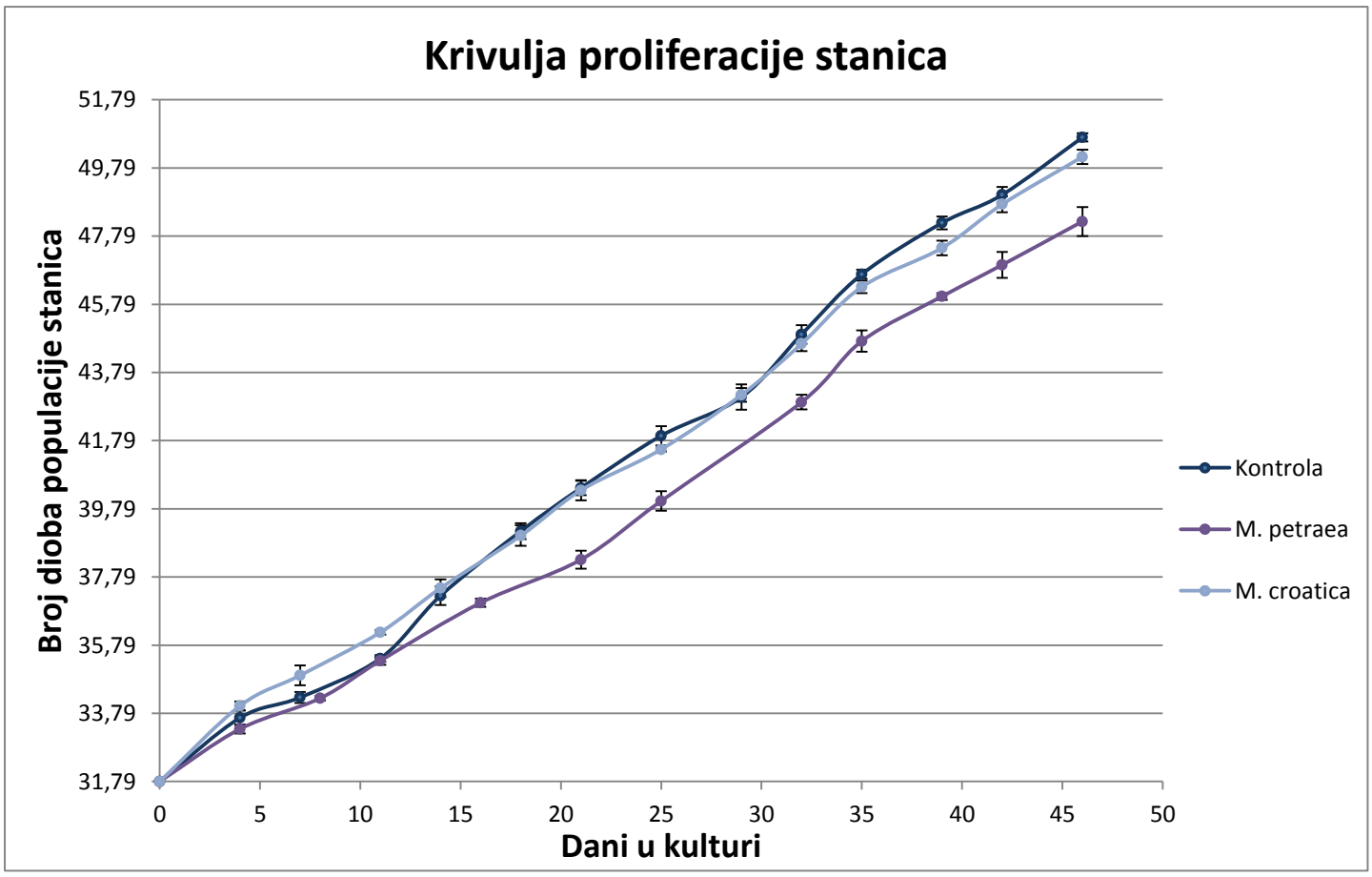
Napravljena je baždarna krivulja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata s koje je vidljivo da oba ekstrakta imaju približno iste koncentracije pri kojima neutraliziraju 50% slobodnih radikala DPPH. Za ekstrakt biljke *M. petraea* ta koncentracija iznosi 20 µg/ml, a za ekstrakt biljke *M. croatica* 23 µg/ml.



Slika 7. Baždarna krivulja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata.

4.2 Djelovanje ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* na staničnu proliferaciju

Stanice MJ90 tretirane su ekstraktima biljaka te je praćen njihov rast od ~32 do ~50 staničnih dioba. Djelovanje ekstrakata praćeno je kroz duži vremenksi period kroz koji je stanična kultura presađivana te je praćenjem broja stanica izračunat prirast stanica, tj. broj dioba populacije kod netretiranih, kontrolnih i tretiranih stanica. Tijekom 46 dana praćenja proliferacije, prosječan broj dioba populacije kontrolnih stanica bio je 50,69, stanica tretiranih ekstraktom biljke *M. croatica* 50,12, a tretiranih ekstraktom *M. petraea* 48,22. Krivulja proliferacije stanica prikazana je na slici 8.



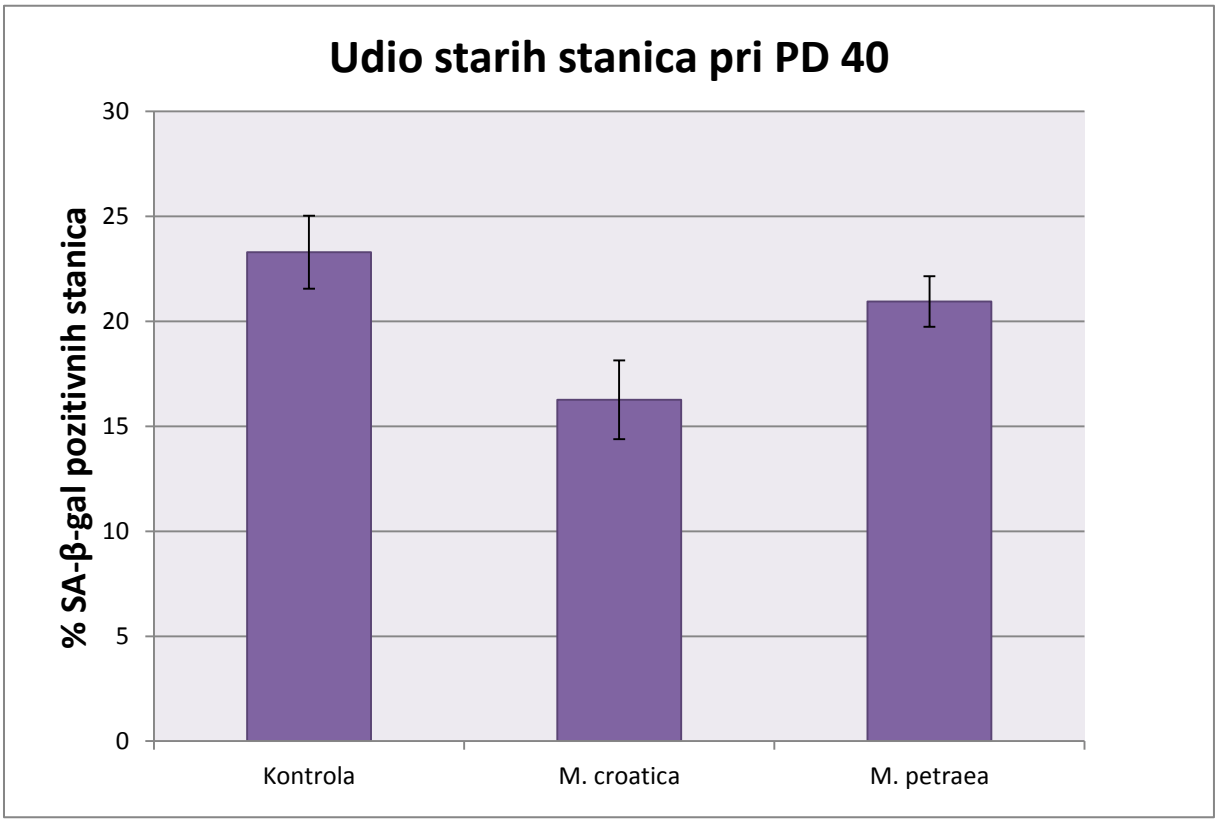
Slika 8. Proliferacija kontrolnih stanica i stanica tretiranih ekstraktima.

4.3 Djelovanje ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na stanično starenje

Bojanjem stanica metodom SA-β-gal određen je postotak starih stanica koje su ušle u senescenciju kod kontrolne i kulture stanica MJ90 tretiranih ekstraktima. Ovom metodom nastaje plavo obojenje vidljivo u citoplazmama specifično starih stanica. Kako bi jezgre neobojanih stanica ipak bile bolje vidljive pod mikroskopom, napravljeno je i bojanje orceinom. Ovaj korak je napravljen radi što točnije statističke obrade.

Stanice su slikane pod mikroskopom radi dokumentacije te izbrojane kako bi se odredio postotak stanica pozitivnih na SA-β-gal . Metoda bojanja SA-β-gal napravljena je dva puta, kod kultura koje su prošle 40 i 50 populacijskih dioba, kako bi se pratio dugotrajni

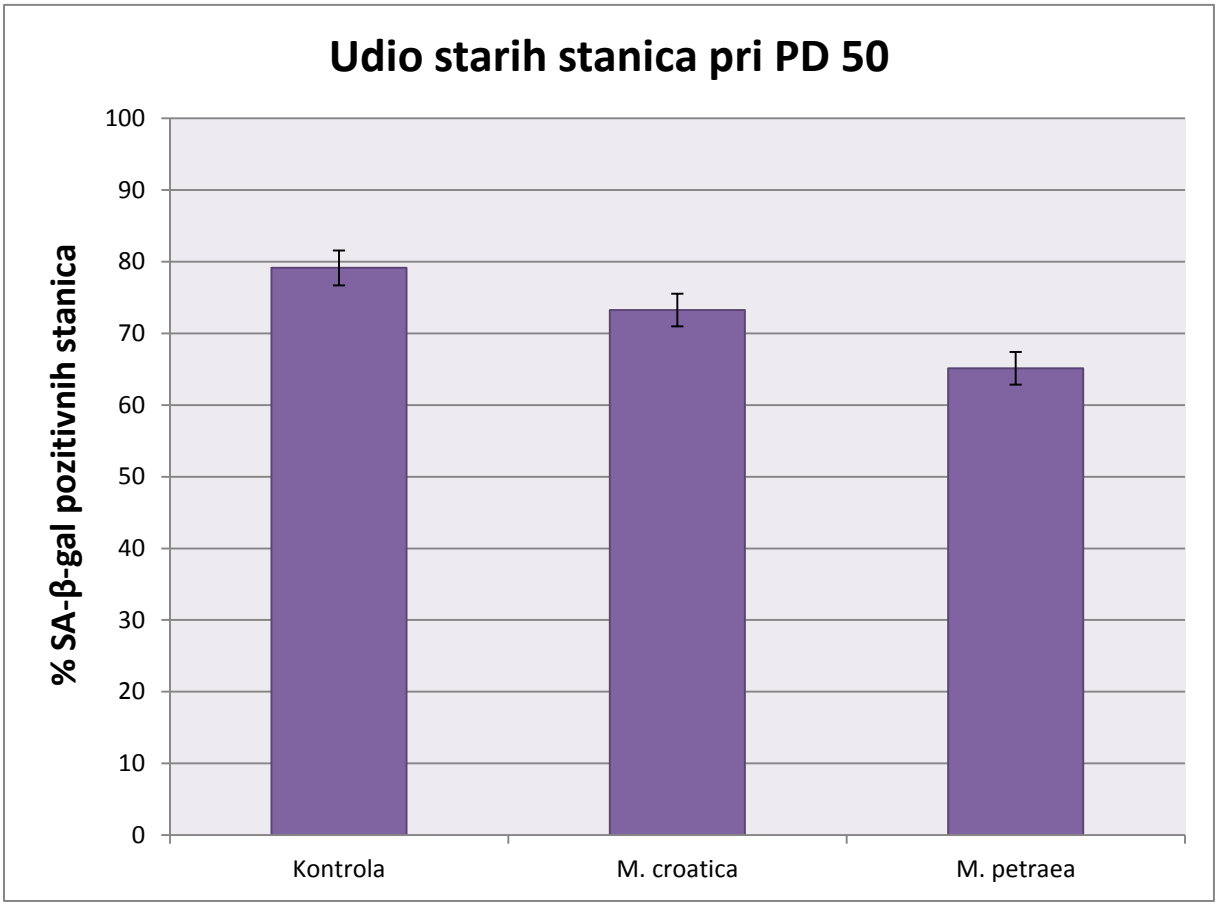
utjecaj ekstrakata na starenje stanica. Oba ekstrakta su pokazala pozitivan učinak na vitalnost stanica. Tako je kod 40 staničnih dioba udio stanica pozitivnih na SA-β-gal u odnosu na ukupan broj stanica u kulturama tretiranim ekstraktom biljke *M. croatica* bio 16,26%, a kod kultura tretiranih ekstraktom biljke *M. petraea* 20,94%. Kontrolne stanice imale su najveći udio starih stanica, 23,29%



Slika 9. Udio starih stanica u odnosu na ukupan broj stanica kod kulture nakon 40 staničnih dioba. Prikazane su i vrijednosti standardne pogreške, a udio SA-β-gal pozitivnih stanica odgovara udjelu starih stanica.

Sa starenjem je udio SA-β-gal pozitivnih stanica porastao u svim staničnim kulturama, ali je pozitivan efekt ekstrakata i dalje prisutan. Tako su kod kultura s prijeđenih 50 staničnih dioba kontrolne stanice ponovno imale najveći udio SA-β-gal pozitivnih stanica u odnosu na ukupan broj stanica, 79,13%, dok je vrijednost za stanice tretirane ekstraktom biljke *M.*

croatica iznosila 73,27% ,a za *M. petraea* 65,13%. Na slici 10. prikazane su srednje vrijednosti udjela starih stanica s izračunatom standardnom pogreškom.

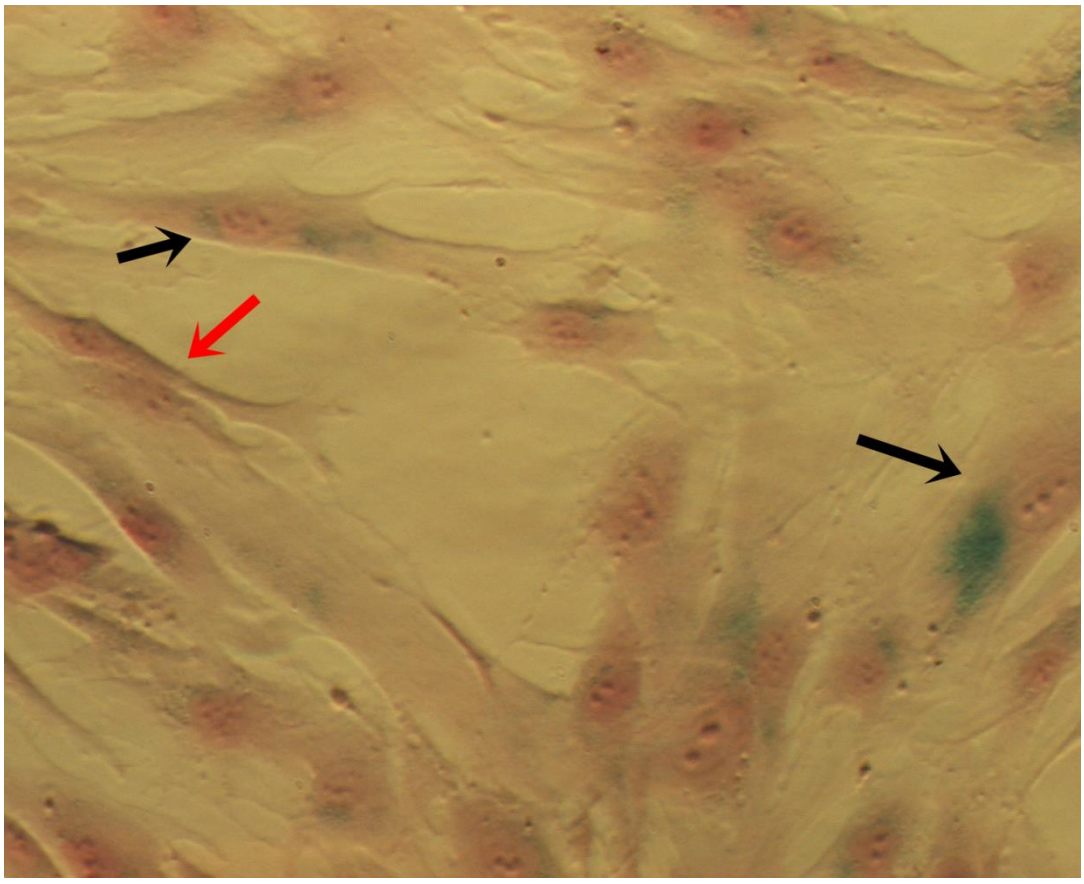


Slika 10. Udio starih stanica u odnosu na ukupan broj stanica kod kulture nakon 50 staničnih dioba.

Udio starih stanica kod kultura tretiranih ekstraktima izražen je također i u odnosu na udio starih stanica kontrole kako bi se jasnije predočile razlike između tretiranih i kontrolnih stanica. Stanice tretirane ekstraktima *M. croatica* imaju 30,19% manje starih stanica nego kontrole nakon 40 populacijskih dioba, a pri prijeđenih 50 populacijskih dioba 7,41% manje od kontrolnih stanica. Stanice tretirane ekstraktima *M. petraea* su pak imale 10,09% manje starih stanica nego kontrole pri 40 staničnih dioba što se povećalo na razliku od 17,69% pri prijeđenih 50 populacijskih dioba. Svi rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Udio starih stanica.

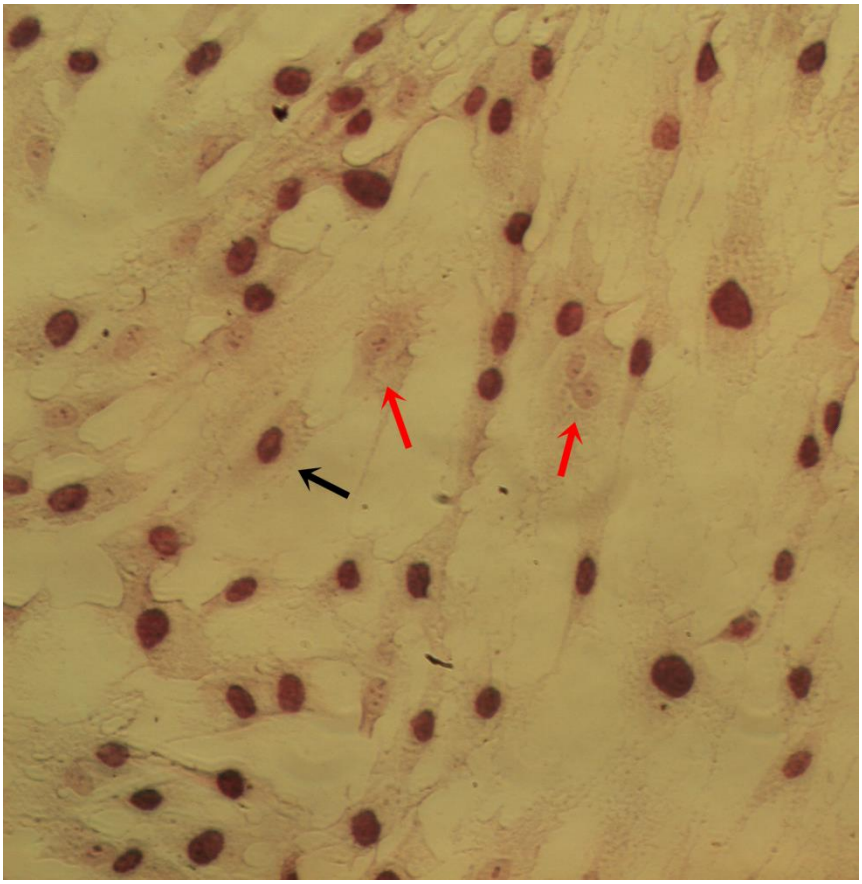
Udio starih stanica			
		U odnosu na ukupan broj stanica	U odnosu na kontrolu
PD 40	Kontrola	23,29%	100%
	M. croatica	16,26%	69,81%
	M. petraea	20,94%	89,91%
PD 50	Kontrola	79,13%	100,00%
	M. croatica	73,27%	92,59%
	M. petraea	65,13%	82,31%



Slika 11. Bojanje *SA-β-gal* kontrolnih stanica kod prijeđenih 40 populacijskih dioba. Crne strelice: stanice pozitivne na SA-β-gal; crvena strelica: stanica negativna na bojanje SA-β-gal (povećanje 200x)

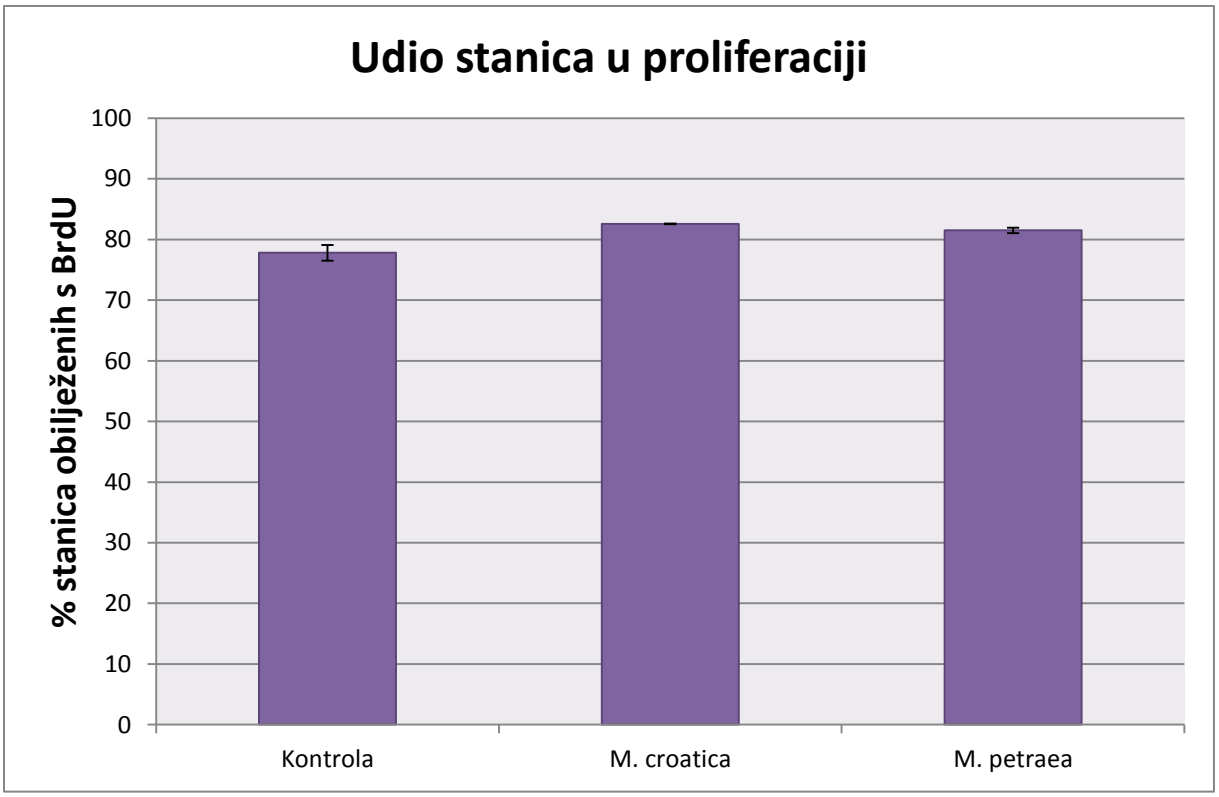
4.4 Djelovanje ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na proliferaciju stanica

Obilježavanje DNA pomoću BrdU korišteno je kako bi se odredio udio stanica u proliferaciji tijekom 18 sati. Metoda se temelji na ugradnji BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) u DNA stanica tijekom replikacije, što se zatim vizualizira imunohistokemijski koristeći antitijelo anti-BrdU. Kod stanica koje su proliferirale vide se zrnate, smeđe obilježene jezgre pod mikroskopom. Kako bi jezgre neobilježenih stanica bile jasnije vidljive, napravljeno je i bojanje orceinom.



Slika 12. Kontrolne stanice nakon 40 populacijskih dioba obilježene s BrdU. Crna strelica: stanica pozitivna na BrdU; crvene strelice: stanice negativne na BrdU (povećanje 200x)

Stanična proliferacija praćena je pomoću BrdU kod netretiranih i kultura MJ90 tretiranih ekstraktima koje su prošle 40 populacijskih dioba. Pokazalo se da oba biljna ekstrakta imaju pozitivan učinak na vitalnost stanične kulture. Tako je statističkom analizom ustanovljeno da su stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* imale najveći postotak BrdU obilježenih stanica u odnosu na ukupan broj stanica, 82,56%. Stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* imale su 81,49% BrdU obilježenih stanica, a kontrolne stanice 77,81% (slika 10). Slični rezultati su dobiveni i u ponovljenom pokusu.



Slika 13. Udio stanica obilježenih s BrdU kod neobrađene i kultura MJ90 obrađenih ekstraktima kod prijeđenih 40 populacijskih dioba.

Kada su udjeli proliferirajućih stanica izraženi relativno prema udjelu proliferirajućih stanica kontrole dobiveno je da su stanice tretirane ekstraktom biljke *M. croatica* imale 6,1% više obilježenih stanica od kontrole, stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* imale su 4,73% više. Slični rezultati su dobiveni i u ponovljenom pokusu.

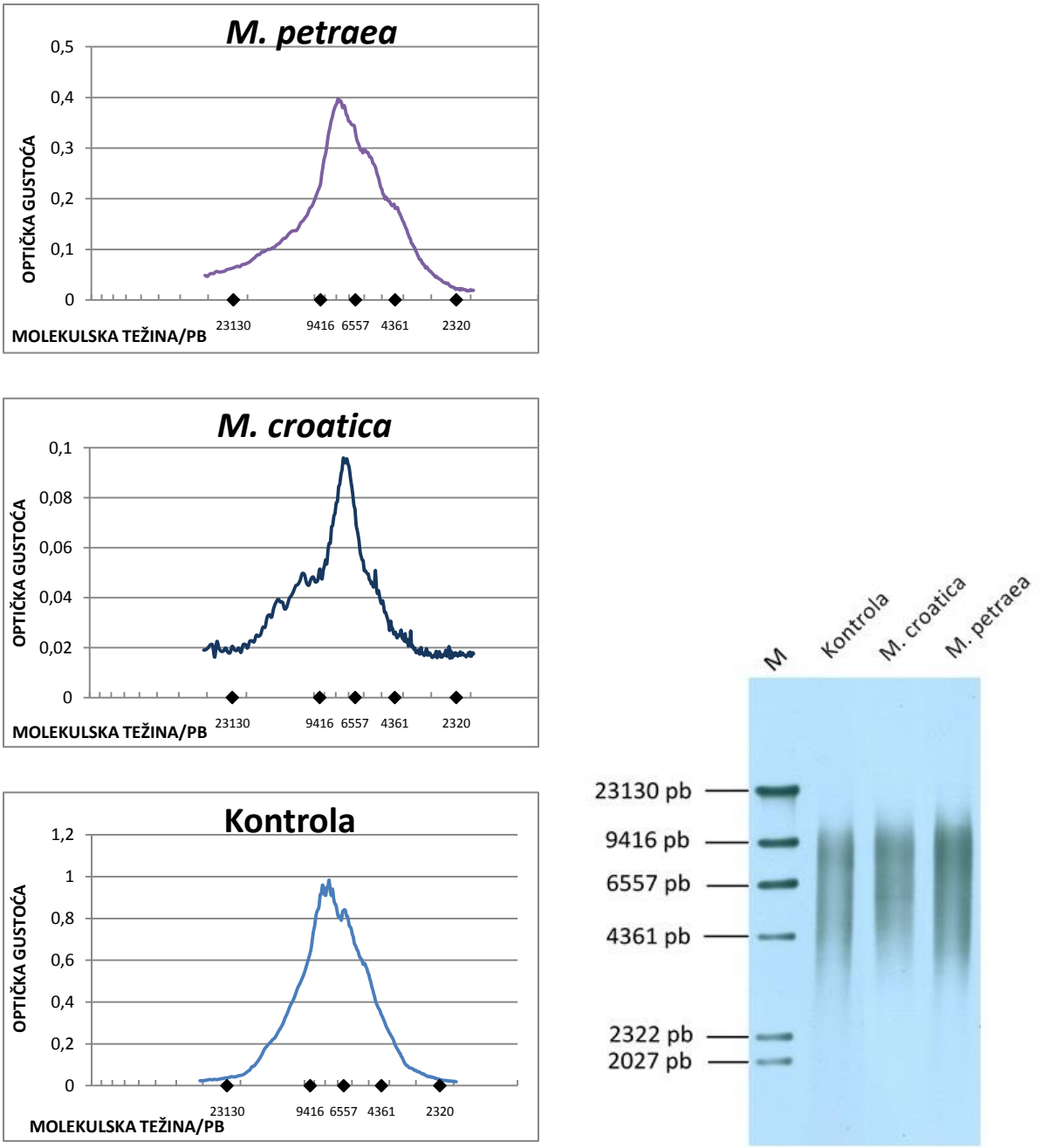
4.5 Analiza duljine telomera

Utjecaj ekstrakata biljaka *Micromeria croatica* i *Moltkia petraea* na duljinu telomera istražio se metodom hibridizacije po Southernu DNA izolirane iz tretiranih i netretiranih kultura MJ90 koje su prošle 40 i 50 populacijskih dioba. Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Master VDS Software. Ekstrapolacijom točaka najveće optičke gustoće na os s vrijednostima molekulske težine kalibrirane prema standardu veličine može se izračunati srednja vrijednost duljine telomera (Slike 14 i 15).

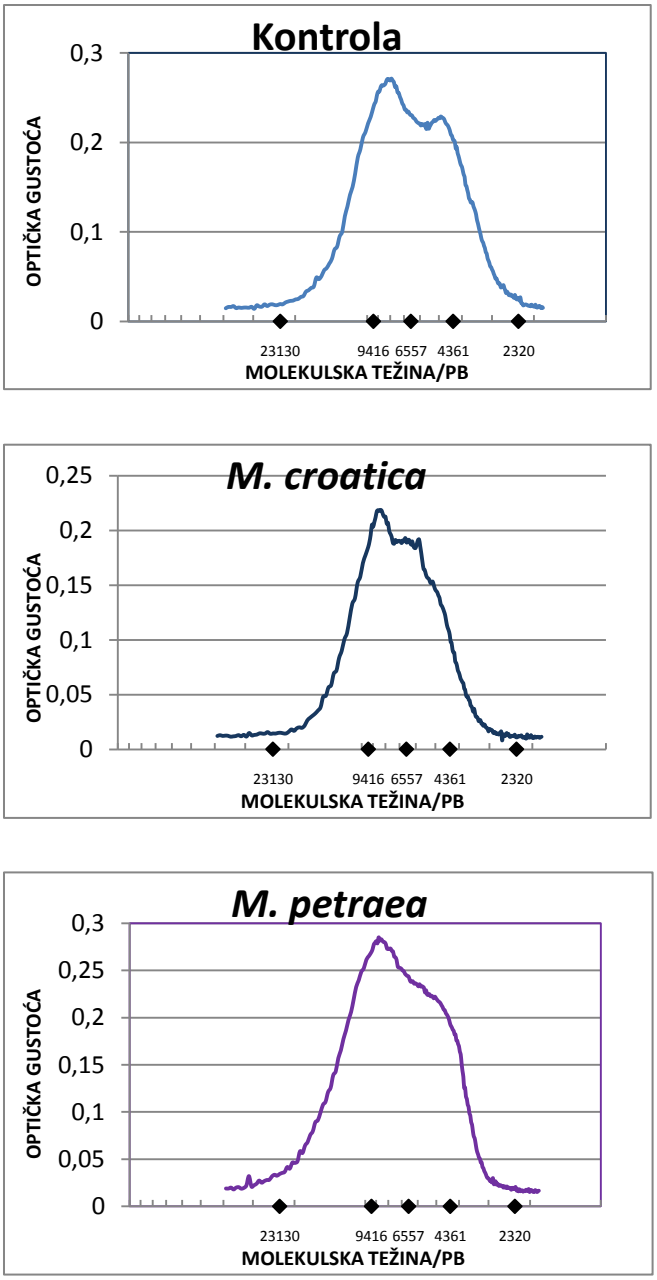
U tablici 5. prikazane su srednje vrijednosti duljine telomera kultura tretiranih ekstraktima i kontrolnih stanica, koje su prošle 40 i 50 populacijskih dioba, dobivene denzitometrijskom analizom. Izračunat je i postotak skraćenja telomera tijekom proliferacije stanica između 40 i 50 populacijskih dioba. Vidljivo je skraćenje duljine telomera kod svih kultura s tijekom proliferacije. Stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* imale su najdulje telomere i nakon 40 i nakon 50 populacijskih dioba. Kod kulture s 40 populacijskih dioba stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* imale su u prosjeku za 260 bp dulje telomere od kontrolnih stanica, a kod kulture s 40 populacijskih dioba ta razlika postala je još veća te je iznosila 453 bp. Stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* su kod kulture s 40 populacijskih dioba imale u prosjeku za 23 bp dulje telomere od kontrolnih stanica, a nakon sljedećih 10 populacijskih dioba imale su za 277 bp dulje telomere u odnosu na kontrolne stanice jednake starosti.

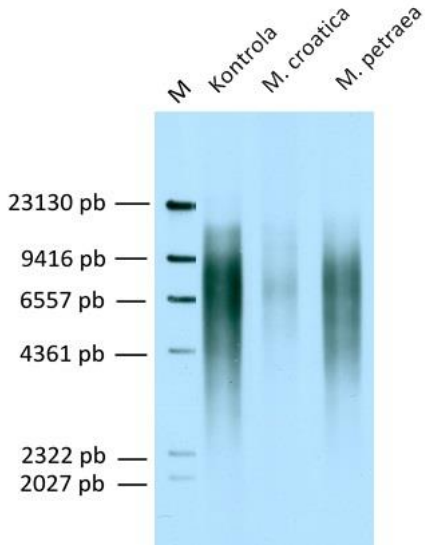
Tablica 5. Srednje vrijednosti duljine telomera kod kultura nakon 40 i 50 populacijskih dioba.

Duljina telomera (bp)			
	PD 40	**PD 50**	**Skraćenje**
Kontrola	6428	6043	386 (6%)
M. croatica	6689	6496	193 (2,88%)
M. petraea	6452	6320	132 (2,04%)



Slika 14. Distribucija duljine telomera kod kultura MJ90 nakon 40 populacijskih dioba. Stanična DNA je nakon elektroforeze prenesena na membranu i telomerne sekvence su detektirane hibiridizacijom s obilježenom sondom. Signali dobiveni duž linije razdvajanja uzorka elektroforezom su denzitometrirani u programu Master VDS Software, a molekulska težina određena je prema standardu veličine DNA (λ HindIII).





Slika 15. Distribucija duljine telomera kod kultura MJ90 nakon 50 populacijskih dioba. (M - λ HindIII)

5. RASPRAVA

Mehanizmi regulacije starenja organizama jedno su od centralnih pitanja koje je oduvijek intrigiralo istraživače tog područja. U prošlosti se starenje pokušavalo objasniti mnogim teorijama, međutim danas je poznato da je starenje proces na koji utječe više čimbenika. Za jedno od najbitnijih otkrića je svakako zaslužan L. Hayflick primijetio da fibroblasti koje je uzgajao imaju ograničen broj dioba (Hayflick i Moorhead 1961). Danas se taj termin koristi da bi se opisala replikacija stanica u kulturi. Kasnije je određen i maksimalan broj populacijskih dioba za pojedine vrste stanica koji se naziva Hayflickov limit. Za humane fibroblaste kakvi su korišteni i u ovom istraživanju iznosi 50-60 populacijskih dioba, nakon čega stanica ulazi u senescenciju. Nakupljanje senescentnih stanica kao i sve manja regenerativna sposobnost tkiva temelj su za starenje na razini organizma. Nadalje, otkriće telomera označilo je veliku prekretnicu u istraživanju starenja i dovelo do niza drugih otkrića koja su konačno rasvijetlila molekularnu pozadinu procesa starenja stanica. Danas je poznato da su telomere i njihova uloga „brojača dioba“ glavni ograničavajući čimbenik replikacijskog potencijala stanica. To je potvrđeno i mnogim istraživanjima (Bodnar i sur. 1998) te također otkrićem enzima telomeraze koji je zaslužan za produljivanje telomera. Ekspresijom telomeraze u somatskim stanicama dobiveni su impresivni rezultati odgode senescencije stanica (Vaziri i Benchimol 1998). Kod eksperimenata *in vivo* na miševima došlo je, ekspresijom telomeraze, do značajnog produljenja životnog vijeka te reverzije na fenotip mladih jedinki. U prilog telomerama kao najbitnijem faktoru određivanja staničnog starenja svakako ide i činjenica da je telomeraza aktivna u matičnim, spolnim i tumorskim stanicama za koje znamo da imaju neograničen replikativni potencijal. Korelacija između duljine telomera i životnog vijeka jedinke konstantno je vidljiva u brojnim studijama. Međutim, uz telomere, postoje i drugi unutarnji te vanjski čimbenici koji mogu utjecati na stanično starenje. Među njima su svakako slobodni radikali koji oštećenjima bioloških molekula mogu dovesti do ubrzanog starenja stanice. Zbog toga možemo reći da su antioksidanski kao neutralizatori slobodnih radikala prirodan način zaštite stanice od oštećenja, te je ključno održavanje njihove ravnoteže u tijelu (Ames i sur., 1993) .

U ovom diplomskom radu potvrđeno je antioksidacijsko djelovanje ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* definirano u prethodnim istraživanjima (Vladimir-Knežević i sur. 2011; Zovko Končić i sur. 2010; Šamec 2013). Iz dobivene baždarne krivulje vidljivo je da

ekstrakti obje biljke imaju podjednaku antioksidativnu aktivnost pri koncentraciji od 10 µg/ml koja je korištena za tretiranje staničnih kultura.

Osim definiranja antioksidativnih svojstava, dosad nisu provedena detaljnija istraživanja učinaka ovih ekstrakata biljaka na biološke molekule izuzev doktorske disertacije Šamec (2013). Također, ovo je prvo istraživanje dugotrajnog efekta ekstrakata *M. croatica* i *M. petraea* provedeno na biološkom sustavu *in vitro*. Iako još uvijek malobrojna, slična istraživanja bioaktivnih svojstava biljaka sve su više prisutna, posebice u zadnje vrijeme kada se sve više uočava njihova potencijalna primjena u medicini (Yang i sur. 2010). U ovom istraživanju promatran je utjecaj ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* na stanično starenje na nekoliko razina.

Određena je krivulja proliferacije stanica iz koje je vidljivo da tretiranje stanica ekstraktom kroz dulje vrijeme (~18 dioba rasta u kulturi) nema nikakav toksičan niti inhibitorni efekt na stanične diobe. Tretirane i kontrolne stanice napravile su približno jednak broj dioba koji je iznosio 50,69 kod kontrolnih stanica, 50,12 kod stanica tretiranih ekstraktom *M. croatica* te 48,22 kod stanica tretiranih ekstraktom *M. petraea*. Razlika između kontrolnih i stanica tretiranih ekstraktom *M. croatica* nije značajna i iznosi manje od jedne stanične diobe (0,57), a također se s grafa na slici 8. vidi da su krivulje proliferacije tih dviju staničnih kultura preklapajuće kroz cijelo vrijeme. Broj dioba stanica tretiranih ekstraktom *M. petraea* razlikuje se od kontrolnih stanica za 2,47 staničnih dioba. Iz grafa je vidljivo da stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* imaju paralelnu krivulju proliferacije s kontrolnim stanicama te ne dolazi do nikakvog usporavanja rasta.

Bojanje *SA-β-gal* opće je prihvaćena metoda određivanja udjela starih stanica u sustavima *in vitro* kao i *in vivo*. Prilično je jednoznačna metoda kod koje udio stanica pozitivnih na SA-β-gal s plavim obojenjem u citoplazmi odgovara udjelu starih stanica (Dimri i sur. 1995). Kod kultura s prijeđenih 40 i 50 populacijskih dioba stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* pokazale su znatno manji udio starih stanica u odnosu na kontrolne stanice, čak 30,19% kod stanične diobe 40, te 7,41% kod stanične diobe 50. Ovakvi rezultati upućuju da je kod stanica tretiranih ekstraktom *M. croatica* sačuvana morfologija mladih stanica dulje vremena nego kod kontrolnih stanica. Moguće je nekoliko načina djelovanja ekstrakta na odgodu staničnih promjena povezanih sa starenjem, a to su svakako smanjena razina

oštećenih proteina i oštećene DNA u stanici. Ovakvi rezultati u skladu su s istraživanjem Šamec (2013) gdje je dokazano smanjenje od čak 60% u odnosu na kontrolu oksidacije proteina goveđeg albumina *in vitro* kod inkubacije ekstraktom *M. croatica* pri koncentraciji 10 μg/ml. Usporedbom rezultata tog istraživanja s rezultatima detekcije starih stanica bojanjem pomoću SA-β-gal, možemo zaključiti da ekstrakt ima zaštitno djelovanje od oštećenja proteina i u živim stanicama. Obzirom na ove rezultate, daljnja istraživanja utjecaja ovog ekstrakta svakako bi trebala uključivati detaljnu analizu oštećenja proteina u živoj stanici.

Duljina telomera svakako je najvažniji čimbenik koji određuje nastanak starih stanica, kao što je već prethodno objašnjeno. Iz tog razloga su izmjerene duljine telomera tretiranih i kontrolnih stanica. Stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* pokazale su znatno dulje telomere od kontrolnih stanica (261 bp pri 40, i 453 bp dulje pri 50 staničnih dioba) što također može biti uzrok sačuvane morfologije mladih stanica uočene kod stanica tretiranih ovim ekstraktom. Ukoliko uzmemo u obzir da se telomere mogu skratiti 30-200 bp po diobi (Harley i sur. 1990), te u prosjeku 50-100 bp po diobi (Hodes 1990) možemo izračunati da će s navedenim razlikama u duljini telomera, tretirane stanice u prosjeku moći napraviti 3,9 do 6,8 staničnih dioba više od kontrolnih stanica prije ulaska u senescenciju. Ovakav pozitivan učinak ekstrakta *M. croatica* na duljinu telomera možemo objasniti na dva načina. Zaštitom telomernih proteina od oštećenja osigurava se stabilnost telomera i smanjuje se mogućnost naglog skraćivanja telomera. Drugi način je da ekstrakt smanjuje sama oštećenja telomerne DNA, za koja znamo da su veoma opasna jer se telomerna DNA zbog svoje specifične strukture teže popravlja od ostatka DNA molekule (Richter i sur. 2007). Ovakvi rezultati ponovno potvrđuju eksperimente *in vitro* doktorske disertacije Šamec (2013) u kojoj su ekstrakti biljke *M. croatica* pokazali zaštitno djelovanje na molekulu DNA od oštećenja uzrokovanih UV zračenjem uz prisutnost vodikova peroksida.

Metodom obilježavanja DNA s BrdU određen je udio proliferirajućih stanica. Stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* pokazale su 6,1% više proliferirajućih stanica u odnosu na kontrolne stanice. Zbroj udjela stanica pozitivnih na SA-β-gal i pozitivnih na BrdU iznosio je ~100% što ukazuje na komplementarnost ovih dvaju testova te na točnost prilikom njihova izvođenja.

Stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* reagirale su slično kao i stanice tretirane ekstraktom *M. croatica*. Udio starih stanica bio je manji u odnosu na kontrolne stanice za 10,09% kod kultura s 40 populacijskih dioba, te 17,69% kod 50 populacijskih dioba. Ovi rezultati potvrđeni su i mjerenjem duljine telomera pri čemu su tretirane stanice ekstraktom *M. petraea* imale dulje telomere u odnosu na kontrolne stanice.

Prema ovim rezultatima kulture tretirane s oba ekstrakta pokazale su značajne razlike u udjelu starih stanica i u duljini telomera u odnosu na kontrolne stanice. Time možemo pretpostaviti da ekstrakti imaju sličan ili isti način djelovanja u stanici, odnosno na isti način sudjeluju u zaštiti staničnih proteina i same DNA, s time da ekstrakt biljke *M. croatica* konstantno pokazuje nešto izraženiji efekt odnosu na ekstrakt *M. petraea*.

6. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju dokazan je pozitivan efekt ekstrakata biljaka *M. croatica* i *M. petraea* na stanice. Efekt je vidljiv na nekoliko razina, uključujući morfologiju i metabolizam stanica. Korištena koncentracija ekstrakata od 10 µg/ml nije pokazala nikakve toksične ili negativne utjecaje na stanični rast.

Iz dobivenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

i. Ekstrakti biljaka *M. croatica* i *M. petraea* ne inhibiraju staničnu proliferaciju tijekom duljeg perioda rasta u kulturi.
ii. Pokazano je da ekstrakt biljke *M. croatica* pozitivno utječe na vitalnost stanica te pokazuje sposobnost usporavanja pada broja proliferirajućih stanica u kulturi, u odnosu na kontrolne stanice. Ekstrakt biljke *M. petraea* također pozitivno utječe na vitalnost stanica.
iii. Pokazano je da stanice tretirane ekstraktom *M. croatica* kao i *M. petraea* imaju znatno sačuvaniju morfologiju i fiziologiju mladih stanica što znači da je usporeno stanično starenje u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Ovakav efekt može biti posljedica zaštitnog djelovanja ekstrakta na proteine stanice ili na samu DNA.
iv. Telomere su dulje kod stanica tretiranih ekstraktom *M. croatica* u odnosu na kontrolne stanice što ukazuje na to da ekstrakti imaju pozitivan utjecaj na zaštitu telomera. Stanice tretirane ekstraktom *M. petraea* također imaju dulje telomere u odnosu na kontrolne stanice.

7. LITERATURA

Ambrosio G., Zweier J. L., Duilio C., Kuppusamy P., Santoro G., Elia P. P., Tritto I., Cirillo P., Condorelli M., Chiariello M., Flaherty J. T. (1993): Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. J. Biol. Chem. 268: 18532-18541

Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922

Arora A., Byrem T. M., Nair M. G., Strasburg G. M. (2000): Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 102-109

Baumann P., Cech T. R. (2001): Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**: 1171-1175

Ben-Porath I., Weinberg R. A. (2004): When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **113**: 8-13

Bianchi A., Smith S., Chong L., Elias P., de Lange T. (1997): TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* **16**: 1785-1794

Blackburn E. H. (2001): Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**: 661-673

Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C.P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-352

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995): Use of free radical method to evaluate antioxidant acticity. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* **28**: 25-30

Bräuchler C., Ryding O., Heubl G. (2008): The genus *Micromeria* (*Lamiaceae*), a synoptical update. *Willdenowia* **38**: 363-410

Cerutti P. (1994): Oxy-radicals and cancer. *Lancet* **344**: 862-863

Chen Y., Yang Y., van Overbeek M., Donigian J. R., Baciu P., de Lange T., Lei M. (2008): A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* **319**: 1092-1096

Colgin L. M., Baran K., Baumann P., Cech T. R., Reddel R. R. (2003): Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr. Biol.* **13**: 942-946

Cook B. D., Dynek J. N., Chang W., Shostak G., Smith S. (2002): Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 332-342

D'Alcontres M. S., Mendez-Bermudez A., Foxon J. L., Salomoni P. (2007): Lack of TRF2 in ALT cells causes PML-dependent p53 activation and loss of telomeric DNA. *J. Cell. Biol.* **179**: 855-867

De Lange T., Shiue L., Myers R. M., Cox D.R., Naylor S.R., Killery A.M., Varmus H.E. (1990): Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 518-527

Del Río L. A., Sandalino L. M., Corpas F. J., Palma J. M., Barroso J. B. (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiol.* **141**: 330-335

Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Liskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9363-9367

Duru M.E., Öztürk M., Uğur A., Ceylan Ö. (2004): The constituents of essential oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol* **94**: 43-48

Gergiou O., Dimitrellos G., Georgiadis T. (1999): *Moltkia petraea* (*Boraginaceae*) in Greece. *Phyton* **40**: 57-69

Greider C. W. (1999): Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* **97**: 419-422

Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460

Hayflick L., Moorhead P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**: 585-621

Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P. C., Chen D. J., Sedivy J. M. (2004): Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53 and $p21^{CIP1}$, but not $p16^{INK4A}$. *Mol. Cell* **14**: 501-513

Hodes R. J. (1990): Telomere length, aging, and somatic cell turnover. *J. Exp. Med.* **190**: 153-156

Iwano T., Tachibana M., Reth M., Shinkai Y. (2004): Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J. Biol. Chem* **279**: 1442-1448

Kappei D., Londono-Vallejo A. (2007): Telomere lenght inheritance and aging. *Mech. Ageing Dev.* **129**: 17-26

Kim S. H., Kaminker P., Campisi J. (1999): TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* **23**: 405-412

Kremer D., Randić M., Kosalec I., Brkljačić A., Lukač G., Krušić I., Ballian D., Bogunić F., Karlović K. (2011): New localities of the subendemic species *Berberis croatica*, *Teucrium arduini* and *Micromeria croatica* in the Dinaric Alps. *Acta Botanica Croatica* **70**: 289-300

Krtolica A., Campisi J. (2002): Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects on the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1401-1414

Li B., Oestreich S., de Lange T. (2000): Identification of human Rap1:implications for telomere evolution. *Cell* **101**: 471-483

Loayza D., de Lange T. (2003): POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **424**: 1013-1018

McClintock B. (1942): The fusion of broken ends od chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **28**: 458-463

Møller I. M., Kristensen B. K. (2004): Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem. and Photobiol. Sci.* **3**: 730-735

Neumann A. A., Reddel R. R. (2002): Telomere maintenance and cancer-look, no telomerase. *Nature reviews* **2**: 879-884

Nikolić T., Fertalj K., Helman T., Mornar V., Kalpić (2001): CROFlora, a database application to handle the Croatian vascular flora. *Acta Botanica Croatica* **60**: 31-48

Nikolić T., Rešetnik I. (2007): Plant uses in Croatia. *Phytologia Balcanica* **13**: 229-238

Olovnikov A. M. (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the fenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**: 181-190

Pecorino L. (2012): Molecular biology of cancer. Mechanisms, targets and therapeutics. Oxford University Press: 27-29

Pelicci P. G. (2004): Do tumor-supressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence. *J. Clin. Invest.* **113**: 4-7

Richter T. S. G., Nelson G., Melcher M., Olijslagers S., von Zglinicki T. (2007): TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mech. Aging. Dev.* **128**: 340-345

Richter T., Zglinicki T. (2007): A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **42**: 1039-1042

Rubelj I., Vondraček Z. (1998): Stochastic mechanism of cellular aging-abrupt telomere shortening as a model of stochastic nature of cellular aging. *J. Theor. Biol.* **197**: 425-438

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* **2012**: 217037

Shiloh Y. (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 156-168

Smith S., de Lange T. (2000): Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* **10**: 1299-1302

Stojanović G., Palić I. (2008): Antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria* Bentham species. *Curr. Pharm. Des.* **14**: 3196-3202

Streit S., Mitchalski C. M., Erkan M., Kleeff J., Friess H. (2008): Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat. Protoc.* **4**: 37-43

Šamec D. (2013): Fitokemijska i genetska istraživanja endemičnih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamus intermedia*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu

Škrobot Vidaček N., Ćukušić A., Ivanković M., Fulgosi H., Huzak M., Smith J. R., Rubelj I. (2010): Abrupt Telomere Shortening in normal human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **45**: 235-242

Takai H., Smogorzewska A., de Lange T. (2003): DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13**: 1549-1556

Van Steensel B., de Lange T. (1997): Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**: 740-743

Vaziri H., Benchimol S. (1998): Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Current Biol.* **8**: 279-282

Wang R. C., Smogorzewska A., de Lange T. (2004): Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**: 355-368

Weitzman S. A., Turk P. W., Howard-Milkowski D., Kozlowski K. (1994): Free radical adducts induce alternations in DNA cytosine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1261-1264

Wiseman H., Halliwell B. (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17-29

Yamauchi Y., Furutera A., Seki K., Toyoda Y., Tanaka K., Sugimoto Y. (2008): Malondialdehyde generated from peroxidized linoleic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 786-793

Yang H. H., Jung B., Kim J. R. (2010): Identification od plant extracts that inhibit cellular senescence in human fibroblasts, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 584-592

Zovko Končić M., Kremer D., Gruz J., Strnad M., Biševac G., Kosalec I., Šamec D., Piljac-Žegarac J., Karlović K. (2010): Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1537-1542

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Matea Cedilak

Datum i mjesto rođenja: 15. kolovoza, 1990., Zagreb

Obrazovanje:

2005. – 2009. V. Gimnazija, Zagreb

2009. – 2012. Preddiplomski studij eksperimentalne biologije, PMF Zagreb

2012. – 2015. Diplomski studij molekularne biologije, PMF Zagreb

Iskustvo:

lis. 2013. - svi. 2014. Projekt citokemijske analize krvi kornjača

- Zavod za animalnu fiziologiju, PMF Zagreb

lip. 2014. - ruj. 2014. Rad u Fidelti Ltd.

- Laboratorij za *in vitro* farmakologiju

sij. 2015. - svi. 2015. Praksa na Institutu za mol. biol., Mainz, Njemačka

- Laboratorij za proteomiku i biologiju kromatina

Dodatne ativnosti:

- IntegraLife Workshop *'Scientific publishing and intellectual property protection in life sciences'* (Zagreb, 11. 2014.)
- Simpozij *'Time-how nature sets the clock'* (Vienna Biocenter, Beč, 11. 2013.)
- Član Udruge studenata biologije – BIUS
- Član Hrvatskog herpetološkog društva Hyla
- Višegodišnje sudjelovanje na manifestaciji 'Noć Biologije'