

Antioksidacijski i antiapoptotski učinak flavonola miricetina u kulturi stanica SH-SY5Y u uvjetima bakrom izazvanog oksidacijskog stresa

Kiralj, Zoran

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:647553>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Zoran Kiralj

**Antioksidacijski i antiapoptotski učinak
flavonola miricetina u kulturi stanica SH-
SY5Y u uvjetima bakrom izazvanog
oksidacijskog stresa**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom izv.dr. sc. Maje Jazvinščak Jembrek, te suvoditeljstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Jazvinščak Jembrek na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada te prilagodbi na specifične okolnosti uzrokovane epidemijom.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na susretljivosti i pomoći pri pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim zaposlenicima Laboratorija za proteinsku dinamiku na pomoći i ugodnoj atmosferi, a posebno dr.sc. Ignaciji Vlašić.

Posebno hvala mojim roditeljima i sestri na razumijevanju, podršci i povjerenju koji su mi pruženi tijekom studiranja.

Hvala svim prijateljima za odlično iskustvo studiranja, uspomene i podršku pred ispite, pogotovo Filipu i Nikoli.

Najviše hvala Sari za sve.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Antioksidacijski i antiapoptotski učinak flavonola miricetina u kulturi stanica SH-SY5Y u uvjetima bakrom izazvanog oksidacijskog stresa

Zoran Kiralj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Jedan od mehanizama u podlozi nastanka neurodegenerativnih promjena je stanje oksidacijskog stresa izazvanog poremećenom homeostazom metalnih iona. Pretpostavlja se da bi antioksidansi prirodnog porijekla mogli pomoći u ublažavanju štetnih učinaka oksidacijskog stresa, a s obzirom na svoja jaka antioksidacijska svojstva, smatra se da bi spojevi poput flavonoida mogli ostvariti neuroprotektivno djelovanje. Cilj istraživanja bio je analizirati učinak flavonoida miricetina na stanice SH-SY5Y kod kojih je stanje oksidacijskog stresa izazvano visokim koncentracijama bakra. Miricetin je povećao toksičan učinak bakra i dodatno smanjio preživljenje stanice SH-SY5Y. Također, potaknuo je produkciju reaktivnih kisikovih vrsta, ukazujući na svoju prooksidacijsku aktivnost u prisutnosti prijelaznog metala. Iako je miricetin potaknuo kondenzaciju kromatina i gubitak integriteta stanične membrane, aktivnost kaspaza 3 i 7 nije se povećala, što ukazuje na aktivaciju stanične smrti neovisne o kaspazama i smrt nekrozom. Osim toga, nakon tretmana bakrom i miricetina uočen je trend porasta ekspresije proteina PARP-1 i p73, dok je ekspresija TAp73 ostala nepromijenjena. Miricetin je pojačao učinak bakra na smanjenje ekspresije izoforme $\Delta Np73$.

(47 stranica, 14 slika, 1 tablica, 84 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: miricetin, bakar, neuroblastom, kaspaze, apoptoza, nekroza, prooksidacijski učinak

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Maja Jazvinščak Jembrek

Suvoditelj: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

doc. dr. sc. Marin Ježić

Rad prihvaćen: 17.02.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

Antioxidative and antiapoptotic effect of flavonol myricetin in cultured SH-SY5Y cells under copper-induced oxidative stress conditions

Zoran Kiralj

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

One of the main mechanisms leading to the development of neurodegenerative diseases is oxidative stress which is induced by metal ions dyshomeostasis. It is presumed that natural antioxidants could help in reduction of harmful effects of oxidative stress, and considering their strong antioxidative properties, it is believed that compounds like flavonoids could exert neuroprotective effects. The aim of this research was to analyse the effects of flavonoid myricetin in SH-SY5Y cells under copper-induced oxidative stress. Myricetin exacerbated toxic effects of copper and further reduced viability of SH-SY5Y cells. It increased production of reactive oxygen species, thus indicating its prooxidative activity in the presence of transition metal. Although myricetin induced chromatin condensation and loss of membrane integrity, activity of caspases 3 and 7 was not increased, indicating the activation of caspase-independent cell death and death by necrosis. In addition, following exposure to copper and myricetin, a trend towards increased expression of PARP-1 and p53 proteins was observed, while expression of TAp73 remained unchanged. Myricetin potentiated the effect of copper and further reduced the expression of the $\Delta Np73$ isoform.

(47 pages, 14 figures, 1 table, 84 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: myricetin, copper, neuroblastoma, caspases, apoptosis, necrosis, prooxidative effect

Supervisor: Assoc. Prof. Maja Jazvinščak Jembrek, PhD

Co-supervisor: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Reviewers: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Assoc. Prof. Renata Matoničkin Kepčija, PhD

Asst. Prof. Marin Ježić, PhD

Thesis accepted: 17th February 2021

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Reaktivne kisikove vrste.....	1
1.1.1. Endogeni izvori	1
1.2. Oksidacijski stres.....	2
1.2.1. Utjecaj OS-a na mozak	3
1.2.2. Poremećaj homeostaze bakra u neurodegenerativnim bolestima – učinak na OS.....	4
1.3. Stanični mehanizmi antioksidacijske obrane.....	5
1.4. Stanična smrt u uvjetima OS-a	6
1.4.1. Proteini uključeni u odgovor na OS i pokretanje apoptoze	7
1.5. Flavonoidi.....	8
1.5.1. Miricetin	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Otopine i puferi.....	14
3.1.3. Protutijela	16
3.1.4. Komerijalni kompleti i ostali materijali.....	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Održavanje stanične kulture SH-SY5Y	17
3.2.2. Brojanje stanica	17
3.2.3. Tretman stanica	18
3.2.4. Test MTT.....	18
3.2.5. Detekcija reaktivnih kisikovih vrsta	19
3.2.6. Detekcija apoptotskih i nekrotičnih stanica.....	19
3.2.7. Određivanje aktivnosti kaspaza-3 i 7.....	20
3.2.8. Određivanje razine ATP-a.....	20
3.2.9. Priprema stanica i izolacija proteina za westernsku metodu otiska.....	21
3.2.10. Određivanje koncentracije proteina.....	21
3.2.11. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	22
3.2.12. Prenošenje proteina na nitroceluloznu membranu i inkubacija sa specifičnim protutijelima.....	22
3.2.13. Vizualizacija ciljnih proteina.....	23
3.2.14. Statistička obrada podataka	23

4. REZULTATI.....	24
4.1. Učinak bakra i miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y	24
4.2. Učinak bakra i miricetina na proizvodnju RKV-a.....	27
4.3. Učinak bakra i miricetina na aktivaciju kaspaza i kondenzaciju kromatina.....	28
4.4. Učinak miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti H ₂ O ₂	32
4.5. Učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y.....	33
4.6. Utjecaj bakra i miricetina na ekspresiju proteina p53, p73 i PARP-1	34
5. RASPRAVA	36
6. ZAKLJUČAK	39
7. LITERATURA.....	40
ŽIVOTOPIS	48

1. UVOD

Oksidacijski stres (OS) opisuje se kao stanje neravnoteže između produkcije i akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) te sposobnosti tijela da ih neutralizira i eliminira. Zbog svoje visoke metaboličke aktivnosti i ograničene stanične regeneracije, mozak je veoma osjetljiv na negativne učinke OS-a. OS potiče različite molekularne puteve koji vode do progresivnog oštećenja strukture i funkcije neurona, rezultirajući u konačnici nastankom neurodegenerativnih bolesti. Brojni prirodni spojevi, posebice iz skupine flavonoida, pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost i posjeduju sposobnost modulacije signalnih puteva te zbog toga raste interes za proučavanjem njihovih učinaka u borbi protiv oksidacijskih oštećenja (Teleanu i sur. 2019).

Antioksidans se opisuje kao tvar koja sprječava ili otklanja oksidacijsko oštećenje ciljne stanice. Time je fiziološka uloga ovih tvari sprječavanje oštećenja staničnih komponenti uslijed kemijskih reakcija koje uključuju slobodne radikale. Istraživanja su pokazala kako je svaka molekula flavonola miricetina sposobna "hvatati" tj. neutralizirati različite radikale, a osim antioksidacijskih svojstava, miricetin ima brojne druge biološke učinke: antivirusne, antibakterijske, protuupalne te protutumorske (Barzegar 2016; Procházková i sur. 2011).

1.1. Reaktivne kisikove vrste

RKV-e se proizvode u organizmu čovjeka kao rezultat staničnog metabolizma, ali i akumuliraju uslijed izlaganja brojnim okolišnim čimbenicima poput zagađivača zraka i sastojaka iz dima cigarete. Veoma su reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanične strukture i narušiti njihovu funkciju ako su prisutne u koncentracijama većim od fizioloških. Regulacija reduciranog i oksidiranog (redoks) stanja molekula važna je za staničnu vijabilnost, aktivaciju, proliferaciju i organsku funkciju. Aerobni organizmi razvili su antioksidacijske mehanizme koji uključuje enzimske i ne-enzimske komponente za učinkovitu regulaciju i sprječavanje štetnih učinaka RKV-a (Birben i sur. 2012).

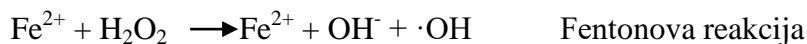
1.1.1. Endogeni izvori

RKV-e nastaju od molekularnog kisika kao rezultat staničnog metabolizma i dijele se na slobodne radikale i spojeve koji nisu slobodni radikali, ali imaju oksidacijsko djelovanje.

Tri glavne RKV-e od fiziološkog značaja su superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i vodikov peroksid (H_2O_2) (Birben i sur., 2012).

Superoksidni anion nastaje adicijom jednog elektrona molekularnom kisiku. Reakcija se odvija uz pomoć nikotin adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze ili ksantin oksidaze, ili preko mitohondrijskog transportnog lanca elektrona (*eng.* mitochondrial electron transport, MET). Elektroni koji se prenose duž ovog lanca služe za redukciju kisika u vodu. No, otprilike 1-3% ukupnog broja elektrona „odlutaju“ iz lanca stvarajući $\cdot\text{O}_2^-$. NADPH oksidaza nalazi se u neutrofilima, monocitima i makrofazima. Prilikom fagocitoze dolazi do naglog stvaranja $\cdot\text{O}_2^-$ što rezultira baktericidnom aktivnošću (Miller i sur. 1990).

H_2O_2 lako difundira kroz plazma membranu, a nastaje pomoću ksantin oksidaze, oksidaza aminokiselina i NADPH oksidaze. Preko Haber-Weiss i Fenton reakcije, H_2O_2 se razlaže u hidroksidni anion (OH^-) u prisutnosti prijelaznog metala poput Fe^{2+} ili Cu^{2+} (Dupuy i sur. 1991, Fenton 1984) :



Hidroksilni radikal najreaktivnija je RKV-a. Osim što može nanijeti veliku štetu stanici, ima sposobnost započeti reakciju lipidne peroksidacije uzimanjem elektrona od polinezasićene masne kiseline. Peroksidacija lipida narušava integritet stanične membrane što dovodi do promjena u membranskoj strukturi (Klebanoff 2015).

1.2. Oksidacijski stres

Narušena ravnoteža između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa rezultira stanjem OS-a. Prilikom OS-a, stanice pokušavaju vratiti redoks ravnotežu aktivacijom ili utišavanjem gena obrambenih enzima, transkripcijskih faktora i strukturnih proteina. Nekontrolirana produkcija RKV-a narušava strukturu DNA, proteina, lipida i aktivaciju nekoliko stresom-induciranih transkripcijskih faktora te proizvodnju pro- i protuupalnih citokina (Birben i sur. 2012). OS u mozgu potiču endogeni čimbenici poput nedjelotvorne antioksidacijske obrane, zastupljenost ekscitotoksičnih i autooksidirajućih neurotransmitera, osjetljivost polinezasićenih masnih kiselina na peroksidaciju i ograničeni regenerativni potencijal. S obzirom da OS utječe na aktivaciju brojnih molekularnih puteva zaslužnih za gubitak

strukture i funkcije neurona, smatra se glavnim čimbenikom u nastanku neurodegenerativnih poremećaja (Teleanu i sur. 2019).

1.2.1. Utjecaj OS-a na mozak

Otprilike 100 milijardi neurona u ljudskom mozgu regulira široki spektar motoričkih i regulatornih funkcija poput kretanja, ravnoteže, vidne i slušne percepcije, osjeta ugone i boli, hormonske i metaboličke regulacije, kao i kompleksne radnje poput govora, te učenja i pamćenja. Male varijacije u tisućama reakcija koje se događaju u njima vode do različitih morfoloških i funkcionalnih karakteristika neurona. Morfološki, neuroni središnjeg živčanog sustava razlikuju se u veličini, broju, razgranatosti dendrita, broju sinapsi, duljini aksona, itd (Wang i Michaelis 2010). Jedna od podjela neurona je s obzirom na neurotransmitere koje koriste prilikom transmisije/neuromodulacije, npr. glutamat, gama-aminomaslačnu kiselinu, acetilkolin, dopamin, adenzin ili peptidne neurotransmitere. Iako su ove razlike u strukturi i funkciji neurona detaljno istražene, manje se zna o različitim odgovorima moždanih stanica na stres i čimbenike starenja koji rezultiraju neurodegenerativnim bolestima. Ovaj fenomen se naziva selektivna neuronska ranjivost. Tako npr. neuroni entorinalnog korteksa, hipokampalne regije CA1, frontalnog korteksa i amigdale su osjetljiviji na neurodegeneraciju povezanu s Alzheimerovom bolesti (AB). U Parkinsonovoj bolesti (PB), dopaminergički neuroni crne tvari (substantiae nigrae) prvi su koji podliježu apoptozi, a amiotropična lateralna skleroza (ALS) karakterizirana je degeneracijom kralježničkih motoričkih neurona (Hyman i sur., 1984).

OS u neurodegenerativnim bolestima uzrokuje promjenu u metabolizmu neurona, ali utječe i na akumulaciju pojedinih proteina. AB je najpoznatiji neurodegenerativni poremećaj karakteriziran demencijom, slabljenjem kognitivnih funkcija, dezorijentacijom te depresijom. Uzrok i razvoj same bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, glavna patološka obilježja su naslage plakova i neurofibrilarnih snopića koji su posljedica izvan- i unutarstaničnog nakupljanja peptida amiloid beta ($A\beta$), odnosno proteina tau. Ovi plakovi ometaju neurotransmisiju što dovodi do neuroupale, poremećaja funkcije neurona, manjka neurotransmitera i u konačnici izaziva smrt neurona. Oligomeri $A\beta$ peptida potiču OS u neuronima. Uz to, redoks aktivni prijelazni metali za koje se zna da prilikom Fentonove reakcije povećavaju produkciju RKV-a, vežu se visokim afinitetom za $A\beta$. Povezanost AB i OS-a dokazana je i visokom razinom lipidne peroksidacije te oksidacijom proteina i DNA u neuronima. Nadalje, neuroni u AB-i imaju nisku proizvodnju ATP-a i citokrom c oksidaze što

upućuje na poremećaj funkcije mitohondrija (Zhu i sur. 2004). U PB, regija *pars compacta substantiae nigrae* selektivno odumire. OS uzrokuje snižavanje koncentracije glutaciona, najvažnije unutarstanične antioksidacijske molekule, te povišenje koncentracije željeza i aktivnosti monoamin oksidaze. Akumulacija slobodnih radikala u ovoj regiji dovodi do oksidacije dopamina u 6-hidrodoamin koji se potom autooksidira u kvinon pri čemu nastaje superoksidni anion. Kaskada ovih reakcija vodi do značajnog porasta OS-a i na kraju propadanja dopaminergičkih neurona (Pearce i sur. 1997).

Za zaštitu od štetnog učinka oksidacijskih modifikacija, neuroni su razvili brojne obrambene mehanizme koji uključuju promjenu konformacije ili razgradnje proteina te izrezivanje baza DNA i popravak DNA. Osim toga, organizam čovjeka opremljen je različitim antioksidacijskim mehanizmima koji služe u borbi protiv negativnih učinaka RKV-a (Wang i Michaelis 2010).

1.2.2. Poremećaj homeostaze bakra u neurodegenerativnim bolestima – učinak na OS

Bakar (Cu) je element sa značajnom ulogom kako u brojnim biološkim funkcijama, tako i u razvoju i funkcioniranju središnjeg živčanog sustava (SŽS-a). Nalazi se u svim dijelovima mozga, a posebno u bazalnim ganglijima, hipokampusu, malom mozgu i brojnim sinaptičkim membranama. Ovaj metal je kofaktor brojnih enzima uključenih u različite metaboličke i redoks reakcije (Giampietro i sur. 2018). Cu omogućuje prijenos elektrona i zato je potreban za katalitičku aktivnost tzv. bakrovih enzima koji su važni za pravilno funkcioniranje mozga i živčanog sustava – tirozinaze u sintezi melanina, citokrom c oksidaze u transportu elektrona u staničnom disanju, bakar/cink superoksid dismutaze (SOD) u antioksidacijskoj obrani, dopamin- β hidroksilaze u biosintezi katekolamina i ceruplazmina koji održava homeostazu željeza u mozgu (Waggoner i sur. 1999). Sudjelujući u redoks reakcijama, Cu može potaknuti stvaranje RKV-a što vodi OS-u. U prisutnosti superoksida ili bilo kojeg drugog reducirajućeg agensa (askorbinske kiseline, glutaciona (GSH)), Cu^{2+} se reducira u Cu^+ koji sudjeluje u nastanku hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida putem Haber-Weiss reakcije. Hidroksilni radikal, najsnažniji oksidacijski radikal u biološkom sustavu, reagira s gotovo svim staničnim spojevima nanoseći niz oksidacijskih oštećenja (Gaetke i sur. 2014).

Homeostaza Cu je regulirana kroz kompleksni sustav transportera Cu i šaperon proteina, a njeno narušavanje rezultira neurodegenerativnim bolestima. Određena istraživanja pokazuju kako nakupljanje Cu u određenim dijelovima mozga pridonosi razvoju neurodegenerativnih

bolesti poput AB-i, ALS-e i Creutzfeldt-Jakobove bolesti (Uriu-Adams i Keen 2005). S obzirom da reagira s peptidom A β , prekursorom amiloid proteina (*eng.* amyloid precursor protein, APP) i proteinom tau, Cu ima ulogu u patogenezi AB-i tako što pomaže u nakupljanju peptida A β i neurotoksičnosti (Giampietro i sur. 2018). S druge strane, oksidacijska oštećenja mogu biti rezultat interakcije homocisteina i Cu²⁺ prilikom koje se proizvodi velika količina H₂O₂ što potiče OS na neuronima i razvoj AB-i (Gaetke i Chow 2003).

1.3. Stanični mehanizmi antioksidacijske obrane

Stanični antioksidacijski sustav zaštite uključuje antioksidacijske enzime SOD-u, katalazu (KAT), glutation peroksidazu (GPx), kao i ne-enzimatske antioksidanse (vitamini E i C, β -karoten, GSH, flavonoidi).

Superoksidni anion nastaje iz različitih izvora, stoga je njegova dismutacija pomoću enzima SOD-e od velikog značaja. H₂O₂ koji nastaje aktiviranjem SOD-e ili drugih oksidaza reducira se u vodu preko aktivnosti KAT-e i GPx-e. KAT je tetramer sastavljen od 4 identična monomera, svaki sadrži hem grupu u aktivnom mjestu. Obitelj GPx-a je obitelj tetramernih enzima koji sadrže selenocistein i koriste tiole malih molekularnih masa, poput GSH, za redukciju H₂O₂ i lipidnih peroksida u alkohole. Zajedničko obilježje antioksidansa je potreba za NADPH kao reducirajućeg faktora. NADPH održava KAT-u u aktivnom stanju, služi kao kofaktor drugim reduktazama i ostalo. S obzirom da održava unutarstaničnu razinu NADPH, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza smatra se esencijalnim regulatornim antioksidacijskim enzimom (Birben i sur. 2012, Dickinson i Forman 2002, Flohé 1988, Kirkman i sur. 1999)

Vitamin C (askorbinska kiselina) neutralizira slobodne radikale i pretvara radikale vitamina E u vitamin E. Najaktivnija forma vitamina E je α -tokoferol i glavni je antioksidans povezan s membranom (Mezzeti i sur. 1996). Antioksidacijska svojstva ovih vitamina usko su povezana s neuroprotektivnim učinkom. Istraživanja su pokazala kako vitamin C i E sprječavaju oksidaciju cisteina koji pridonosi nakupljanju proteina tau (Boothby i Doering 2005). GSH se nalazi u gotovo svim staničnim strukturama. Donira elektron vodikovom peroksidu koji se reducira u vodu i kisik. Štiti stanice preko interakcije s proapoptotičkim i antiapoptotičkim signalnim putevima, te regulira nekoliko transkripcijskih faktora. Karotenoidi su pigmenti pronađeni u biljaka. β -karoten reagira s peroksilnim, hidroksilnim i superoksidnim radikalima (El-Agamey i sur., 2004, Masella i sur. 2005).

Iako su stanični antioksidacijski mehanizmi jako učinkoviti u održavanju redoks homeostaze, oni ne uklanjaju u potpunosti RKV-e iz unutarstaničnog okruženja, niti bi to bilo poželjno s obzirom da stanice koriste RKV-e kao signalne molekule za praćenje promjena u unutar- i izvanstaničnom okolišu. Stoga, kombinacija antioksidacijskih enzima i neenzimatskih antioksidanasa pruža svestran i prilagodljiv sustav zaštite i kontrole unutarstanične razine RKV-a (Wang i Michaelis 2010).

1.4. Stanična smrt u uvjetima OS-a

Pretjerano nakupljanje RKV-a i njihovo djelovanje sa staničnim makromolekulama, može izazvati staničnu smrt kroz proces apoptoze. Apoptoza je biokemijski proces kojim se oštećene i promijenjene stanice uklanjaju iz višestaničnog organizma. (Jiang i sur. 2019). Sam proces je veoma kompleksan i dijeli se na dva glavna puta: vanjski i unutarnji. Međutim, dokazano je kako su oni međusobno povezani i da molekule jednog puta utječu na drugi. Oba puta imaju zajednički završni korak – cijepanje kaspaze-3 dovodi do degradacije DNA i jezgrenih proteina, formiranja apoptotskih tijela, ekspresije liganada za fagocitne receptore i na kraju fagocitoze (Elmore 2007).

Glavno morfološko obilježje apoptotske stanice je kondenzacija kromatina i fragmentacija jezgre. Kondenzacija započinje uz jezgrinu ovojnicu stvarajući polumjesečasti ili prstenasti oblik. U fazama kasne apoptoze, kondenzacija se pojačava i u konačnici dolazi do karioreksije, odnosno raspada jezgre unutar stanice (Majno i Joris 1995). Kondenzacija i fragmentacija jezgre može se uočiti svjetlosnim, elektronskim te fluorescencijskim mikroskopom uz pomoć fluorescentnih boja, čime se olakšava detekcija apoptotskih stanica (Kressel i Groscurth 1994). Drugi oblik stanične smrti, nekroza, opisuje se kao stanična smrt koja je posljedica okolišnih faktora koji izazivaju nekontrolirano oslobađanje staničnog sadržaja (Fink i Cookson 2005). Intenzitet oštećenja i energetska razina stanice određuje krajnji ishod stanične sudbine. Dokazano je kako niska koncentracija ATP-a u stanici dovodi do nekroze (Leist i Jaatela 2001). Morfologija nekrotičnih stanica je raznolika. Stanična membrana je propusna, organeli se proširuju, a ribosomi se odvajaju od endoplazmatskog retikuluma. (Clarke 1990). Za detekciju nekrotičnih stanica koriste se molekule koje inače ne prolaze staničnu membranu, a u ovom slučaju uspijevaju. Propidij jodid (PI), cijaninske boje kao i nekoliko drugih se koriste za detekciju stanica s oštećenom membranom. Njihov visoki afinitet za DNA te pojačana fluorescencija prilikom vezanja za DNA ih čini pogodnim za detekciju nekrotičnih stanica (Kressel i Groscurth 1994).

Iako zajednički završni korak unutarnjeg i vanjskog puta apoptoze uključuje prisutnost aktiviranih izvršnih kaspaza, u određenim istraživanjima, koja su koristila inhibitore kaspaza, apoptoza se i dalje pojavljivala. Tako je otkrivena apoptoza neovisna o kaspazama čiji je pokretač promjena membranskog potencijala mitohondrija. Mitohondriji su veliki izvor RKV-a, stoga njihovo oštećenje vodi do povećane razine RKV-a koje potom aktiviraju poli (ADP-riboza) polimerazu-1 (PARP-1). Aktivacija PARP-1 je neophodna za otpuštanje faktora indukcije apoptoze (*eng.* apoptosis inducing factor, AIF) iz mitohondrija koji potom cijepa DNA što rezultira apoptozom stanice (Hongmei 2012).

Recentna istraživanja fokusiraju se sve više na OS i njegov utjecaj na signalne molekule u neurodegenerativnim bolestima, što u konačnici vodi apoptozi. Visoke koncentracije glutamata previše stimuliraju glutamatergične neurone što dovodi do povećane koncentracije RKV-a, OS-a i naposljetku smrti neurona. Ekscitotoksičnost glutamata pojavljuje se kako u akutnim neurodegenerativnim stanjima (infarkt, trauma, epileptični napad), tako i u neurodegenerativnim bolestima poput AB-i i ALS-e (Radi i sur. 2014).

1.4.1. Proteini uključeni u odgovor na OS i pokretanje apoptoze

Proteaze koje u svom aktivnom mjestu sadrže cistein te cijepaju proteinski supstrat nakon aspartata su kaspaze, a karakteristično su aktivirane tijekom apoptoze. Kao što je prethodno navedeno, kaspaze se aktiviraju vanjskim ili unutarnjim putem. Unutarnji put, koji koristi većina neurona, uslijed oslobađanja mitohondrijskog citokroma c u citoplazmu inducira stvaranje apoptosoma i potom aktivaciju različitih kaspaza (Stefanis 2005).

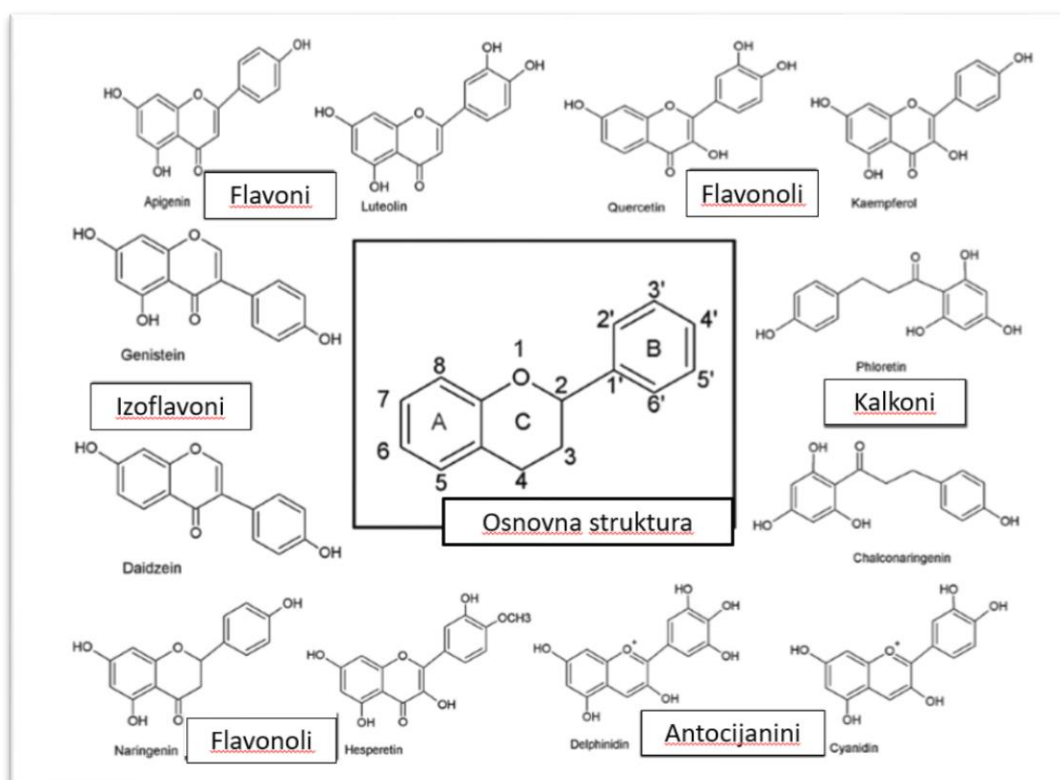
Transkripcijski faktor p53 ima važnu ulogu u određivanju stanične smrti ili preživljenja primarno regulirajući transkripciju različitih pro- i antiapoptotskih gena (Zubčić i sur. 2020). Dva srodnika proteina p53 - p63 i p73 pokazuju veliku strukturnu sličnost s p53. Bez obzira na razlike u njihovoj funkciji, njihova međusobna interakcija određuje sudbinu stanice (Zorić i sur. 2010). Povećana razina i aktivacija proteina p53 dovodi do smrti neurona u različitim uvjetima OS-a, uključujući i visoke koncentracije bakra (Radovanović i sur. 2019). S druge strane, prekomjerna ekspresija $\Delta Np73$ (izoforna proteina p73) može inhibirati p53 i tako sačuvati neurone od stanične smrti. No, oštećenjem DNA, $\Delta Np73$ se brzo razgrađuje putem nepoznatog mehanizma, čime se gubi neuroprotektivan učinak (Maise i sur. 2004).

Uslijed OS-a stvaraju se oštećenja na DNA, a za popravak DNA, većina eukariotskih stanica eksprimira protein PARP-1. PARP-1 je jezgreni enzim koji se veže za lance oštećene DNA formirajući poli (ADP-riboza) polimere. PARP-1 se u konačnici odvaja s krajeva DNA olakšavajući daljnji proces popravka (Diaz-Hernandez i sur. 2007).

1.5. Flavonoidi

Prirodni spojevi su složene kemijske molekule koje se nalaze uglavnom u biljkama i mikroorganizmima, a osim što su u stanju spriječiti ili umanjiti štetu uzrokovanu OS-om, pokazalo se da moduliraju unutarstanični prijenos signala izravnim utjecajem na enzime kao što su kinaze, regulatorni proteini i receptori (Bagli i sur. 2016).

Flavonoidi su važni prirodni spojevi koji pripadaju skupini sekundarnih biljnih metabolita s polifenolnom strukturom. Rasprostranjeni su u biljnom carstvu i povezuju se sa širokim spektrom pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje (Panche i sur. 2016). Osnovnu strukturu flavonoida čine tri prstena – dva aromatska centra sa središnjim oksigeniranim heterociklom (Barzegar 2016), a s obzirom na razlike u vezanju prstena B na ugljik prstena C te razinu nezasićenosti odnosno oksidacije, flavonoidi se dijele u nekoliko podskupina (Slika 1) (Panche i sur. 2016).



Slika 1. Osnovna struktura i podjela flavonoida (preuzeto i prevedeno od Panche i sur. 2016)

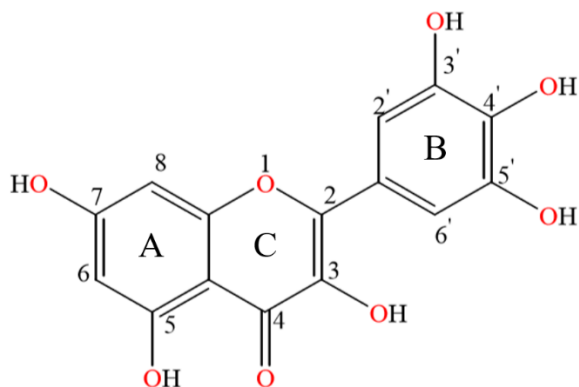
Pokazano je da flavonoidi ostvaruju brojne neuroprotektivne učinke u različitim eksperimentalnim sustavima, te zbog toga postoji znatan interes za njihove biološke učinke, od kojih se posebno ističe antioksidacijski (Pollastri i sur. 2011). Antioksidacijski učinak postižu na više načina: heliranjem iona prijelaznih metala, aktivacijom antioksidacijskih enzima i inhibicijom oksidaza, a temelji se na doniranju vodikova atoma te potom hvatanju nastalog slobodnog radikala i u konačnici prekidanju lančane reakcije (Kazazić 2004). Flavonoidi reagiraju s različitim signalnim proteinima poput kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (*eng.* extracellular-signal-regulated kinase, ERK) i fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) te tako moduliraju njihovo djelovanje koje vodi povoljnim neuroprotektivnim učincima. Flavonoidi također zaustavljaju razvoj neurodegenerativnih bolesti inhibiranjem apoptoze neurona koja je inducirana neurotoksičnim tvarima (slobodnim radikalima, peptidom A β) (Ayaz i sur. 2019).

Bioaktivnost flavonoida ovisi o njihovoj strukturi, pri čemu flavonoli pripadaju aktivnijim spojevima. Flavonoli sadrže keto skupinu i utvrđeno je da njihov unos u organizam ima pozitivne učinke na smanjenje rizika od nastanka neurodegenerativnih i kardiovaskularnih

bolesti. Nalaze se u raznom voću i povrću, a najistraženiji flavonoli su kempferol, kvercetin i miricetin (Survay i sur. 2010).

1.5.1. Miricetin

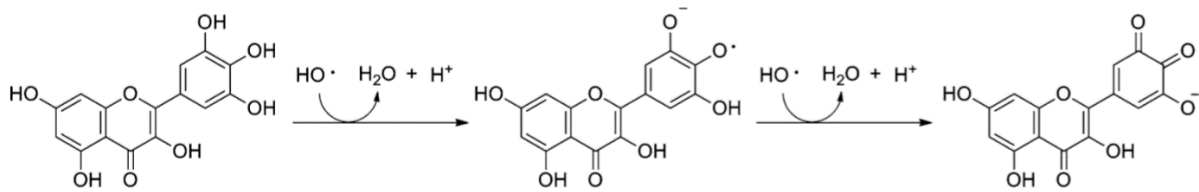
Miricetin je prirodni flavonol s jedinstvenom kemijskom strukturom. Sastoji se od dva aromatska prstena povezana zajedno s heterocikličkim pironskim prstenom (Slika 2) (Barzegar 2016). Spoj pokazuje niz bioloških aktivnosti koje uključuju antikancerogena, antidijabetička, antioksidacijska i protuupalna svojstva. Osim toga, miricetin inhibira produkciju RKV-a i aktivaciju kaspaze 3 koji su posljedica citotoksičnosti izazvane glutamatom, pružajući tako zaštitni učinak neuronima (Shimmyo i sur. 2008b).



Slika 2. Kemijska struktura miricetina (preuzeto i uređeno prema Barzegar 2016)

1.5.1.1. Antioksidans ili prooksidans?

Antioksidacijski mehanizam miricetina uključuje inaktivaciju superoksidnog aniona prijenosom elektrona pri čemu nastaje ariloksil radikal (Slika 3). Zbog same stabilizacije ariloksil radikala, antioksidacijski učinak raste. To se očituje u hvatanju različitih vrsta radikala i iona, što uključuje $\cdot\text{O}_2^-$ generiran u sustavu fenazin metosulfat-NADH te $\cdot\text{OH}$ generiran u prisutnosti H_2O_2 (Park i sur. 2016). Miricetin ima sposobnost regeneracije aktivnosti i proteinske ekspresije staničnih antioksidacijskih enzima poput SOD-e, KAT-e i GPx-e (Semwal i sur. 2016).



Slika 3. Predloženi antioksidacijski mehanizam djelovanja miricetina. (Preuzeto od Park i sur. 2016)

Antioksidacijski učinak miricetina dokazan je različitim staničnim testovima. U fibroblastima pluća kineskog hrčka, miricetin je pokazao protektivni učinak putem inaktivacije peroksidnog radikala i regulacije apoptoze. Slično se događa i u stanicama kvasca, a miricetin je učinkovit i u prevenciji poremećaja funkcije mitohondrija blokiranjem lipidne peroksidacije i stvaranja RKV-a (Park i sur. 2016). No, prema Duthie i Morrice (2012), pozitivan učinak miricetina *in vivo* ograničen je njegovom slabom bioraspoloživosti.

Bez obzira na svoje antioksidacijske učinke, pojedine studije pokazale su kako miricetin posjeduje i prooksidacijska svojstva. Prooksidansi su spojevi koji induciraju OS proizvodnjom RKV-a ili inhibiranjem antioksidacijskog mehanizma obrane. Smatra se da postoje tri čimbenika koja utječu na promjenu antioksidansa u prooksidans, a to su:

1. Prisutnost metalnog iona
2. Koncentracija antioksidansa
3. Redoks potencijal spoja

Dokazano je da se flavonoidi ponašaju kao prooksidansi u uvjetima kada je prisutan prijelazni metal. Prisutnost bakra ili željeza katalizira redoks reakciju stvarajući radikale koji oštećuju lipide i DNA (Sotler i sur. 2019). Smatra se da su prooksidacijska svojstva izravno proporcionalna ukupnom broju hidroksilnih skupina u flavonoidnoj molekuli. S obzirom na mnogostruke hidroksilne skupine u molekuli miricetina, iz toga proizlazi i njegov značajan utjecaj na produkciju hidroksilnog radikala ($\cdot\text{OH}$) u Fentonovoj reakciji (Procházková i sur. 2011).

Iako u niskim koncentracijama miricetin inhibira Fe-induciranu lipidnu peroksidaciju u mikrosomima jetre štakora, pri višim koncentracijama pokazuje prooksidacijski učinak te potiče nastanak hidroksilnih radikala. U prisutnosti antitumorskih antibiotika uzrokuje čak i oštećenje DNA (Park i sur. 2016). Miricetin ubrzava nastanak $\cdot\text{OH}$ u prisutnosti Fe^{3+} -EDTA i H_2O_2 . Tijekom ove reakcije miricetin prolazi kroz proces autooksidacije pri čemu nastaje $\cdot\text{O}_2^-$

a potom i $\cdot\text{OH}$ koji uzrokuje oštećenja na ne-lipidnim staničnim komponentama (Ong i Khoo 1997) te se zato potencijalni negativni učinci miricetina prilikom “transformacije” u prooksidans ne smiju zanemariti.

1.5.1.2. Neurobiološka aktivnost

Brojna istraživanja fokusirana su na potencijalnu primjenu miricetina u sprječavanju razvoja neurodegenerativnih bolesti. Njegov učinak temelji se na specifičnoj reakciji s tau proteinom. Tau protein se nalazi u distalnim dijelovima aksona te pridonosi fleksibilnosti i stabilnosti mikrotubula (Semwal i sur. 2015). Kao što je već spomenuto, fibrili $\text{A}\beta$ i neurofibrilarni snopovi koji se sastoje od hiperfosforiliranih formi proteina tau, glavni su uzročnici AB-i. Miricetin ima terapijski potencijal protiv ove bolesti na način da inhibira formiranje kako fibrila $\text{A}\beta$, tako i neurofibrilarnih snopova (Park i sur. 2016).

Peptidi $\text{A}\beta$ nastaju cijepanjem APP-a. Reakciju cijepanja provode enzimi β -sekretaza (BACE) i γ -sekretaza, a miricetin inhibira enzim BACE-1 (Shimmyo i sur. 2008a). Formiranje fibrila $\text{A}\beta$ ima neurotoksični učinak i uzrokuje nastanak RKV-a, miricetin ima neuroprotektivni učinak tako što neutralizira nastale radikale (Choi i sur. 2014). U zadnje vrijeme, sve se više govori o važnosti oligomera $\text{A}\beta$ u nastanku AB-i, a miricetin se pokazao kao učinkovit inhibitor njihovog formiranja (Ono i sur. 2012). S druge strane, u istraživanju Jimenez i suradnika (2004) miricetin nije pokazao neuroprotektivni učinak u stanicama SH-SY5Y u kojima je apoptoza izazvana rotenonom. Ovo otkriće ukazuje na činjenicu da je potrebno još istraživanja za otkrivanje stvarnih učinaka miricetina.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak flavonola miricetina na preživljenje neuronalnih stanica kod kojih je oksidacijsko oštećenje izazvano visokim koncentracijama iona bakra, te djelomično razjasniti molekularne mehanizme u podlozi njegovog djelovanja, prvenstveno praćenjem antioksidacijskog i antiapoptotskog djelovanja. S obzirom na poznata antioksidacijska svojstva flavonola i ostalih flavonoida, hipoteza istraživanja bila je da će miricetin povećati preživljenje stanica SH-SY5Y i ublažiti posljedice bakrom-izazvanog oksidacijskog oštećenja.

Antioksidacijski učinak miricetina odredio sam mjerenjem nastajanja RKV-a kao glavnog markera OS-a, a apoptotske promjene sam pratio promatranjem kondenzacije kromatina te mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7.

Osim toga, analizirao sam učinak miricetina na promjene u ekspresiji proteina p53, p73 i PARP-1 budući da su ovi proteini uključeni u odgovor stanice na oksidacijsko oštećenje i pokretanje apoptoze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Istraživanje sam proveo na staničnoj liniji neuroblastoma SH-SY5Y dobivenoj iz koštane srži četvorogodišnjakinje oboljele od neuroblastoma. S obzirom da posjeduje brojne biokemijske i funkcionalne karakteristike neurona, stanična linija SH-SY5Y se koristi kao model za njihovo proučavanje (Xie i sur. 2010).

3.1.1. Kemikalije

- Sigma Aldrich (SAD) : medij za uzgoj stanica (eng. Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM), penicilin/streptomycin, Na-piruvat, L-glutamin, fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum, FBS), tripsin, vodikov peroksid (H_2O_2), miricitrin, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT), 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat (H_2DCFDA), 2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol-trihidroklorid trihidrat (Hoechst 33342), propidij jodid, tris-baza, N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED), 10% natrijev dodecil sulfat (eng. sodium dodecyl sulphate, SDS), amonijev persulfat (APS)
- Kemika (Hrvatska) : etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), bakar (II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \times 5 H_2O$), dimetil-sulfoksid (DMSO), etanol, metanol, naftol modriilo, octena kiselina
- Chennai (TCI Chemicals Pvt. Ltd., India): miricetin

3.1.2. Otopine i puferi

- Kompletirani medij za održavanje stanične kulture: DMEM s dodatkom 100 jedinica penicilina G/mL i 100 $\mu g/mL$ streptomicina, 1 mM Na-piruvata, 2 mM L-glutamina i 10% FBS-a.
- Pufer za ispiranje stanica (eng. phosphate buffered saline, PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.4
- Otopina za odvajanje stanica od površine posudice: PBS sa 0.05% tripsina i 1 mM EDTA.
- $CuSO_4 \times 5 H_2O$: matična otopina 5×10^{-2} M u dH_2O

- miricetin: matična otopina: 3.18 mg/mL u DMSO, 10 mM
- H₂O₂: 10 mM
- miricitrin: matična otopina: 4.64 mg/mL u DMSO
- MTT: 5mg/mL u PBS-u (10x)
- H₂DCFDA: 40 mM u DMSO
- Hoechst 33342: 1 mg/mL u dH₂O
- PI: 1 mg/mL u dH₂O
- Otopina za bojanje (10x): 13.34 μL PI (200 μM) + 2.8 μL Hoechst 33342 (50 μM) + 83.86 μL H₂O
- Tris-baza (pH = 8.8): 90.885 g Tris + reH₂O do 500 mL (*c* = 1.5 mol/L)
- Tris-baza (pH = 6.8): 60.57 g Tris + reH₂O do 100 mL (*c* = 1 mol/L)
- 30% matična otopina akrilamida: 30% akrilamid + 0.8% bisakrilamid
- 10% SDS (pH = 7.2): 10 g SDS + reH₂O do 100 mL
- APS : 10 g amonijev persulfat + reH₂O do 100 mL
- Pufer za nanošenje uzoraka, 4 × LB (*eng.* laemmli buffer): 2 mL Tris (*c* = 1 mol/L, pH = 6.8) + 617,2 mg ditioneitol (DTT) (*c* = 100 mmol/L) + 800 mg 10% SDS + 4 mL glicerol + 40 mg bromfenol plavo
- Pufer za elektroforezu (10 ×): Tris-baza (*c* = 25 mmol/L) + glicin (*c* = 190 mmol/L) + 0.1% SDS
- Otopina za bojanje membrane: 0.5 g naftol modriilo + 50 mL etanol + 10 mL octena kiselina + reH₂O do 500 mL
- Otopina za odbojavanje membrane: 40% metanol + 7% octena kiselina, reH₂O
- Otopina za blokiranje membrane: 5 g obrano mlijeko u prahu + TBST do 100 mL
- Pufer TBST (10 ×) (*eng.* tris buffer saline tween, TBST): NaCl (*c* = 150 mmol/L) + Tris (*c* = 50 mmol/L) + 50 mL Tween-20 + reH₂O do 500 mL
- Pufer za prijenos (10 ×): Tris-baza (*c* = 184 mmol/L) + glicin (*c* = 140 mmol/L) + 20% etanol

Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje

Sastojak	Gel za sabijanje (9%) Volumen (mL)	Gel za razdvajanje (10%) Volumen (mL)
ReH ₂ O	4.3	4.0
30% matična otopina akrilamida	3	3,3
1,5 M Tris (pH 8.8)	-	2,5
1 M Tris (pH 6.8)	2,5	-
10%-tni SDS	0.1	0.1
10%-tni APS	0.1	0.1
TEMED	0.005	0.004

3.1.3. Protutijela

- Primarna protutijela:

anti-p53 α (TSR α dobiveno ljubaznošću prof. Bourdona, 1:2000)

anti-p73 (ab40658, Abcam, 1:3000)

anti-PARP-1 (F-2: sc-8007, Santa Cruz Biotechnology, SAD, 1:1000)

anti- β -aktin (7DC2C10, 60008 1-Ig, Proteintech: 1:10000)

- Sekundarna protutijela:

Konjsko protumišje (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology, SAD, 1:3000)

Kozje protuzečje (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology, SAD, 1:3000)

3.1.4. Komercijalni kompleti i ostali materijali

- komercijalni komplet *CellTiter-Glo*[®] 2.0 *Cell Viability Assay* (Promega)
- komercijalni komplet *Caspase-Glo*[®] 3/7 *Assay* (Promega)
- inhibitori proteaza (Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, Indianapolis, IN, USA)
- komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina *Pierce*[™] *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD); standardi otopine proteina albumina iz

goveđeg seruma, (*eng.* bovine serum albumine. BSA) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/mL

- nitrocelulozna membrana za transfer proteina *GE Healthcare Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose Membrane*, pora promjera 0.2 µm
- biljeg molekulskih masa *Precision Plus Protein Standards Dual Color*, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Održavanje stanične kulture SH-SY5Y

Stanice sam uzgajao u posudicama za staničnu kulturu (25 cm²), u kompletiranom mediju, na 37 °C pri 5% CO₂ uz relativnu vlažnost 95%. Kako stanice proliferiraju, s vremenom ispunje posudicu za kulturu te ih je potrebno presaditi. Odvajanje stanica od podloge i premještanje u svježi medij naziva se pasažiranje. Ovaj postupak omogućuje daljnji rast stanične linije i izvodio sam ga dva puta tjedno. Iz posudice za staničnu kulturu uklonio sam stari medij te stanice dva puta isprao sa po 2 mL PBS-a, a potom s 0.5 mL otopine s tripsinom. Nakon 10-ak minuta stanice se odvajaju od dna posudice te zaokružuju što se prati svjetlosnim mikroskopom. Odvojene stanice sam resuspendirao u 2 mL kompletiranog medija, od čega sam u posudici ostavio 1/5 suspenzije (400 µL) za daljnje održavanje kulture, a ostatak stanične suspenzije koristio sam za potrebe eksperimenta.

3.2.2. Brojanje stanica

Suspenziju za brojanje stanica (30 µL kompletiranog medija + 20 µL stanične suspenzije + 50 µL tripanskog modrila) prenio sam na komoricu za brojanje stanica po Bürker-Turku. Vijabilne stanice imaju netaknutu staničnu membranu, tripansko modilo ne prodire u njih, pa su stoga one nebojene. Stanice sam brojao u hemocitometru pod svjetlosnim mikroskopom u 4 vidna polja. Broj vijabilnih stanica odredio sam formulom:

$$N/mL = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj vidnih polja}} \times 5 \times 250 \times 10^3$$

gdje N predstavlja broj stanica, a 5 je faktor razrjeđenja.

Nakon izračuna, stanice sam razrijedio na potreban volumen za nasađivanje na pločice s 96 ili 6 bunarića. Prije svakog tretmana, pločice sam inkubirao tijekom 24 sata kako bi se stanice pričvrstile za podlogu posudice za uzgoj.

3.2.3. Tretman stanica

Stanice sam tretirao rastućim koncentracijama CuSO_4 (100 μM – 1,5 mM), rastućim koncentracijama miricetina (1, 2, 5, 10 i 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) te kombinacijom CuSO_4 i miricetina. Na pločice s 96 bunarića, u svaki bunarić dodao sam 100 μL stanične suspenzije koja je sadržavala 20×10^3 stanica. Kombinacije koncentracija nanosio sam u kvadripletu. Nakon 24-satne inkubacije mjerio sam njihovo preživljenje metodom MTT. Kao kontrolu sam koristio netretirane stanice.

Osim bakra, pratio sam učinak H_2O_2 i miricetina na preživljenje stanicea SH-SY5Y. Stanice sam tretirao sa 100 μL 600 μM H_2O_2 i koncentracijama miricetina od 1, 5 i 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tijekom 24 sata.

Stanice sam tretirao i rastućim koncentracijama miricitrina (1, 5 i 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) u prisutnosti CuSO_4 (0.5 mM). Kombinacije koncentracija nanosio sam u kvadripletu te sam stanice stavio u inkubator kroz 24 sata. Preživljenje sam mjerio metodom MTT.

3.2.4. Test MTT

MTT je kolorimetrijski test za analizu metaboličke aktivnosti stanica, indikatora vijabilnosti, proliferacije i citotoksičnosti. NAD(P)H-ovisni oksidoredukcijski stanični enzimi reduciraju tetrazolijsku boju MTT u netopljivi formazan ljubičaste boje.

Nakon inkubacije, uklonio sam stari medij i stanice tretirao s 0.5 mg/mL MTT boje u 40 μL medija. Pločicu sam stavio u inkubator, 3 sata na 37°C . Test sam provodio u mraku (omatanjem pločice u aluminijsku foliju) zbog osjetljivosti reagensa na svjetlost. Za otapanje formazanskih kristala dodao sam 160 μL DMSO-a u svaki bunarić i ostavio pločicu da se lagano tresu na tresilici tijekom nekoliko minuta kako bi se kristalići potpuno otopili. Rezultate sam očitao spektrofotometrijski, pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems), mjerenjem apsorbancije na 570 nm.

3.2.5. Detekcija reaktivnih kisikovih vrsta

H₂DCFDA kemijski je reducirani oblik fluoresceina koji se koristi kao pokazatelj reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama. Nakon cijepanja acetatnih skupina unutarstaničnim esterazama i oksidacije u prisutnosti slobodnih radikala, nefluorescentni H₂DCFDA pretvara se u visoko fluorescentni 2', 7'-diklorofluorescein (DCF).

U sve bunariće osim kontrole dodao sam 100 μM H₂DCFDA u PBS-u, u koju sam dodao samo PBS zbog određivanja autofluorescencije stanica. Pločicu sam inkubirao 30 min nakon čega sam otopinu odstranio iz bunarića, a stanice isprao sa 100 μL PBS-a. U svaki bunarić sam dodao 100 μL PBS-a te sam pločicu vratio u inkubator na 1 sat. Za očitavanje rezultata koristio sam Varian Cary Eclipse fluorescencijski spektrofotometar. Emitiranu fluorescenciju odredio sam pomoću luminometra Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fischer), ekscitacijom pri valnoj duljini 485 nm i emisijom na 538 nm. Rezultate sam izrazio u postotku intenziteta fluorescencije u usporedbi s kontrolnom skupinom.

3.2.6. Detekcija apoptotskih i nekrotičnih stanica

Promjene koje zahvaćaju jezgru najlakše se mogu vizualizirati primjenom fluorescencijskih boja koje specifično boje DNA. Hoechst 33342 i PI su fluorescentne boje koje sam koristio za detekciju apoptotskih, odnosno nekrotičnih promjena u stanicama. Hoechst 33342 boja je niske molekularne mase što joj omogućuje prolaz kroz staničnu membranu i vezanje za DNA. Emitira plavu svjetlost (460 - 490nm) nakon ekscitacije ultraljubičastim svjetlom i koristi se za detekciju kondenziranog kromatina u apoptotskim stanicama (žarko plavo obojene). S druge strane, PI je crvena boja velike molekularne mase zbog čega nema mogućnost prolaska kroz staničnu membranu. Ukoliko je stanična membrana oštećena, PI će ući u stanica i obojiti staničnu jezgru. Ekscitira se valnom duljinom od 488 nm, a emitira na 617 nm.

Stanice sam tretirao na pločici sa 6 bunarića. Iz svakog bunarića sam medij prenio u zasebne mikropravete za centrifugiranje. Zatim sam u bunariće dodao 350 μL tripsina i ostavio do 10 min kako bi se stanice odvojile od podloge. Stanice sam potom resuspendirao u 1 mL kompletiranog medija, i zatim prenio u mikropravete s pripadajućim medijem. Uzorke sam stavio na centrifugiranje, 5 min pri 1200 rpm. Dekantirao sam supernatant, dodao 1 mL PBS-a, resuspendirao stanice, prebacio suspenziju u tubicu Eppendorf (1.5 mL) te ponovno

centrifugirao. Postupak resuspenzije i centrifugiranja ponovio sam još jednom. Nakon dekantiranja supernatanta, stanice sam resuspendirao u 27 μ L PBS-a.

U miliQ vodi sam pomiješao 50 μ M Hoechst 33342 i 200 μ M PI. Boje sam pomiješao s uzorkom u omjeru 1:10 te ostavio nekoliko minuta na sobnoj temperaturi kako bi ušle u stanice. 15 μ L obojene suspenzije stanica sam nanio na predmetno stakalce i fotografirao pomoću mikroskopa EVOS Flويد Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific).

3.2.7. Određivanje aktivnosti kaspaza-3 i 7

Aktivnost kaspaza 3 i 7 odredio sam pomoću kompleta Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) prema uputstvima proizvođača. Kaspaze 3 i 7 ključni su izvršni enzimi u apoptozi ovisnoj o kaspazama, te se često aktiviraju u uvjetima OS-a i izazivaju smrt neurona. Komplet sadrži luminogeni supstrat s tetrapeptidnom sekvencom DEVD (DEVD-aminoluciferin).

Pločicu sa stanicama sam ekvilibrirao na sobnu temperaturu te sam zatim u svaki bunarić dodao 80 μ L reagensa Caspase-Glo 3/7. Pločicu sam stavio na tresilicu (500 rpm, 30 sekundi) što dovodi do lize stanice. Kaspaze specifično cijepaju DEVD supstrat čime se otpušta aminoluciferin (supstrat za luciferazu). Slijed tih reakcija rezultira luminiscencijom čiji je intenzitet proporcionalan aktivnosti kaspaza. Pločicu sam stavio na inkubaciju na sobnoj temperaturi 90 minuta, nakon čega sam luminiscenciju mjerio pomoću luminometra Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fischer).

3.2.8. Određivanje razine ATP-a

Nakon tretmana bakrom i/ili miricetinom, vijabilnost stanica odredio sam pomoću komercijalnog kompleta *CellTiter-Glo*® 2.0 (Promega) prema uputstvima proizvođača. Ovom metodom sam mjerio ATP, nastao u metabolički aktivnim stanicama, pomoću ATP-ovisne luciferaze.

U svaki bunarić sam dodao 100 μ l reagensa *CellTiter-Glo* 2.0. Pločicu sam potom ostavio na tresilici 2 min kako bi došlo do lize stanica. Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, luminiscentni signal sam očitao luminometrom (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fischer) s vremenom integracije od 0.8 sekundi po bunariću.

3.2.9. Priprema stanica i izolacija proteina za westernsku metodu otiska

Uzgajao sam 2×10^6 stanica u posudicama površine 25 cm^2 (po jednu posudicu za svaku eksperimentalnu skupinu). Nakon 24h inkubacije, stanice sam tretirao koncentracijama bakrova sulfata (0.5 mM) i miricetina ($5 \text{ }\mu\text{g/mL}$) te ponovno vratio u inkubator na isti period. Nakon završetka tretmana, stanice sam u mediju odvojio od podloge strugalicom (na ledu) i prenio u epruvetu Falcon od 15 mL . Stanice sam stavio u centrifugu 5 min pri 1200 g , supernatant sam odlio, talog isprao s PBS-om i ponovno stavio na centrifugiranje. Ovaj dio sam ponovio 2 puta, nakon čega sam talog pohranio pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Stanični talog resuspendirao sam u puferu za lizu stanica ($1 \times$ inhibitori proteaza u PBS-u) te sam uzorke stavio u led. Homogenizaciju uzorka sam izveo soniciranjem pomoću ultrazvučnog sonikatora pri amplitudi od 80% . Svaki uzorak homogenizirao sam 3 puta po 30 sekundi (nakon svakih 10 sekundi rađene su kratke pauze). Nakon toga, uzorke sam stavio na centrifugiranje 15 minuta pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$, na 12500 g .

3.2.10. Određivanje koncentracije proteina

Metodom BCA (*eng.* bicinchonic acid assay) odredio sam ukupnu koncentraciju proteina u uzorku. Metoda se temelji na reakciji između proteina i bakrovih (II) iona iz otopine B. U bazičnim uvjetima, bakar se reducira u Cu^+ ion koji stvara kompleks s bicinkoničnom kiselinom ljubičasto plavog obojenja. Koncentracija proteina proporcionalna je intenzitetu ovog obojenja što sam odredio spektrofotometrijski na 570 nm . Niz razrjeđenja standardne otopine BSA poslužio mi je za izradu baždarne krivulje.

U bunariće mikrotitarske pločice otpipetirao sam $20 \text{ }\mu\text{L}$ standardne otopine BSA za sva razrjeđenja, $20 \text{ }\mu\text{L}$ reH₂O (negativna kontrola) i $20 \text{ }\mu\text{L}$ uzoraka (razrjeđeni $10 \times$ s reH₂O) koje sam nanio u duplikatima. Potom sam u svaki bunarić dodao $200 \text{ }\mu\text{L}$ radnog reagensa BCA (otopina A (sadrži natrijev karbonat, natrijev hidrogenkarbonat, bicinkoničnu kiselina i natrijev tartarat u $0,1 \text{ mol/L}$ natrijevom hidroksidu) + otopina B (sadrži bakrov(II) sulfat ($w = 4\%$)) u omjeru $50:1$).

Pločicu sam postavio na tresilicu (1 min), zatim na inkubaciju 30 min u vodenu kupelj temperature $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pa sam ostavio na sobnu temperaturu da se ohladi i na kraju izmjerio apsorbciju. Koncentraciju proteina u uzorcima odredio sam pomoću dobivene baždarne krivulje.

3.2.11. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu je metoda razdvajanja proteina na temelju molekularne mase pomoću deterdženta natrij dodecil-sulfata koji stvara denaturirajuće uvjete. Za razdvajanje su potrebna dva gela (sabijajući i razdvajajući) (Tablica 1). Prije pripreme otopina, na specijalizirani stalak postavio sam dva stakla priljubljena jedno uz drugo. Između stakala sam prvo izlio gel za razdvajanje te dodao na površinu izopropanol. Nakon što se gel polimerizirao (30-45 min), izopropanol sam odlio, gel isprao s dH_2O , dodao gel za sabijanje i umetnuo češljic za formiranje jažica. Umrežavanje traje do 45 min, nakon čega sam češljic pažljivo uklonio, a stakla s gelom prenio u kadicu za elektroforezu koju sam ispunio do vrha puferom za elektroforezu.

Prije nanošenja uzoraka u jažice, izračunao sam volumen koji sadrži 50 μg proteina i volumen pufera potrebnog za nanošenje uzoraka na gel (4 x LB). Uzorke sam zagrijao 5 min na 95 °C i centrifugirao. Nakon što sam nanio uzorke u jažice, kadicu sam priključio na uređaj za napajanje. Za sabijanje gela, elektroforezu sam provodio 30 min na 90 V, nakon čega slijedi razdvajanje od 90 min pri 110V.

Kako bih mogao analizirati proteine točno određenih veličina, u jednu jažicu sam nanio i obojani standard proteina poznatih molekularnih masa.

3.2.12. Prenos proteina na nitroceluloznu membranu i inkubacija sa specifičnim protutijelima

Nakon elektroforeze, stakla sam razdvojio i gel prenio u sustav za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Redoslijed slaganja sustava od dna prema vrhu je sljedeći: spužvica, dva filter papira, gel, nitrocelulozna membrana, dva filter papira i spužvica. Sustav sam složio u kazeti koju sam, nakon zatvaranja, vratio u elektroforetsku kadicu. U kadicu sam stavio pufer za prijenos, posudicu s ledom i magnet, nakon čega sam ju postavio na magnetnu mješalicu. Tako složeni sustav ostavio sam preko noći pod stalnim naponom od 13 V.

Kako bih provjerio uspješnost prijenosa proteina, nitroceluloznu membranu sam inkubirao u otopini za bojanje (naftolno modrilo). Nakon toga sam odbojavao u otopini za odbojavanje pa blokirao u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u prahu (Dukat, Hrvatska) u 1 x TBST-u. Membrane sam potom isprao 3 puta po 10 min u puferu TBST i inkubirao s primarnim protutijelom preko noći na temperaturi od 4 °C. Nakon inkubacije, membrane sam isprao 3 puta po 10 min u TBST-u, inkubirao sa sekundarnim protutijelom 1 sat pri sobnoj

temperaturi. Ponovo sam isprao u TBST-u, dodao otopinu za detekciju kemiluminiscencije i očitao.

Osim protutijela za ciljne proteine, koristio sam protutijelo za β -aktin. Signal dobiven za β -aktin služio je za normalizaciju, s obzirom da je njegova ekspresija neovisna o tretmanu (Radonić i sur. 2004).

3.2.13. Vizualizacija ciljnih proteina

Vizualizacija proteina omogućena je principom kemiluminiscencije koja je rezultat reakcije reagensa ECL (Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) sa peroksidazom iz hrena kojom su obilježena sekundarna protutijela. Otopinu za vizualizaciju sam nanio na membranu i inkubirao 1 minutu u mraku. Višak sam otklonio papirnatom maramicom, a membrane prenio u uređaj za detekciju signala, Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, London, UK).

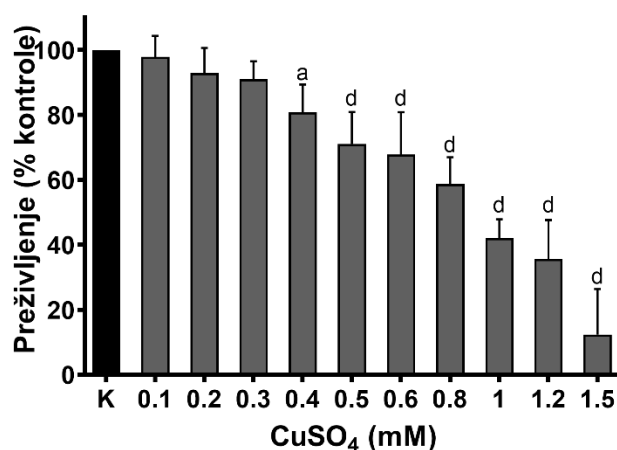
3.2.14. Statistička obrada podataka

Statističku analizu proveo sam pomoću programa GraphPad Prism (San Diego, CA). Isti sam program koristio i za grafički prikaz podataka. Sve vrijednosti izrazio sam kao srednju vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Analizu sam proveo pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA-e). Post hoc usporedbu proveo sam pomoću Tukey-evog testa višestruke usporedbe za međusobnu usporedbu svih grupa, a Dunnett-ov test višestruke usporedbe odabrao sam za usporedbu s kontrolnim uzorkom. Razinu statističke značajnosti postavio sam na $p < 0.05$.

4. REZULTATI

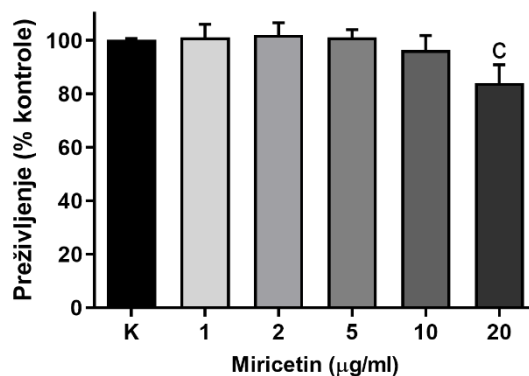
4.1. Učinak bakra i miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y

Stanice SH-SY5Y tretirao sam različitim koncentracijama CuSO_4 (0.1 - 1.5 mM) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana, preživljenje stanica SH-SY5Y odredio sam primjenom testa MTT koji mjeri metaboličku aktivnost stanica. Kao što je prikazano na Slici 4, bakar je u ovisnosti o koncentraciji smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y. Koncentracija pri kojoj sam prvi puta utvrdio statistički značajan toksični učinak bakra bila je 0.4 mM. Pri toj koncentraciji preživljenje je iznosilo $80.80 \pm 8.54\%$ u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0.05$, Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e). Nakon primjene 0.5 mM CuSO_4 preživljenje je iznosilo $71.03 \pm 9.81\%$ ($p < 0.0001$) te sam ovu koncentraciju odabrao za daljnja istraživanja. U najvećoj primijenjenoj koncentraciji (1.5 mM) preživljenje stanica smanjilo se na 12.34%.



Slika 4. Učinak rastućih koncentracija CuSO_4 na preživljenje stanica SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija srednje vrijednosti iz 5 neovisnih pokusa provedenih u kvadripletu. **a)** $p < 0.05$, **d)** $p < 0.0001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e.

Nakon određivanja grafa doza-odgovor za bakar, istražio sam učinak flavonoida miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y. Stanice sam tijekom 24 sata tretirao koncentracijama miricetina od 1 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Slika 5). Tek u najvišoj primijenjenoj koncentraciji miricetin je smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y na $84.05 \pm 6.81\%$ ($p < 0.001$).

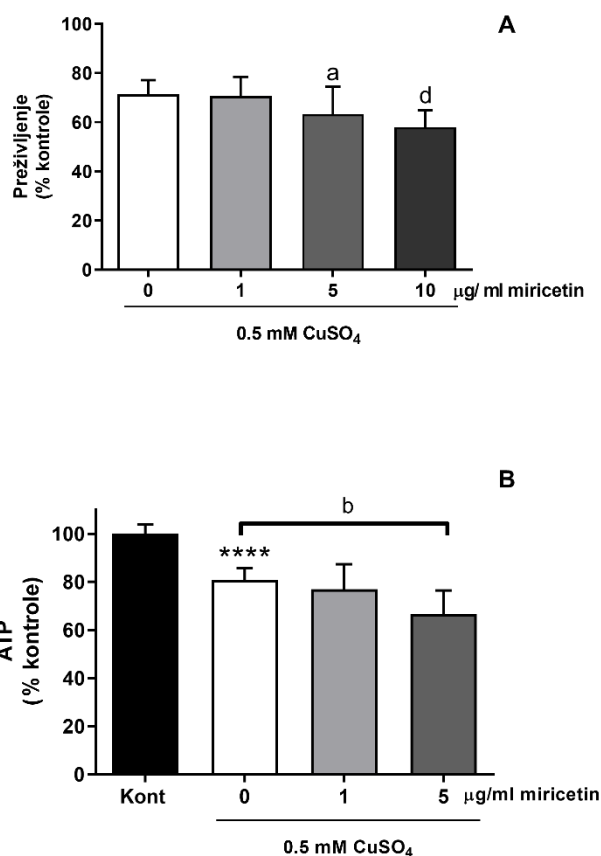


Slika 5. Učinak rastućih koncentracija miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijaciju srednje vrijednosti iz 4 neovisna pokusa provedena u kvadripletu. c) $p < 0.001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test.

U nastavku istraživanja, utvrdio sam učinak miricetina na preživljenje stanica koje sam istovremeno tretirao s 0.5 mM CuSO_4 . Preživljenje sam odredio metodom MTT. Koristio sam koncentracije miricetina od 1, 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ budući da te koncentracije primijenjene samostalno nisu imale učinak na preživljenje stanica SH-SY5Y. Istovremena primjena miricetina i 0.5 mM CuSO_4 povećala je toksični učinak bakra. Bakar primijenjen samostalno smanjio je preživljenje na 71.35%. Značajan učinak miricetina na preživljenje bio je vidljiv pri koncentraciji od 5 $\mu\text{g/mL}$. U usporedbi sa skupinom tretiranom samo bakrom, preživljenje se dodatno smanjilo za 11.22%, odnosno u usporedbi s kontrolnom skupinom iznosilo je $63.39 \pm 11.09\%$ ($p < 0.05$; Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e). Kod istovremene primjene 0.5 mM CuSO_4 i 10 $\mu\text{g/mL}$ miricetina preživjelo je 58.02% stanica (Slika 6A).

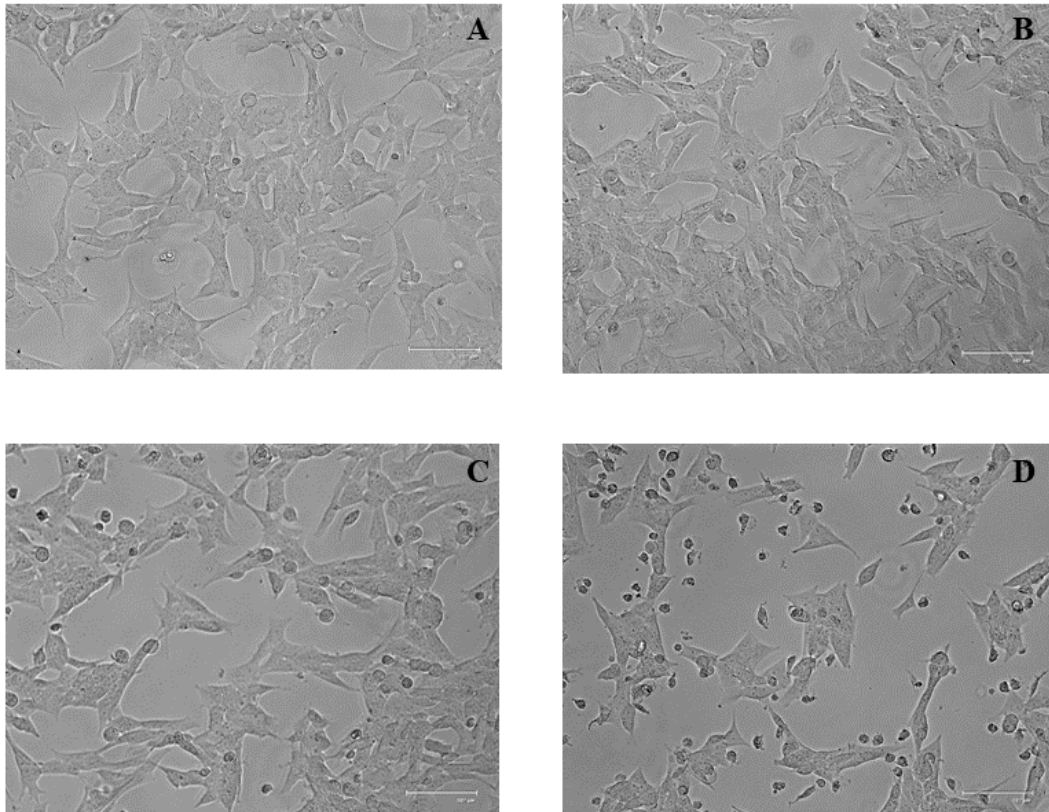
Osim metode MTT, proveo sam test vijabilnosti stanica temeljen na mjerenju stanične razine ATP-a. Njegova razina je proporcionalna broju živih stanica. Ispitao sam kako tretman stanica SH-SY5Y određenim koncentracijama miricetina (1 i 5 $\mu\text{g/mL}$), u prisutnosti 0.5 mM CuSO_4 tijekom 24 sata, utječe na unutarstaničnu zalihu ATP-a (Slika 6B).

Kao i u metodi MTT, tretman stanica 0.5 mM CuSO_4 smanjio je razinu unutarstaničnog ATP-a na $80.80 \pm 4.83\%$ kontrolne grupe ($p < 0.0001$, jednosmjerna ANOVA i *post hoc* Tukey-ev test). Dodatno smanjenje za 17.5% izazvala je primjena miricetina koncentracije 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$), te je preživljenje u toj skupini iznosilo $66.66 \pm 9.79\%$ u usporedbi s kontrolnim stanicama.



Slika 6. Učinak različitih koncentracija miricetina u prisutnosti CuSO_4 na preživljenje stanica SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija srednje vrijednosti iz 5 (**A**) neovisnih pokusa provedenih u kvadripletu, odnosno iz 3 (**B**) neovisna pokusa provedena u triplikatu. **A)** Preživljenje mjereno metodom MTT, **B)** Test vijabilnosti temeljen na unutarstaničnoj razini ATP-a. **a)** $p < 0.05$, **d)** $p < 0.0001$ u usporedbi sa stanicama tretiranim s CuSO_4 , jednosmjerna ANOVA, Dunnet-ov test. ******)** $p < 0.0001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, **b)** $p < 0.01$ u usporedbi sa samostalnim učinkom CuSO_4 , jednostruka ANOVA, Tukey-ev test.

Toksični učinak istovremene primjene 0.5 mM CuSO_4 i 5 μg/mL miricetina uočio sam i pod svjetlosnim mikroskopom. U odnosu na kontrolnu skupinu, učinak miricetina (Slika 7B) nije se značajno odrazio na morfološki izgled stanica. U kontrolnoj skupini (Slika 7A) stanice su imale oblik epitelnih stanica i bile su pričvršćene za površinu posudice. Značajne morfološke promjene primijetio sam nakon kombiniranog tretmanu stanica bakrom i miricetinom (Slika 7D). Stanice su bile manje izdužene i uočio sam zaokružene stanice koje plutaju u mediju.



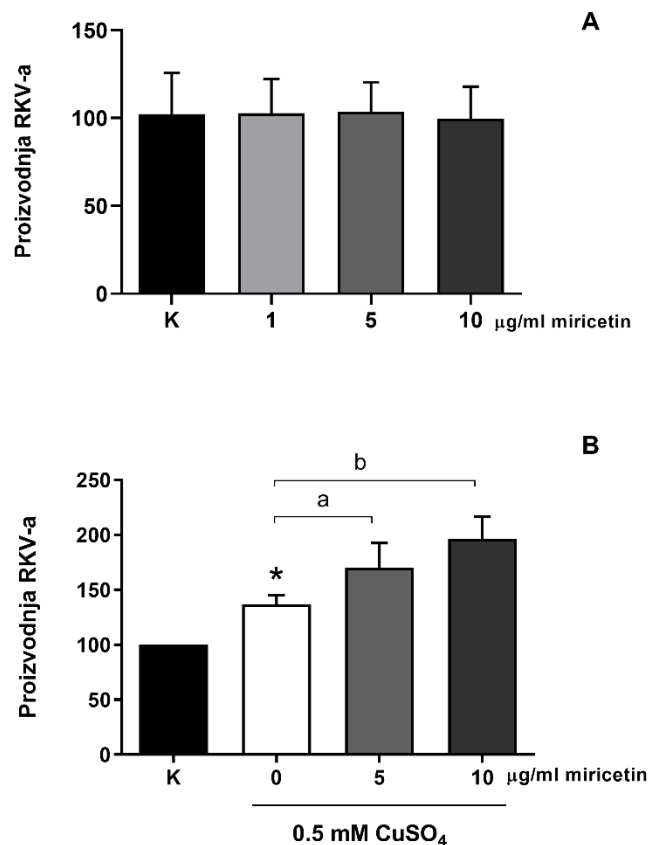
Slika 7. Morfološke promjene stanica SH-SY5Y nakon izlaganja bakru i miricetinu. Prikazane su slike stanica nakon završetka tretmana slikane mikroskopom EVOS FLoid Cell Imaging System. **A)** stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima, **B)** stanice tretirane miricetinom (5 µg/mL), **C)** stanice tretirane s CuSO₄ (0.5 mM), **D)** kombinirani tretman stanica s miricetinom i CuSO₄.

4.2. Učinak bakra i miricetina na proizvodnju RKV-a

Nakon što sam ispitao preživljenje stanica SH-SY5Y, istražio sam učinak miricetina, samostalno i u prisutnosti CuSO₄, na unutarstanično nakupljanje RKV-a.

Samostalan učinak rastućih koncentracija miricetina (1-10 µg/mL) nije bio vidljiv, tj. nije rezultirao promjenama u proizvodnji RKV-a (Slika 8A, $p > 0.05$ prema Dunnett-ovom testu nakon jednosmjerne ANOVA-e).

S druge strane, bakar primijenjen samostalno povećao je razinu RKV-a za 37% u usporedbi s kontrolnom skupinom, odnosno ona je iznosila $137.00 \pm 8.13\%$ ($p < 0.05$, Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e) (Slika 8B). Primjena miricetina dodatno je povećala proizvodnju RKV-a. Rezultati pokazuju prooksidacijski učinak miricetina, i to proporcionalno njegovoj koncentraciji. Razina RKV-a pri koncentracijama miricetina od 5 µg/mL i 10 µg/mL iznosila je $169.90 \pm 22.69\%$ ($p < 0.05$) i $196.30 \pm 20.35\%$ ($p < 0.01$) (Slika 8B).



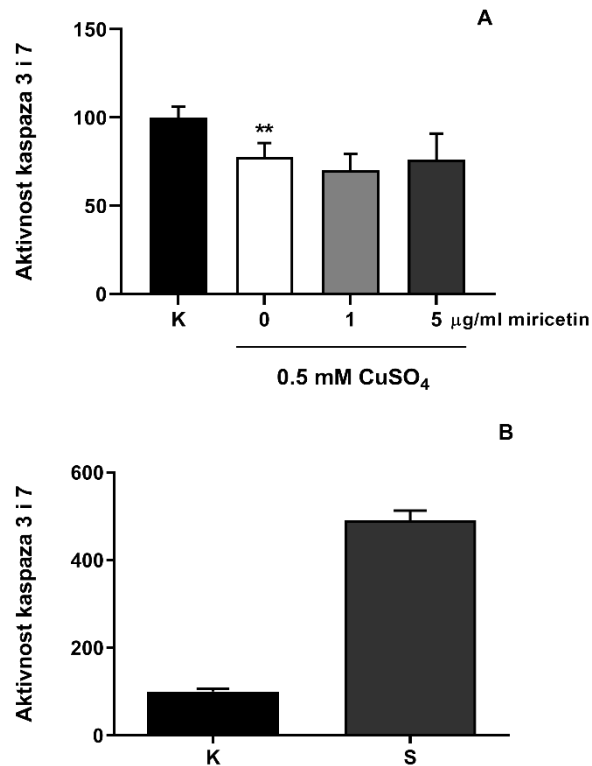
Slika 8. Učinak različitih koncentracija miricetina samostalno i u prisutnosti CuSO₄ na proizvodnju RKV-a. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija srednje vrijednosti iz 2 (A) ili 4 (B) neovisna pokusa provedena u kvadripletu. A) Stanice tretirane rastućim koncentracijama miricetina, B) Stanice tretirane miricetinom u prisutnosti CuSO₄. *) $p < 0.05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, a) $p < 0.05$ i b) $p < 0.01$ u usporedbi sa samostalnim učinkom CuSO₄, jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test višestruke usporedbe za A i Tukey-ev test za B.

4.3. Učinak bakra i miricetina na aktivaciju kaspaza i kondenzaciju kromatina

Visoke koncentracije bakra povećavaju razinu RKV-a koje uzrokuju oksidacijska oštećenja i tako smanjuju preživljenje stanica SH-SY5Y. Ovisno o intenzitetu oksidacijskog oštećenja, stanična smrt se može pokrenuti kroz proces programirane stanične smrti tj. apoptoze ili nekroze. Sama apoptoza može biti ovisna ili neovisna o aktivaciji kaspaza, no u oba slučaja smrt stanice popraćena je kondenzacijom kromatina kao jednim od glavnih obilježja. Ključni izvršni enzimi u procesu apoptoze ovisne o kaspazama su kaspaze 3 i 7. S druge strane, jedno od osnovnih obilježja nekroze je gubitak integriteta stanične membrane.

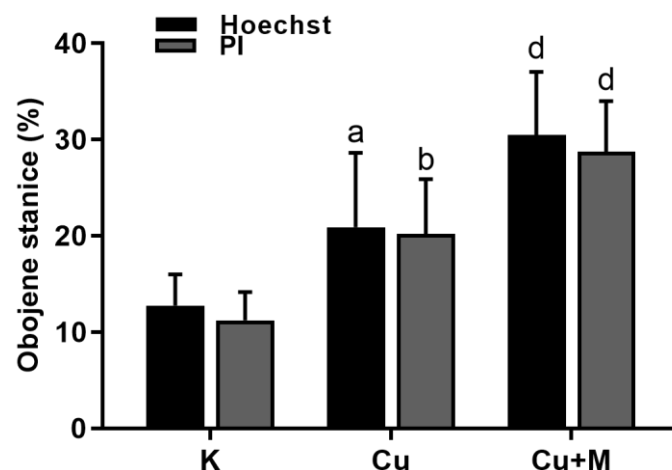
Za razlikovanje apoptoze od nekroze, stanice sam tretirao bojama Hoechst 33342 i propidij jodidom (PI) koje emitiraju fluorescentno svjetlo nakon interkaliranja u DNA. Kondenzaciju kromatina pratio sam bojom Hoechst 33342 (5 μ M), a stanice u zadnjoj fazi apoptoze ili u nekrozi bojanjem PI-om (5 μ M). Boja Hoechst 33342 lako prodire kroz stanične membrane i boji jezgre većine stanica tamno plavom bojom, dok je kod jezgara s kondenziranim kromatinom prisutno intenzivno svijetlo plavo obojenje. PI crveno boji stanice s oštećenom staničnom membranom (Slika 11).

Aktivnost kaspaza 3 i 7 se smanjila prilikom tretmana s 0.5 mM CuSO_4 i ostala smanjena za vrijeme kombiniranog tretmana bakrom i miricetinom (1 i 5 μ g/mL) (Slika 9A). Bakar primijenjen samostalno smanjio je aktivnost kaspaza na $77.73 \pm 7.81\%$ ($p < 0.01$, Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e). Dodatkom 1 μ g/mL miricetina ona je iznosila $70.25 \pm 9.07\%$, odnosno $76.12 \pm 14.85\%$ za 5 μ g/mL, te se nije razlikovala u odnosu na skupinu tretiranu samo bakrom. Kao pozitivnu kontrolu aktivnosti kaspaza 3 i 7, koristio sam staurosporin, pokretač unutrašnjeg puta apoptoze. Tretmanom stanica sa koncentracijom staurosporina od 100 nM, aktivnost kaspaza povećala se približno 5 puta u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 9B).



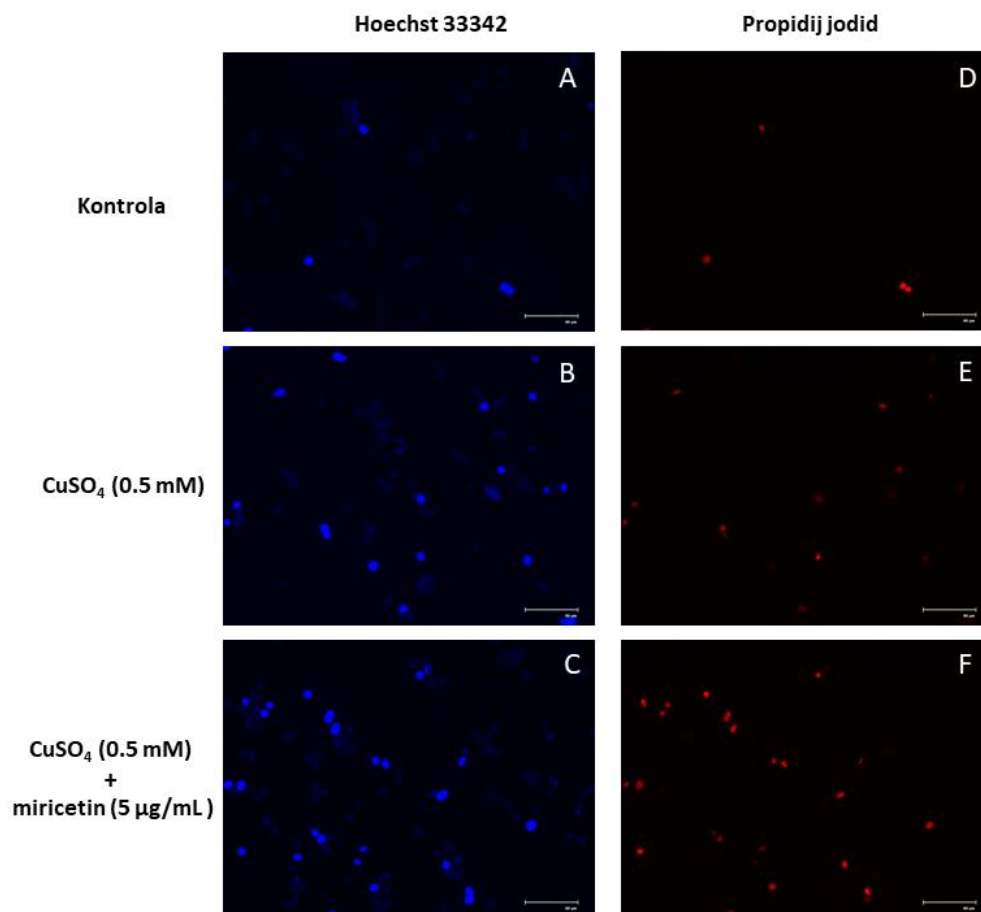
Slika 9. Učinak miricetina u prisutnosti CuSO₄ na aktivnost kaspaza 3 i 7. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija srednje vrijednosti iz 2 neovisna pokusa provedena u triplikatu. **A)** Stanice tretirane miricetinom u prisutnosti CuSO₄, **B)** Utjecaj staurosporina na aktivnost kaspaza 3 i 7. **K)** Kontrolna skupina, **S)** Stanice tretirane staurosporinom. **) p < 0.01 u usporedbi s kontrolnom skupinom, jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test.

Primjena bakra uzrokovala je promjenu strukture kromatina unutar jezgre, kao i nekrotične promjene na stanicama SH-SY5Y (Slika 10). Udio stanica s apoptotskim, odnosno nekrotičnim promjenama, iznosio je $20.88 \pm 7.73\%$ ($p < 0.05$, Tukey-ev test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e) i $20.18 \pm 5.71\%$ ($p < 0.01$). U prisutnosti $5 \mu\text{g/mL}$ miricetina, promjene su bile još izraženije. Apoptotske promjene bile su prisutne na $30.49 \pm 6.56\%$ stanica ($p < 0.0001$), a nekrotične na $28.73 \pm 5.26\%$ stanica ($p < 0.0001$).



Slika 10. Učinak miricetina i bakra na apoptotske i nekrotične promjene u stanicama SH-SY5Y.

Prikazani su rezultati analize apoptotskih promjena, odnosno kondenzacije kromatina pomoću boje Hoechst 33342, te analiza stanica s oštećenom membranom koristeći boju PI. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija srednje vrijednosti iz jednog neovisnog pokusa u biološkom duplikatu pri čemu je za svaku tretiranu skupinu prebrojano više od 500 stanica u najmanje 5 nasumično odabranih vidnih polja. **K)** Kontrolna skupina, **Cu)** Stanice tretirane s 0.5 mM CuSO₄, **Cu+M)** Stanice tretirane s 5 µg/mL miricetina u prisutnosti CuSO₄. **a)** $p < 0.05$, **b)** $p < 0.01$ i **d)** $p < 0.0001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, jednostruka ANOVA, Tukey-ev test.

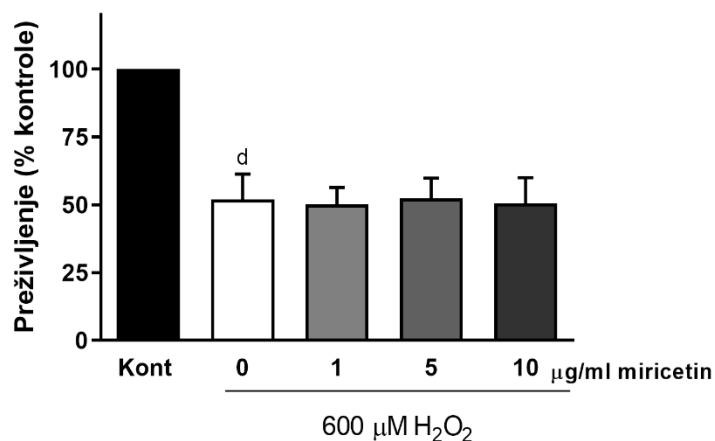


Slika 11. Obojene jezgre stanica SH-SY5Y s Hoechst 33342 i PI-om. Prikazane su reprezentativne slike dobivene pomoću fluorescencijskog mikroskopa EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific). Kondenzirani kromatin prikazan je intenzivno plavim obojenjem, a crveno su obojene stanice u završnoj fazi apoptoze i nekroze. **A i D)** Kontrolne stanice, **B i E)** Stanice tretirane s CuSO₄, **C i F)** Stanice tretirane miricetinom u prisutnosti CuSO₄.

4.4. Učinak miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti H₂O₂

Budući da je miricetin pokazao prooksidacijsko i neurotoksično djelovanje u prisutnosti suviška bakra, istražio sam kakav će učinak imati miricetin ako se primijeni istovremeno s H₂O₂, RKV-om koja stanice dovodi u stanje OS-a. Stanice SH-SY5Y sam tretirao rastućim koncentracijama miricetina (1 - 10 µg/mL) u prisutnosti 600 µM H₂O₂ tijekom 24 sata. Poslije tretmana, odredio sam preživljenje stanica metodom MTT (Slika 12).

Pri koncentraciji od 600 µM H₂O₂, preživljenje stanica je iznosilo 51.93 ± 9.45%. Dodatak rastućih koncentracija miricetina nije utjecao na preživljenje stanica SH-SY5Y.

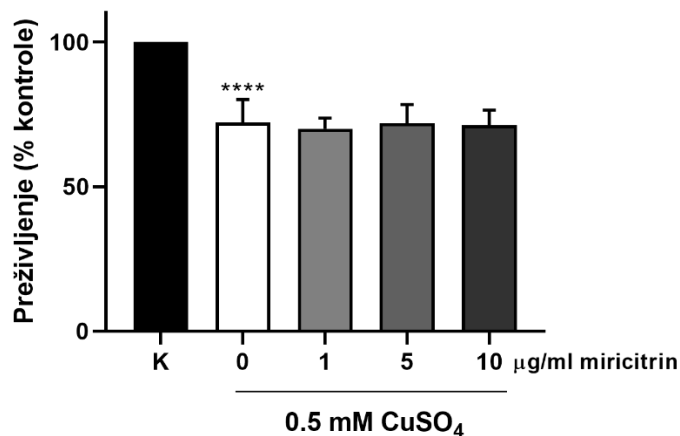


Slika 12. Učinak različitih koncentracija miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti H_2O_2 . Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa provedena u kvadriletu. **d)** $p < 0.0001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, jednosmjerna ANOVA i *post hoc* Tukey-ev test.

4.5. Učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y

Miricitrin je glikozid miricetina, i s obzirom da su slične kemijske strukture, stanice SH-SY5Y sam tretirao i miricitrinom (1-10 $\mu\text{g/mL}$) u prisutnosti 0.5 mM CuSO_4 , tijekom 24 sata kako bi utvrdio određuje li šećerna skupina učinak flavonoida. Preživljenje stanica mjerio sam metodom MTT.

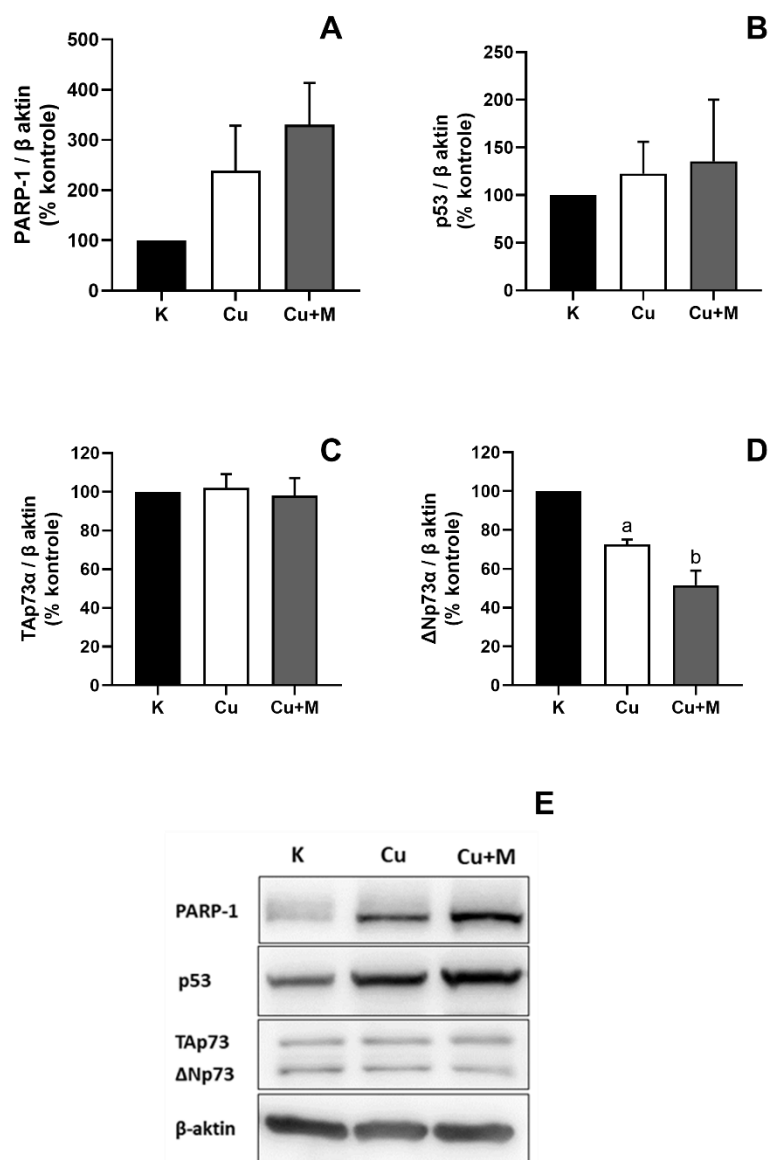
Primijenjen samostalno, 0.5 mM CuSO_4 smanjio je preživljenje stanica SH-SY5Y na $72.07 \pm 7.96\%$ ($p < 0.0001$, Tukey-ev-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e). Za razliku od miricetina, miricitrin nije imao utjecaj na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti iona bakra (Slika 13).



Slika 13. Učinak različitih koncentracija miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti CuSO_4 . Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija srednje vrijednosti iz 2 pokusa provedena u kvadripletu. ****) $p < 0.0001$, Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e.

4.6. Utjecaj bakra i miricetina na ekspresiju proteina p53, p73 i PARP-1

Kako bih bolje razjasnio molekularne mehanizme neurotoksičnih učinaka bakra i miricetina, pratio sam promjene u ekspresiji proteina koji sudjeluju u odgovoru na OS i reguliraju staničnu smrt. Intenzitete proteinskih vrpca dobivenih metodom westernskog otiska sam denzitometrijski odredio pomoću programa Fiji (ImageJ) i normalizirao u odnosu na ekspresiju β -aktina čija se ekspresija smatra konstantnom u različitim eksperimentalnim uvjetima (Radonić i sur. 2004). PARP-1 je nuklearni enzim s važnom ulogom u regulaciji popravka DNA. Bakar je povećao njegovu ekspresiju za 140% u usporedbi s kontrolnom grupom, a dodatkom miricetina ekspresija proteina PARP-1 ukupno se povećala za 230% u usporedbi s kontrolnim stanicama (Slika 14A). Transkripcijski faktor p53 stanični je detektor oštećenja DNA. Trend pojačane ekspresije bio je manje izražen nego za protein PARP-1. Nakon tretmana bakrom, razina proteina p53 povećala se za 22.5%, a u prisutnosti 5 $\mu\text{g/mL}$ miricetina za 35.5% u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali ta povećanja nisu dosegla razinu statističke značajnosti (Slika 14B). Analizirao sam i ekspresiju dvije izoforme proteina p73: TAp73 α i $\Delta\text{Np73}\alpha$ (Slika 14C i D). Ekspresija TAp73 α ostala je nepromijenjena, dok se ekspresija $\Delta\text{Np73}\alpha$ u prisutnosti bakra smanjila na $72.50 \pm 2.50\%$ ($p < 0.05$), a miricetin je dodatno smanjio na $51.50 \pm 7.50\%$ ($p < 0.01$) u usporedbi s kontrolom.



Slika 14. Učinak bakra i miricetina na ekspresiju apoptotskih proteina. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška iz dvije neovisne stanične izolacije. **A)** Ekspresija proteina PARP-1, **B)** Ekspresija proteina p53, **C i D)** Ekspresija izoformi proteina p73, **E)** Reprezentativni otisci westernske metode. **K)** Kontrolna skupina, **Cu)** Stanice tretirane s 0.5 mM CuSO₄, **Cu+M)** Stanice tretirane s 5 μ g/mL miricetina u prisutnosti CuSO₄. **a)** $p < 0.05$, **b)** $p < 0.01$ Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e.

5. RASPRAVA

Zbog svojih snažnih antioksidacijskih svojstava te sposobnosti keliranja metala i modulacije redoks-ovisnih signalnih puteva, flavonoidi su privukli interes znanstvenika kao potencijalni agensi u borbi protiv neurodegenerativnih poremećaja (Jazvinščak i sur. 2012, Kelsey i sur. 2010). U tom pogledu, smatrao sam kako bi ispitivanje uloge miricetina u uvjetima bakrom izazvanog OS-a moglo pružiti rezultate koji će biti korisni u daljnjim istraživanjima terapeutika za neurodegenerativne bolesti. Neuroprotektivni utjecaj miricetina dokazan je u nekoliko istraživanja (Shimmyo i sur. 2008b, Semwal i sur. 2016, Zhang i sur. 2011), ali postoje i ona koja pokazuju njegov toksični utjecaj koji proizlazi iz prooksidacijske aktivnosti. Anti- i prooksidacijska aktivnost miricetina te drugih flavonoida ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina te kemijskom okruženju, koje može uključivati prisutnost redoks aktivnog prijelaznog metala (Chobot i Hadacek 2011, Jomova i sur. 2019).

S obzirom da je neravnoteža bakra jedan od važnih čimbenika u nastanku i razvoju neurodegenerativnih poremećaja (Li i sur. 2017), u stanicama neuroblastoma SH-SY5Y, OS sam potaknuo suviškom bakra. U staničnoj liniji SH-SY5Y, koja se često koristi kao model za proučavanje funkcije neurona, uključujući i stanični odgovor na oksidacijska oštećenja (Kritis i sur. 2015), suvišak iona bakra smanjio je preživljenje i povećao produkciju RKV-a. Neurotoksični učinak bakra bio je prvi puta vidljiv pri koncentraciji od 0.4 mM, koja je u istraživanju Lovell i sur. (1998) utvrđena u amiloidnim plakovima mozga oboljelog od AB-i. Trend pada preživljenja stanica SH-SY5Y u ovisnosti od koncentracije bakra slaže se s istraživanjem Lan i sur. (2016), u kojem su i niže koncentracije bakra (0.05-0.2 mM) utjecale na smanjivanje preživljenja.

Istovremeni tretman stanica SH-SY5Y s miricetinom i bakrom, dodatno je smanjio preživljenje i povećao produkciju RKV-a, što jasno ukazuje na citotoksični i prooksidacijski utjecaj miricetina u prisutnosti bakra. Istraživanje Sahu i sur. (1993) govori kako prooksidacijsko svojstvo flavonoida proizlazi iz njihove redoks aktivnosti u prisutnosti kisika i prijelaznih metala. Sama redoks aktivnost flavonoida ovisi o broju hidroksilnih skupina koje se mogu lagano oksidirati. Miricetin posjeduje 6 hidroksilnih skupina i stoga se oksidacija miricetina može potaknuti divalentnim bakrovim ionom, a slijed reakcija u konačnici dovodi do stvaranja hidroksilnog radikala putem Fenton-ove reakcije (Radovanović i sur. 2019, Yoshino i sur. 1999). Dakle, citotoksični učinak miricetina u stanicama SH-SY5Y je povezan s povećanom proizvodnjom RKV-a i stvaranjem elektrofilnih oksidacijskih

produkata koji nanose oksidacijska oštećenja različitim biomolekulama i tako ugrožavaju staničnu funkciju. Ovaj učinak nije se vidio prilikom tretmana miricitrinom (miricetin-3-O-ramnozid) koji ima vezanu glikozidnu skupinu na kisiku prstena C. Određena istraživanja (Atabey-Ozdemir i sur. 2017, Yokimozo i Moriwaki 2005) su pokazala kako miricitrin slabo stvara komplekse s bakrom, što vjerojatno objašnjava izostanak promjene u preživljenju stanica SH-SY5Y pri tretmanu miricitrina s bakrom.

S druge strane, miricetin lako stvara komplekse s bakrom i tako može izazvati promjene na dušičnim bazama DNA, te lomove njenih lanaca (Schwerdtle i sur. 2007). Važni proteini koji se aktiviraju prilikom oštećenja DNA su p53, p73 i PARP-1. Sličan trend pojačane ekspresije, u stanicama SH-SY5Y, imali su proteini p53 i PARP-1. Njihova ekspresija se povećala prilikom tretmana bakrom, a prisutnost miricetina ju je dodatno pojačala, čime se ukazuje na izraženija oštećenja DNA u nazočnosti flavonoida. Kada je DNA veoma oštećena, pojačana ekspresija PARP-a dovodi do bioenergetskog kolapsa i nekrotične smrti stanice (Ko i Ren 2012). Slično kao u mom istraživanju, pojačana ekspresija PARP-1 u istraživanju Gerace i sur. (2014) dovela je do smrti neurona hipokampusa koja je karakterizirana niskom razinom ATP-a i smanjenom aktivacijom kaspaza. Pojačana ekspresija p53 i pokretanje apoptoze dokazana je na mnogo različitih vrsta stanica, pa tako i u neuronima koji su bili izloženi OS-u (Miller i sur. 2000). Ovi rezultati pokazuju, kako su proteini PARP-1 i p53 imali zaštitnu ulogu u stanicama SH-SY5Y. Određene studije (De Laurenzi i sur. 2000, Miller i sur. 2000) govore kako izoforma $\Delta Np73$ regulira preživljenje neurona tijekom njihovog razvoja te ima ključnu ulogu u diferencijaciji neuroblastomskih stanica. Izravnim vezanjem za p53, $\Delta Np73$ spašava neurone od stanične smrti tako što inhibira proapoptotičku aktivnost p53. Pojačana ekspresija $\Delta Np73$ ima neuroprotektivni učinak, ali prilikom velikih oštećenja DNA, ova izoforma se brzo raspada nepoznatim mehanizmom, što uzrokuje smrt stanica (Pozniak i sur. 2002). Ekspresija ove izoforme u stanicama SH-SY5Y se smanjila, što vjerojatno ukazuje na sposobnost miricetina da stvara kompleks s bakrom i samim tim oštećenja na DNA, što dovodi do degradacije $\Delta Np73$ i smrti stanica.

Istraživanje Hasegawa i sur. (1992) pokazalo je kako bakar utječe na smrt neurona uglavnom preko aktivacije apoptoze. Sama apoptoza može biti aktivirana ovisno ili neovisno o kaspazama, a oba puta aktivacije u neuronima su dokazana u istraživanju Han i sur. (2003). Glavni izvršni enzimi apoptoze su kaspaza 3 i 7, a njihova aktivnost u stanicama SH-SY5Y je bila tek blago smanjena prilikom svih tretmana. Sličan utjecaj bakra, povišenje razine RKV-a i supresija apoptoze, vidljiva je u istraživanju Liao i sur. (2020) na malignim stanicama.

Kondenzirani kromatin je obilježje oba puta apoptoze, a budući da su miricetin i bakar potaknuli kondenzaciju bez aktivacije kaspaza 3 i 7, vjerojatno su stanice SH-SY5Y ušle u proces apoptoze neovisan o kaspazama. No, brojna istraživanja govore o tome kako povećana produkcija RKV-a može utjecati na promjenu stanične smrti iz apoptoze u nekrozu. Određene stanice SH-SY5Y se se bojale i PI-om, što ukazuje na prisutnost nekrotičnih stanica. Broj nekrotičnih stanica i stanica s kondenziranim kromatinom bio je najveći pri istovremenom tretmanu bakrom i miricetinom, što je u skladu s rezultatima testova vijabilnosti. Isto tako istraživanja Miyoshi i sur. (2007) te Yan Khan i sur. (2012) pokazuju kako flavonoidi u prisutnosti bakra potiču produkciju RKV-a, što opterećuje antioksidacijski sustav obrane i vodi stanice u apoptozu i nekrozu.

Bakar ima mogućnost reagiranja s H_2O_2 stvarajući tako hidroksilni radikal putem Fenton-ove reakcije. Iako H_2O_2 nije slobodan radikal i ima ograničenu reaktivnost, on vrlo lako prolazi kroz membrane i ulazi u unutarstanični prostor. Stoga, ukoliko se poremeti antioksidacijski sustav obrane, njegovo nakupljanje dovodi do patoloških promjena. U istraživanju Zhao i suradnika (2019), preživljenje stanica SH-SY5Y smanjivalo se ovisno o koncentraciji H_2O_2 , a drastično smanjenje za 50% u usporedbi s kontrolom je bilo vidljivo pri koncentraciji od 600 μM , što se slaže s rezultatima mog istraživanja. Miricetin u ovim uvjetima OS-a nije utjecao na preživljenje stanica, što se može objasniti odsustvom bakrovih iona i samim time Fenton-ove reakcije putem koje se stvaraju hidroksilni radikali. Neovisno o tome, moglo bi se očekivati da u prisutnosti H_2O_2 miricetin djeluje antioksidacijski i da će to imati pozitivan učinak na preživljenje. Budući da to nije opaženo, može se zaključiti da sama prisutnost antioksidansa nije dovoljna za povećanje preživljenja, te da osim nakupljanja RKV-a, i drugi čimbenici, kao što je npr. poremećaj prijenos signala unutar redoks aktivnih signalnih puteva, utječu na preživljenje stanica SH-SY5Y u uvjetima OS-a.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja zaključio sam:

- Tretman stanica SH-SY5Y s CuSO_4 (izvor iona Cu^{2+}) smanjuje preživljenje stanica ovisno o primijenjenoj koncentraciji.
- Tretman stanica SH-SY5Y miricetinom pokazuje toksično djelovanje tek pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 20 $\mu\text{g/mL}$.
- Istovremeni tretman miricetina (5 i 10 $\mu\text{g/mL}$) i 0.5 mM CuSO_4 povećava toksični učinak bakra i dodatno smanjuje preživljenje stanica, dok flavonoid miricitrin nema učinak na preživljenje. Miricetin u koncentracijama 1-10 $\mu\text{g/mL}$ u prisutnosti 600 μM H_2O_2 ne utječe na preživljenje stanica SH-SY5Y.
- Unutarstanična razina RKV-a se povećava nakon tretmana s 0.5 mM CuSO_4 . U prisutnosti iona bakra miricetin djeluje prooksidacijski i dodatno potiče nastanak RKV-a.
- Tretman stanica s CuSO_4 ne povećava aktivnost kaspaza 3 i 7. Aktivnost kaspaza 3 i 7 ostaje nepromijenjena nakon kombiniranog tretmana s CuSO_4 i miricetinom te upućuje na aktivaciju programirane stanične smrti neovisne o kaspazama.
- Miricetin potiče bakrom-izazvane apoptotične i nekrotične procese na stanicama SH-SY5Y.
- U uvjetima OS-a potaknutog suviškom iona bakra, vidljiv je trend porasta ekspresije proteina PARP-1 i p53 koji se dodatno povećava u prisutnosti miricetina. Miricetin pojačava učinak bakra na smanjenje ekspresije izoforme ΔNp73 . Ekspresija TAp73 se ne mijenja nakon tretmana bakrom, kao niti u prisutnosti miricetina.

7. LITERATURA

Atabey Ozdemir B., Demirkiran O., Yildiz U., Tekin I. O., Coban B. (2017): Cytotoxicity and DNA binding of copper (II) and zinc (II) complexes of flavonoids: quercetin, myricetin, rutin. *Bulgarian Chemical Communications* 49(4): 901-907.

Ayaz M., Sadiq A., Junaid M., Ullah F., Ovais M., Ullah I., Ahmed J., Shahid M. (2019): Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic propensity in aging associated neurological disorders. *Front. Aging Neurosci.* 11: 155.

Bagli E., Goussia A., Moschos M.M., Agnantis N., Kitsos G. (2016): Natural compounds and neuroprotection: Mechanisms of action and novel delivery systems. *In Vivo* 30(5): 535-547.

Barzegar A. (2016): Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. *Mol. Biol. Res. Commun.* 5(2): 87-95.

Birben E., Murat Sahiner U., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5(1): 9-19.

Boothby L.A., Doering P.L. (2005): Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.* 39(12): 2073-2080.

Chobot V., Hadacek F. (2011) Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Rep.* 16: 242–247.

Choi S.M., Kim B.C., Cho Y.H., Choi K.H., Chang J., Park M.S., Kim J.K. (2014): Effects of flavonoid compounds on β -amyloid-peptide induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam. Med. J.* 50: 45–51.

Clarke P.G. (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.

De Laurenzi V., Raschella G., Barcaroli D., Annicchiarico-Petruzzelli M., Ranalli M., Catani M.V., Tanno B., Costanzo A., Levrero M., Melino G. (2000): Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* 275: 15226-15231.

Diaz-Hernandez J.I., Moncada S., Bolaños J.P., Almeida A. (2007): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ.* 14(6): 1211-1221.

Dickinson D.A., Forman H.J. (2002): Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973: 488–504.

Dupuy C., Virion A., Ohayon R., Kaniewski J., Dème D., Pommier J. (1991): Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 3739–3743.

Duthie G, Morrice P (2012) Antioxidant capacity of flavonoids in hepatic microsomes is not reflected by antioxidant effects in vivo. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012: 165127.

El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott T.G. (2004): Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 37–48.

Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35(4): 495-516.

Fenton H.J.H. (1984): Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65: 899–910.

Fernandez S. P., Nguyen M., Yow T. T., Chu C., Johnston G. A. R., Hanrahan J. R., Chebib M. (2009): The Flavonoid Glycosides, Myricitrin, Goossypin and Naringin Exert Anxiolytic Action in Mice. *Neurochemical Research.* 34(10): 1867-1875.

Flohé L. (1988): Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 49: 663–668.

Gaetke L.M., Chow C.K. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1-2): 147-163.

Gaetke L.M., Chow-Johnson H.S., Chow C.K. (2014): Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88(11): 1929-1938.

Gerace E., Masi A., Resta F., Felici R., Landucci E., Mello T., Pellegrini-Giampietro D.E., Mannaioni G., Moroni F. (2014): PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neurobiol. Dis.* 70: 43–52.

Giampietro R., Spinelli F., Contino M., Colabufo N.A. (2018): The pivotal role of copper in neurodegeneration: A new Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders. *Mol Pharm.* 15(3): 808-820.

Ha T.K., Jung I., Kim M.E., Bae S.K., Lee J.S. (2017): Anti-cancer activity of myricetin against human papillary thyroid cancer cells involves mitochondrial dysfunction-mediated apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* 91: 378-384.

Han B. S., Hong H.-S., Choi W.-S., Markelonis G. J., Oh T. H., Oh, Y. J. (2003): Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment. *The Journal of Neuroscience* 23(12): 5069–5078.

Hasegawa T., Kaneko F., Niwa Y. (1992): Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice. *Life Sci.* 50: 1893–1903.

Hongmei Z. (2012): Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. U: Ntuli T. *Apoptosis and Medicine*. London, IntechOpen, str. 1-22.

Hyman B. T., Van Horsen G. W., Damasio A. R., Barnes, C. L. (1984): Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225: 1168–1170.

Jazvinščak Jembrek M., Vlainić J., Rudovanović V., Erhardt J., Oršolić N. (2014): Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *BioMetals* 27: 1303-1322.

Jazvinščak Jembrek M., Vuković L., Puhović J., Erhardt J., Oršolić, N. (2012): Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J. Mol. Neurosci.* 47: 286–299.

Jiang M., Zhu M., Wang L., Yu S. (2019): Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomed Pharmacother.* 120: 109506

Jimenez M.F.M., Reus M.I.S., Andres D., Cascales M., Benedi J. (2004): Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BrainRes.* 1009: 9–16.

Kelsey N.A., Wilkins H.M., Linseman D.A. (2010): Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15: 7792–7814

Kim G. H., Kim J. E., Rhie S. J., Yoon S. (2015): The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurol.* 24(4): 325-340.

Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. (1999): Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 274: 13908–13914.

Klebanoff S.J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77: 598–625.

Ko H.L., Ren E.C. (2012): Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules* 2: 524–548.

Kressel M., Groscurth P. (1994): Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 278: 549-556.

Kritis A.A., Stamoula E.G., Paniskaki K.A., Vavilis, T.D. (2015): Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 91.

Lan A., Xiong X., Chen J., Wang X., Chai Z., Hu, Y. (2016): AMPK inhibition enhances the neurotoxicity of Cu(II) in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicity Research* 30(3): 499–509.

Lee J.H., Choi Y.J., Park S.H., Nam M.J. (2018): Potential role of nucleoside diphosphate kinase in myricetin-induced selective apoptosis in colon cancer HCT-15 cells. *Food Chem. Toxicol.* 116(B): 315-322.

Leist M., Jaattela M. (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 589-598.

Li Y., Jiao Q.; Xu H., Du, X., Shi L., Jia, F., Jiang H. (2017): Biometal dyshomeostasis and toxic metal accumulations in the development of Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 10: 339.

Liao Y., Zhao J., Bulek K., Tang F., Chen X., Cai G., Jia S., Fox P.L., Huang E., Pizarro T.T. i suradnici (2020): Inflammation mobilizes copper metabolism to promote colon tumorigenesis via an IL-17-STEAP4-XIAP axis. *Nat. Commun.* 11: 900.

Lovell M. A., Robertson J. D., Teesdale W. J., Campbell J. L., Markesbery W. R. (1998): Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences* 158: 47–52.

Maisse C., Munarriz E., Barcaroli D., Melino G., De Laurenzi V. (2004): DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DeltaNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ.* 11(6): 685-687.

Majno G., Joris I. (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3-15.

Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16(10): 577–586.

Mezzetti A., Lapenna D., Romano F., Costantini F., Pierdomenico S.D., De Cesare D., Cuccurullo F., Riario-Sforza G., Zuliani G., Fellin R. (1996): Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. *J. Am. Geriatr. Soc.* 44: 823–827.

Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. (1990): Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 95–108.

Miller F.D., Pozniak C.D., Walsh G.S. (2000): Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. *Cell Death Differ.* (10): 880-888.

Miyoshi N., Naniwa K., Yamada T., Osawa T., Nakamura Y. (2007): Dietary flavonoid apigenin is a potential inducer of intracellular oxidative stress: The role in the interruptive apoptotic signal. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 466(2): 274–282.

Ono K., Li L., Takamura Y., Yoshiike Y., Zhu L., Han F., Yamada M. (2012) Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J. Biol. Chem.* 287: 14631–14643.

Park K.S., Chong Y., Kim M.K. (2016): Myricetin: biological activity related to human health. *Appl. Biol. Chem.* 59: 259-269.

Pearce R. K., Owen A., Daniel S., Jenner P., Marsden C.D. (1997): Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 104: 661–677.

Pollastri S., Tattini M. (2011): Flavonols: old compounds for old roles. *Ann Bot* 108: 1225-1233.

Pozniak C.D., Barnabé-Heider F., Rymar V.V., Lee A.F., Sadikot A.F., Miller F.D. (2002): p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J. Neurosci.* 22: 9800–9809.

Procházková D., Boušová I, Wilhelmová N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82(4): 513-523.

Radi E., Formichi P., Battisti C., Federico A. (2014): Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 42(3): 125-152.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. (2014): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(4):856-62.

Radovanović V., Vlainić J., Hanžić N., Ukić P., Oršolić N., Baranović G., Jazvinščak Jembrek M. (2019): Neurotoxic effect of ethanolic extract of propolis in the presence of copper ions is mediated through enhanced production of ROS and stimulation of caspase-3/7 activity. *Toxins (Basel)*. 11(5): 273.

Sahu S.C., Gray G.C. (1993): Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett.* 70: 73–79.

Salim S. (2016): Oxidative stress and the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360: 201-205.

Schwerdtle T., Hamann I., Jahnke G., Walter I., Richter C., Parsons J.L., Dianov G.L., Hartwig A. (2007): Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosylation and PARP-1 activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 201–210.

Semwal D.K., Semwal R.B., Combrinck S., Viljoen A. (2016): Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients* 8(2): 90.

Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H. (2008a): Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 819–825.

Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H. (2008b): Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase-3. *J. Neurosci. Res.* 86(8): 1836-1845.

Stefanis L. (2015): Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist.* 11(1): 50-62.

Teleanu R.I., Chircov C., Grumezescu A.M., Volceanov A., Teleanu D.M. (2019): Antioxidant therapies for neuroprotection - a review. *J. Clin. Med.* 8(10): 1659.

Uriu-Adams J.Y., Keen C.L. (2005): Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* 26(4-5): 268-298.

Waggoner D.J., Bartnikas T.B., Gitlin J.D. (1999): The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 6(4): 221-230.

Wang X., Michaelis E.K. (2010): Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging. Neurosci.* 2: 12.

Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 123(8): 1086-1092.

Yar Khan H., Zubair H., Fahad Ullah M., Ahmad A., Mumtaz Hadi S. (2012): A Prooxidant Mechanism for the Anticancer and Chemopreventive Properties of Plant Polyphenols. *Current Drug Targets* 13(14): 1738–1749.

Yokomizo A., Moriwaki M. (2005): Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69(4): 693–699.

Yoshino M., Haneda M., Naruse M., Murakami K. (1999): Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol. Genet. Metab.* 68: 468–472.

Zhang K., Ma Z., Wang J., Xie A., Xie J. (2011): Myricetin attenuated MPP(+)-induced cytotoxicity by anti-oxidation and inhibition of MKK4 and JNK activation in MES23.5 cells. *Neuropharmacology* 61: 329–335.

Zhang X.H., Chen S.Y., Tang L., Shen Y.Z., Luo L., Xu C.W., Liu Q., Li D. (2013): Myricetin induces apoptosis in HepG2 cells through Akt/p70S6K/bad signaling and mitochondrial apoptotic pathway. *Anticancer Agents Med. Chem.* 13(10): 1575-1581.

Zhang X.H., Zou Z.Q., Xu C.W., Shen Y.Z., Li D. (2011): Myricetin induces G2/M phase arrest in HepG2 cells by inhibiting the activity of the cyclin B/Cdc2 complex. *Mol. Med. Rep.* 4(2): 273-277.

Zhao X., Fang J., Li S., Gaur U., Xing X., Wang H., Zheng W. (2019): Artemisinin attenuated hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative injury in SH-SY5Y and hippocampal neurons via the activation of AMPK Pathway. *Int J Mol Sci.* 20(11): 2680.

Zheng L.-F., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.-L. (2008): Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure–activity relationship. *Food and Chemical Toxicology* 46(1): 149–156.

Zhu X., Raina A. K., Lee H. G., Casadesus G., Smith M. A., Perry G. (2004): Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1000: 32–39.

Zorić, A., Horvat, A., Slade, N. (2010): Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina Fluminensis.* 46 (2): 135-143.

Zubčić K., Radovanović V., Vlainić J., Hof P.R., Oršolić N., Šimić G., Jazvinščak Jembrek M. (2020): PI3K/Akt and ERK1/2 signalling are involved in quercetin-mediated neuroprotection against copper-induced injury. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020: 9834742.

ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Zoran Kiralj

Datum rođenja: 31.12.1996

Obrazovanje:

2018 – 2021 Diplomski studij eksperimentalne biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

2015 – 2018 Preddiplomski studij biologije

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Titula: univ. bacc. biol.

2011 – 2015 Srednja škola

Gimnazija Vukovar, Vukovar

Znanstveni rad:

Sadžak A., Vlašić I., Kiralj Z., Batarelo M., Oršolić N., Jazvinščak Jembrek M., Kušen I., Šegota S. (2021): Neurotoxic Effect of Flavonol Myricetin in the Presence of Excess Copper. *Molecules* 26(4): 845.

Dodatno:

2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama (A kategorija)

2019. Stečeno zvanje : državni karate sudac

2015. Stečeno majstorsko zvanje karate-do-a