

Toksični učinak bakra u kulturi stanica neuroblastoma SH-SY5Y

Batarelo, Marijana

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:217:194468>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marijana Batarelo

**Toksični učinak bakra u kulturi stanica
neuroblastoma SH-SY5Y**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marijana Batarelo

**Toksični učinak bakra u kulturi stanica
neuroblastoma SH-SY5Y**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku u zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Jazvišćak Jembrek, te suvoditeljstvom v. pred. dr. sc. Julije Erhardt. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale:

Prvenstveno zahvaljujem svojim roditeljima koji su iskazali strpljenje, razumijevanje i što su me ohrabрили kada mi je najviše trebalo.

Želim zahvaliti svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Maji Jazvinščak Jembrek na iznimnoj pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se v.pre.dr.sc. Juliji Erhardt na razumijevanju i susretljivosti.

Hvala svim mojim prijateljima koji su moje vrijeme studiranja učinili ljepšim i zabavnijim.

Zadnje, ali ne i posljednje, zahvaljujem se svojim Zelovljanima koji su me bodrili kroz cijelo školovanje i koji me nikad nisu pitali kad ću završit fakultet iz znatiželje već zbog fešte.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Toksični učinak bakra u kulturi stanica neuroblastoma SH-SY5Y

Marijana Batarelo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Oksidacijski stres, uzrokovan neravnotežom stvaranja i uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ima važnu ulogu u starenju mozga i razvoju neurodegenerativnih bolesti. U ovom radu, istraživala sam toksični učinak bakra na stanice neuroblastoma SH-SY5Y. Testom MTT, tripanskim modrilom i mjerenjem razine ATP-a ustanovila sam značajan pad preživljenja stanica SH-SY5Y nakon tretmana bakrom. Bakar je povećao proizvodnju reaktivnih vrsta, koje pri visokim vrijednostima izazivaju oksidacijsko oštećenje, te smanjio razinu glutationa. Također, izazvao je kondenzaciju kromatina bez aktivacije kaspaza 3 i 7, kao i oštećenja stanične membrane, iz čega zaključujem da je bakar izazvao programiranu staničnu smrt putem neovisnim o aktivaciji kaspaza i nekrozu. Na proteinskoj razini došlo je do povećane ekspresije proteina p53 i PARP-1, dok se ekspresija proteina NME1 smanjila. Primjena inhibitora proteina PARP-1 (PJ34) nije utjecala na toksičnost, dok je primjena inhibitora proteina p53 (pifitrin- α) uzrokovala povećanje toksičnosti bakra. Flavonoid miricetin pojačao je citotoksičnost bakra prooksidacijskim djelovanjem. Dobiveni rezultati razjašnjavaju mehanizam prooksidacijskog djelovanja bakra na staničnoj i molekularnoj razini što bi moglo pridonijeti razvoju novih farmakoloških pristupa u prevenciji i terapiji neurodegenerativnih bolesti.

(51 stranica, 14 slika, 1 tablica, 72 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Oksidacijski stres, redoks metali, ROS, neuroblastom, prooksidansi, antioksidansi, neurodegeneracija

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

Suvoditelj: v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Ocjenitelji: v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

doc. dr. sc. Zoran Marčić

prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

Toxic effect of copper in neuroblastoma SH-SY5Y cells

Marijana Batarelo

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Oxidative stress, caused by an imbalance in the formation and elimination of reactive oxygen and nitrogen species, plays an important role in brain aging and the development of neurodegenerative diseases. In this study, I investigated the toxic effect of copper on SH-SY5Y neuroblastoma cells. By MTT test, trypan blue exclusion assay, and ATP level measurement, I found a significant decline in SH-SY5Y cell survival after copper treatment. Copper has increased the production of reactive species, which at high values cause oxidative damage, and reduced glutathione levels. It also caused chromatin condensation without caspase 3 and 7 activation, as well as cell membrane damage, from which I conclude that copper caused programmed cell death via caspase-independent activation and necrosis. At the protein level, there was increased expression of p53 and PARP-1 proteins, while NME1 protein expression decreased. Administration of the PARP-1 protein inhibitor (PJ34) did not affect toxicity, whereas administration of the p53 protein inhibitor (pifitrin- α) caused an increase in copper toxicity. The flavonoid myricetin enhanced the cytotoxicity of copper by its prooxidative action. The obtained results clarify the mechanism of prooxidative action of copper at the cellular and molecular level, which could contribute to the development of new pharmacological approaches in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

(51 pages, 14 figures, 1 table, 72 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: Oxidative stress, redox metals, ROS, neuroblastoma, prooxidants, antioxidants, neurodegeneration

Supervisor: Assoc. Prof. Maja Jazvišćak Jembrek, PhD

Co-supervisor: Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Reviewers: Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD
Asst. Prof. Zoran Marčić, PhD
Prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted: 15th November 2021

Sadržaj:

| | |
|---|-----------|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1 Oksidacijski stres | 1 |
| 1.2. Neurodegenerativne bolesti i oksidacijski stres | 3 |
| 1.2.1. Stanična smrt u uvjetima oksidacijskog stresa | 4 |
| 1.3. Bakar i neurodegenerativne bolesti..... | 5 |
| 1.4. Prirodni antioksidans – miricetin..... | 7 |
| 2. Cilj istraživanja | 9 |
| 3. Materijali i metode..... | 10 |
| 3.1. Materijali | 10 |
| 3.1.1. Kemikalije..... | 10 |
| 3.1.2. Otopine i puferi | 11 |
| 3.1.3. Protutijela | 12 |
| 3.1.4. Komercijalno dostupni kompleti i ostali materijali | 13 |
| 3.2. Metode..... | 14 |
| 3.2.1. Uzgoj i održavanje stanične kulture neuroblastomskih stanica SH-SY5Y | 14 |
| 3.2.2. Tretiranje stanica SH-SY5Y s različitim koncentracijama CuSO ₄ | 14 |
| 3.2.3. Metode određivanje preživljenja stanica SH-SY5Y nakon tretmana s CuSO ₄ | 14 |
| 3.2.3.1. Brojenje stanica metodom bojenja s tripanskim modrilom | 15 |
| 3.2.3.2. Test MTT | 15 |
| 3.2.3.3. Mikroskopiranje stanica SH-SY5Y nakon tretiranja s otopinama CuSO ₄ različite koncentracije | 16 |
| 3.2.3.4. Mjerenje razine ATP-a uz pomoć CellTiter-Glo 2.0 kompleta | 16 |
| 3.2.4. Metode mjerenja nastanka RKV-a..... | 17 |
| 3.2.4.1. Detekcija RKV-a uz pomoć 2',7'-diklorofluorescin diacetata | 17 |
| 3.2.4.2. Detekcija RKV-a uz pomoć omjera GSH/GSSG..... | 18 |
| 3.2.5. Metoda određivanja aktivnosti kaspaza 3/7 | 19 |
| 3.2.6. Određivanje apoptotskih i nekrotičnih stanica nakon tretmana s CuSO ₄ | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.7. Westernska metoda otiska (<i>engl. Western Blot</i>) | 21 |
| 3.2.7.1. Tretman stanica SH-SY5Y i izolacija proteina za westernsku metodu otiska | 21 |
| 3.2.7.2. Koncentracija proteina..... | 22 |
| 3.2.7.3. Razdvajanje proteina..... | 22 |
| 3.2.7.4. Nitrocelulozna membrana..... | 23 |
| 3.2.7.5. Specifična protutijela..... | 24 |
| 3.2.8. Metoda primjene inhibitora proteina PARP-1 i p53 | 24 |
| 3.2.9. Statistika | 25 |
| 4. Rezultati | 26 |
| 4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih bakrom | 26 |
| 4.1.1. Morfološke promjene stanica SH-SY5Y nakon tretmana s CuSO ₄ | 27 |
| 4.1.2. Mjerenje razine ATP i bojenje tripanskim modrilom..... | 28 |
| 4.2. Određivanje nastanka reaktivnih radikala | 28 |
| 4.3. Djelovanje bakra na aktivaciju kaspaza i strukturu kromatina..... | 30 |
| 4.4. Uloga proteina PARP-1, p53 i NME1 nakon tretiranja SH-SY5Y stanica s CuSO₄ | 33 |
| 4.5. Utjecaj flavonoida miricetina na neurotoksični učinak bakra..... | 35 |
| 5. Rasprava | 39 |
| 6. Zaključci | 43 |
| 7. Literatura..... | 44 |
| 8. Životopis..... | 50 |

Popis kratica

APS – amonijev persulfat

ATP – adenzin trifosfat

CAT – katalaza; *engl. Catalase*

DMEM – Dulbecc-ov modificirani orlov medij; *engl. Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO – dimetil sulfoksid

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FBS – fetalni goveđi serum; *engl. Fetal bovine serum*

GPx – glutation peroksidaza; *engl. Glutathion peroxidase*

GR – glutation reduktaza; *engl. Glutathione reductase*

GSH – glutation; *engl. Glutathione*

H2DCFDA – 2',7' - diklorodihidrofluorescin diacetat

HNE – 4-hidroksinonenal

KMB – krvno moždana barijera

MAP kinase – mitogen aktivirana protein kinaza; *engl. mitogen activated protein*

MDA – malondialdehid

NB – neurodegenerativne bolesti

OS – oksidacijski stres

PI – propidij jodid

SDS – natrijev dodecil sulfat; *engl. Sodium dodecyl sulphate*

TMED – tris baza N,N,N,N-tetrametiletildiamin

1. Uvod

Produljenjem životnog vijeka čovjeka došlo je do povećanja broja slučajeva neurodegenerativnih bolesti (NB). Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, spinocerebralna ataksija, Huntingtonova bolest i amiotrofična lateralna skleroza samo su neke od neurodegenerativnih bolesti (Abramov i sur. 2017). Neurodegenerativne bolesti okarakterizirane su agregacijom tj. nakupljanjem proteina nepravilne konformacije kao što su α -sinuklein, β -amiloid, tau i huntingtin, te razvojem oksidacijskog stresa (OS-a) (Abramov i sur. 2020). Kako im i samo ime kaže, njihovo obilježje je sporo i kontinuirano propadanje živčanih stanica za koje, još uvijek, nema lijeka (Rizvi i sur. 2014). Propadanje živčanih stanica dovodi do narušavanja motoričkih i kognitivnih funkcija organizma, što u konačnici može rezultirati smrću (Wang i Michaelis 2010). Nastanak i patofiziologija neurodegenerativnih bolesti još nije u potpunosti jasna (Niedzielska i sur. 2016), stoga je ključno istraživati kako bismo saznali više o tim bolestima, te pronašli bolju terapiju za ljude koji su nažalost pogođeni ovim bolestima.

Bakar je redoks aktivan metal. Nužan je za funkcioniranje stanica zbog toga što čini dio aktivnih mjesta raznih enzima koji su uključeni u razne biološke procese bitne za život (Prohaska i Gybina 2004). Citotoksičnost bakra često se pripisuje njegovoj mogućnosti da reagira s vodikovim peroksidom, H_2O_2 , stvarajući izrazito reaktivni hidroksil radikal, $HO\cdot$, koji pokreće lipidnu peroksidaciju i na taj način dovodi do oštećenja bioloških molekula posredstvom OS-a. Međutim, kratak životni vijek nastalih radikala i manjak metoda s kojima bi mogli s velikom točnošću pratiti njihov nastanak čine mehanizam citotoksičnosti bakra i dalje nejasnim (Saporito-Magriña i sur. 2018).

1.1 Oksidacijski stres

Narušena ravnoteža između prooksidansa i antioksidansa, u korist prooksidansa, dovodi do stanja zvanog OS. Na razvoj OS-a utječu vanjski (egzogeni) i unutarnji (endogeni) čimbenici. Vanjski čimbenici mogu biti ksenobiotici, infekcija (virusna ili bakterijska), zračenje, nekvalitetna prehrana, ultrazvuk, pušenje, konzumacija alkohola i slično. Unutarnji čimbenici koji dovode do OS-a su biološke reakcije unutar organizma (Niedzielska i sur. 2016). Biološki oksidansi obuhvaćaju produkte vanjskih i unutarnjih čimbenika nastanka OS-a, a to su reaktivne vrste (RV). U RV spadaju reaktivne kisikove vrste (RKV) i reaktivne dušikove vrste (RDV). Kisik ima dva slobodna elektrona paralelnih okretaja u vanjskoj elektronskoj ljusci zbog čega lako stupa u interakcije s drugim molekulama, osobito u prisustvu metalnih iona, što dovodi do formiranja radikala (RKV-a) (Kim i sur. 2015).

RKV-e nastaju tijekom obrane organizma od patogena, staničnog disanja i staničnog metabolizma (Falkowski i Godfrey 2008). Najpoznatije RV-e su singlet kisik ($^1\text{O}_2$), superoksid radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($\text{OH}\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2), dušikov oksid (NO), i peroksininitrit anion (ONOO^-) (Krötz i sur. 2004). Mitohondrijski respiratorni lanac, odgovoran za stanično disanje, glavni je izvor RKV-a u fiziološkim uvjetima. Redoks reakcijama, reguliranim s pet enzimatskih kompleksa, dolazi do prijenosa elektrona kako bi se na unutrašnjoj membrani mitohondrija stvorila energija u obliku molekule ATP (Kim i sur. 2015). Neki elektroni (0,2–2 %) koji se prenose reagiraju s kisikom što dovodi do stvaranja RKV-a (Zhao i sur. 2019). Enzimski sustav NADPH oksidaza, koji se nalazi u membrani fagocitnih stanica uključujući i mikrogliju, stanice urođenog imunološkog sustava koje su prisutne u središnjem živčanom sustavu, smatra se kao znatan izvor RV-a. Prilikom imunološke reakcije elektroni se prenose sa NADPH na kisik pri čemu se stvaraju velike količine $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 (Kim i sur. 2015). Tako da RV-e, pri fiziološkim vrijednostima, imaju bitnu ulogu kao regulatori i posrednici fizioloških reakcija. Do problema dolazi kad se njihova koncentracija toliko poveća da dolazi do aktivacije niza bioloških procesa koji povećavaju mogućnost oštećenja bioloških molekula zbog toga što RKV-e i RDV-e lako stupaju u reakcije s lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama i ugljikovodicima (Niedzielska i sur. 2016). Povrh toga, oksidacijskim oštećenjem mitohondrija dolazi do dodatnog povećanja stvaranja RV-a, kao i pokretanja programirane stanične smrti koja može biti ovisna ili neovisna o aktivaciji kaspaza. Prilikom pokretanja apoptoze neovisne o kaspazama, nakupljanje RKV-a dovodi do aktivacije enzima poli (ADP-riboza) polimeraze 1 (PARP-1), koja sudjeluje u otpuštanju faktora indukcije apoptoze (*engl. apoptosis inducing factor; AIF*) (Hongmei 2012).

Različiti radikali različito reagiraju s molekulama i tako uzrokuju oštećenje. Radikali s jačim afinitetom (npr. $\text{OH}\cdot$ i ONOO^-) djelovat će na molekule koje se nalaze u neposredoj blizini njihovog nastanka i tu će izazvati oštećenje bioloških molekula, dok radikali sa slabijim afinitetom (npr. $^1\text{O}_2$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$) mogu duže vrijeme nereagirati s biološkim molekulama, pa iz tog razloga prijeđu veće udaljenosti i uzrokuju oštećenje na mjestima udaljenim od njihovog mjesta nastanka (Cordeiro 2014). RV-e uzrokuju promjene u strukturi i funkciji staničnih membrana, proteina, lipoproteina, enzima, hormona i genetskog materijala. RV-e na membranu djeluju tako da uzrokuju lipidnu peroksidaciju. Lipidna peroksidacija dovodi do autooksidacije polinezasićenih masnih kiselina i formiranja produkata reaktivnih aldehida kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (HNE). Aldehidi reagiraju s DNK ili proteinima te slično kao i RKV-e, uzrokuju promjene njihove strukture i funkcije (Fritz i Petersen 2013). Promjene proteina uzrokovane oksidacijskim oštećenjem najčešće se događaju na bočnim lancima cisteina i metionina. Osim promjene u funkciji proteina, formiraju se produkti koji su otporni na proteolitičku razgradnju (Stadtman 2006).

Postoji nekoliko mehanizama pomoću kojih se organizam štiti od OS-a, tj. negativnog utjecaja RV-a. Antioksidacijski sustav je zadužen za sprječavanje oštećenja uzrokovanog

oksidansima. Fiziološke vrijednosti RV-a su pod strogim nadzorom u tijelu zahvaljujući enzimskim i neenzimskim antioksidansima. Svrha im je održavanje ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa, te na taj način kontrolirati razinu OS-a. Ključne molekule enzimskog antioksidacijskog sustava su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT; *engl. catalase*), glutation peroksidaza (GPx; *engl. glutathion peroxidase*) i glutation reduktaza (GR). U neenzimski antioksidacijski sustav spadaju glutation (GSH), tioredoksin (Trx; *engl. thioredoxin*), vitamini (A,C i E), flavonoidi, elementi u tragovima, proteini kao što su albumin, ceruloplazmin i metalotionein (Niedzielska i sur. 2016). SOD ima ulogu u pretvaranju visoko reaktivnog $O_2^{\cdot-}$ u manje reaktivni H_2O_2 i O_2 . H_2O_2 djelovanjem CAT raspada se na vodu i O_2 . Prijelazni metali bakar i željezo imaju ulogu kao kofaktori oba ova enzima. Djelovanjem GPx dolazi do oksidacije GSH koji ima ulogu u redukciji H_2O_2 i $OH\cdot$ kako bi postali manje toksični (Liu i sur. 2015). Za razliku od enzimatskih, neenzimatski antioksidansi direktno se vežu i neutraliziraju RV-e kako bi zaustavili njihovu daljnju proizvodnju (Pizzino i sur. 2017).

1.2. Neurodegenerativne bolesti i oksidacijski stres

Neurodegenerativne bolesti povezuju se s motoričkim i kognitivnim poremećajima. Jedno od njihovih temeljnih obilježja je nakupljanje oštećenih proteina koji tvore različite oligomerne oblike, fibrile i agregate, poput neurofibrilnih čvorova i plakova, koji predstavljaju glavne simptome bolesti (Kipps i sur. 2005). Povećanje stvaranja RV-a u živčanom sustavu i akumulacija tj. nakupljanje oksidacijskog oštećenja pojavljuje se starenjem organizma što korelira s pojavom neurodegeneracije. Postoje brojni dokazi koji upućuju na povezanost OS-a i razvoja neurodegenerativnih bolesti. Neravnoteža između proizvodnje RKV-a i njihove eliminacije posredstvom antioksidacijskih sustava primjećena je kod svih neurodegenerativnih bolesti. Mozak, koji čini samo 2 % ukupne tjelesne mase, a troši 20 % ukupnog kisika, zbog visokog udjela lipida i velike potrošnje kisika osobito je osjetljiv na OS. Još jedan od razloga zašto je mozak osjetljiv na OS je činjenica da se u mozgu nalaze niske vrijednosti antioksidacijskih enzima i molekula, a visoke koncentracije cinkovih i bakrovih iona (Cobley i sur. 2018). Mehanizam kojim dolazi do oštećenja nije jasan, ali se pretpostavlja da RKV-e aktiviraju razne molekularne kaskadne reakcije koje uzrokuju povećanje propusnosti krvno moždane barijere (KMB), te tako dolazi do promjene morfologije mozga, neuropale i smrti stanica (Gu i sur. 2011). Povrh toga, oštećenje stanične i mitohondrijske DNK uzrokovano RKV-ma dovodi do poremećaja transkripcije i u konačnici narušava stabilnost genoma (Klein i sur. 2003). Također, prekomjerno stvaranje RKV-a može dovesti do poremećaja regulacije redoks-osjetljivih signalnih puteva koji imaju važnu ulogu u kontroli procesa koji su povezani s preživljenjem ili smrću stanica. Smatra se da navedene promjene imaju ulogu u procesu starenja, mutagenezi i patologiji neuredegeneracije (Loh i sur. 2006; Russo i sur. 2018).

1.2.1. Stanična smrt u uvjetima oksidacijskog stresa

Nekroza i apoptoza su dva glavna načina odumiranja neurona kod neurodegenerativnih bolesti. Karakteristika nekroze je prekomjerni unos iona u stanicu što dovodi do osmotskog šoka i promjene stabilnosti stanične membrane kroz koju tada nesmetano prolazi stanični sadržaj koji izlazi izvan stanice. Također, dolazi i do oštećenja DNK nastalog lomovima, ali kromatin se ne kondenzira (Chi i sur., 2018). Apoptoza je energetska ovisna stanična smrt koju aktiviraju geni zaduženi za održavanje ravnoteže organizma. Prilikom apoptoze dolazi do morfoloških promjena stanica koje postaju manje i gušće, također dolazi do promjena u kondenzaciji kromatina, loma DNK, morfoloških promjena mitohondrija, a u konačnici dolazi do raspadanja stanice (Loh i sur. 2006). Transkripcijski faktor p53 ima ulogu u staničnoj smrti regulirajući transkripciju proapoptotskih i antiapoptotskih gena (Zubčić i sur. 2020).

Programirana stanična smrt, apoptoza, najčešće se javlja kao odgovor stanice na prekomjerne vrijednosti RNV-a i aktivaciju kaspaza (Sheline i sur. 2002). Bakar može izazvati različite oblike stanične smrti, ovisno o primijenjenoj koncentraciji bakrovih iona i specifičnostima staničnih modela, kao što su smrt apoptozom posredovanom aktivacijom kaspaza preko vanjskog ili unutrašnjeg puta i apoptozom neovisnom o aktivaciji kaspaza (Kawakami i sur. 2008; Paris i sur. 2009; Tardito i sur. 2011).

Sve zdrave stanice sadržavaju kaspaze u obliku neaktiviranih proenzima (kaspaza zimogeni). Aktivacija proenzima može se postići proteolitičkim sazrijevanjem ili interakcijom s alosteričkim aktivatorom. Prilikom primanja apoptotičnog signala, kaspaza-zimogeni proteolitički se obrađuju kako bi nastali aktivni enzimi proteaza kaspaza. Pokretač kaspazne aktivnosti mogu biti inflamasi 8, pidosom 9, signalni kompleks inducirane-smrti (*engl. death-inducing signaling complex (DISC)*) i apoptosom 11. Zrela kaspaza je heterotetramer koji se sastoji od dva heterodimera podrijetlom od dva prekursora. Kaspaze koje sudjeluju u apoptozi mogu se podijeliti na grupu pokretača kaspaza (kaspaza 2,8,9,10) i grupu efektivnih kaspaza (kaspaza 3,6,7). Kaspaza 3 je glavna efektivna kaspaza koja razgrađuje većinu staničnih substrata u apoptotičkim stanicama. Kaspaza 3 cijepanjem stvara prokaspazu 3 i na taj način se obnavlja, također može biti aktivirana preko drugih kaspaza (8 i 9) koje proteolitički kataliziraju njen nastanak. Kaspaza 8 aktivira protein, podrijetom iz grupe Bcl-2, koji utječe na promjenu stabilnosti i propusnosti vanjske membrane mitohondrija. Preko, tada propusne membrane, izlazi citokrom c koji aktivira kaspazu 3 i 9. Kaspaza 7 slična je kaspazi 3 prema rascjepljivanju staničnih substrata prilikom apoptoze. Također, sudjeluju u pojačavanju signala kaspazne aktivnosti unutar mitohondrija. Iako aktivacija kaspaza ima ulogu u apoptozi, pokusi u kojima su korišteni inhibitori dokazuju da apoptoza ne mora biti ovisna o kaspazama. Primjenom inhibitora kaspaza i dalje je došlo do smrti slične apoptozi. AIF je glavni efektor apoptoze neovisne o kaspazama. To je mitohondrijalni protein koji se tijekom oštećenja premješta u jezgru gdje uzrokuje

fragmentaciju DNA i kondenzaciju kromatina. Također do smrti može doći i autofagijom stanica kod koje je obilježje nakupljanje autofagnih mjehurića (Kroemer i Martin 2005; Kumar 2007; Hongmei 2012).

Kao odgovor na OS, aktiviraju se određeni proteini koji imaju značajnu ulogu u popravku oksidacijskih oštećenja i aktivaciji staničnih procesa koji su uključeni u preživljenje ili smrt stanice. DNK oštećenje aktivira kaskadne reakcije popravka DNK. Proteini PARP-1, p53 i NME1 imaju ulogu u popravku DNK zavojnice. Protein p53 ima ključnu ulogu u staničnom odgovoru na OS. Pri niskim razinama OS-a ima antioksidacijska svojstva uz pomoć kojih spašava stanicu od smrti. Pri visokim razinama OS-a ima prooksidacijska svojstva koja dovode do povećanja stresa unutar stanice, što u konačnici dovodi do smrti stanice. Tako da, p53, ovisno o uvjetima, regulira ekspresiju raznih gena (sestrin, GPx, aldehyd dehidrogenaza, tumor protein p53-inducirani nuklearni protein) koji sudjeluju u staničnom odgovoru na OS. Osim toga, može regulirati razinu staničnog OS-a preko glikolize koja u tom slučaju pokreće ekspresiju regulatora TIGAR (*engl. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) i preko smanjenja ekspresije fosfoglicerat mutaze. U konačnici, ravnoteža proteina p53 između prooksidacijskog i antioksidacijskog stanja ima ključnu ulogu u smanjenju nakupljanja OS-a i DNK oštećenja (Liu i Xu 2011). PARP-1 je jezgreni protein koji se veže za lance DNK i formira poli (ADP-riboza) polimere. U prisutnosti RKV-a, PARP-1 se aktivira i dolazi do otpuštanja AIF-a iz mitohondrija. Kao što je već objašnjeno, AIF cijepa DNK, što u konačnici dovodi do apoptoze stanice (Hongmei 2012). Protein NME1 (nukleozid-difosfat kinaza) je enzim s raznim funkcijama. Odgovoran je za održavanje ravnoteže nukleozid difosfata i trifosfata, te sudjeluje u prijenosu signala kroz stanicu i regulaciji ekspresije gena (Yi i sur. 2021).

1.3. Bakar i neurodegenerativne bolesti

Bakar, element nužan za život, u normalnim uvjetima u tijelu se nalazi vezan za proteine. Međutim, ako je prisutan u suvišku, bakar može postati slobodan i u tom slučaju katalizira stvaranje visoko reaktivnih hidroksil radikala. Tako da bakar, iako potreban, ima sposobnost inicirati OS i na taj način poremetiti važne životne funkcije. Oštećenje nastalo OS-om, a uzrokovano bakrom, povezuje se s kroničnim izlaganjem povećanim vrijednostima bakra što može biti uzrokovano nesrećama, zagađenjem okoliša ili određenom vrstom posla (profesionalno oboljenje). Bakar u organizam velikim dijelom unosimo prehranom, a najvećim dijelom se skladišti u jetri (Gaetke i Chow 2003). Unos bakra ovisi o raznim čimbenicima, uključujući kemijski oblik i prisutnost drugih komponenti kao što su cink i željezo koji ometaju unos bakra u organizam. Bakar se u organizam uglavnom unosi preko tankog crijeva i želuca (Turnlund i sur. 1997). Dio unutarnjeg, endogenog bakra se reapsorbira iz probavnih sokova. Aminokiseline, kao što su cistein, metionin i histidin vežu bakar kako bi se apsorbirao preko

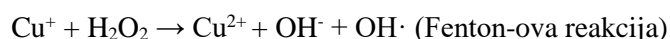
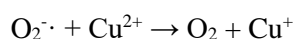
aminokiselinskog transportnog sustava. Reducirani glutation i organske kiseline (mliječna, octena, limunska i dr.) tvore ligande s bakrom koji se lako apsorbiraju (Jacob i sur. 1987).

Bakar u krv ulazi preko tankog crijeva, veže se za albumin, transkuprein i histidin te odlazi u jetru gdje se može skladištiti u hepatocitima, plazmi ili žuči (Turnlund i sur. 1998). Bakar skladišten u hepatocitima uglavnom se veže za metalotionin ili se ugrađuje u kuproenzime. Ceruloplazmin je glavni Cu-vezajući protein koji sadrži 6 atoma bakra u oksidiranom ili reduciranom obliku i koji prenosi bakar do tkiva. 60 – 90 % bakra u krvi je u formi ceruloplazmina (Harris 1993). Metalotionin ima antioksidacijsko djelovanje jer veže unutarstanični ionski bakar i tako sprječava citotoksičnost (Luza i sur. 1996).

Homeostazna regulacija bakra preko povećanog unosa ili izlučivanja štiti organizam od citotoksičnosti ili nedostatka bakra u organizmu. Endogeno izlučivanje je primarna metoda regulacije skladištenja bakra u organizmu (Turnlund 1998). Žučni kanali predstavljaju put izlučivanja bakra, kojeg izbacujemo iz organizma mokrenjem, znojenjem i fecesom (Gaetke i Chow 2003).

Iako još nije u potpunosti razjašnjeno kako bakar uzrokuje OS, smatra se da nekoliko mehanizama može objasniti staničnu toksičnost uzrokovanu bakrom. Temeljni mehanizam uključuje svojstvo slobodnih iona Cu da sudjeluju u nastanku RV-a. Bakar, kao redoks metal, javlja se u dva oblika, oksidirani Cu^{2+} i reducirani Cu^+ oblik koji sudjeluju u redoks reakcijama. U prisutnosti superoksid radikala ili reducensa (npr. askorbinske kiseline, glutationa) Cu^{2+} se reducira na Cu^+ koji katalizira nastajanje hidroksil radikala ($\text{OH}\cdot$) iz vodikovog peroksida (H_2O_2) kroz poznatu reakciju zvanu Haber-Weiss (Gaetke i Chow 2003).

Haber-Weiss reakcija:



Reducirani GSH veže ione metala, kao što je bakar, s kojima tvori komplekse kako bi smanjio dostupnost iona bakra unutar stanice i na taj način spriječio njegovo toksično djelovanje. Cu-GSH kompleks je redoks aktivna molekula koja reagira s O_2 i tvori $\text{O}_2\cdot^-$ koji dalje sudjeluje u Haber-Weiss reakciji. Isto tako, Cu-GSH kompleks reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} koji uz prisustvo H_2O_2 sudjeluje u Fenton-ovoj reakciji (Scheiber i sur. 2014).

Hidroksil radikal, kao jaki radikal, sposoban je reagirati sa svakom biološkom molekulom. U interakcijama s proteinima i nezasićenim masnim kiselinama može izazvati oksidacijsko oštećenje i dovesti do nastanka proteinskih i lipidnih radikala. Slično kao željezo, bakrom potaknuta proizvodnja RKV-a može pokrenuti pucanje DNK zavojnice i oksidirati njezine baze. Povećanje oštećenja DNK

koje je izazvano $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ vjerojatno je uzrokovano povećanim vrijednostima Cu^{2+} u blizini nukleosomalne DNK zbog povezivanja Cu i histona, ili povećane reaktivnosti uslijed promjene konformacije baza koje su zbog toga lakše dostupne (Trumbore i sur. 2001; Gaetke i Chow 2003). U smislu oksidacijskog oštećenja, najznačajnija posljedica povećanih vrijednosti bakra je lipidna peroksidacija. Reakcijom lipidnih radikala i kisika formiraju se peroksi radikali koji oštećuju stanice tako da im mijenjaju fluidnost i propusnost membrana ili direktno oštećuju DNA i druge unutarstanične molekule (Mattie i Freedman 2001).

U mozgu, bakar je potreban za pravilan razvoj i metaboličke potrebe. Kao kofaktor pojedinih enzima, također ima važnu ulogu u prijenosu živčanih signala i neuromodulaciji. Zbog toga, u mozgu se nalaze visoke vrijednosti iona bakra (8 – 11 % ukupnog bakra u organizmu, prema Manto, 2014). Bakar u mozak ulazi preko KMB-e, prolazeći kao slobodan ion. Ioni bakra mogu se preko prijenosnika prenijeti u stanice ili se vezati za molekule (metalotionein, GSH ili specijalizirani šaperoni) koje reguliraju homeostazu bakra (Scheiber i sur., 2014). Kocentracija bakra u mozgu, koja se smatra fiziološkom, iznosi 3,1 – 5,1 μg po gramu tkiva. (Manto, 2014).

1.4. Prirodni antioksidans – miricetin

Grupa prirodnih spojeva, flavonoidi imaju malu molekulsku masu i promjenjive strukture. Posjeduju antioksidacijsko djelovanje zahvaljujući brojnim dvostrukim vezama i hidroksilnim skupinama koje mogu poslužiti kao donor vodika kako bi se neutralizirali radikali i uhvatili ioni prijelaznih metala (Panche i sur. 2016). Osnovnu strukturu flavonoida čine heterociklički i aromatski prsten tj. benzopiran (prsteni A i C) na koji je vezan benzenski prsten (prsten B), a daljnja podjela ovisi o položaju veze između prstena B i C, stupnju oksidacije i nezasićenosti prstena C, kao i obrascu hidroksilacije i supstituciji na trećem C atomu (Dajas i sur., 2013).

Zbog njihovih antioksidacijskih svojstava, razmatra se upotreba flavonoida u prevenciji i liječenju neuredegenerativnih bolesti (Vauzour i sur, 2008). Flavonoli su flavonoidi s ketonskom i hidroksilnom skupinom na poziciji C3 prstena, a jedan od poznatijih je miricetin (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavon kanabiscetin (Semwal i sur. 2016). Miricitrin (miricetin-3-O-ramnozid) je glikozid miricetina koji nastaje vezanjem šećera ramnoze na poziciji C3. Glikozilacija mijenja kemijska i fizikalna svojstva molekula, pa se tako smatra da glikozidni oblik flavonoida, kao što je miricitrin, može imati jača antioksidacijska svojstva (Hwang i Chung, 2018). Miricetin posjeduje snažna antioksidacijska svojstva koja ovise o katekolu prstena B i hidroksilnoj grupi na položaju C4. Dosadašnja istraživanja pokazuju da štiti organizam od lipidne peroksidacije i sprječava apoptozu, a preko regulacije signalnih puteva MAP kinaza, potiče aktivnost enzima SOD, CAT i GPx. Zbog toga

se pretpostavljalo da bi mogao imati i neuroprotektivno djelovanje kod neurodegeneracije (Semwal i sur. 2016).

2. Cilj istraživanja

Ioni bakra, dokazano utječu na razvoj oksidacijskog stresa koji se nalazi u pozadini razvoja patoloških promjena neurodegenerativnih bolesti.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Razjasniti stanične i molekularne mehanizme koji se nalaze u podlozi toksičnog učinka bakra u kulturi stanica neuroblastoma SH-SY5Y
- Pripomoći razvoju novih novih farmakoloških pristupa u prevenciji i liječenju oksidacijskih oštećenja uzrokovanih visokim koncentracijama bakra

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Svoje istraživanje sam provela na stanicama neuroblastomske stanične linije SH-SY5Y koja je rezultat trostrukog kloniranja podlinije SK-N-SH. Dobivena je biopsijom koštane srži četverogodišnje pacijentice oboljele od neuroblastoma početkom 1970. godine (Biedler i sur. 1973). Stanice SH-SY5Y posjeduju mnoge biokemijske i funkcionalne karakteristike neurona, što ih čini dobrim modelom za ovo istraživanje (Joshi i sur. 2006).

3.1.1. Kemikalije

U svrhu ovog istraživanja korištene su sljedeće kemikalije:

1. Proizvođač: Sigma Aldrich (SAD)
 - 10 % natrijev dodecil sulfat (*engl. sodium dodecyl sulphate – SDS*);
 - 2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol-trihidroklorid trihidrat, poznat kao boja Hoechst 33342;
 - 2',7'- diklorodihidrofluorescin diacetat (H_2DCFDA);
 - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid, poznat kao MTT;
 - Amonijev persulfat (APS);
 - fetalni goveđi serum (*engl. fetal bovine serum – FBS*);
 - L-glutamin;
 - Medij za uzgoj stanica (*engl. Dulbecco's modified eagle's medium – DMEM*);
 - Na-piruvat;
 - Penicilin i streptomycin;
 - Propidij jodid;
 - tripsin;

- Tris baza, N,N,N, N-tetrametiletildiamin (TEMED);
2. Proizvođač: Kemika (Hrvatska)
- bakar (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$);
 - dimetil sulfoksid (DMSO);
 - etanol;
 - etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA);
 - metanol;
 - naftol modriilo:
 - octena kiselina.
3. Proizvođač: Chennai (India)
- Miricetin

3.1.2. Otopine i puferi

U svrhu ovog istraživanja, bile su potrebne sljedeće otopine i puferi.

- 10 % SDS (w/v), pH=7,2 (10 g SDS + reH₂O do 100 mL)
- 30 % (w/v) matična otopina akrilamida (30 % akrilamid + 0,8 % bisakrilamid)
- APS (10 g amonijev persulfat + reH₂O do 100 mL)
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (matična otopina 5×10^{-2} M u dH₂O)
- H₂DCFDA (40 mM u DMSO)
- Hoechst 33342 (1 mg/mL u dH₂O)
- Medij za održavanje stanične kulture – kompletirani medij (DMEM s dodatkom 100 jedinica penicilina G po mL i 100 µg/mL streptomicina, 1 mM Na-piruvat, 2 mM L-glutamin i 10 % FBS-a)
- MTT (5 mg/mL u PBS 10×)

- Otopina za blokiranje membrane (5 g obrano mlijeko u prahu + TBST do 100 mL)
- Otopina za bojenje 10× (13,34 μL PI (200 μM) + 2,8 μL Hoechst 33342 (50 μM) + 83,86 μL H₂O)
- Otopina za bojenje membrane (0,5 g naftol modriilo + 50 mL etanol + 10 mL octena kiselina + reH₂O do 500 mL)
- Otopina za odbojenje membrane (40 % metanol + 7 % octena kiselina + reH₂O do 500 mL)
- Otopina za odvajanje stanica sa površine posudice (PBS s 0,05 % tripsina i 1 mM EDTA)
- PI (1 mg/mL u dH₂O)
- Pufer TBST (*engl. tris buffer saline tween*) 10×: (NaCl (c=150 mmol/L) + Tris (c=50 mmol/L) + 50 mL Tween-20 + reH₂O do 500 mL)
- Pufer za elektroforezu (10×: Tris baza (c= 25 mmol/L) + glicin (c=190 mmol/L) + 0,1 % SDS)
- Pufer za ispiranje stanica (*engl. phosphate buffered saline – PBS*) koji se sastoji od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄; pH=7,4
- Pufer za nanošenje uzoraka 4×LB (*engl. laemmli buffer*: 2 mL Tris (c=1 mol/L, pH=6,8) + 617,2 mg ditiotreeitol (DDT: c=100 mmol/L) + 800 mg 10 % SDS + 4 mL glicerol + 40 mg bromfenol plavo)
- Pufer za prijenos – 10× (Tris baza (c=184 mmol/L) + glicin (c=140 mmol/L) + 20%-tni etanol)
- Tris baza pH=6,8 (60,57 g Tris + reH₂O do 100 mL; c=1 mol/L)
- Tris baza pH=8,8 (90,885 g Tris + reH₂O do 500 mL; c=1,5 mol/L)
- Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Coctail Tablets (Roche, Indianapolis, IN, SAD) – korišten za inhibiciju proteaza

3.1.3. Protutijela

U svrhu ovog istraživanja, bila su potrebna sljedeća protutijela.

1. Primarna protutijela

- Anti -NME1 (dobiveno ljubaznošću Dr. I. Lascu, Francuska i Dr. S. Volarevića, Rijeka; 1:3000)
- Anti-p53 α (TRSA dobivena zahvaljujući prof. Bourdona; 1:2000)
- Anti-PARP-1 (F-2, sc-8007, Santa Cruz Biotechnology, SAD; 1:1000)
- Anti- β aktin (7DC2C10, 60008 1-Ig, Proteintech; 1:10000)

2. 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. Komercijalno dostupni kompleti i ostali materijali

U svrhu ovog istraživanja, bili su potrebni sljedeći komercijalno dostupni kompleti i ostali materijali.

1. Komercijalni kompleti

- Caspase – Glo 3/7 Assay (Promega) – korišten za određivanje aktivnosti kaspaza 3/7
- CellTiter – Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega) – korišten za određivanje preživljenja stanica
- GSH/GSSG – Glo Assay (Promega) – korišten za određivanje omjera GSH/GSSG
- PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) –Standardi otopine albumina iz goveđeg seruma (*engl. Bovine serum albumine, BSA*) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g/mL}$ korišteni za određivanje koncentracije proteina westernskom metodom otiska

2. Ostali materijali

- GE Healthcare AmershamTM ProtranTM NC Nitrocellulose Membrane – Nitrocelulozna membrana za transfer proteina s porama promjera 0,2 μm korišten kod westernske metode otiska

- Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad, SAD) – biljeg molekulskih masa raspona 10-250 kDa korišten kod westernske metode otiska

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj i održavanje stanične kulture neuroblastomskih stanica SH-SY5Y

Kako bi stanice SH-SY5Y uzgojila u posudicama za staničnu kulturu ($P=25\text{ cm}^2$) bilo je potrebno osigurati kompletirani medij za uzgoj i držati ih u prilagođenim uvjetima unutar inkubatora ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , relativna vlažnost 95%). Stanice nakon nekog vremena ispune cijelu posudicu i tad ih premještamo u novu. U ovom istraživanju, to sam činila dva puta tjedno. Stari medij iz posudica sam uklonila kako bi stanice isprala s 2 mL PBS-a. Pošto su stanice pričvršćene za dno posudice, nakon ispiranja sam dodala $0,5\text{ mL}$ tripsina koji odvaja stanice od dna posudice nakon 10-ak minuta, što sam provjerila pod mikroskopom gdje je bilo vidljivo da stanice plutaju u mediju. Odvojene stanice nakon toga izmiješala sam s 2 mL kompletiranog medija. Od 2 mL stanica pomiješanih s medijem, $400\text{ }\mu\text{L}$ sam vratila u posudicu i dodala novi svježi medij kako bi održala staničnu kulturu, a ostatak suspenzije sam koristila za pokuse.

3.2.2. Tretiranje stanica SH-SY5Y s različitim koncentracijama CuSO_4

Stanice SH-SY5Y sam tretirala s rastućim koncentracijama CuSO_4 ($0 - 1,5\text{ mM}$) tijekom 24h kako bi saznala koje koncentracije značajno utječu na vijabilnost, također, te koncentracije su mi služile u daljnjem istraživanju. U jažice pločice stavila sam $100\text{ }\mu\text{L}$ stanične suspenzije, gustoće stanica 20×10^3 stanica/jažici. U jažice sam zatim dodala različite koncentracije CuSO_4 ($0 -$ kontrola, $0,05\text{ mM}$, $0,1\text{ mM}$, $0,2\text{ mM}$, $0,3\text{ mM}$, $0,4\text{ mM}$, $0,5\text{ mM}$, $0,6\text{ mM}$, $0,8\text{ mM}$, 1 mM , $1,2\text{ mM}$, $1,5\text{ mM}$) te sam pločicu inkubirala 24 sata u inkubatoru na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Takva pločica služila mi je za daljnja istraživanja.

3.2.3. Metode određivanje preživljenja stanica SH-SY5Y nakon tretmana s CuSO_4

Preživljenje tretiranih stanica SH-SY5Y sam promatrala i analizirala preko nekoliko metoda opisanih dalje u tekstu.

3.2.3.1. Brojenje stanica metodom bojenja s tripanskim modrilom

Unutar suspenzije stanica, dobivenu prethodno opisanim postupkom, potrebno je izbrojati žive stanice kako bi ih razrijedila i nasadila unutar jažica pločice za nasađivanje koju ću koristiti u daljnjim pokusima. Nakon nasađivanja stanica potrebno je inkubirati pločicu kako bi se stanice pričvrstile za dno jažica. Stanice sam brojala na način da sam prvo napravila suspenziju za brojanje stanica koja se sastoji od 30 μL kompletiranog medija, 20 μL stanične suspenzije i 50 μL tripanskog modrila. Suspenziju za brojanje stanica sam prenijela na komoricu za brojanje stanica (Bürker – Turk). Ishod sam promatrala pod mikroskopom uz pomoć hemocitometra u 4 vidna polja. Žive stanice imaju neoštećenu membranu pa tripansko modrilo ne može prodrijeti u njih, dok su mrtve stanice obojene plavo. Izbrojane stanice sam uvrstila u formulu specifičnu za Bürker – Turk-ovu komoricu kako bi dobila broj živih stanica.

Formula za određivanje gustoće stanica:

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

N^* = ukupan broj stanica

5^{**} = faktor razrijeđenja

3.2.3.2. Test MTT

Kako bi odredila preživljenje stanica nakon tretiranja s različitim koncentracijama CuSO_4 , koristila sam MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid). To je kolorimetrijski test koji se koristi za *in vitro* analizu citotoksičnosti i stanične proliferacije (Wan i sur. 1994). Broj živih stanica u jažicama pločice očitava se pomoću spektrofotometra što nudi brojne prednosti kao što je brzina, jednostavnost, cijena i sigurnost. Potrebno je napomenuti da rezultati testa ovise o broju stanica i mitohondrijskoj aktivnosti u stanicama. Iz tog razloga u ovom istraživanju koristila sam i dodatne metode za analizu preživljenja stanica (tripanskim modrilom, određivanjem razine ATP-a). Metoda se temelji na tome da mitohondrijski enzim, sukcinat dehidrogenaza, unutar živih stanica cijepa tetrazolijsku sol MTT u formazan koji je plavo obojen (Wan i sur. 1994), smatra se da je količina nastalog formazana proporcionalna broju živih stanica.

U svom istraživanju, koristila sam inkubiranu pločicu za nasađivanje u kojoj su bile stanice SH-SY5Y. Pločice sam tretirala različitim koncentracijama CuSO_4 (0-1,5 mM) tijekom 24 sata. Nakon 24 sata, iz jažica pločice uklonila sam medij te dodala 0,5 mg/mL MTT u 40 μL medija.

Tretiranu pločicu sam zatim prekrila aluminijskom folijom zbog osjetljivosti boje na svjetlo i stavila u inkubator (37 °C). Nakon tri sata inkubacije u jažice sam dodala 160 µL DMSO-a koji ima funkciju otapanja nastalih kristala formazana. Takvu pločicu sam opet prekrila aluminijskom folijom i stavila na tresilicu kako bi se kristali lakše i brže otopili. Nakon 10-ak minuta rezultate sam očitala uz pomoć spektrofotometrijskog automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems) mjerenjem apsorbancije na 570 nm.

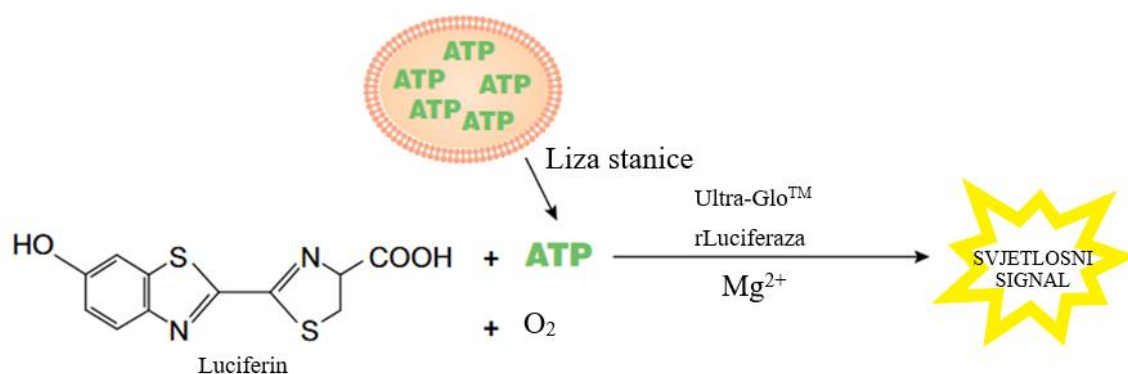
3.2.3.3. Mikroskopiranje stanica SH-SY5Y nakon tretiranja s otopinama CuSO₄ različite koncentracije

Unutar malenih petrijevih zdjelica (promjer 35 mm) nasadila sam stanice SH-SY5Y i inkubirala ih 24 sata, kako sam već objasnila u prethodnim metodama. Inkubirane stanice sam zatim tretirala s određenim koncentracijama CuSO₄ (0,5 mM, 0,8 mM i 1 mM) koje su prema testu MTT izazvale značajnu promjenu u preživljenju stanica, a jedna netretirana petrijevka služila mi je kao kontrola. Nakon inkubacije od 24 sata stanice sam mikroskopirala uz pomoć mikroskopa *EVOS Fluid Cell Imaging System* i slikala.

3.2.3.4. Mjerenje razine ATP-a uz pomoć CellTiter-Glo 2.0 kompleta

Nakon tretmana stanica SH-SY5Y s CuSO₄ odredila sam razinu ATP-a uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta *CellTiter-Glo 2.0 (Promega)* prema protokolu danom od strane proizvođača. Mjerenje unutarstanične proizvodnje ATP-a smatra se najosjetljivijom i najbržom metodom za određivanje preživljenja stanica (Riss i sur. 2013).

Metodu sam provela na način da sam u svaku jažicu pločice koja je sadržavala stanice SH-SY5Y tretirane s CuSO₄ (prethodno inkubirano 24 sata) koncentracije 0,5 mM i 1 mM, dodala 100 µL reagensa dobivenog unutar komercijalnog kompleta, s tim da sam pločicu prethodno inkubirala na sobnoj temperaturi 30-ak minuta kako bi se pločica temperirala. Reagens se sastoji od male molekule pro-substrata i luciferaze. Žive stanice s aktivnim metabolizmom, reduciraju pro-substrat u substrat koji difundira u medij unutar jažica gdje ga koristi luciferaza kako bi stvorila luminiscentni signal uz pomoć luciferina koji reagira s ATP-a, O₂ i Mg⁺ koje stvara živa, metabolički aktivna stanica (Slika 1).



Slika 1. Način djelovanja CellTiter-Glo 2.0 kompleta. Molekula luciferina uz prisustvo ATP-a, kisika i magnezija koji nastaju aktivnošću stanice, proizvodi svjetlosni signal kojeg pomoću luminometra kvantificiramo u ovisnosti o jakosti nastalog svjetlosnog signala. (Izvor: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-2_0-assay/?catNum=G9241)

Pločicu sa reagensom sam zatim stavila na tresilicu 2 minute kako bi došlo do lize stanice. Nakon toga pločicu sam ostavila 10-ak minuta na sobnoj temperaturi kako bi se svjetlosni signal stabilizirao. Rezultate sam očitala uz pomoć luminometra *Fluoroksan ascent FL, Thermo Fisher* s vremenom integracije od 0,8 sekundi po jažici.

3.2.4. Metode mjerenja nastanka RKV-a

Toksični učinak prijelaznih metala najviše se prepisuje sposobnosti stvaranja RKV-a i izazivanju OS-a (Chen i sur. 2018).

3.2.4.1. Detekcija RKV-a uz pomoć 2',7'-diklorofluorescin diacetata

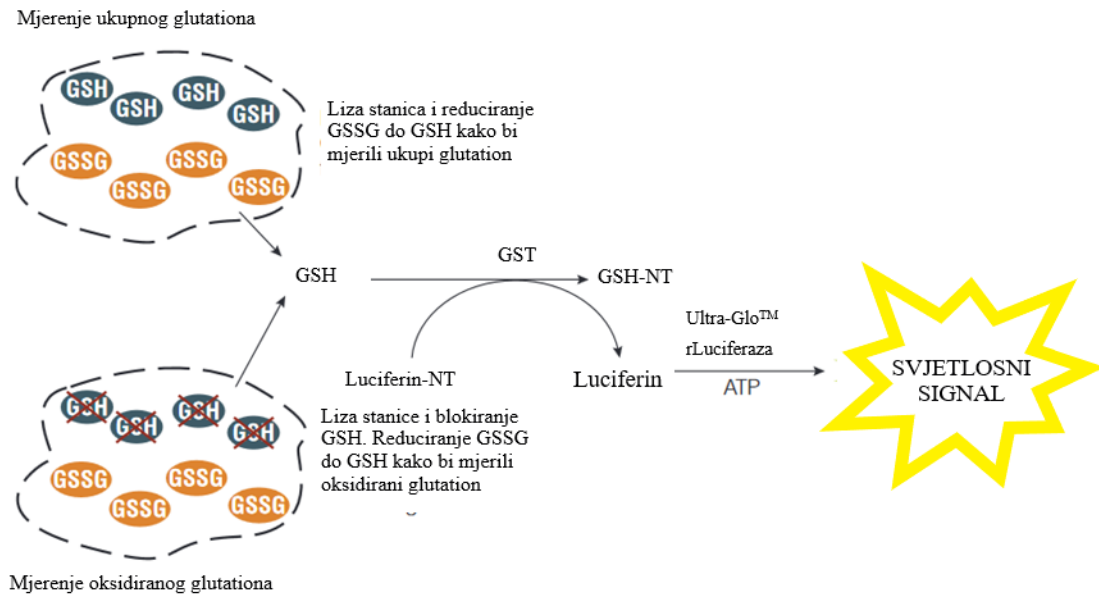
H₂DCFDA je reducirani oblik fluoresceina koji se inače koristi kao indikator RKV-a u stanicama. Unutarstanične esterase cijepaju acetatne skupine H₂DCFDA, a zatim dolazi do njegove oksidacije u prisustvu slobodnih radikala. Zbog toga H₂DCFDA se pretvara u visoko fluorescentni 2',7'-diklorofluorescin (*engl. dichlorofluorescein; DFC*).

Unutar jažica sa stanicama SH-SY5Y prethodno tretiranih s 0,5 mM i 1 mM CuSO₄ dodala sam 50 µL H₂DCFDA u PBS-u, a u jažice koje su mi služile kao slijepa proba za određivanje autofluorescencije stanica stavila sam samo PBS. Pločicu sam inkubirala 30 minuta. Nakon toga, otopinu sam izvukla iz jažica i isprala stanice sa 100 µL PBS-a. Zatim sam opet napunila jažicu sa 100 µL PBS-a. Takvu pločicu sam stavila u inkubator 1 sat. Nakon 1 sat, pločica je bila spremna za očitavanje. Emitirana fluorescencija određena je pomoću luminometra *Flouroskan Ascent FL (Thermo Fischer)*, s tim da su valne duljine ekscitacije i emisije iznosile 485 nm, odnosno 538 nm.

3.2.4.2. Detekcija RKV-a uz pomoć omjera GSH/GSSG

Korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *GSH/GSSG-Glo Assay (Promega)* odredila sam unutarstanični omjer GSH/GSSG, koji služi kao dodatna metoda za određivanje prisutnosti RKV-a i stanja OS-a. Metoda se temelji na luminiscenciji, stvara se stabilni luminiscentni signal. Komplet funkcionira na način da GSH reagira s molekulom luciferin-NT što dovodi do nastanka luciferina koji uz pomoć glutathion S-transferaze počinje emitirati svjetlosni signal (Slika 2). Jakost nastalog svjetlosnog signala ovisi o prisutnom GSH. Stoga, količina GSH je proporcionalna svjetlosnom signalu kojeg mjerimo.

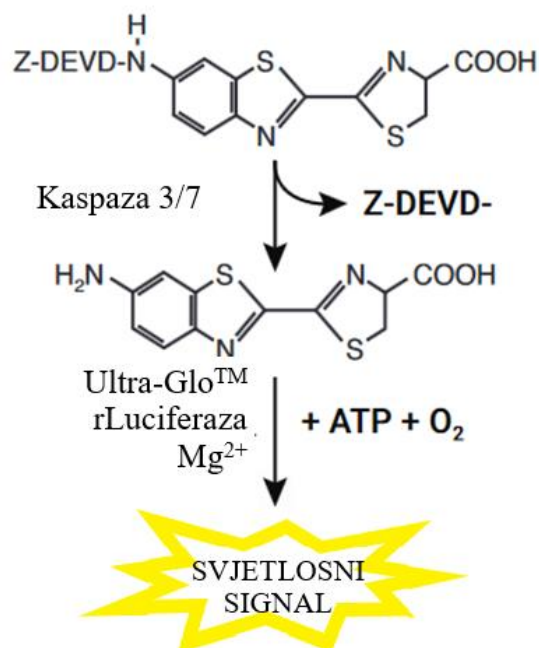
Pripremljenoj pločici sa stanicama SH-SY5Y tretiranih s 0,5 mM CuSO₄ otklonila sam medij. U ½ jažica sam dodala 50 µL reagensa za lizu koji specifično određuje ukupni glutathion i 50 µL reagensa za lizu koji specifično određuje oksidirani glutathion u ostalih ½ jažica. Jedna netretirana jažica mi je služila kao slijepa proba. Reagense sam prethodno pripremila prema uputama proizvođača. Rok trajanja reagensa je 30 minuta, stoga treba paziti na vrijeme. Takvu pločicu stavila sam na tresilicu (sobna temperatura) 5 minuta. Nakon 5 minuta, dodala sam 50 µL reagensa za nastanak luciferina u sve jažice, za koji je također bitno da se iskoristi u roku 30 minuta. Kratko sam pločicu stavila na tresilicu, a zatim sam je 30 minuta inkubirala na sobnoj temperaturi. Nakon toga, u svaku jažicu sam dodala 100 µL reagensa za detekciju luciferina. Pločicu sam opet kratko stavila na tresilicu, a nakon 15 minuta sam mjerila luminiscenciju uz pomoć luminometra (*Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher*).



Slika 2. Način djelovanja GSH/GSSG kompleta. Ukupni GSSG pretvaramo u GSH (kod mjerenja ukupnog glutatona). GSH reagira s luciferin prekursorom. Reakcija dovodi do nastanka luciferina koji uz prisustvo ATP-a emitira svjetlosni signal koji mjerimo luminometrom. (Izvor: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh_gssg_glo-assay/?catNum=V6611)

3.2.5. Metoda određivanja aktivnosti kaspaza 3/7

Kako bih razjasnila mehanizme stanične smrti, mjerila sam aktivnost kaspaza 3/7 koje imaju ulogu u staničnoj smrti koja može biti ovisna ili neovisna o kaspazama. Aktivnost kaspaza sam odredila uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta *Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)* koji se temelji na luminiscenciji, prateći protokol od strane proizvođača. Do luminiscencije dolazi nakon što se doda reagens koji lizira stanice. Reakcija je popraćena kaspaznim rascjepivanjem substrata što rezultira proizvodnjom svjetlosnog signala od strane luciferaze (Slika 3).



Slika 3. Način djelovanja Caspase 3/7-Glo kompleta. Kaspaza 3/7 cijepa substrat DEVD-aminoluciferin na aminoluciferin kojeg luciferin koristi za nastanak svjetlosnog signala kojeg mjerimo uz pomoć luminometra. (Izvor: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090#protocols)

Pufer i substrat, dobiven unutar kompleta, nakon izjednačavanja temperature, sam pomiješala kako bi dobila reagens. Nakon toga, u pločicu s jažicama, u kojoj se nalaze stanice SH-SY5Y tretirane s 0,5 mM i 1 mM CuSO₄, dodala sam 80 μL reagensa, a pločicu sam potom stavila na tresilicu 30-ak sekundi kako bi došlo do lize stanica. Nakon toga, pločicu sam inkubirala na sobnoj temperaturi 90 minuta. Poslije inkubacije, luminiscenciju sam očitala uz pomoć luminometra *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Fisher).

3.2.6. Određivanje apoptotskih i nekrotičnih stanica nakon tretmana s CuSO₄

Metoda bojenja tretiranih stanica SH-SY5Y s Hoechst 33342 i propidij jodidom (PI), koje su fluorescentne boje, omogućila mi je vidljivo uočavanje promjena jezgre stanica. Navedene boje vežu se i boje DNK stanica.

Boja Hoechst 33342 (2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol) ima nisku molekularnu masu, što joj omogućava prolazak kroz membranu stanice, tako da boji sve stanice. Emitira svjetlost plavog obojenja (460 – 490 nm) pod utjecajem UV svjetlosti. Veže se za dijelove DNK bogate adeninom i timinom. Koristi se za određivanje kondenziranog kromatina u

apoptotskim stanicama kod kojih se javlja izrazito plavo obojenje. Za razliku od boje Hoechst 33342, boja propidijev jodid ima veliku molekularnu masu što joj onemogućava prolazak kroz staničnu membranu. Iz tog razloga PI se koristi kao indikator mrtvih stanica. Kroz oštećenu membranu, PI lako prolazi i boji jezgru stanice crveno s tim da je ekscitacija 488 nm, a emitira crveno obojenje na 617 nm.

Iz jažica pločice sa 6 jažica sa stanicma SH-SY5Y tretiranih s 0,5 mM CuSO₄ i kontrolnih pločica koje nisu tretirane s CuSO₄, medij sam prenijela u epruvete za centrifugiranje. Nakon toga, kako bi se stanice unutar jažica odvojile, dodala sam 350 µL tripsina i ostavila sam 10-ak minuta pločicu kako bi tripsin djelovao. Nakon 10-ak minuta, stanice unutar jažica sam miješala s 1 mL kompletiranog medija i prenijela u epruvete u koje sam prethodno stavila medij, pritom pazeći da prethodno preneseni medij i stanice odvojene s dna jažica pripadaju istoj jažici. Ovaj postupak sam ponovila još jednom kako bi bila sigurna da su sve mrtve stanice prenešene. Epruvete sam zatim centrifugirala pri 1200 rpm (*engl. revolutions per minute*) kroz 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant sam izlila, a talog stanica izmiješala s 1 mL PBS-a. Izmiješani talog sam prebacila u Eppendorf-ovu epruvetu (1,5 mL) kako bi opet centrifugirala uzorke. Taj postupak sam ponovila još jednom, a nakon što sam izlila supernatant, talog sam izmiješala s 27 µL PBS-a. Takve stanice spremne su za bojenje. Boju sam pripremila miješanjem 50 µM boje Hoechst 33342 i 200 µM PI u kvarcnoj vodi (qH₂O). Pripremljenu boju sam miješala s uzorcima u omjeru 1:10, a nakon toga sam inkubirala na sobnoj temperaturi par minuta kako bi boja djelovala, tj. ušla u stanice i obojila jezgre. Na predmetna stakalca nanijela sam 15 µL obojenog uzorka, a stanice sam nakon bojenja vizualizirala uz pomoć mikroskopa *EVOS Flouid Cell Imaging Station (Thermo Fisher)*.

3.2.7. Westernska metoda otiska (*engl. Western Blot*)

Westernska metoda otiska je analitička metoda koja služi za detekciju određenog proteina. Korištenjem primarnih i sekundarnih protutijela, ciljani proteini postaju vidljivi na nitroceluloznoj membrani. Ova metoda sastoji se od više dijelova.

3.2.7.1. Tretman stanica SH-SY5Y i izolacija proteina za westernsku metodu otiska

Stanice SH-SY5Y, uzgojene u posudicama (P=25 cm²), gustoće 2×10⁶/posudici, tretirala sam s 0,5 mM CuSO₄ (inkubacija 24 sata). Nakon završetka tretmana, stanice sam odvojila s dna posude uz pomoć strugalice, a cijeli postupak sam radila na ledu. Sastrugane stanice sam prenijela u epruvetu (15 mL) i centrifugirala pri 1200 rpm / 5minuta. Nakon što su stanice pale na dno, supernatant sam

odlila, a talog kojeg čine stanice sam isprala s PBS-om kako bi opet centrifugirala stanice. Ovaj postupak s centrifugiranjem sam ponovila još dva puta, a nakon toga dobiveni talog sam pohranila u zamrzivač pri temperaturi od -80 °C.

Talog, dobiven prethodnom metodom, pomiješala sam s puferom za lizu stanica (1×inhibitori proteaza u PBS-u). Dobivene uzorke stavila sam na led. Stanice unutar uzorka sam dodatno razorila uz pomoć ultrazvučnog sonikatora. Sonikatorom sam uzorke tretirala tri puta po 30 sekundi, s tim da sam svakih 10 sekunda radila pauzu. Uzorke sam, nakon soniciranja, stavila centrifugirati (12500 g / 4 °C / 15 minuta).

3.2.7.2. Koncentracija proteina

Uz pomoć kompleta BCA (*engl. bicinchronic acid assay*) odredila sam koncentraciju proteina u uzorcima dobivenih prethodnom metodom. Komplet se temelji na reakciji proteina i bakar (II) iona. Pošto komplet čini bicinkonična kiselina, pri bazičnim uvjetima bakar se reducira u Cu^+ oblik koji tvori komplekse s bicinkroničnom kiselinom ljubičastog obojenja. Jakost obojenja proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorcima. Koncentracije proteina odredila sam uz pomoć spektrofotometra, pri valnoj duljini od 570 nm. Komplet također sadrži standardnu otopinu BSA koju sam razrijeđivala kako bih dobila potrebnu baždarnu krivulju.

Unutar svake jažice mikrotitarske pločice koja je sadržavala uzorke prethodno dobivene, stavila sam 20 μL standardne otopine BSA različitih razrijeđenja. U jažice koje su mi služile kao negativna kontrola stavila sam 20 μL dH_2O . U ostale jažice stavila sam 20 μL uzorka razrijeđenog $10\times$ s reH_2O . U svaku jažicu sam zatim dodala 200 μL radnog reagensa koji se sastoji od otopine A i B u omjeru 50:1. Otopina A sastoji se od natrijevog karbonata, natrijevog hidrogenkarbonata, bicinkonične kiseline i natrijevog tartarata koji je otopljen u 0,1 mol/L natrijevom hidroksidu. Otopina B sadrži bakrov (II) sulfat ($w=4\%$). Pločicu sam stavila na tresilicu 1 minutu, te sam je prebacila u vodenu kupelj (37 °C) na inkubaciju u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, pločicu sam ostavila na sobnoj temperaturi i očitala apsorbanciju pomoću spektrofotometra.

3.2.7.3. Razdvajanje proteina

Proteine sam razdvojila uz pomoć denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu. Proteini se, kako putuju kroz gel, razdvajaju na temelju njihove molekularne mase. Denaturirajuće uvjete stvara deterdžent natrij dodecil sulfat. Kako bi uspješno razdvojila proteine, potrebne su dvije vrste gela, 9%-tni sabijajući i 10%-tni razdvajajući gel (Tablica 1). Gelove sam napravila prema

sastavu vidljivom na tablici 1. Prvo sam izlila gel za razdvajanje i na njegovu površinu dodala izopropanol. Nakon 30-45 minuta gel se polimerizirao, izopropanol sam izlila i isprala površinu gela s dH₂O. Potom sam izlila gel za sabijanje, a nakon što se gel djelomično polimerizirao, na površinu sam umetnula češljic za formiranje jažica. Polimerizirane gelove (nakon otprilike 45 minuta) sam isprala s dH₂O. Nakon pripreme, gelove sam prenijela u kadicu za elektroforezu koju sam ispunila s puferom za elektroforezu. 50 µg proteina (prethodno izračunate koncentracije proteina u uzorcima) sam pomiješala s puferom za nanošenje uzoraka (4×LB). Uzorke sam zagrijala na 95 °C kroz 5 minuta i centrifugirala, te sam ih nanijela u jažice gelova, s tim da sam u prvu jažicu stavila standard koji služi za analizu jer pomoću njega određujemo molekularne mase ostalih proteina. Kadnicu s puferom i gelom potrebno je priključiti na aparat za elektroforezu s tim da je prvih 30 minuta napon 90 V, a nakon toga napon postavljamo na 110 V, sve dok se proteini ne rasporede po gelu.

Tablica 1. Sastojci gela za elektroforezu.

| <i>Sastojci</i> | 9%-tni gel (sabijajući); | 10%-tni gel (razdvajajući) |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>30%-tna, matična otopina akrilamida</i> | 3 mL | 3,3 mL |
| <i>reH₂O</i> | 4,3 mL | 4,0 mL |
| <i>1 M Tris (pH=6,8)</i> | 2,5 mL | n/a |
| <i>1,5 M Tris (pH=8,8)</i> | n/a | 2,5 mL |
| <i>10%-tni SDS</i> | 0,1 mL | 0,1 mL |
| <i>10%-tni APS</i> | 0,1 mL | 0,1 mL |
| <i>TEMED</i> | 0,005 mL | 0,004 mL |

3.2.7.4. Nitrocelulozna membrana

Gel sam, nakon završene elektroforeze, prebacila u sustav za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Sustav tzv. western sendvič, sastoji se od kazete koja cijeli sustav učvršćuje, dvije spužvice između kojih se sa svake strane nalaze dva filter papira, a između filter papira nalaze se gel i nitrocelulozna membrana. Sustav sam stavila u kadicu s puferom za prijenos (*engl. transfer buffer; TB*), ledom i magnetom za miješanje. Kadnicu sam zatim priključila na napon od 13 V, a ispod kadice sam postavila magnetnu miješalicu. Cijeli sustav sam ostavila preko noći kako bi se proteini prenijeli na nitroceluloznu membranu.

3.2.7.5. Specifična protutijela

Uspješnost prijenosa proteina provjerila sam uz pomoć naftol modrila. Nakon toga bilo je potrebno odbojati membranu, što sam učinila s otopinom za odbojavanje. Membranu sam potom blokirala s 5 %-tnom otopinom nemasnog mlijeka (w/v) u $1\times$ TBST puferu, membranu u kadici stavila sam na tresilicu (50-ak okretaja u minuti) 30-ak minuta. Nakon toga, membrane sam isprala u puferu TBST tri puta po deset minuta. Membrane su tada bile spremne za nanošenje protutijela. Protutijela β - aktin sam koristila za normalizaciju. Nanesena primarna protutijela sam inkubirala preko noći pri 4 °C. Sutra sam membrane opet ispirala s puferom TBST (3×10 min) i stavila sekundarna protutijela koja sam 1 sat inkubirala pri sobnoj temperaturi. Nakon 1 sat, membranu sam isprala u TBST-u i dodala otopinu za određivanje kemiluminiscencije. Kemiluminiscencija je rezultat reakcije reagensa ECL (*Western Lightning Plus – ECL; Enhanced Chemiluminescence Substrate; Ealham, MA, SAD*) s peroksidazom iz hrena kojom su obilježena sekundarna protutijela. Otopinu je bilo potrebno nanijeti na membranu i inkubirati minutu u mraku, a nakon toga, membrane sam pregledala i očitala uz pomoć uređaja za detekciju signala (*Alliance 4.7; Uvitec, Cambridge, London, UK*).

3.2.8. Metoda primjene inhibitora proteina PARP-1 i p53

Primjenom specifičnih inhibitora, PARP-1 inhibitor VIII (PJ34) i p53 inhibitora pifitrin- α , istraživala sam ulogu tih proteina u preživljenju stanica nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄. U kompletiranom mediju sam pripremila 5 μ M PARP-1 inhibitor VIII te 0,5 μ M otopinu inhibitora pifitrin- α . Stanice SH-SY5Y sam tretirala unutar mikrotitarske pločice s 96 jažica. Za svaku analizu imala sam četiri skupine uzoraka. Prva skupina je bila kontrola koju su činile stanice koje nisam tretirala ni s CuSO₄, ni s otopinom inhibitora. Drugu skupinu su činile stanice koje sam tretirala samo s inhibitor, dok su treću skupinu činile stanice koje sam tretirala samo s 0,5 mM CuSO₄. Četvrtu skupinu činile su stanice tretirane istovremeno s 5 μ M (PJ34) ili 0,5 μ M (pifitrin- α) inhibitorom i 0,5 mM CuSO₄, pri čemu je inhibitor dodan 30 minuta prije bakra. Tretirane stanice sam 24 sata inkubirala pri 37 °C. Rezultate sam vizualizirala i očitala uz pomoć metode MTT koju sam prethodno opisala.

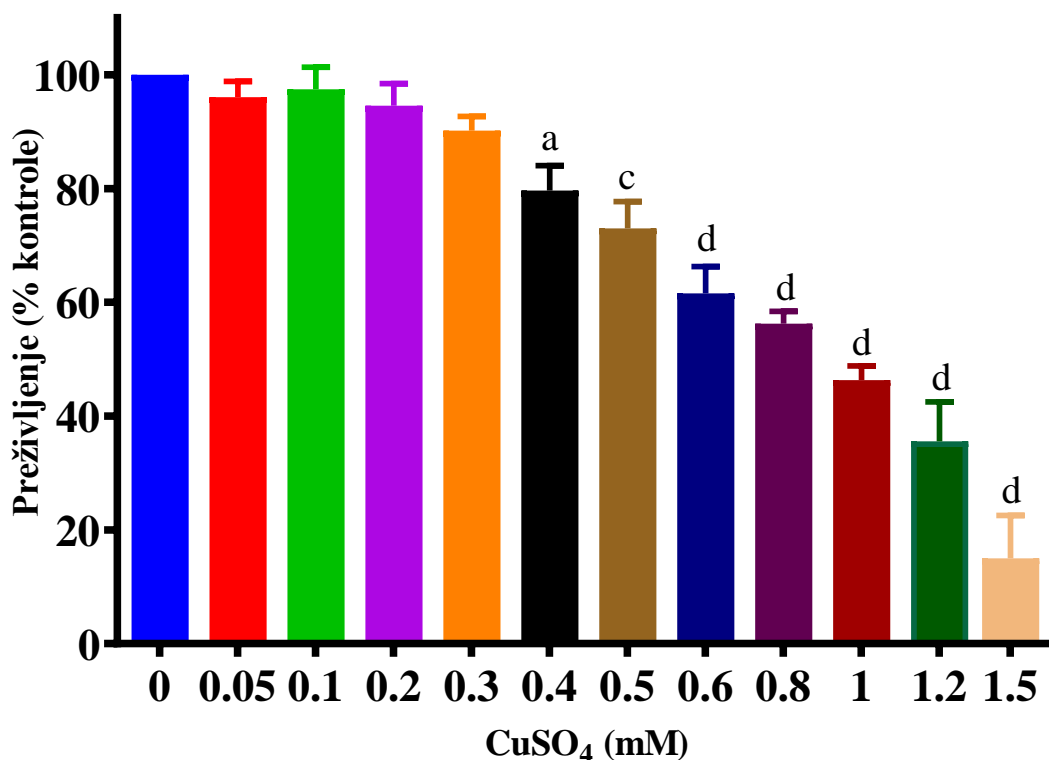
3.2.9. Statistika

Uz pomoć programa GraphPad Prism (San Diego, CA, SAD) sam većinu dobivenih rezultata statistički obradila i grafički prikazala. Prikazane vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost i njenu standardnu pogrešku. Za određivanje statističke značajnosti rezultata koristila sam jednosmjernu analizu varijance (ANOVA-e). Kod obrade podataka dobivenih usporedbom skupina s kontrolom koristila sam Dunnett-ov test višestruke usporedbe, a kod obrade podataka dobivenih usporedbom više skupina koristila sam Tukey-ov test višestruke usporedbe. Student t-test sam koristila kod određivanja statističke značajnosti razlike u mjerenjima dvije skupine uzoraka. Vrijednost $p < 0,05$, bila je granična vrijednost statistički značajnih razlika.

4. Rezultati

4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih bakrom

Stanicama SH-SY5Y koje su tretirane različitim koncentracijama CuSO_4 , od 0-1,5 mM, preživljenje sam odredila pomoću testa MTT. Prema dobivenim rezultatima (Slika 4), vidljivo je da bakar pri koncentraciji 0,4 mM uzrokuje statistički značajno smanjenje preživljenja stanica ($p < 0,05$, Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e). Preživljenje se smanjuje na $79,6 \pm 4,4$ % u odnosu na kontrolnu skupinu. Primjenom većih koncentracija, preživljenje se postepeno smanjuje, ali čak ni najveća korištena koncentracija od 1,5 mM CuSO_4 nije uzrokovala smrt svih stanica. Smanjenje preživljenja pri koncentraciji 1,5 mM CuSO_4 približno je 85 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Primjenom 0,5 mM CuSO_4 preživjelo je $73,0 \pm 4,7$ %, dok je primjenom 1 mM CuSO_4 preživljenje iznosilo $46,3 \pm 2,5$ %. U ovom istraživanju, kako bih istražila molekularne i stanične mehanizme povezane sa smrću stanica, uglavnom sam pratila učinke 0,5 mM CuSO_4 jer je ta koncentracija izazvala blago oštećenje i odumiranje stanica SH-SY5Y.

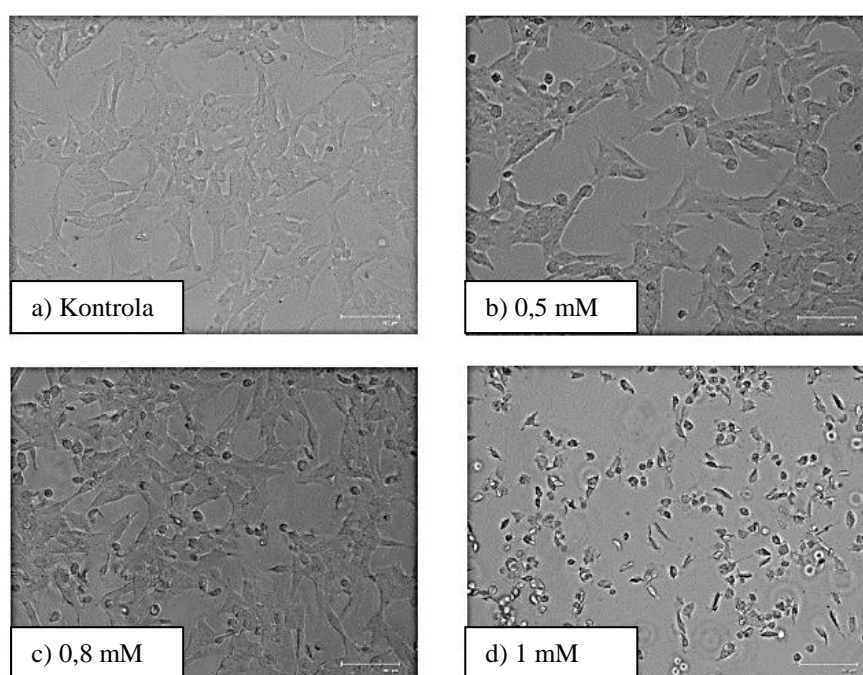


Slika 4. Preživljenje stanica SH-SY5Y nakon tretiranja raznim koncentracijama CuSO_4 . Na grafu su prikazani rezultati dobiveni nakon tretiranja stanica SH-SY5Y s CuSO_4 (0-1,5 mM) tijekom 24 sata. Preživljenje je određeno pomoću testa MTT. Dobiveni rezultati prikazuju srednju vrijednost i

njenu standardnu pogrešku četiri neovisna eksperimenta u odnosu na kontrolnu skupinu (0). Rezultati su obrađeni pomoću Dunnet-ovog testa višestruke usporedbe nakon primjene jednosmjerne ANOVA-e (značajnost: ^a $p < 0,005$, ^c $p < 0,001$, ^d $p < 0,0001$).

4.1.1. Morfološke promjene stanica SH-SY5Y nakon tretmana s CuSO₄

Morfološke promjene i intenzitet odumiranja stanica SH-SY5Y pratila sam uz pomoć mikroskopa (*EVOS Fluid Cell Imagig System*), a rezultati su prikazani na slici 5. U kontroli (Slika 5/a) vidljive su stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima. Stanice su razgranate i pričvršćene na površinu posude. Nakon tretiranja s 0,5 mM CuSO₄ (Slika 5/b) vidljivo je da stanice lagano odumiru i lagano se otpuštaju u medij. Primjenom većih koncentracija (Slika 5/c) dolazi do jačeg oštećenja stanica koje postaju izduženije i tanje. Primjenom 0,1 mM CuSO₄ vidljiva je vrlo izražena promjena (Slika 5/d) u odnosu na kontrolu. Malobrojne stanice koje su pričvršćene za podlogu su male i nerazgranate, dok je većina stanica zaokružena i pluta u mediju.



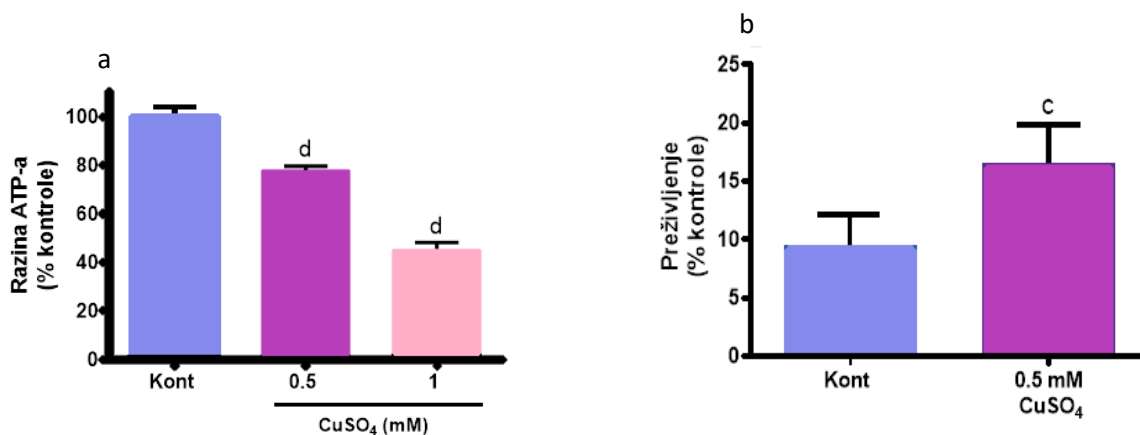
Slika 5. Morfološke promjene SH-SY5Y stanica nakon tretiranja s CuSO₄. Nakon tretiranja stanica slikala sam rezultat na mikroskopu (*EVOS Fluid Cell Imagig System*). Slika **a**) prikazuje kontrolnu skupinu stanica; Slika **b**) prikazuje stanice tretirane s 0,5 mM CuSO₄; Slika **c**) prikazuje stanice tretirane s 0,8 mM CuSO₄; Slika **d**) prikazuje stanice tretirane s 1 mM CuSO₄ (Slike dobivene pomoću *EVOS Fluid Cell Imagig System*).

4.1.2. Mjerenje razine ATP i bojenje tripanskim modrilom

Za dodatnu analizu preživljenja koristila sam odabrane koncentracije, 0,5 mM i 1 mM CuSO₄. Preživljenje sam analizirala metodom koja se temelji na mjerenju razine ATP-a uz pomoć kompleta CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega) (Slika 6/a) i tripanskim modrilom (Slika 6/b).

Povišene koncentracije bakra smanjuju unutarstanične zalihe ATP-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, ovisno o primijenjenoj koncentraciji. Unutarstanični ATP nakon izlaganja 0,5 mM CuSO₄ smanjio se na 78 % vrijednosti izmjerene u kontrolnim stanicama, dok je nakon izlaganja 1 mM CuSO₄ razina ATP-a iznosila 45 % vrijednosti izmjerene u kontrolnim stanicama ($p < 0,0001$, Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

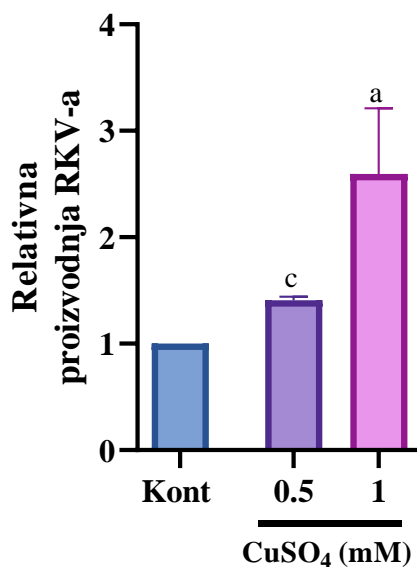
Tripansko modriilo je specifično po tome što boja ulazi isključivo u mrtve stanice s oštećenom membranom i tako pridonosi u razlikovanju citotoksičnog i antiproliferacijskog učinka bakra na stanice. Nakon tripsiniziranja i centrifugiranja u kontrolnoj skupini sam izbrojala 9,6±0,9 % plavo obojenih, odnosno, mrtvih stanica. Kod stanica izloženih 0,5 mM CuSO₄, udio mrtvih stanica bio je značajno veći iznosio je 16,5±1,1 % ($p < 0,001$, Student t – test)



Slika 7. Mjerenje preživljenja stanica SH-SY5Y primjenom tripanskog modrila i mjerenjem ATP-a. Slika 6/a) stanicama nakon tretmana s CuSO₄ (0,5 mM i 1 mM) odredila sam razinu unutarstaničnog ATP-a. Rezultate sam dobila iz dva neovisna pokusa provedena u triplikatu ($p < 0,0001$, Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e). Slika 6/b) Uz pomoć tripanskog modrila utvrdila sam da primjenom 0,5 mM CuSO₄ dolazi do povećanja udjela mrtvih stanica, u odnosu na kontrolnu skupinu, a rezultate sam dobila iz pet neovisnih pokusa provedenih u duplikatu ($p < 0,001$, Student t -test).

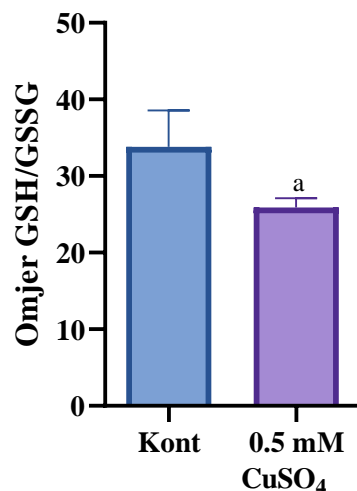
4.2 Određivanje nastanka reaktivnih radikala

Analizirala sam učinak 0,5 i 1 mM CuSO₄ na stvaranje i nakupljanje RKV-a koji imaju značajnu ulogu u razvoju OS-a i patoloških stanja povezanih s neurodegeneracijom. Flourescentnom metodom koja koristi 2',7' - diklorofluorescin diacetat utvrdila sam da izlaganje stanica SH-SY5Y CuSO₄ tijekom 24 sata povećava unutarstaničnu proizvodnju slobodnih radikala (Slika 7). Tretiranje s 0,5 mM CuSO₄ povećalo je proizvodnju slobodnih radikala za 41 % u odnosu na kontrolnu skupinu (41,0±2 %), dok je tretiranje stanica s 1 mM CuSO₄ povećalo je razinu slobodnih radikala za 160 % (159,7±31 %) u odnosu na kontrolnu skupinu



Slika 7. Analiza proizvodnje RKV-a primjenom 0,5 mM i 1 mM CuSO₄ u stanicama SH-SY5Y uz pomoć fluorescentne metode koja koristi 2',7' - diklorofluorescin diacetat. Tijekom 24 sata stanice SH-SY5Y su izlagane različitim koncentracijama bakra što je uzrokovalo povećanje unutarstanične proizvodnje RKV-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku četiri neovisna pokusa provedena u kvadripletu (^a $p < 0,05$, ^c $p < 0,001$; Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

Unutarstanični omjer reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) glutationa koristi se kao dodatni parametar za određivanje nastanka reaktivnih radikala i stanja OS-a, a odredila sam ga uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta (*GSH/GSSG-Glo Assay; Promega*). Nakon tretiranja stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO₄ omjer GSH/GSSH se smanjio s 33,8 na 25,9 (Slika 8) što predstavlja smanjenje od 23,4 % ($p < 0,05$, Student *t*-test).

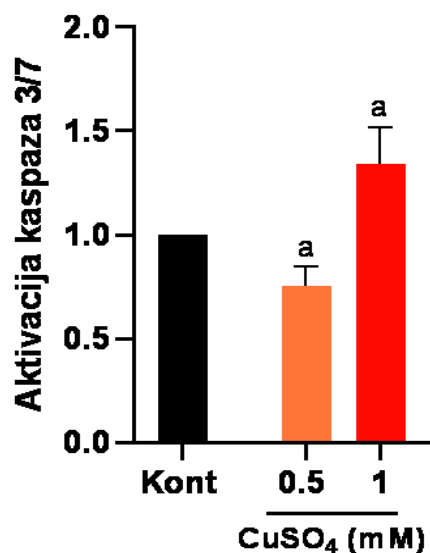


Slika 8. Omjer GSH/GSSH nakon primjene 0,5 mM CuSO₄ u stanicama SH-SY5Y. Omjer GSH/GSSG sam odredila pomoću komercijalnog kompleta (*GSH/GSSG-Glo Assay; Promega*) nakon tretmana stanica s 0,5 mM CuSO₄. Bakar je uzrokovao smanjeni omjer GSH/GSSH. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku pet neovisnih pokusa provedena u triplikatu u odnosu na kontrolnu skupinu. (^a $p < 0,05$, Student t – test)

4.3. Djelovanje bakra na aktivaciju kaspaza i strukturu kromatina

Smrt stanice u uvjetima OS-a može se događati kroz proces apoptoze i/ili nekroze, ovisno o jačini oštećenja. Smrt apoptozom (programirana stanična smrt) može biti ovisna ili neovisna o aktivaciji proteaza kaspaza. Oba oblika apoptoze popraćena su strukturnim promjenama kromatina. Osnovna razlika nekroze i apoptoze je u održavanju stanične membrane. Kako bi razjasnila mehanizam stanične smrti uzrokovan djelovanjem bakra, analizirala sam aktivaciju izvršnih kaspaza 3 i 7, stupanj kondenzacije kromatina pomoću boje Hoechst 33342 i propusnost membrane stanica SH-SY5Y za propidij jodid.

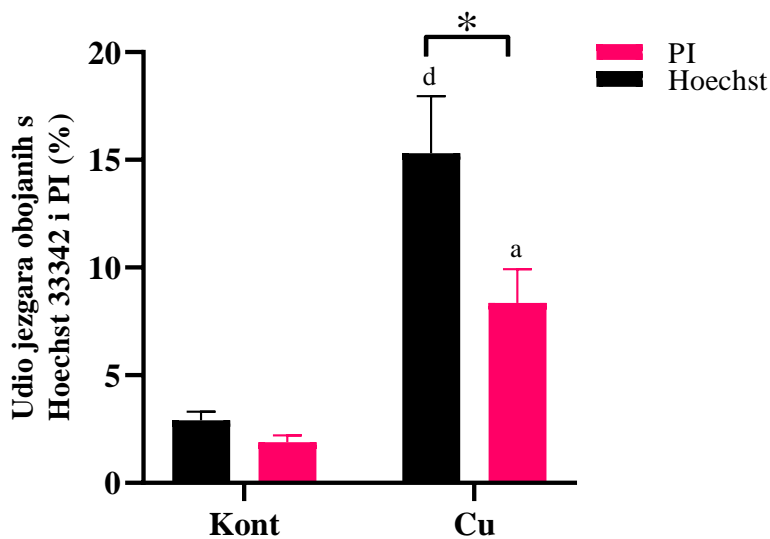
Djelovanje izvršnih kaspaza 3 i 7 odredila sam pomoću komercijalno dostupnog kompleta (*Caspase-Glo 3/7 Assay; Promega*). Nakon tretiranja stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO₄ (Slika 9) došlo je do laganog smanjenja aktivnosti kaspaza 3 i 7 na 76 % u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini, dok je nakon tretiranja s 1 mM CuSO₄ aktivnost kaspaza 3 i 7 bila lagano povišena za 34 % u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini.



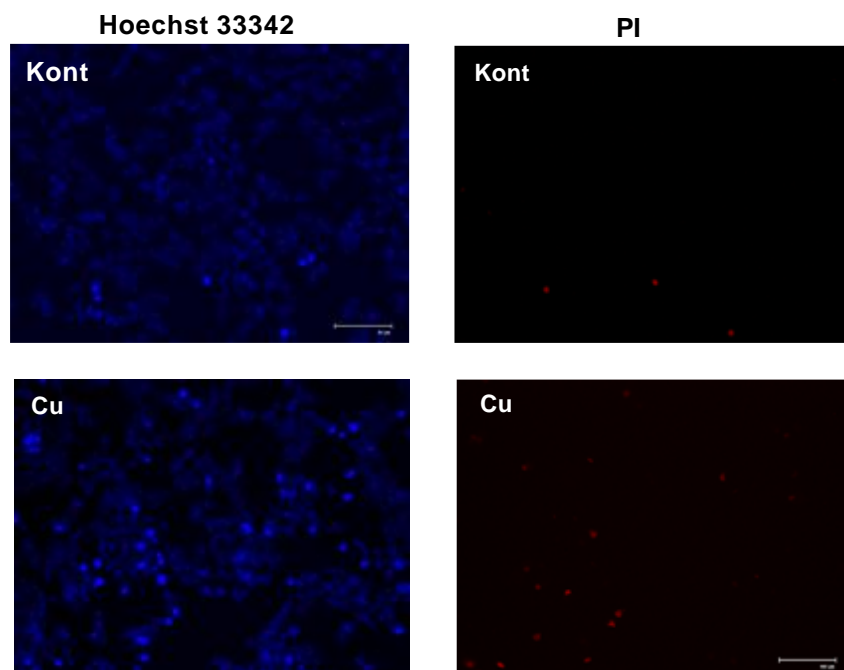
Slika 9. Aktivacija izvršnih kaspaza 3 i 7 nakon tretiranja stanica SH-SY5Y s CuSO₄. Pomoću komercijalnog kompleta (Caspase-Glo 3/7 Assay - Promega) analizirala sam aktivaciju kaspaza 3/7. Kod stanica SH-SY5Y tretiranih s 0,5 mM CuSO₄ aktivacija kaspaza bila je blago smanjena, a nakon tretiranja s 1 mM CuSO₄ povećana. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku iz 3 neovisna pokusa u duplikatu u usporedbi s kontrolnom skupinom (^a $p < 0,05$, Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

Strukturne promjene kromatina pratila sam pomoću fluorescentne boje Hoechst 33342 (Slika 10) koja je prolazi kroz staničnu membranu i veže se za DNK živih i mrtvih stanica, a pritom emitira plavo fluorescentno svjetlo. Nakon tretmana SH-SY5Y stanica s 0,5 mM CuSO₄ udio stanica koje su imale kondenzirani kromatin (plavo obojene) povećan je s 2,9 % na 15,3 % ($p < 0,0001$, Tukey-ev test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

Propidij jodid je boja koja ne može proći kroz staničnu membranu osim ako stanična membrana nije oštećena, tako da nam propidij jodid ukazuje na prisutnost posljednje faze apoptoze ili nekrozu. Nakon ulaska u jezgru, propidij jodid se veže za DNK i emitira crveno fluorescentno svjetlo. Nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄ (Slika 10) udio crveno obojenih stanica povećao se s 1,9 % na 8,4 % ($p < 0,05$, Tukey-ev test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).



Slika 10. Prikaz udjela stanica s strukturnim promjenama kromatina i oštećenjem stanične membrane. Stanice SH-SY5Y tretirane s 0,5 mM CuSO₄ bojila sam fluorescentnim bojama Hoechst 33342 i propidij jodidom. Tretman bakrom povećao je udio stanica sa strukturnim promjenama kromatina i broj stanica koje su u zadnjoj fazi apoptoze i/ili nekrozi. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku iz dva neovisna pokusa provedena u duplikatu u odnosu na kontrolnu skupinu (^a $p < 0,05$, ^d $p < 0,0001$, Tukey-ev test).

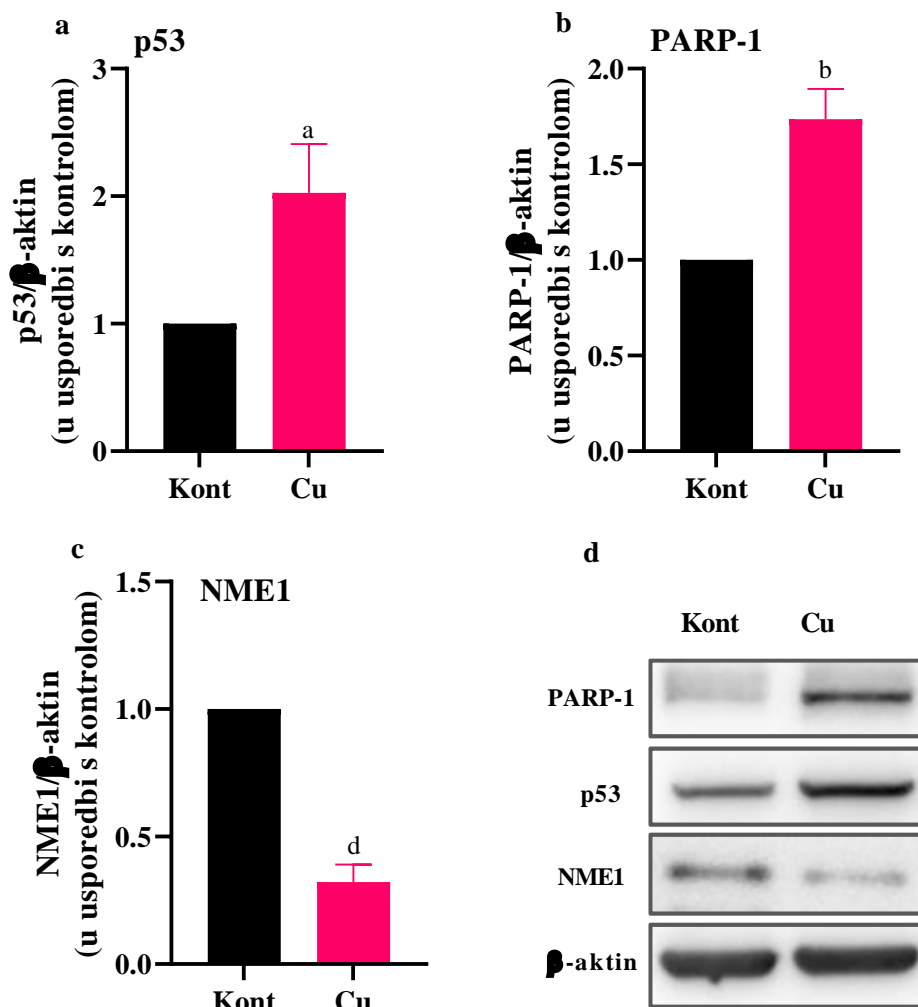


Slika 11. Prikaz fluorescencije nakon bojenja s Hoechst 33342 i propidij jodidom. Na slici je vidljivo citotoksično i proapoptotsko djelovanje bakra na stanice SH-SY5Y. U usporedbi s kontrolom,

vidljivo je povećanje broja plavo obojenih stanica nakon bojenja s Hoechst 33342 bojom i povećanje crveno obojenih stanica nakon obojenja s propidij jodidom.

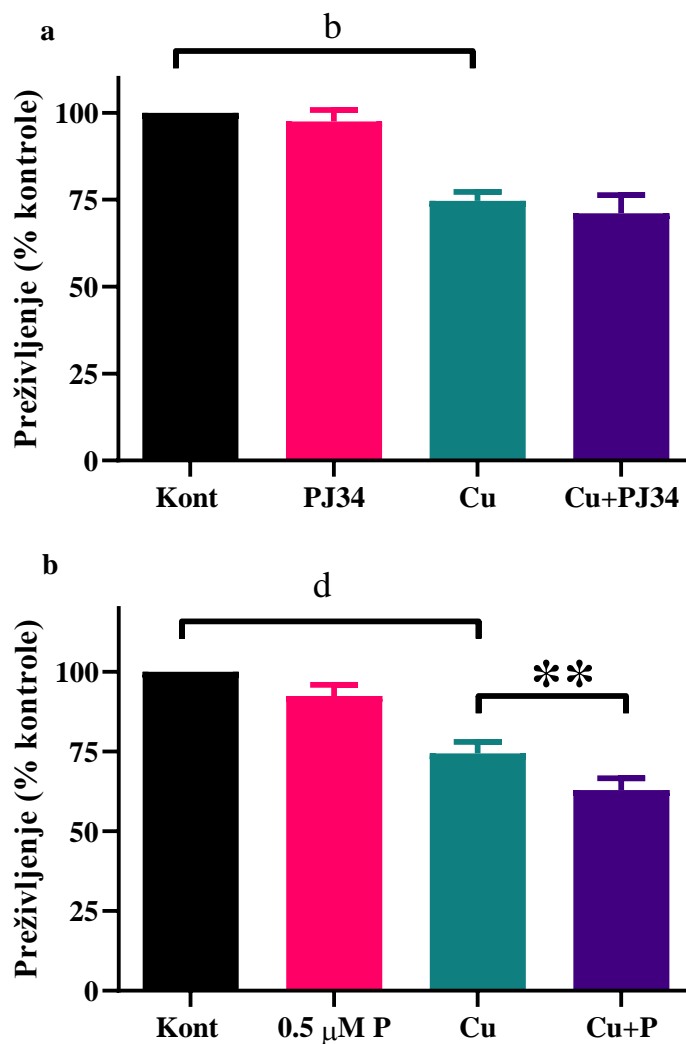
4.4. Uloga proteina PARP-1, p53 i NME1 nakon tretiranja SH-SY5Y stanica s CuSO₄

Westernskom metodom otiska sam analizirala ekspresiju proteina PARP-1, p53 i NME1 (Slika 12/c) kako bi razjasnila stanične procese povezane s neurotoksičnim učincima bakra. Enzim PARP-1 ima ulogu u popravku DNK oštećene OS-om. Transkripcijski faktor p53 također se aktivira pri oštećenju DNK, a ovisno o jačini oštećenja može pokrenuti transkripciju proteina uključenih u preživljavanje stanice ili proteina uključenih u staničnu smrt. NME1 je enzim (nukleozid-difosfat kinaza) koji isto tako ima ulogu u regulaciji transkripcije proteina i popravku DNK. Nakon tretiranja stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO₄ tijekom 24 sata, ekspresija PARP-1 (Slika 12/b) se povećala za 73,6 % (^b $p < 0,01$, Student t-test), p53 (Slika 12/a) za 102,7 % (^a $p < 0,05$, Student t-test), a ekspresija NME1 (Slika 12/c) se smanjila na 32,2 % (^d $p < 0,0001$, Student t-test) u odnosu na vrijednosti u fiziološkim uvjetima. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku nakon 5 neovisnih pokusa u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 12. Ekspresija proteina PARP-1, p53 i NME1 uz pomoć westernske metode otiska. Nakon tretmana stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO₄ analizirala sam ekspresiju navedenih proteina. Vidljivo je došlo do povećanja ekspresije proteina PARP-1 i p53, dok je kod NME1 došlo do smanjenja ekspresije. Na slici 12/d su prikazani reprezentativni rezultati westernske metode otiska i jakost signala na principu kemoluminiscencije nakon obilježavanja s primarnim i sekundarnim protutijelima. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku nakon 5 neovisnih pokusa (^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^d $p < 0,0001$, Student t-test)

Ulogu proteina PARP-1 i p53 analizirala sam i farmakološkim pristupom, tj. primjenom specifičnih inhibitora. PARP-1 inhibitor VIII (PJ34), inhibitor proteina PARP-1, u koncentraciji 5 μ M istovremeno primijenjen s 0,5 mM CuSO₄ nije promijenio jakost toksičnog učinka bakra (Slika 13/a). Pifitrin- α , inhibitor transkripcijske aktivnosti p53, u koncentraciji 0,5 μ M primijenjen istovremeno s 0,5 mM CuSO₄ pojačao je toksični učinak bakra (Slika 13/b). Smanjio je preživljenje sa 74,5 % na 62,9 % u odnosu na kontrolnu skupinu. ($p < 0,01$, Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e).

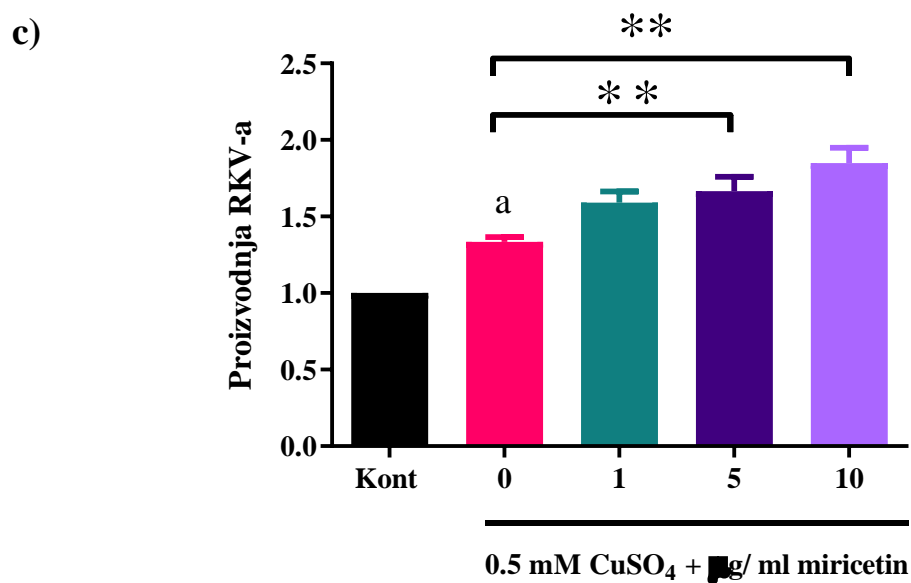
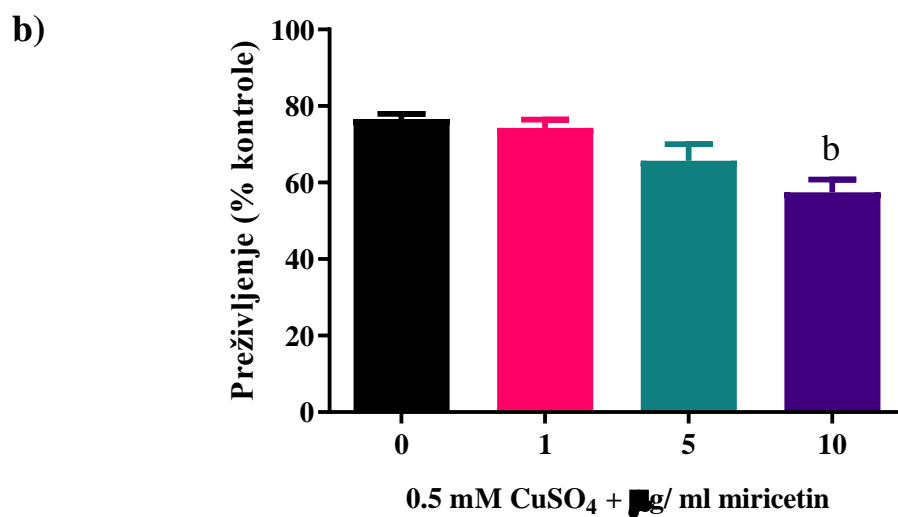
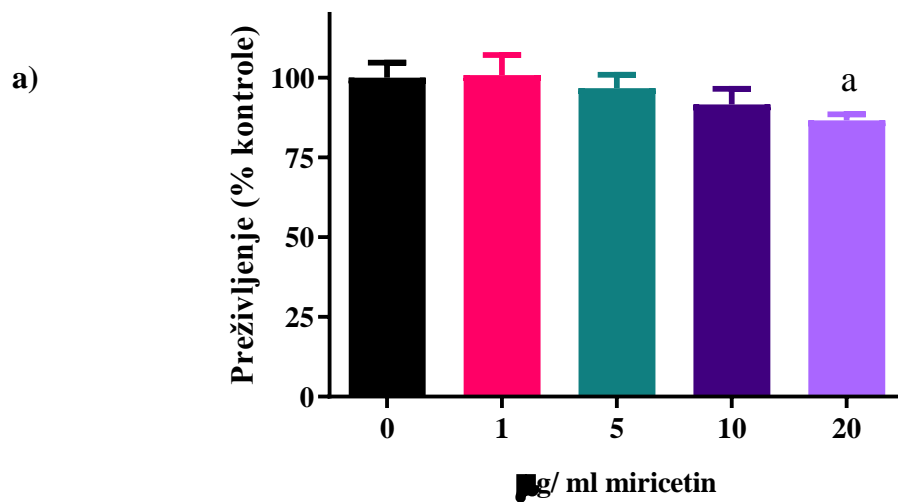


Slika 13. Učinak inhibitora PJ34 i pifitrin- α na neurotoksični učinak bakra. Stanice SH-SY5Y su istovremeno tretirane s 0,5 mM CuSO₄ i 5 μ M PARP inhibitorom VIII (PJ34) (Slika 13/a), odnosno s 0,5 μ M pifitrin- α (Slika 13/b). MTT metodom sam analizirala preživljenje stanica. Inhibitor PJ34 nije promijenio toksični učinak bakra na stanice, dok je pifitrin- α uzrokovao pojačanje toksičnog učinka bakra na stanice. Rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku iz 3 neovisna pokusa provedena u kvadriletu u odnosu na kontrolnu skupinu (^b $p < 0,01$, ^d $p < 0,0001$, ^{**} $p < 0,01$, Tukey-ev test nakon jednosmjerne ANOVA-e).

4.5. Utjecaj flavonoida miricetina na neurotoksični učinak bakra

Flavonoidi, skupina prirodnih spojeva, pretpostavlja se mogu smanjiti oksidacijsko oštećenje i smrt stanice u uvjetima OS-a. Iz tog razloga sam u svom istraživanju promatrala i učinak flavonoida miricetina na toksični učinak bakra. Prvo sam odredila krivulju doza-odgovor koja mi je pokazala da

miricetin u koncentraciji do 10 $\mu\text{g/mL}$ ne utječe na preživljenje stanica SH-SY5Y (Slika 14/a). Kod stanica koje su istovremeno tretirane bakrom i miricetinom, miricetin je u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ povećao toksično djelovanje bakra na stanice (Slika 14/b) tj. smanjio je preživljenje stanica sa 76,6 % na 57,5 % ($p < 0,01$, Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e). Kako antioksidansi u prisutnosti prijelaznih metala, kao što je bakar, mogu djelovati kao prooksidansi, analizirala sam utječe li miricetin na nakupljanje RKV-a kod stanica koje su istovremeno tretirane s 0,5 mM CuSO_4 (Slika 14/c). Pri najvišoj primjenjenom koncentraciji vidljivo je neurotoksično djelovanje miricetina u prisutnosti bakra, a koncentracija RKV-a se povećala s 33,4 % na 84,9 % u odnosu na stanice tretirane samo bakrom ($p < 0,001$, Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e).



Slika 14. Utjecaj miricetina na toksični učinak bakra. MTT metodom sam analizirala preživljenje stanica. Rezultati SH-SY5Y stanica tretiranih s 1-20 $\mu\text{g/mL}$ miricetina tijekom 24 sata prikazani su na slici 14/a. Miricetin u najvećoj koncentraciji od 20 $\mu\text{g/mL}$ uzrokovao je smanjenje preživljenja stanica. Na Slici 14/b su prikazani rezultati dobiveni nakon istovremene primjene miricetina i 0,5 mM CuSO_4 gdje je miricetin u najvećoj koncentraciji povećao toksični učinak bakra. Dobiveni rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku iz 4 neovisna pokusa u kvadripletu u odnosu na kontrolnu skupinu (^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e). Isto tako, miricetin u kombinaciji s bakrom povećao je proizvodnju RKV-a (Slika 14/c). Dobiveni rezultati prikazuju srednju vrijednost i standardnu pogrešku iz 5 neovisnih pokusa u kvadripletu u odnosu na skupinu stanica tretiranih samo s bakrom ($p < 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; Tukey-ov test nakon jednosmjerne ANOVA).

5. Rasprava

Niske vrijednosti reaktivnih vrsta imaju bitnu ulogu u neuronalnoj plastičnosti, međutim visoke razine RV-a dovode do oštećenja živčanih stanica što u konačnici rezultira smrću stanice (Kishida i Klann 2007; Di Meo i sur. 2016). Bakar je sastavni dio brojnih enzima koji sudjeluju u transferu elektrona. U mozgu, enzimi ovisni o bakru (npr. dopamin β -hidroksilaza, monoamin oksidaza) kataliziraju nastanak i metabolizam neurološki aktivnih tvari. Visoke vrijednosti bakra u mozgu čine ovaj prijelazni metal bitnim za živčani sustav (Arciello i sur. 2005). Poremećaji ravnoteže bakra doprinose razvoju OS-a koji se nalazi u pozadini brojnih oboljenja, uključujući i neurodegenerativne bolesti (Giampietro i sur., 2018).

Stanice SH-SY5Y su podlinija stanične linije SK-N-SH iz koje su nastale subkloniranjem tri puta. Stanice SH-SY5Y sastoje se od adherentnih i plutajućih stanica, od kojih su oba tipa vijabilna. Stanice se pojavljuju u obliku neuroblast-sličnih i epitel-sličnih stanica. Stanice se mogu difrencirati do neuron-sličnog fenotipa koji je okarakteriziran neuronalnim biljezima, a za to se najčešće koristi retinoična kiselina (Kovalevich i Langford, 2013). Međutim, različite su od zrelih neurona po tome što se mogu dijeliti, imaju drugačiju morfologiju, nedostaju neuron specifični biljezi, a neuron specifični proteini su prisutni u znatno manjim koncentracijama. Unatoč nedostacima, stanice SH-SY5Y koriste se kao uobičajeni model neurona za *in vivo* istraživanja raznih neurobioloških mehanizama, pa tako i istraživanja vezana uz odgovor živčanih stanica na oksidacijsko oštećenje (Agholme i sur. 2010; Sadžak i sur. 2021).

U svom radu koristeći različite koncentracije CuSO_4 za tretiranje stanica SH-SY5Y potakla sam nastanak OS-a. Primjenom sve većih koncentracija CuSO_4 , javio se trend pada preživljenja stanica. Pri primjeni 0,4 mM CuSO_4 , što odgovara koncentraciji bakra nađenoj u amiloidnim plakovima ljudi oboljelih od Alzheimerove bolesti (Hordyjewska i sur. 2014), dolazi do značajnog odumiranja stanica. U svrhu ovog istraživanja, za tretiranje stanica SH-SY5Y, odabrala sam 0,5 mM i 1 mM koncentracije CuSO_4 . Preživljenje sam provjerila i mjerenjem staničnog ATP-a. Prijenosom elektrona unutar mitohondrija, stvara se energija u obliku molekule ATP. Tretiranjem stanica SH-SY5Y s 0,5 i 1 mM CuSO_4 potiče se stvaranje oksidacijskog oštećenja. Oštećenjem stanične membrane, uzrokovanim oksidacijskim oštećenjem, stanice gube sposobnost stvaranja ATP molekula, a prethodno stvoreni ATP brzo razgrade stanične ATP-aze iz citoplazme (Riss i sur 2013). Tako da bakar, iako nema direktan učinak na mitohondrije, stvaranjem RKV-a ometa funkciju mitohondrija što u konačnici dovodi do smanjenja stvaranja molekula ATP-a (Jazvinščak Jembrek i sur., 2014). Dobiveni rezultati koji prikazuju smanjenje molekula ATP-a, također potvrđuju navedene tvrdnje. Još jedna metoda kojom

sam određivala preživljenje nakon tretmana s CuSO_4 je bojenje tripanskim modrilom. Tripansko modriilo, zahvaljujući svom svojstvu da ulazi isključivo u mrtve stanice s oštećenom membranom, omogućilo je prebrojavanje udjela mrtvih stanica nakon tretmana s bakrovim ionima (Strober, 2001). Dobiveni rezultati još jednom su potvrdili da bakar smanjuje preživljenje stanica. No, kako je udio mrtvih stanica određen tripanskim modrilom bio manji od izračunatog smanjenja preživljenja metodom MTT, čini se da bakar ne djeluje na stanice SH-SY5Y isključivo citotoksično, nego i antiproliferacijski.

Očekivano, razvojem OS-a, dolazi do povećanja razine RKV-a u stanicama. Poremećaj staničnog disanja, koji je jedan od glavnih izvora RKV-a, sekundarno uzrokovan bakrom dovodi do stvaranja radikala visokog afiniteta koji oštećuju biomolekule. Brojna istraživanja potvrđuju da OS potaknut nakupljanjem bakrovih iona sudjeluje u nastanku i progresiji raznih neurodegenerativnih bolesti (Hordyjewska i sur, 2014; Zubčić i sur. 2020; Sadžak i sur. 2021).

Pri visokim vrijednostima unutarstaničnih reducensa, bakar se reducira u Cu^+ koji se veže s GSH i s njim pravi kompleks Cu-GSH. Na taj način sprječava se da ioni bakra uzrokuju oksidacijsko oštećenje, ali kompleks Cu-GSH može reducirati molekularni kisik, pri čemu nastaje superoksid anion. Stoga, toksičnost bakra proizlazi iz činjenice da bakar pojačava stvaranje RKV-a unutar stanice (Sadžak i sur. 2021). Neurotoksični učinak bakra, također je opisan u radu Zubčić i sur. 2020, gdje su naveli da narušavanje homeostaze bakra u organizmu dovodi do promjene prijenosa signala duž redoks-osjetljivih signalnih puteva unutar stanice, što je također karakteristika procesa nastanka neurodegeneracije. Svojim istraživanjem još jednom sam potvrdila da bakrovi ionu uistinu uzrokuju povećanje nakupljanja RKV-a i da je stanje OS-a povezano s odumiranjem stanica. Osim povišene razine RKV-a, i unutar stanični omjer GSH/GSSG u stanicama tretiranih s CuSO_4 potvrdio je da izlaganje stanica visokim koncentracijama bakra, u ovom slučaju 0,5 i 1 mM CuSO_4 , dovodi do povećanja RKV-a i stanja OS-a. Bakar iscrpljuje unutarstanični GSH. Dio Cu iona oksidira GSH u GSSH, a dio Cu iona tvori komplekse s GSH (Cu-GSH). Iscrpljenje GSH može dovesti do narušavanja redoks ravnoteže i funkcije staničnih proteina, što također može pojačati toksični učinak bakra.

OS, osim što oštećuje biološke molekule, može dovesti i do programirane stanične smrti tj. apoptoze. Ioni bakra dovode do smrti stanica uglavnom preko aktivacije apoptoze (Hasegawa i sur. 1992). Preko brojnih posrednika, aktivatori stanične smrti dovode do kaskade proteaza kaspaza koje razgrađuju stanične dijelove i proteine, te pokreću razne procese unutar stanice (Bredesen i sur. 2006). Istraživana stanična smrt, uzrokovana suviškom bakrovih iona, u raznim istraživanjima ukazuje da stanična smrt uvelike ovisi o koncentraciji iona bakra, vremenu tretiranja i staničnom modelu (Liu i sur. 2020; Kumar 2006). Smrt može nastati apoptozom ovisnom o kaspazama, apoptozom neovisnom o kaspazama, autofagijom i nekrozom (Kroemer i Martin 2005). Kod nekih istraživanja, bakar je pokrenuo staničnu smrt uzrokovanu kaspazama (Radovanović i sur. 2019; Trejo-Solis i sur. 2012), međutim u mom istraživanju, stanice SH-SY5Y nakon tretmana s bakrom nisu pokazale izražene promjene aktivnosti kaspaza-3 i 7. Tretiranjem stanica s 0,5 mM CuSO_4 došlo je do blagog smanjenja aktivnosti

kaspaza, a primjenom 1 mM CuSO₄ došlo je do blagog povećanja aktivnosti. S obzirom na blage promjene aktivnosti kaspaza 3 i 7 nakon tretmana s 0,5 mM i 1 mM CuSO₄, čini se da apoptoza ovisna o kaspazama nije primarni proces smrti stanice, budući da se kod ovog oblika stanične smrti njihova aktivnost poveća nekoliko puta. Kroemer i sur. (2005) su utvrdili da djelovanjem inhibitora kaspaza, i dalje dolazi do aktivacije apoptoze, što je značilo da osim kaspaznom aktivnošću, do apoptoze može doći i nekim drugim staničnim procesima. Neki od poznatih puteva su apoptoza-slična smrt kod koje ne dolazi do kondenzacije kromatina, loma DNK, prisutnosti fragmenata DNK i apoptotskih tijela; smrt uzrokovana autofagijom kod koje dolazi do nakupljanja autofagnih mjehurića; i nekroza kod koje dolazi do bujanja citoplazmatskih organela. Prema Loh i sur. (2006), kondenzacija kromatina jedno je od karakterističnih svojstava apoptoze. Strukturne promjene kromatina i broj apoptotskih stanica nakon tretiranja s CuSO₄, analizirala sam bojenjem s Hoechst 33342 i PI. Dobiveni rezultati potvrdili su povećani broj stanica s kondenziranim kromatinom (apoptotske stanice), kao i povećan broj nekrotičnih stanica. Bojenjem tretiranih stanica s PI i usporedbom s rezultatima bojenja pomoću boje Hoechst 33342, utvrdila sam postojanje većeg udjela stanica s strukturnim promjenama kromatina nego stanica s uništenom staničnom membranom. To pokazuje da je kod većeg dijela stanica do smrti došlo uslijed pokretanja apoptoze neovisne o kaspazama, a kod manjeg dijela stanica vjerojatno je došlo do snažnog oksidacijskog oštećenja i odumiranja nekrozom.

Tijekom odgovora stanice na OS dolazi do aktivacije određenih proteina koji imaju značajnu ulogu u popravku oksidacijskih oštećenja i aktivaciji staničnih procesa koji su uključeni u preživljenje ili smrt stanice. DNK oštećenje aktivira kaskadne reakcije popravka DNK. PARP-1 je protein senzor DNK oštećenja koji pokreće i propagira DNK popravak preko poli-ADP-ribosilacije ključnih DNK proteina odgovornih za popravak. Osim popravka DNK, PARP-1 ima ulogu u raznim patološkim procesima povezanim sa starenjem (Dluzen i sur. 2017). Pri velikim oštećenjima DNK, PARP-1 ne može popraviti DNK, iz tog razloga pokreće se nekroza (Dong i sur. 2020). Promatranjem ekspresije PARP-1 utvrdila sam povećanje za 73,6 %, što je dokaz njegove aktivacije nakon primjene iona bakra i izazivanja OS-a. Tumor supresor protein p53 ima ključnu ulogu u zaustavljanju staničnih ciklusa, apoptozi, starenju i diferencijaciji kao odgovor na razne genotoksične i stanične stresove, uključujući OS. Protein p53 ima različite uloge ovisne o razini OS-a. Ukoliko je razina OS-a niska, p53 ima anti-oksidacijsku ulogu koja promiče preživljenje stanica. Pri visokoj razini OS, p53 ima prooksidacijsku ulogu zahvaljujući kojoj pokreće apoptozu stanice (Liu i Xu 2011). Praćenjem ekspresije proteina p53, vidljiv je njegov porast, što upućuje na to da je p53 uključen u odgovor stanica na oštećenje. Saleh i sur. (2017) utvrdili su pojačanu osjetljivost limfocita pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti na OS, što je rezultiralo staničnom smrću nekrozom i apoptozom, a imali su povišene razine PARP-1 i p53 mRNA. Koristeći inhibitore PARP-1 (PARP-1 inhibitor VIII – PJ34) i p53 (pifitrin- α) pobliže sam analizirala ulogu ovih proteina. Primjena PJ34 nije dovela do promjene toksičnog učinka bakra, ali sam primjenom pifitrin- α uočila porast toksičnosti bakra. To upućuje na zaključak da

PARP-1, iako aktiviran, nema ključnu ulogu u procesima vezanim uz smrt stanica, odnosno da protein p53 ima protektivnu ulogu u stanju bakrom-izavaganog OS-a u našim uvjetima, što i je u skladu s prethodno objašnjenom antioksidacijskom i protektivnom ulogom p53 u uvjetima blagog OS-a. NME1 je nukleozid-difosfat kinaza te ima ulogu u kontroli unutarstanične nukleotidne homeostaze na način da pokreće prijenos fosfatne skupine s nukleozid trifosfata, uglavnom ATP-a, na nukleozid difosfate (Yi i sur. 2021). Ekspresija NME1 u stanicama tretiranim s ionima bakra smanjila se na 32,2 % u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini, mogući uzrok toga je smanjenje unutarstanične razine ATP-a zbog nakupljanja RKV-a.

Smatra se da bi flavonoidi, pa tako i miricetin, zahvaljujući svojim opisanim antioksidacijskim svojstvima, mogli smanjiti nakupljanje RKV-a i djelovati neuroprotektivno. Poznato je da flavonoidi mogu direktno neutralizirati slobodne radikale, kelirati metalne ione i modulirati prijenos signala unutar redoks-osjetljivih signalnih puteva (Kumar i Pandey 2013). U koncentracijama do 10 µg/mL, miricetin primijenjen samostalno nije značajno utjecao na preživljenje stanica SH-SY5Y. Međutim, poznato je da u prisutnosti prijelaznih metala, neki flavonoidi, posebice iz skupine flavonola, mogu djelovati kao prooksidansi (Sahu i Gray 1993). Tretiranje stanica SH-SY5Y istovremeno s bakrom i miricetinom dovelo je do daljnjeg smanjenja preživljenja stanica SH-SY5Y tj. povećalo je toksični učinak bakra, i povećanog stvaranja RKV-a, što upućuje na to da je upravo prooksidacijsko djelovanje važno za njegovo citotoksično djelovanje u prisutnosti bakra u našim uvjetima. Prema tome, dobiveni rezultati pokazuju da je potreban oprez ako bi se razmatrala potencijalna primjena miricetina, i nekih drugih flavonoida, u prevenciji i liječenju patoloških promjena povezanih s OS-om.

6. Zaključci

Na temelju rezultata ovog istraživanja, zaključujem da u staničnoj kulturi neuroblastoma SH-SY5Y nakon tretmana s CuSO_4 :

- Pri koncentracijama većim od 0,4 mM CuSO_4 dovodi do značajnog smanjenja preživljenja stanica
- Dolazi do povećanja stvaranja RKV-a i smanjenja razine glutationa koji su indikatori OS-a
- Stanična smrt je aktivirana apoptotskim putem koji nije ovisan o kaspazama
- Osim apoptozom neovisnom o aktivaciji kaspaza, dio stanica odumire nekrozom
- Protein p53 ima značajnu, protektivnu ulogu u stanju OS-a
- Flavonoid miricetin pojačava toksični učinak bakra

7. Literatura

- Abramov A.Y., Berezhnov A. V., Fedotova E.I., Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. (2017): Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders. *Biochemical Society Transactions* 45: 1025–1033.
- Abramov A.Y., Potapova E. V., Dremin V. V., Dunaev A. V. (2020): Interaction of oxidative stress and misfolded proteins in the mechanism of neurodegeneration. *Life* 10: 1–14.
- Agholme L., Lindström T., Kågedal K., Marcusson J., Hallbeck M. (2010): An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease* 20(4): 1069-1082.
- Arciello M., Rotilio G., Rossi L. (2005): Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327: 454–459.
- Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A. (1973): Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research* 33: 2643– 2652.
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. (2006): Cell death in the nervous system. *Nature* 443(7113):796-802.
- Chi H., Chang H., Sang T. (2018): Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences* 19(10): 3082.
- Cobley J.N., Fiorello M.L., Bailey D.M. (2018): 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. *Redox Biology* 15: 490–503.
- Cordeiro R.M. (2014): Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochimica et biophysica acta* 1838: 438–444.
- Dajas, F., Andrés, A. C., Florencia, A., Carolina, E., & Felicia, R. M. (2013). Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 13(1): 30–35.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016: 1245049.
- Dluzen D.F., Kim Y., Bastian P., Zhang Y., Lehrmann E., Becker K.G., Hooten N.N., Evans M.K. (2017): MicroRNAs Modulate Oxidative Stress in Hypertension through PARP-1 Regulation. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017: 3984280.

- Dong, K.; Yan, Y.; Lu, L.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, M.; Ding, J. PJ34 protects photoreceptors from cell death by inhibiting PARP-1 induced parthanatos after experimental retinal detachment. *Current Eye Research* 15: 1-7.
- Falkowski P.G., Godfrey L. V. (2008): Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 2705–2716.
- Fritz K.S., Petersen D.R. (2013): An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 59: 85–91.
- Gaetke L.M., Chow C.K. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147–163.
- Gaetke L.M., Chow-Johnson H.S., Chow C.K. (2014): Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology* 88: 1929–1938.
- 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. *Molecular Pharmaceutics* 15(3): 808-820
- Gu Y, Dee CM, and Shen J (2011) Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 3:1216–1231.
- Harris E.D. (1993): Transport of Copper. *Progress in clinical and biological research* 380: 163-79. PMID: 8456124.
- Hasegawa, M., Asai, S. (1992): Effects of static magnetic field on undercooling of a copper melt. *Journal of Materials Science* 27:6123–6126.
- Hongmei Z., Vogt C. (2012): Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. *Apoptosis and Medicine* 3– 22.
- Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J. (2014): The many “faces” of copper in medicine and treatment. *BioMetals* 27: 611–621.
- Hwang I. W. i Chung S. K. (2018): Isolation and Identification of Myricitrin, an Antioxidant Flavonoid, from Daebong Persimmon Peel. *Preventive Nutrition and Food Science* 23(4): 341-346.
- Jacob R.A., Skala J.H., Omaye S.T., Turnlund J.R. (1987): Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men. *Journal of Nutrition* 117: 2109–2115.
- Jazvinščak Jembrek M., Vlainić J., Radovanović V., Erhardt J., Oršolic 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.
- Joshi S., Guleria R., Pan J., DiPette D., Singh U.S. (2006): Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 25: 240–247.

- Kawakami M., Inagawa R., Hosokawa T., Saito T., Kurasaki M. (2008): Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2157-2164.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology* 24(4): 325–340.
- Kipps C.M., Duggins A.J., Mahant N., Gomes L., Ashburner J., McCusker E.A. (2005): Progression of structural neuropathology in preclinical Huntington’s disease: A tensor based morphometry study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 76: 650–655.
- Kishida, K. T., & Klann, E. (2007). Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling* 9(2): 233–244.
- Klein J.A., Ackerman S.L. (2003): Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* 111: 785–793.
- Kovalevich J., Langford D. (2013): Chapter 2 Considerations for the Use of SH - SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in molecular biology* 1078, 9–21.
- Kroemer G., Martin S.J. (2005): Caspase-independent cell death. *Nature medicine* vol. 11(7): 725-30.
- Krötz F., Sohn H.Y., Pohl U. (2004): Reactive oxygen species: Players in the platelet game. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1988–1996.
- Kumar S. (2007): Caspase function in programmed cell death. *Cell death and differentiation* 14(1) 32-43.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013: 162750.
- Liu D., Xu Y. (2011): p53, Oxidative Stress, and Aging. *Antioxidants & redox signaling* vol. 15(6): 1669-78.
- Liu T., Zhong S., Liao X., Chen J., He T., Lai S. (2015): A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One*: 10(10):e0138904.
- Loh K.P., Huang S.H., Silva R. De, Tan B.K.H., Zhu Y.Z. (2006): Oxidative Stress : Apoptosis in Neuronal Injury. *Current Alzheimer research* 3(4): 327-37.
- Luza, S C, and H C Speisky. “Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity.” *The American journal of clinical nutrition* 63(5): 812S-20S.
- Manto M. (2014): Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration. *Toxics* 2, no. 2: 327-345.
- Mattie M.D., Freedman J.H. (2001): Protective effects of aspirin and vitamin E (α -tocopherol) against copper-and cadmium-induced toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285: 921–925.
- Niedzielska E., Smaga I., Gawlik M., Moniczewski A., Stankowicz P., Pera J., Filip M. (2016): Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 53: 4094–4125.
- Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 5: E47.

- Paris I., Perez-Pastene C., Couve E., Caviedes P., Ledoux S., Segura-Aguilar J. (2009): Copper-dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry* 284: 13306-13315.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Review Article Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017: 8416763..
- Prohaska J.R., Gybina A. a (2004): Recent Advances in Nutritional Sciences Intracellular Copper Transport in Mammals 1,2. *Journal of Nutrition* 134: 1003–1006.
- Radovanović, V.; Vlainić, J.; Hanžić, N.; Ukić, P.; Oršolić, N.; Baranović, G., Jazvinščak Jembrek, M. 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* 2019, 11(5): 273
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
- Rizvi S.H.M., Parveen A., Verma A.K., Ahmad I., Arshad M., Mahdi A.A. (2014): Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. *PloS one* vol. 9(5): e98409.
- Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-morte D., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. (2018): Oxidative stress , aging , and diseases. *Clinical interventions in aging* 13: 757-772.
- 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* (Basel, Switzerland) vol. 26(4) 845.
- Sahu S. C., Gray G. C. (1993): Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Letters* 70(1-2): 73-79
- Salech, F.; Ponce, D. P.; SanMartín, C. D.; Rogers, N. K.; Chacón, C.; Henríquez, M.; Behrens, M. I. PARP-1 and p53 regulate the increased susceptibility to oxidative death of lymphocytes from MCI and AD patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017, 9:310.
- Saporito-Magriñá C.M., Musacco-Sebio R.N., Andrieux G., Kook L., Orrego M.T., Tuttolomondo M.V., Desimone M.F., Boerries M., Borner C., Repetto M.G. (2018): Copper-induced cell death and the protective role of glutathione: The implication of impaired protein folding rather than oxidative stress. *Metallomics* 10: 1743–1754.
- Scheiber I.F., Mercer J.F.B., Dringen R. (2014): Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology* 116: 33–57.

- Semwal, D.K.; Semwal, R.B. Combrinck, S.; Viljoen, A. (2016): Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*, 8, 90
- Sheline C.T., Choi E.H., Kim-Han J.S., Dugan L.L. Choi D.W. (2002): Cofactors of mitochondrial enzymes attenuate copper-induced death in vitro and in vivo. *Annals of Neurology* 52: 195-204.
- Stadtman E.R. (2006): Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928: 22-38.
- Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Appendix 3.
- Tardito S., Bassanetti I., Bingardi C., Elviri L., Tegoni M., Mucchino C. i sur. (2011): Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells. *Journal of the American Chemical Society* 133: 6235-6242
- Trejo-Solís, C.; Jimenez-Farfan, D.; Rodriguez-Enriquez, S.; Fernandez-Valverde, F.; Cruz-Salgado, A.; Ruiz-Azuara, L.; Sotelo, J. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* 12:156.
- Trumbore C.N., Ehrlich R.S., Myers Y.N. (2001): Changes in DNA conformation induced by gamma irradiation in the presence of copper. *Radiation Research* 155: 453–465.
- Turnlund J.R. (1998): Turnlund, J R. “Human whole-body copper metabolism. *The American journal of clinical nutrition* 67(5): 960S-964S.
- Turnlund J.R., Scott K.C., Peiffer G.L., Jang A.M., Keyes W.R., Keen C.L., Sukanashi T.M. (1997): Copper status of young men consuming a low-copper diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 65: 72–78.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., & Spencer, J. P. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & nutrition*, 3(3-4): 115–126.
- Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D.F. (1994): A study of the reproducibility of the MTT test *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5: 154–159.
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience* 2, 12.
- Yi B., Yu K., Tossounian M., Denchev S., Lawrence R., Arora P., Tsuchiya Y., Peak-chew S.Y., Filonenko V., Oxenford S., Angell R., Gouge J., Skehel M., Gout I. (2021): Redox Biology Regulation of metastasis suppressor NME1 by a key metabolic cofactor coenzyme A. *Redox Biology* 44: 101978
- Zhao R.U.Z., Jiang S., Zhang L.I.N., Yu Z. (2019): Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) *International Journal of Molecular Medicine* 44: 3–15.

Zubčić K., Radovanovi V., Vlaini J., Hof P.R., Or N., Goran Š., Jazvin M. (2020): PI3K / Akt and ERK1 / 2 Signalling Are Involved in Quercetin- Mediated Neuroprotection against Copper- Induced Injury. 2020. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 1-14.

8. Životopis

Ime i prezime: Marijana Batarelo

Datum rođenja: 1.7.1996

Obrazovanje:

2011. – 2015. Srednja stručna škola, Zdravstvena škola Split; Sanitarni tehničar (Republika Hrvatska)

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Biologija i ekologija mora, Sveučilišni odjel za studije mora, Split (Republika Hrvatska)

2018. – 2021. Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, Fiziologija i imunobiologija Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska)

Dodatna znanja:

Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama: LabAnim A kategorija (Laboratory Animal Science Course: FELASA equivalent (60 sati))

PSS (*engl. Professional scuba schools – Open water diver*), rekreativno ronjenje

Vozačka dozvola (B kategorija)

Manifestacije:

Sudjelovanje u festivalu znanosti (animator)

TOV (Tjedan otvorenih ventila)

Radno iskustvo:

Prodavač u suvenirnici, Split (Rujan 2017.) – Studentski posao

Rad u trgovini, inventura; Kaufland: Split, Sinj (Veljača 2016.) – Studentski posao

Anketiranje, Ipsos; Split (povremeno) – Studentski posao

Administrativni poslovi, Lagermax AED; Sinj (Lipanj 2020. -) – Studentski posao

Znanstveni radovi:

Sadžak, Anja; Vlašić, Ignacija; Kiralj, Zoran; Batarelo, Marijana; Oršolić, Nada; Jazvinščak Jembrek, Maja; Kušen, Ines; Šegota, Suzana. (2021). Neurotoxic Effect of Flavonol Myricetin in the Presence of Excess Copper. *Molecules*. 26. 845. 10.3390/molecules26040845.