

# Učinak flavonoida miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti toksičnih koncentracija iona bakra

---

Krstačić Galić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:993085>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Antonio Krstačić-Galić

**Učinak flavonoida miricitrina na preživljenje  
stanica SH-SY5Y u prisutnosti toksičnih  
koncentracija iona bakra**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

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

## Zahvale

*Hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Jazvinščak Jembrek na strpljenju, odličnom vodstvu i iznimnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada te svemu što me naučila o radu u labosu.*

*Hvala i dr. sc. Juliji Erhardt, v. pred. na susretljivosti i suradnji.*

*Hvala mojim roditeljima na razumijevanju i povjerenju tijekom studija i obrazovanja općenito. Bez njihove podrške ne bih mogao završiti studij.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su studentske godine učinili ljepšima, posebno Lovru i Nini koji su sa mnom prošli svih pet godina studija i najbolje me razumjeli tijekom ispitnih rokova.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak flavonoida miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti toksičnih koncentracija iona bakra

Antonio Krstačić-Galić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Oksidacijski stres izazvan promjenom homeostaze metalnih iona, uključujući i iona bakra, jedan je od mehanizama u podlozi nastanka neurodegenerativnih bolesti. Budući da trenutačno ne postoji zadovoljavajuća terapija koja bi spriječila ili usporila njihovu progresiju, aktivno se istražuju potencijalni novi lijekovi. Flavonoidi su skupina prirodnih spojeva porijeklom iz biljaka. S obzirom na njihovo poznato antioksidacijsko i antiapoptotsko djelovanje, pretpostavlja se da bi mogli biti učinkoviti u usporavanju ili prevenciji neurodegenerativnih procesa. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak flavonoida miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog toksičnim koncentracijama iona bakra. Suprotno očekivanjima, miricitrin je djelovao prooksidacijski, pojačao neurotoksičan učinak bakra te dodatno smanjio preživljenje stanica. Potaknuo je produkciju reaktivnih kisikovih vrsta te iscrpljenje unutarstaničnog glutationa i ATP-a. Na prooksidacijsko djelovanje miricitrina upućuje i pad aktivnosti superoksid dismutaze te inaktivacija akonitaze. Stanična smrt vjerojatno je izazvana procesima apoptoze i nekroze jer je miricitrin povećao aktivnost kaspaza 3/7, kondenzaciju kromatina te bojanje s propidij-jodidom. Neurotoksični učinak miricitrina povećao se u prisutnosti vortmanina, inhibitora signalnog puta PI3/Akt, te smanjio u prisutnosti BAPTA-AM, kelatora unutarstaničnog kalcija i MK-801, blokatora N-metil-D-aspartat receptora za glutamat, što ukazuje na važnu ulogu iona kalcija u pokretanju stanične smrti nakon izlaganja bakru i miricitrinu.

Ključne riječi: oksidacijski stres, flavonoidi, prooksidacijsko djelovanje, ioni kalcija  
(57 stranica, 21 slika, 1 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Jazvinšćak Jembrek

Komentor: dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

Ocjenitelji:

dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

prof. dr. sc. Nada Oršolić

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 9.2.2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# Effect of flavonoid myricitrin on viability of SH-SY5Y cells in the presence of toxic concentrations of copper ions

Antonio Krstačić-Galić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Oxidative stress induced by disturbed homeostasis of metal ions, including copper ions, is one of the mechanisms underlying the development of neurodegenerative diseases. As currently there is no effective treatment capable to prevent or slow their progression, potential new drugs are actively being investigated. Flavonoids are a group of natural compounds originating from plants. Considering their known antioxidant and antiapoptotic activity, it is assumed that they could be effective in slowing down or preventing neurodegenerative processes. The aim of this study was to investigate the effect of the flavonoid myricitrin on the survival of SH-SY5Y cells in oxidative stress conditions induced by toxic concentrations of copper ions. Contrary to expectations, myricitrin demonstrated a prooxidative effect, enhanced the neurotoxic effect of copper and further reduced cell survival. It stimulated production of reactive oxygen species and reduced intracellular glutathione and ATP levels. Decreased superoxide dismutase activity and aconitase inactivation also indicated its prooxidative action. Cell death was probably induced by apoptosis and necrosis as myricitrin increased caspase-3/7 activity, chromatin condensation and propidium iodide staining. The neurotoxic effect of myricitrin was increased in the presence of wortmannin, an inhibitor of the PI3/Akt signaling pathway, and decreased in the presence of BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator, and MK-801, a blocker of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors, indicating the important role of calcium ions in the initiation of cell death following exposure to copper and myricitrin.

Keywords: oxidative stress, flavonoids, prooxidative activity, calcium ions  
(57 pages, 21 figures, 1 table, 76 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Maja Jazvišćak Jembrek, PhD

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

Reviewers:

Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Prof. Nada Oršolić, PhD

Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Thesis accepted: 9<sup>th</sup> February 2023

## **Popis kratica**

**AIF** – faktor induciranja apoptoze (engl. *apoptosis-inducing factor*)

**GSH** – glutation

**MAP kinaze** – Mitogen-aktivirane protein kinaze

**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid

**PARP** – poli ADP riboza polimeraza

**PBS** – pufer za ispiranje stanica (engl. phosphate buffered saline)

**PI** – propidij jodid

**PI3-K** – fosfoinozitol-3 kinaza

**RKV** – reaktivne kisikove vrste

**SOD** – superoksid dismutaza

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 Oksidacijski stres.....	1
1.2. Neurodegeneracija i oksidacijski stres .....	3
1.3. Stanična smrt i oksidacijski stres.....	5
1.4. Bakar i uloga u neurodegenerativnim bolestima .....	7
1.5. Flavonoidi: Miricitrin .....	9
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIJALI.....	12
3.1.1. Stanična linija.....	12
3.1.2. Kemikalije.....	12
3.1.3. Otopine i puferi .....	13
3.1.4. Ostali pribor .....	13
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Održavanje stanične kulture SH-SY5Y i priprema stanica za eksperiment .....	13
3.2.2. Tretiranje stanica SH-SY5Y bakrom i miricitrinom.....	14
3.2.3. Test MTT .....	14
3.2.4. Kristal violet.....	15
3.2.5 Mjerenje razine ATP-a.....	15
3.2.6. Mjerenje razine RKV-a.....	16
3.2.7. Glutation .....	16
3.2.8. Mjerenje aktivnosti akonitaza .....	17
3.2.9. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze.....	18
3.2.10. Mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7.....	19
3.2.11. Određivanje apoptotskih i nekrotičnih stanica bojanjem s Hoechst 33342 i propidij jodidom .....	20



3.2.12. Inhibitori signalnih puteva .....	20
3.2.13. Određivanje koncentracije proteina .....	21
3.2.14. Statistička obrada podataka.....	22
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y nakon tretmana bakrom i miricitrinom .....	23
4.2. Učinak bakra i miricitrina na stvaranje RKV-a, omjer reduciranog i oksidiranog glutaciona te aktivnost akonitaze i superoksid dismutaze.....	29
4.3. Učinak bakra i miricitrina na aktivaciju kaspaza i kondenzaciju kromatina.....	33
4.4. Učinak bakra i miricitrina na aktivaciju signalnih puteva povezanih s odgovorom na oksidacijski stres i pokretanje stanične smrti .....	37
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>42</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>48</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>49</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>57</b>

# 1. UVOD

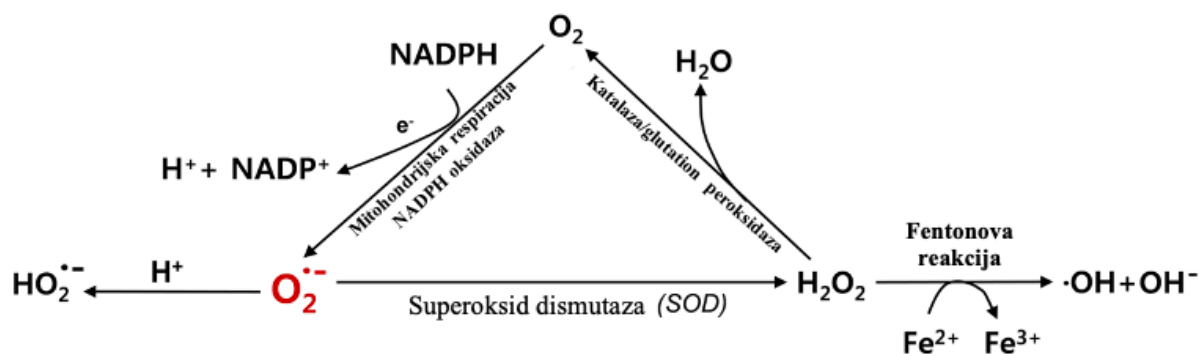
## 1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres opisuje se kao stanje u kojem proizvodnja i nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) premašuje sposobnost sustava antioksidacijske zaštite za njihovim uklanjanjem. RKV-e skupni je naziv koji obuhvaća radikale, ali i molekule od kojih lako mogu nastati radikali (Bayir 2005). RKV-e nastaju djelovanjem egzogenih i endogenih utjecaja. Egzogeni obuhvaćaju različite čimbenike poput izloženosti dimu cigareta, teškim metalima ili ionizirajućem zračenju. Endogeni nastaju raznim biokemijskim i fiziološkim procesima unutar stanice. Fiziološki najznačajnije RKV-e su superoksidni anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Birben i sur. 2012; Krumova i Cosa 2016).

Superoksidni anion nastaje dodatkom jednog elektrona molekuli kisika. Do toga endogeno najčešće dolazi djelovanjem ksantin oksidaze, nikotin adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze ili preko mitohondrijskog transportnog lanca elektrona – 1 do 3% elektrona odvaja se od lanca i stvara  $\cdot\text{O}_2^-$  (Birben i sur. 2012). Superoksidni anion može se prevesti u stabilniji vodikov peroksid djelovanjem superoksid dismutaze (SOD), a  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastaje i djelovanjem ksantin oksidaze, NADPH oksidaze ili oksidaza aminokiselina. Slabo je reaktivan, ali lako prolazi kroz membrane. Može se razlagati na hidroksidni anion ( $\text{OH}^-$ ) i hidroksilni radikal u pristunosti iona prijelaznih metala poput željeza i bakra putem Fentonove ili Haber-Weissove reakcije. Hidroksilni radikal jedan je od najreaktivnijih radikala i najopasniji u biološkim sustavima jer ne postoji odgovarajući enzim za njegovo uklanjanje, stoga izaziva i najveća oštećenja stanica (Birben i sur. 2012; Kim i sur. 2015). Odnos između superoksidnog aniona, hidroksilnog radikala i vodikovog peroksida sažeto je prikazan na Slici 1.

RKV-e nastaju tijekom različitih staničnih procesa i njihova je koncentracija u normalnim fiziološkim uvjetima niska. Nisu samo ko-produkti metaboličkih aktivnosti, već imaju i fiziološku funkciju. Primjerice, velike količine superoksidnog aniona nastaju prilikom fagocitoze u makrofazima i monocitima, pri čemu on ima baktericidnu funkciju (Birben i sur. 2012). Neke RKV-e služe kao signalne molekule, za što su vrlo povoljne zbog svoje male veličine i sposobnosti lakog difundiranja kroz membrane (Hancock i sur. 2001). Sudjeluju i u procesima poput

fosforilacije proteina, aktivacije nekih transkripcijskih faktora i kontroli proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Pizzino i sur. 2017).



**Slika 1.** Odnos između fiziološki najčešćih radikala: superoksidnog aniona, vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala (preuzeto i prevedeno od Kim i sur. 2015)

Za uklanjanje slobodnih radikala zaslužni su antioksidacijski sustavi obrane. Razlikujemo endogene, prirodno prisutne u tijelu, i egzogene, koji se primarno unose kroz prehranu. Endogeni se još dodatno dijele na enzimске i ne-enzimске. Enzimске čine SOD, katalaza koja razlaže vodikov peroksid na vodu i kisik te glutathion peroksidaza koja također neutralizira vodikov peroksid. Za njezino funkcioniranje važan je glutathion (GSH), najvažniji unutarstanični antioksidans. GSH je dio ne-enzimskog sustava zaštite kojeg još čine i primjerice lipoična kiselina, L-arginin i koenzim Q10. Neki od najpoznatijih egzogenih ne-enzimskih antioksidansa su vitamin E, osobito  $\alpha$ -tokoferol, vitamin C i flavonoidi. Ne-enzimski antioksidansi imaju nekoliko mehanizama djelovanja kojima neutraliziraju slobodne radikale i time sprječavaju njihovo citotoksično djelovanje: donacija elektrona, keliranje iona metala i regulacija ekspresije gena (Lobo i sur. 2010; Pizzino i sur. 2017).

Oksidacijski stres nastaje kad se RKV-e stvaraju u prevelikim količinama, do čega mogu dovesti endogeni procesi poput poremećaja funkcije mitohondrija, kao i egzogeni procesi, primjerice izloženost teškim ili prijelaznim metalima. Pri tome se stvara više RKV-a nego ih antioksidacijski sustavi zaštite mogu ukloniti. Količina RKV-a veća od fiziološki očekivane opasna je jer su slobodni radikali vrlo reaktivni zbog nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci (Krumova i Cosa 2016). Zbog toga mogu stupati u reakcije sa staničnim membranama, proteinima

i DNA. U reakciji s membranama dolazi do lipidne peroksidacije. Napad RKV-a na polinezasićene masne kiseline dovodi do dodatnog stvaranja slobodnih radikala čime se reakcija lančano širi. Proteinima djelovanjem RKV-a može biti promijenjena struktura, što potencijalno dovodi do gubitka aktivnosti i stanične funkcije. DNA je također osjetljiva na oksidacijski stres. U reakciji s bazama, osobito gvaninom, radikali mogu dovesti do stvaranja lezija i mutageneze, ali i gubitka epigenetičkih informacija. Nekontrolirana i dugotrajna izloženost oksidacijskom stresu može dovesti do razvoja kroničnih i degenerativnih bolesti, ubrzati proces starenja, kao i izazvati dodatna oštećenja u akutnim patološkim stanjima poput moždanog udara (Pizzino i sur. 2017).

## 1.2. Neurodegeneracija i oksidacijski stres

Iako prosječno teži samo 1400 grama, što čini oko 2% tjelesne mase, mozak je jedan od metabolički najaktivnijih organa. Troši 20% tijelu dostupnog kisika i oko 25% glukoze. To mu je potrebno kako bi održavao normalnu funkciju oko 86 milijardi neurona i 250-300 milijardi glija stanica (Cobley i sur. 2018).

Neurodegenerativne bolesti heterogena su skupina poremećaja koji primarno zahvaćaju neurone. Zajednička im je karakteristika nakupljanje izvanstaničnih ili unutarstaničnih proteinskih agregata, odnosno abnormalnih proteina. Oni prevladavaju u kasnijim fazama bolesti i vidljivi su u mozgovima oboljelih *post mortem*, stoga su u ranijoj literaturi navedeni kao glavni uzrok nastanka i progresije neurodegenerativnih bolesti (Taylor i sur. 2002; Forman i sur. 2004). Ipak, novija istraživanja sugeriraju kako je agregacija zapravo neuroprotektivan mehanizam jer su oligomerne forme promijenjenih i oštećenih proteina puno toksičnije; mogu prolaziti kroz stanične membrane, oštećivati stanice i remetiti sinaptički prijenos (Wells i sur. 2021). Etiologija neurodegenerativnih bolesti nije u potpunosti razjašnjena. Oko 90% slučajeva su sporadični, uzrokovani kombinacijom okolišnih čimbenika i načina života, dok je preostalih 10-ak % nasljedno ili posljedica mutacija (Shukla i sur. 2011). Najpoznatije su neurodegenerativne bolesti Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Alzheimerova bolest najčešći je neurodegenerativni poremećaj. Klinički se manifestira slabljenjem kognitivnih funkcija (poput problema s govorom ili koncentracijom i gubitkom pamćenja), konfuzijom i promjenama raspoloženja. Pacijenti obično umiru 5 do 9 godina nakon dijagnoze. U Alzheimerovoj bolesti dolazi do nakupljanja i agregacije peptida amiloida beta ( $A\beta$ ) u plakove izvan stanice, dok se unutar stanice nakupljaju neurofibrilarni

snopići građeni od hiperfosforiliranog proteina tau. Patološku podlogu Parkinsonove bolesti čini odumiranje dopaminergičkih neurona u crnoj tvari (lat. *substantia nigra*). U Parkinsonovoj bolesti dolazi do unutarstaničnog nakupljanja neurofilamentnih inkluzija, tzv. Lewyjevih tjelešaca, sastavljenih od različitih proteina, primarno  $\alpha$ -sinukleina i ubikvitina. Klinički se manifestira tremorom, rigidnošću mišića, posturalnom nestabilnošću i bradikinezom (Kim i sur. 2015; Niedzielska i sur. 2016).

Najvažniji je čimbenik u razvoju i progresiji neurodegenerativnih bolesti starenje. Kako se životni vijek ljudi produljio, tako je i udio oboljelih od neurodegenerativnih bolesti u populaciji sve veći, stoga je važno naći lijekove koji će usporiti, a možda i spriječiti progresiju bolesti (Maher 2019). Trenutačno dostupne terapije prvenstveno su simptomatske. Lijekovi poput Levodope, koja se koristi u Parkinsonovoj bolesti, ili inhibitora kolinesteraza, koji se koriste u Alzheimerovoj bolesti, ne usporavaju progresiju bolesti već samo ublažavaju simptome (Poddar i sur. 2021)

Patofiziologija neurodegenerativnih bolesti vrlo je složena. Postoje različiti molekularni mehanizmi u podlozi njihova nastanka, a kao jedan od izrazito važnih smatra se oksidacijski stres. Kao što je prethodno objašnjeno, dugotrajna izloženost oksidacijskom stresu iscrpljuje sustave antioksidacijske zaštite i dovodi do oštećenja proteina, lipida i DNA te poremećaja funkcije neurona, čime se ubrzava proces starenja i razvoj neurodegenerativnih bolesti (Singh i sur. 2019). Primjerice, nakupljanje  $A\beta$  u pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti dodatno potiče proizvodnju RKV-a, što dalje utječe na poremećaj funkcije mitohondrija, lipidnu peroksidaciju te oksidaciju proteina, DNA i RNA. Povrh toga, u mozgu oboljelih pronađene su smanjene količine antioksidansa i antioksidacijskih enzima u odnosu na zdrave osobe što ukazuje na njihovo iscrpljenje zbog dugotrajne izloženosti oksidacijskom stresu (Kim i sur. 2015; Wells i sur. 2021).

Oksidacijski stres za mozak predstavlja posebnu opasnost. Mozak je na oksidacijski stres osjetljiviji od drugih organa. Nekoliko je razloga za to, među njima već navedena potreba mozga za velikom količinom kisika. Osim toga, mozak sadrži veliku količinu polinezasićenih masnih kiselina koje su supstrat za lipidnu peroksidaciju. Također, u mozgu se nalazi velika količina prijelaznih metala, poput željeza i bakra, koji sudjeluju u redoks reakcijama i mogu katalizirati nastajanje RKV-a. Neurotransmiteri, poput dopamina, mogu se autooksidirati, a njihovo metaboliziranje dovodi do stvaranja  $H_2O_2$ . Naposljetku, povišenje količine RKV-a je opasno jer

mozak ima manju sposobnost antioksidacijske zaštite, primjerice neuroni sadrže oko 50% manje citoplazmatskog glutationa (GSH) nego ostale stanice (Cobley i sur. 2018; Kim i sur. 2015).

### 1.3. Stanična smrt i oksidacijski stres

U neurodegenerativnih bolesti dva su glavna oblika odumiranja neurona: apoptoza i nekroza. Ta se dva oblika razlikuju prema morfološkim promjenama stanica i očuvanju cjelovitosti stanične membrane, odnosno prema tome dolazi li do „curenja“ staničnog sadržaja ili ne (Chi i sur. 2018). Apoptoza je oblik programirane stanične smrti. Prilikom apoptoze dolazi do smanjenja veličine stanice, kondenzacije kromatina, fragmentacije jezgre i u konačnici formiranja apoptotskih tjelešca koje uklanjaju lokalni fagociti. Membrana stanice ostaje očuvana do samog kraja procesa, stoga stanični sadržaj ne curi u izvanstanični prostor. Postoje dva puta pokretanja apoptoze: vanjski, ovisan o staničnim receptorima, i unutarnji, ovisan o mitohondrijima. U vanjskom se putu smrt stanice pokreće vezanjem izvanstaničnih liganada na stanične receptore, dok su za unutarnji put važni podražaji unutar stanice, primjerice oštećenje DNA, što dovodi do aktiviranja transkripcijskog faktora p53 i pojačane ekspresije proapoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2. Oba puta povećavaju propusnost unutarnje membrane mitohondrija, što aktivira Bcl-2 homolognu regiju 3 koja potiče otpuštanje proapoptotskih faktora, poput citokroma c te proteina Smac, DIABLO ili faktora induciranja apoptoze (engl. *apoptosis-inducing factor*, AIF), iz mitohondrija u citosol. Ovi faktori dalje potiču provođenje apoptoze ovisno ili neovisno o kaspazama. U putu ovisnom o kaspazama otpušteni faktori aktiviraju inicijatorske kaspaze (kaspaze 2, 8, 9 i 10) putem različitih mehanizama, ovisno o aktiviranom faktoru. Najpoznatiji citokrom c veže se za Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) u citoplazmi i time tvori apoptosom koji se veže za i aktivira kaspazu 9. Inicijatorske kaspaze potom cijepaju izvršne kaspaze (kaspaze 3, 6 i 7) i tako ih aktiviraju. Izvršne kaspaze dalje cijepaju brojne stanične supstrate pa njihova aktivnost dovodi do degradacije citoskeleta i staničnih organela. Jedan od nuklearnih supstrata koje aktiviraju je nukleaza aktivirana kaspazama (engl. *caspase-activated DNase*) koja izaziva fragmentaciju DNA i kondenzaciju kromatina. Degradacija DNA i staničnih proteina naposljetku dovodi do formiranja apoptotskih tjelešaca te ekspresije liganada za fagocitne receptore i fagocitozu. U putu neovisnom o kaspazama ključan je proapoptotski faktor AIF. Pokazano je da nakupljanje RKV-a aktivira enzim poli ADP-riboza polimerazu 1 (PARP-1) i dovodi do otpuštanja AIF iz mitohondrija. AIF dalje uzrokuje kondenzaciju kromatina i cijepanje DNA i odvodi stanicu u apoptozu. Povišena

količina RKV-a također može dovesti i do apoptoze ovisne o kaspazama. Dugotrajnija izloženost oksidacijskom stresu iscrpljuje GSH u stanici zbog čega antioksidacijski sustavi obrane ne mogu neutralizirati RKV-e koje nastaju u mitohondriju. Povišena količina RKV-a dovodi do promjene u membranskom potencijalu mitohondrija i povećanja propusnosti membrane što uzrokuje otpuštanje citokroma c u citosol i pokreće kaskadnu reakciju kaspaza (Ryter i sur. 2007; Hongmei 2012).

Nekroza, odnosno nekrotična stanična smrt, morfološki je karakterizirana bubrenjem stanice i organela što u konačnici dovodi do oštećenja stanične membrane i curenja staničnog sadržaja. Dolazi do nasumične degradacije DNA te formiranja slabo ograničenih nakupina kromatina. Dugo se smatralo da je nekroza kao oblik stanične smrti slučajna i samim time nekontrolirana. Iako i dalje nisu u potpunosti razjašnjene razlike između programirane i nekontrolirane nekroze, otkriveno je kako ju može inducirati nekoliko faktora, primjerice faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF). Oblik programirane nekroze, nekroptoza, pojavljuje se u nekim neurodegenerativnim bolestima (Ryter i sur. 2007; Kroemer i sur. 2009; Chi i sur. 2018). Normalne fiziološke razine ATP-a unutar stanice obično vode k apoptozi, a niske nekrozi (Chen i sur. 2018).

Transkripcijski faktor p53 vrlo je važan u određivanju sudbine stanice. Pri slabijim oštećenjima potiče popravak DNA, a pri jačima staničnu smrt (Wang i sur. 2014a). U fiziološkim uvjetima, neuroni su nešto otporniji na proapoptotske podržaje i stresne uvjete od ostalih somatskih stanica, stoga mogu preživjeti i funkcionirati tijekom života zdravih osoba. Izloženost oksidacijskom stresu smanjuje dostupnost antioksidansa što dugoročno šteti neuronima i osobito njihovim mitohondrijima (Chi i sur. 2018). Dokazano je da povišene količine RKV-a mogu aktivirati p53 koji zatim odvodi stanicu u apoptozu (Polyak i sur. 1997). Oksidacijski stres, s obzirom da su mitohondriji najosjetljiviji na promjene količine RKV-a među organelima, obično uzrokuje apoptozu unutarnjim putem.

Još jedan od proteina uključenih u odgovor stanice na oksidacijsko oštećenje je PARP-1, jezgreni enzim važan za popravak oštećenih DNA lanaca. Prilikom blažih oštećenja, veže se na DNA lance na mjestu nastanka lezija i formira poli ADP-riboza polimere nakon čega se odvaja s lanca kako bi nastupili daljnji koraci popravka. Kao što je ranije navedeno, uključen je u apoptozu

neovisnu o kaspazama. U apoptozi ovisnoj o kaspazama vrlo rano ga cijepaju i inaktiviraju efektorske kaspaze, vjerojatno kako bi se spriječio uzaludni utrošak energije na popravak DNA u apoptotskoj stanici (Ko i Ren 2012).

Ulogu u signalnim putevima apoptoze ima unutarstanični kalcij, koji služi kao kofaktor ili prijenosnik signala brojnih proteina uključenih u apoptozu. Može djelovati proapoptotski, ali i antiapoptotski (Orrenius i sur. 2003).

Mitogen-aktivirane protein (MAP) kinaze enzimi su unutarstaničnih signalnih puteva, i evolucijski su konzervirani u eukariota. Reguliraju odgovor stanice na brojne signale poput hormona, faktora rasta, citokina, ali i oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres vrlo često utječe na aktivaciju MAP kinaza, najčešće p38 i JNK, a njihovi signalni putevi potiču aktivaciju određenih transkripcijskih faktora i uzrokuju promjene u ekspresiji gena što dovodi do sinteze proapoptotskih proteina (Ray i sur. 2012; Mansuri i sur. 2014).

#### **1.4. Bakar i uloga u neurodegenerativnim bolestima**

Bakar je esencijalan mikroelement u ljudskom tijelu. Koncentracija bakra u ljudskoj jetri i mozgu je oko 5  $\mu\text{g/g}$  tkiva, a 0,3-0,5  $\mu\text{M}$  u cerebrospinalnoj tekućini. Ima brojne fiziološke funkcije: sudjeluje u respiraciji, diferencijaciji eritrocita, apsorpciji i transportu željeza u tijelu (ceruloplazmin), razvoju i održavanju vezivnog tkiva. Kofaktor je nekoliko enzima uključenih u metaboličke funkcije i redoks reakcije, primjerice superoksid dismutaze 1 i 3 (SOD1 i SOD3) važne za antioksidacijsko djelovanje, i citokrom c oksidaze važne za sintezu ATP-a u mitohondrijima. Bakar se nalazi u brojnim sinaptičkim membranama i u cijelom mozgu, u najvećim količinama u hipokampusu, bazalnim ganglijima te malom mozgu. Osim već navedenih uloga, u mozgu je važan za sintezu neurotransmitera i neuropeptida, osobito za aktivnost dopamin- $\beta$ -hidroksilaze. Uočena je njegova prisutnost u nekim sinapsama što upućuje na ulogu u komunikaciji između neurona, iako točna uloga još nije razjašnjena (Giampietro i sur. 2018; Scheiber i sur. 2014).

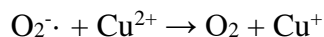
Bakar se u tijelo unosi uglavnom prehranom, a potom apsorbira u proksimalnom dijelu tankog crijeva. Oko 75% apsorbiranog bakra kroz portalnu se venu pohranjuje u jetri, dok ostatak kola u perifernoj cirkulaciji, uglavnom vezan za albumin. Od bakra metaboliziranog u jetri, 20%



se ponovno izlučuje u probavni sustav, a preostalih se 80% veže za ceruloplazmin i izlučuje u periferiju (Bost i sur. 2016). Bakar u mozak ulazi kao slobodni ion preko membranskih prijenosnika ATP7A i njemu homolognog ATP7B koji se nalaze na endotelnim stanicama krvno moždane barijere i koroidnog spleta gdje se potom veže na različite molekule poput GSH ili specijaliziranih šaperona (Giampietro i sur. 2018; Lutsenko i sur. 2019). Vežanjem bakra za proteine sprječava se njegovo potencijalno toksično djelovanje i sudjelovanje u redoks reakcijama (Gaetke i sur. 2014).

Poremećaj homeostaze bakra vrlo je opasan za organizam. Bakar je vrlo reaktivan prijelazan metal, stoga je u previsokim količinama toksičan. S druge strane, u prisutnosti smanjenih koncentracija bakra, stanice mogu biti osjetljivije na oksidacijski stres, a dolazi i do problema u razvoju i funkciji organizma. Primjerice, u Menkesovoj bolesti pacijenti imaju značajan manjak količine bakra u tijelu. Bolest prati neurološka degeneracija i poteškoće u razvoju mišićnog i vezivnog tkiva zbog deficita enzima, uključujući i antioksidacijskih, za čiju je aktivnost bakar nužan. U suprotnom slučaju, Wilsonovoj bolesti, bakar se, zbog mutacije koja uzrokuje nefunkcionalnost membranskih prijenosnika bakra, nagomilava u stanici i izaziva stanje oksidacijskog stresa te oštećenja DNA i RNA (Gaetke i Chow 2003; Scheiber i sur. 2014). Poremećaj funkcije nadbubrežne žlijezde također može dovesti do prevelike količine bakra u organizmu, kao i neki okolišni čimbenici, primjerice konzumacija kontaminirane vode (Gaetke i sur. 2014).

Nekoliko je mehanizama kojima bakar može potaknuti stanje oksidacijskog stresa. Bakar je za stanicu najopasniji kao slobodni ion ( $\text{Cu}^+$  i  $\text{Cu}^{2+}$ ). Iako je obično vezan za proteine koji sprječavaju njegovo toksično djelovanje, pri poremećaju homeostaze dio postaje slobodan i može ulaziti u redoks reakcije. U prisutnosti superoksidnog aniona ili reducirajućih agensa poput GSH dolazi do redukcije  $\text{Cu}^+$  u  $\text{Cu}^{2+}$  putem Haber-Weissove reakcije što katalizira nastanak vrlo opasnog hidroksilnog radikala (Gaetke i Chow 2003):



Zbog povećane količine slobodnog bakra, u stanici prvo dolazi do iscrpljenja kelirajućih molekula, uključujući i unutarstaničnog GSH, a zatim do povećanja količine RKV-a i oksidacijskog stresa

(Jazvinščak Jembrek i sur. 2014). GSH s bakrom tvori Cu(I)–GSH komplekse. Prilikom homeostaze takvo keliranje smanjuje dostupnost unutarstaničnog bakra i reducira njegovu toksičnost, ali ovaj je kompleks redoks aktivan. Stupa u reakciju s molekularnim kisikom i tvori superoksidne anione što doprinosi oksidacijskom stresu u prisutnosti povišenih koncentracija bakra. Osim toga, Cu(I)-GSH kompleks može reducirati  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  koje može sudjelovati u Fentonovoj reakciji i dodatno stvarati hidroksilne radikale (Scheiber i sur. 2014).

Promjene u homeostazi bakra, cinka i željeza utječu na patogenezu Alzheimerove bolesti (Hordyjewska i sur. 2014). Tako su povišene koncentracije bakra pronađene u mozgu oboljelih.  $\text{Cu}^{2+}$  veže se za  $\text{A}\beta$  i tako povećava njegovu toksičnost i potiče dodatan nastanak RKV-a. Također je moguće da narušava aktivnost proteolitičkih enzima koji razgrađuju plakove  $\text{A}\beta$ . Povrh toga, bakrovi ioni pojačavaju hiperfosforilaciju proteina tau i stimuliraju njihovu agregaciju u snopiće, stoga bakar ubrzava progresiju bolesti (Scheiber i sur. 2014; Zubčić i sur. 2020a, 2020b). Homeostaza bakra narušena je i u drugim neurodegenerativnim bolestima, poput Huntingtonove i Parkinsonove bolesti, kao i kod prionskih bolesti (Gromadzka i sur. 2020).

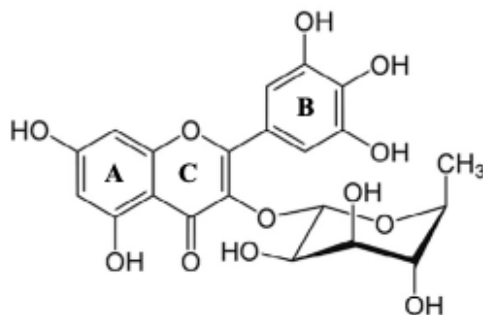
### **1.5. Flavonoidi: Miricitrin**

Flavonoidi su polifenolni spojevi. Sekundarni su metaboliti biljaka, a u organizam ih najčešće unosimo konzumacijom voća i povrća te pića poput sokova, čajeva ili vina. Karakterizira ih prisutnost dva ili više aromatskih prstenova, od kojih svaki ima barem jednu hidroksilnu skupinu. U biljkama imaju niz funkcija poput zaštite od abiotičkog stresa ili UV zračenja, a u ljudskom organizmu su pokazali antioksidacijsko, antiupalno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje, kao i potencijal u tretmanu neurodegenerativnih bolesti, krvožilnih bolesti i osteoporoze (Mansuri i sur. 2014; Panche i sur. 2016).

Preko 8000 do sad otkrivenih flavonoida dijeli se u šest skupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidi i izoflavoni (Maher 2019; Mutha i sur. 2021). Gotovo sve skupine mogu djelovati kao antioksidansi. Svoje antioksidacijsko djelovanje ostvaruju putem nekoliko mehanizama. Zbog posjedovanja velikog broja hidroksilnih skupina i dvostrukih veza mogu lako donirati vodik i time neutralizirati radikale, ali i kelirati ione prijelaznih metala poput bakra i željeza. Osim toga, pokazalo se da mogu inhibirati aktivnost oksidaza, prvenstveno ksantin oksidaze, koje sudjeluju u nastajanju radikala (Rice-Evans i sur. 1996; Panche i sur. 2016). Ta im

svojstva omogućuju da djeluju neuroprotektivno, stoga se sve više istražuje njihova potencijalna primjena u prevenciji i liječenju neurodegenerativnih bolesti (Maher 2019). Nadalje, pokazuju učinak u modulaciji signalnih puteva u neuronima, primjerice aktivacijom kinaze ERK (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) ili fosfoinozitol-3 kinaze (PI3-K) te inhibicijom kinaza JNK i p38. Modulacijom dolazi do brojnih povoljnih učinaka poput prevencije oksidacijskog stresa i apoptoze te poboljšanja kognitivnih funkcija na animalnim modelima (Mansuri i sur. 2014).

Miricitrin ili miricetin-3-O-ramnozid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ) (Slika 2) pripada skupini flavonola. Nastaje glikozilacijom flavonoida miricetina vezanjem šećera ramnoze na kisik prstena C. Snažnog je antioksidacijskog djelovanja; glikozidni oblici flavonoida općenito pokazuju snažnije antioksidacijsko djelovanje zbog većeg broja hidroksilnih skupina (Hwang i Chung 2018). Pokazao je i niz neuroprotektivnih učinaka: umanjuje neuroupalu inhibicijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i signalnih puteva MAP kinaza te modulacijom signalnog puta NLRP3/Bax/Bcl, te ublažava neurotoksični učinak spojeva s reaktivnim karbonilnim skupinama (Wang i sur. 2014b; Gong i sur. 2019; Yang i sur. 2019).



**Slika 2.** Kemijska struktura miricitrina (preuzeto i prilagođeno prema Domitrović i sur. 2015)

Istraživanja su pokazala da neki antioksidansi, uključujući flavonoide, mogu djelovati i prooksidativno. Flavonoidi u prisutnosti metalnih iona, poput bakra i željeza, s njima stvaraju komplekse koji kataliziraju nastanak RKV-a, prvenstveno hidroksilnog radikala preko Fentonove reakcije. Toksičnost vjerojatno ovisi o broju i poziciji hidroksilnih skupina flavonoida. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnili mehanizmi njihova djelovanja (Azmi i sur. 2006; Farhan i Rizvi 2022).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Bakar i njemu pridruženi oksidacijski stres su značajni čimbenici u podlozi nastanka i razvoja brojnih neurodegenerativnih bolesti za čije liječenje još uvijek ne postoje zadovoljavajući farmakološki pristupi. Velik broj istraživanja usmjeren je na otkrivanje učinkovitih lijekova koji bi mogli usporiti ili spriječiti progresiju neurodegenerativnih bolesti. Jedna od skupina spojeva koji bi se potencijalno mogli koristiti u terapijske svrhe su flavonoidi s obzirom na njihovo dokazano antioksidacijsko djelovanje te sposobnost keliranja metala i modulaciju signalnih puteva.

Cilj diplomskog rada je utvrditi učinak flavonoida miricitrina na preživljenje stanica neuroblastoma SH-SY5Y u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog visokim koncentracijama bakra, te djelomično razjasniti molekularne mehanizme u podlozi tog učinka, prvenstveno analizom pokazatelja oksidacijskog stresa, aktivacije signalnih puteva i procesa uključenih u pokretanje stanične smrti.

Hipoteza je rada da će miricitrin povećati preživljenje stanica SH-SY5Y izloženih toksičnim koncentracijama bakra ublažavajući njegovo neurotoksično djelovanje. Od parametara povezanih s oksidacijskim stresom odredit će utjecaj miricitrina na proizvodnju RKV-a, omjer reduciranog i oksidiranog glutaciona, te aktivnost SOD-a i akonitaze. Utvrdit će i do kojeg oblika stanične smrti dolazi u stanicama tretiranim bakrom i miricitrinom te pokušati razjasniti molekularne mehanizme uključene u preživljenje stanica SH-SY5Y primjenom specifičnih inhibitora odabranih signalnih puteva.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanična linija

Sve sam eksperimente proveo u kulturi neuroblastomskih stanica SH-SY5Y. Stanična linija SH-SY5Y koristi se od 80-ih godina prošlog stoljeća za neurobiološka istraživanja. Prvi se puta opisuje u radu Biedlera i sur. 1978. godine. Klon je stanične linije SK-N-SH uspostavljene biopsijom metastatskog neuroblastoma iz koštane srži četverogodišnje djevojčice. Ovim stanicama nedostaju neke karakteristike zrelih neurona. Različita im je stanična morfologija, mogu se dijeliti, nedostaju im neki neuron-specifični biljezi kao što je NeuN, a sadrže i znatno manje količine neuron-specifičnih proteina u usporedbi sa zrelim neuronima (Agholme i sur. 2010). Usprkos razlikama, posjeduju brojna biokemijska i funkcionalna obilježja neurona. Osim toga, lakše ih je održavati nego diferencirane, zrele neurone, a zbog svog ljudskog porijekla posjeduju brojne proteine koji nisu prisutni u pojedinom animalnim staničnim modelima (Kovalevich i Langford 2013). Zbog svega se toga često koriste i opće su prihvaćeni neuronalni model u *in vitro* neurobiološkim istraživanjima, pa tako i istraživanjima neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (Xicoy i sur. 2017; de Medeiros i sur. 2019).

##### 3.1.2. Kemikalije

- Kemika (Hrvatska): bakar (II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), dimetil-sulfoksid (DMSO), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
- Sigma (SAD): BAPTA-AM, 4-diamino-2,3-dicijano-1,4-bis(2-aminofeniltijo)-butadien (UO126), 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat ( $\text{H}_2\text{DCF-dA}$ ), DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), fetalni goveđi serum (FBS, *Fetal Bovine Serum*), formaldehid, Hoechst 33342 (2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H- benzimidazol trihidroklorid trihidrat), L-glutamin, glutation, kristal violet, leupeptin, miricitrin, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazolium bromid), Na-piruvat, nifedipin, penicilin/streptomycin, propidij jodid, tripansko modriilo, tripsin
- Ascent Scientific (SAD): vortmanin
- Alfa Aesar (SAD): MK-801, pifittrin- $\alpha$ , PARP inhibitor VIII (PJ34), SB203580, SP600125

### 3.1.3. Otopine i puferi

- pufer za ispiranje stanica (PBS, *Phosphate Buffered Saline*):  
137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4
- CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O: matična otopina 5 x 10<sup>-2</sup> M u dH<sub>2</sub>O
- GSH: 10 mM u DMEM-u
- H<sub>2</sub>DCF-dA: 25 mg/mL u DMSO
- Hoechst 33342: 1 mg/mL u dH<sub>2</sub>O
- miricitrin: 10 mg/mL u DMSO
- MTT: 5 mg/mL u PBS-u (10x)
- propidij jodid: 1 mg/mL u dH<sub>2</sub>O
- tripsin: PBS s 0,05% tripsina i 1 mM EDTA
- Matične otopine inhibitora (sve u DMSO): BAPTA-AM – 10 mM, leupeptin – 10 mM, MK-801 – 10 mM, nifedipin – 100 mM, PARP inhibitor VIII (PJ34) – 10 mM, pifitrin- $\alpha$  – 10 mM, SB203580 – 25 mM, SP600125 – 50 mM, UO126 – 10 mM, vortmanin – 20 mM

### 3.1.4. Ostali pribor

- komorica Bürker-Türk, plastične tube (15 i 50 mL), posude za staničnu kulturu (Falcon), pločice s 96 (0,32 cm<sup>2</sup>; Sigma) i 24 bunarića (9,4 cm<sup>2</sup>; TPP, Švicarska), tubice Eppendorf (1,5 i 2 mL), pipete (Eppendorf Research), pipetor Turbo-Fix (TPP), svjetlosni mikroskop (Zeiss), centrifuga (Eppendorf), čitač pločica Multiskan MS (Labsystems), fluorescencijski mikroskop EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific), spektrofotofluorometar za mikropločice Tecam Infinite M200 (Tecan)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje stanične kulture SH-SY5Y i priprema stanica za eksperiment

Stanice sam uzgajao u kompletiranom mediju u posudicama za staničnu kulturu površine 25 cm<sup>2</sup>. Držao sam ih u inkubatoru na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti. Stanice bi nakon nekog vremena ispunile cijelu površinu posudice te se tada mora provesti pasažiranje, tj. odvajanje stanica od podloge i presađivanje u manjem broju u svježij medij. Pasažiranje sam provodio dva puta tjedno. Iz posudice sam uklonio stari medij i isprao stanice s 2 mL PBS-a, zatim dodao 0,5 mL tripsina kako bi se stanice, pričvršćene za posudicu, odvojile od površine. Nakon 10-12 minuta,

odvajanje stanica sam provjerio svjetlosnim mikroskopom. Odvojene stanice sam resuspendirao u 2 mL kompletiranog medija. 400  $\mu$ L sam vratio u posudicu i dodao svježi medij kako bih održao staničnu kulturu, a preostalu suspenziju sam koristio za potrebe istraživanja.

Stanice za istraživanje brojao sam koristeći Bürker-Türk komoricu na svjetlosnom mikroskopu. Suspenzija za brojanje stanica sastojala se od 20  $\mu$ L stanične suspenzije, 30  $\mu$ L kompletiranog medija i 50  $\mu$ L tripanskog modrila. Suspenziju bih prenio na komoricu te nakon inkubacije u trajanju od 5 min promatrao stanice pod svjetlosnim mikroskopom. Brojao sam samo vijabilne stanice; one imaju neoštećenu staničnu membranu, stoga tripanskog modrilo ne može ući u njih i nisu obojane. Brojao sam ih u najmanje 4 vidna polja (4x16) i njihov broj u mililitru suspenzije odredio prema formuli:

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

pri čemu je N broj stanica, a 5 faktor razrjeđenja.

### **3.2.2. Tretiranje stanica SH-SY5Y bakrom i miricitrinom**

Na početku istraživanja tretirao sam stanice rastućim koncentracijama  $\text{CuSO}_4$  tijekom 24 sata (100  $\mu$ M-1,5 mM) kako bih odredio najmanju koncentraciju koja izaziva statistički značajno smanjenje preživljenja stanica. Koncentracije sam pripremio u kompletiranom mediju. Mjerenje sam proveo na pločici s 96 bunarića, svaka koncentracija određivana je u triplikatu. Približno 24 sata prije tretmana u svaki sam bunarić dodao 100  $\mu$ L stanične suspenzije sa  $20 \times 10^3$  stanica kako bi se stanice dobro pričvrstile za podlogu. Nakon 24 sata tretmana mjerio sam preživljenje stanica testom MTT. Isti postupak koristio sam i za pripremu stanica za tretmane bakrom, miricitrinom i/ili specifičnim inhibitorima signalnih puteva.

### **3.2.3. Test MTT**

Testom MTT odredio sam vijabilnost stanica. Preživljenje stanica temelji se na aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza stanica koje topivi žuti supstrat 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) metaboliziraju u netopivi ljubičasti formazan. Do promjene dolazi samo u vijabilnim stanicama, stoga je količina nastalog formazana proporcionalna broju

preživjelih stanica. Nakon što je pločica s 96 bunarića tretirana bakrom i miricitrinom 24 sata, iz bunarića sam otklonio medij s bakrom i miricitrinom i dodao 40  $\mu\text{L}$  medija s 20  $\mu\text{g}$  boje MTT (koncentracija 0,5 mg/mL u DMEM-u). Stanice sam potom vratio u inkubator na 3 sata. Nakon završetka inkubacije u svaki sam bunarić dodao 160  $\mu\text{L}$  DMSO kako bi se nastali formazan otopio. Rezultate sam očitao spektrofotometrijski pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems). Izmjerio sam apsorbanciju na 570 nm.

#### **3.2.4. Kristal violet**

Preživljenje stanica odredio sam i bojanjem s kristal violetom. Test se temelji na sposobnosti boje kristal violet da se veže na stanične proteine i DNA. Stanice se tokom stanične smrti odljepljuju od podloge. Ispiranjem se takve stanice uklanjaju te je obojenje u bunarićima s manje preživjelih stanica manje intenzivno. Nakon što je pločica s 24 bunarića tretirana bakrom i miricitrinom tijekom 24 sata, maknuo sam medij i bunariće isprao dva puta s PBS-om. Stanice sam potom fiksirao dodavanjem 200  $\mu\text{L}$  4% formaldehida u svaki bunarić. Nakon 20 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi formaldehid sam otklonio iz bunarića i isprao ih PBS-om. Potom sam dodao 200  $\mu\text{L}$  0,5% kristal violeta u svaki bunarić i inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam bunariće isprao 4 do 5 puta do potpunog odbojavanja, svaki put dodavajući po 500  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O. Pločicu sam okrenuo naopačke i pustio ju da se u potpunosti osuši. Nakon što se dobro osušila, u svaki sam bunarić dodao po 300  $\mu\text{L}$  metanola te stavio 20 minuta na klackalicu (brzina 5, nagib 7) kako bi se boja dobro otopila. Potom sam po 100  $\mu\text{L}$  otopine prebacio u pločicu s 96 bunarića i rezultate očitao spektrofotometrijski pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems). Izmjerio sam apsorbanciju na 570 nm.

#### **3.2.5 Mjerenje razine ATP-a**

Nakon tretmana stanica s bakrom i miricitrinom razinu ATP-a sam izmjerio komercijalno dostupnim testom *CellTiter-Glo 2.0* (Promega) slijedeći upute proizvođača. Razina unutarstaničnog ATP-a proporcionalna je preživljenju stanica. U svaki bunarić pločice sam dodao po 100  $\mu\text{L}$  reagensa koji sadrži luciferin i luciferazu. U vijabilnim stanicama luciferaze koriste luciferin te uz utrošak ATP-a, O<sub>2</sub> i Mg<sup>+</sup> stvaraju luminiscentni signal. Pločicu sam ostavio 2 min na tresilici kako bi došlo do lize stanica te potom inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi.



Luminiscentni signal sam očitao pomoću spektrofluorometra za mikropločice (Tecan, Salzburg, Austrija) s vremenom integracije od 1000 ms po bunariću.

### **3.2.6. Mjerenje razine RKV-a**

Nakupljanje RKV-a unutar stanica nakon tretmana bakrom i/ili miricitrinom mjerio sam pomoću 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H<sub>2</sub>DCF-dA). Pripremio sam 100 µM H<sub>2</sub>DCF-dA otapanjem u PBS-u, a potom u sve bunariće, osim kontrole, dodao po 50 µL otopine. Za određivanje autofluorescencije stanica u netretirane (kontrolne) stanice sam dodao jednaki volumen čistog PBS-a. Pločicu sam inkubirao 40 minuta na 37 °C u inkubatoru kako bi boja difundirala u stanice. H<sub>2</sub>DCF-dA je nefluorescirajući spoj, ali nakon difuzije u stanicu, stanične ga esterase deacetiliraju, a potom u prisutnosti RKV-a u stanici oksidira u fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF). Očitana je fluorescencija stoga proporcionalna količini nastalih RKV-a unutar stanice. Fluorescenciju sam izmjerio pomoću spektrofluorometra za mikropločice (Tecan, Salzburg, Austrija) pri valnoj duljini ekscitacije 488 nm i emisije 535 nm.

### **3.2.7. Glutation**

#### **3.2.7.1. Mjerenje omjera GSH/GSSG**

Omjer unutarstaničnog reduciranog i oksidiranog glutaciona, GSH i GSSG-a, odredio sam pomoću komercijalno dostupnog testa *GSH/GSSG-Glo Assay (Promega)*. Omjer služi kao mjera za određivanje intenziteta oksidacijskog stresa. Test se temelji na reakciji GSH i molekule luciferina-NT putem glutation S-transferaze što dovodi do nastanka kompleksa GSH-NT i molekule luciferina koja emitira svjetlosni signal. Intenzitet signala ovisi o količini nastalog GSH.

Test sam provodio na pločici s 96 bunarića. Nakon završetka tretmana, iz svakog sam bunarića uklonio medij. Reagense sam pripremio prema uputama proizvođača i u pola bunarića dodao 50 µL reagensa koji određuje ukupni glutation, a u drugu polovinu reagens koji određuje oksidirani glutation (sadrži N-etilmaleimid koji blokira GSH). Jednu netretiranu jažicu ostavio sam kao slijepu probu. Pločicu sam zatim stavio na tresilicu 5 minuta kako bi se stanice dobro lizirale. Nakon lize, dodao smo 50 µL reagensa za nastanak luciferina u bunariće, potom inkubirao pločicu 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u svaki sam bunarić dodao po 100 µL

reagensa za detekciju luciferina. Nakon 15 minuta inkubacije, luminiscenciju sam izmjerio pomoću spektrofluorometra za mikropločice (Tecan, Salzburg, Austrija). Omjer za svaki tretman izračunao sam prema formuli:

$$\frac{GSH}{GSSG} = \frac{\text{očitana luminiscencija ukupnog GSH} - \text{očitana luminiscencija GSSG}}{\text{očitana luminiscencija GSSG RLU/2}}$$

### 3.2.7.2. Dodatak egzogenog GSH

S obzirom da je GSH najvažniji unutarstanični antioksidans, utvrdio sam utječe li dodatak egzogenog GSH na preživljenje stanica. Koristio sam 0,2 mM otopinu GSH pripremljenu u kompletiranom mediju. Svaki sam tretman nanosio u triplicatu. Kao kontrolu sam koristio stanice uzgojene u kompletiranom mediju. Nakon 24 sata uspoređivao sam preživljenje stanica tretiranih samo s bakrom i miricitrinom (0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 5, 10 i 20 μg/μL miricitrina) s preživljenjem stanica koje su dodatno tretirane s egzogenim GSH. Preživljenje stanica odredio sam testom MTT.

### 3.2.8. Mjerenje aktivnosti akonitaza

Aktivnost akonitaza izmjerio sam pomoću komercijalno dostupnog testa *Aconitase Activity Assay Kit* (Sigma-Aldrich) slijedeći upute proizvođača. Akonitaze su reverzibilno inaktivirane tijekom oksidacijskog stresa, stoga se mjerenje njihove aktivnosti koristi kao biljeg oksidacijskih oštećenja. Test se temelji na enzimskoj reakciji pri kojoj akonitaza konvertira citrat u izocitrat što rezultira obojenjem koje je proporcionalno enzimskoj aktivnosti akonitaze u uzorku. Za svaki sam tretman uzgajao po 2x10<sup>6</sup> stanica u posudicama površine 25 cm<sup>2</sup> (po jednu posudicu za kontrolu i bakar te bakar u prisutnosti 1 i 5 μg/μL miricitrina, a po dvije za bakar u prisutnosti 10 i 20 μg/μL miricitrina zbog visoke smrtnosti). Nakon završetka tretmana sam ih odvojio od podloge pomoću tripsina i brojao koristeći Bürker-Türk komoricu na svjetlosnom mikroskopu. Izračunao sam koliko stanične suspenzije moram uzeti kako bi imao milijun stanica po svakom tretmanu. Odvojenu količinu stanične suspenzije sam centrifugirao na 1250 rpm 5 minuta, zatim sam uklonio medij te ponovno centrifugirao u PBS-u. Potom sam PBS uklonio i stanice homogenizirao na ledu u puferu dobivenom s testom. Homogenizirane stanice centrifugirao sam 10 minuta na 800 g te potom odvojio po 100 μL supernatanta koji je u daljnjim koracima bio uzorak. U svaki sam uzorak dodao po 10 μL otopine za aktivaciju akonitaze, zatim inkubirao sve uzorke sat vremena na ledu. Po

završetku inkubacije uzorke sam nanio na pločicu s 96 bunarića. 50 µL uzorka dodao sam u bunariće u triplicatima te potom po 50 µL reakcijske smjese s potrebnim enzimima i supstratima pripremljene prema uputama proizvođača. Pločicu sam stavio na tresilicu jednu minutu kako bi se sadržaj bunarića dobro izmiješao, zatim ju inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u svaki sam bunarić dodao po 10 µL otopine za razvijanje reakcije i inkubirao pločicu 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije mjerio sam apsorbanciju pri 450 nm pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems). Očitanje je proporcionalno enzimskoj aktivnosti, odnosno količini nastalog izocitrata koja se računa iz standardne krivulje. Jedna jedinica aktivnosti akonitaze je količina enzima koja izomerizira 1 µmol citrata u izocitrat u minuti pri 7,4 pH i 25 °C. Rezultate sam izračunao prema formuli i normalizirao na ukupnu količinu proteina u uzorku

$$\text{Aktivnost akonitaze} \left( \frac{\text{mili U}}{\text{mL}} \right) = \frac{B \times \text{stupanj razrijeđenja uzorka}}{T \times V}$$

pri čemu su

B – količina (nmol) nastalog izocitrata

T – vrijeme inkubacije u minutama

V – količina uzorka dodana u bunarić (mL).

### 3.2.9. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze izmjerio sam pomoću komercijalno dostupnog testa *SOD Determination Kit (Sigma-Aldrich)* slijedeći upute proizvođača. Stanice sam uzgajao i tretirao u posudicama za staničnu kulturu. Nakon završetka tretmana sam ih odvojio pomoću tripsina i brojao koristeći Bürker-Türk komoricu na svjetlosnom mikroskopu. Izračunao sam koliko stanične suspenzije moram uzeti kako bih imao 2 milijuna stanica po svakom tretmanu. Odvojenu količinu stanične suspenzije sam centrifugirao na 1250 rpm 5 minuta, zatim uklonio medij te ponovno centrifugirao u PBS-u. PBS sam uklonio i stanice homogenizirao u puferu dobivenim s testom. Homogenizirane stanice sam centrifugirao 10 minuta na 14000 g te potom odvojio supernatant.

Potom sam na pločicu nanio uzorke prema Tablici 1.

Tablica 1. Raspored uzoraka na pločici pri mjerenju aktivnosti SOD

	Uzorak (μL)	SP1 (μL)	SP2 (μL)	SP3 (μL)
Supernatant (uzorak)	20	0	20	0
ddH <sub>2</sub> O	0	20	0	20
WST otopina	200	200	200	200
Enzimska otopina	20	20	0	0
Pufer za razrjeđenje	0	0	20	20

SP – slijepa proba

Pločicu sam inkubirao 20 minuta na 37 °C, zatim mjerio apsorbanciju na 450 nm pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems). Aktivnost SOD (postotak inhibicije) za svaki sam tretman izračunao prema formuli, te normalizirao prema sadržaju ukupnih proteina u uzorku.

$$SOD \text{ aktivnost (postotak inhibicije)} = \frac{(ASP1 - ASP3) - (Auzorak - ASP2)}{(ASP1 - ASP3)} \times 100$$

### 3.2.10. Mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7

Aktivnost kaspaza 3 i 7 izmjerio sam pomoću komercijalno dostupnog testa *Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)* slijedeći upute proizvođača. Test se temelji na luminiscenciji, kaspaze specifično cijepaju DEVD supstrat što dovodi do otpuštanja aminoluciferina koji je supstrat za luciferazu, stoga je intenzitet luminiscencije proporcionalan aktivnosti kaspaza.

Nakon što sam pločicu sa stanicama i reagense ekvilibrirao na sobnu temperaturu u svaki sam bunarić dodao po 80 μL reagensa *Caspase-Glo 3/7*. Pločicu sam potom stavio na tresilicu na 30 sekundi kako bi se stanice dobro lizirale. Nakon 90 minuta inkubacije luminiscenciju sam mjerio pomoću spektrofluorometra za mikropločice (Tecan, Salzburg, Austrija).

### **3.2.11. Određivanje apoptotskih i nekrotičnih stanica bojanjem s Hoechst 33342 i propidij jodidom**

Razliku između apoptotskih i nekrotičnih stanica najlakše je vizualizirati primjenom boja Hoechst 33342 (2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid trihidrat) i propidijevog jodida (PI). Hoechst 33342 plava je boja niske molekularne mase zbog čega može prolaziti staničnu membranu i vezati se za DNA. Apoptotske stanice imaju kondenzirani kromatin te su njihove jezgre intenzivno plavo obojane. PI emitira fluorescenciju crvene boje i velike je molekularne mase, stoga ne može proći intaktnu staničnu membranu. Prilikom nekroze dolazi do oštećenja stanične membrane, PI ulazi u stanice, interkalira se u DNK i boji jezgru crveno.

Stanice sam tretirao na pločici s 24 bunarića koji su sadržavali odgovarajuće koncentracije bakra i miricitrina u 500  $\mu$ L kompletiranog medija. Nakon 24 sata tretmana, u svaki sam bunarić dodao po 1,5  $\mu$ L otopine Hoechst 33342 i PI konačne koncentracije 1 mg/mL. Pločicu sam stavio na tresilicu na 5 minuta kako bi boja dobro difundirala kroz stanični medij u bunariću. Stanice sam fotografirao pomoću mikroskopa (EVOS Fluid Cell Imaging Station, Thermo Fisher Scientific).

### **3.2.12. Inhibitori signalnih puteva**

PARP i p53 važni su u odgovoru stanice na oksidacijsko oštećenje DNA. Koristio sam 5  $\mu$ M PJ34, PARP inhibitor, te 0,5  $\mu$ M pifitrin- $\alpha$ , inhibitor transkripcijske aktivnosti p53, kako bi vidio jesu li oni uključeni u stanični odgovor na oksidacijsko oštećenje nakon tretmana bakrom i miricitrinom.

Budući da su MAP kinaze često uključene u odgovor na stres u stanici i pokretanje stanične smrti ispitao sam utječu li inhibitori signalnih puteva MAP kinaza na preživljenje stanica. Koristio sam 10  $\mu$ M SB203580, inhibitor kinaze p38, 1  $\mu$ M UO126 koji je visoko selektivan inhibitor kinaze MEK1/2 koja fosforilira i aktivira kinaze ERK1/2, te 5  $\mu$ M SP600125 koji djeluje kao inhibitor kinaze JNK. Osim njih, istražio sam učinak 30 nM vortmanina, inhibitora kinaze PI3K koja je uzvodni aktivator kinaze Akt (PKB).

Ioni kalcija također mogu biti uključeni u pokretanje stanične smrti i neke signalne puteve, stoga sam istražio učinak nekoliko inhibitora koji moduliraju aktivnost proteina povezanih sa

signalizacijom kalcija: 10  $\mu$ M BAPTA-AM, kelator unutarstaničnih iona kalcija, 100  $\mu$ M MK-801, blokator kalcijevog kanalića N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat, 10  $\mu$ M nifedipin koji blokira kalcijeve kanale ovisne o naponu te 100  $\mu$ M leupeptin, inhibitor kalpaina, kalcijem aktiviranih proteaza.

Stanice sam tretirao na pločicama s 96 bunarića. Koristio sam najveću koncentraciju inhibitora koja sama po sebi nije uzrokovala razliku u preživljenju stanica tijekom tretmana, a otopine svih inhibitora sam pripremio u kompletiranom mediju. Kao kontrolu sam koristio netretirane stanice uzgojene u kompletiranom mediju. Nakon 24 sata preživljenja stanica sam odredio pomoću testa MTT. Uspoređivao sam preživljenje stanica tretiranih samo bakrom i/ili miricitrinom (0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 5, 10 i 20  $\mu$ g/mL miricitrin) s preživljenjem stanica koje su dodatno tretirane s jednim od inhibitora.

### 3.2.13. Određivanje koncentracije proteina

Ukupnu koncentraciju proteina u uzorcima izmjerio sam pomoću metode BCA (engl. *bicinchonic acid assay*). Temelji se na reakciji između proteina i bakar (II) iona. Bakar se u bazičnim uvjetima reducira u Cu<sup>+</sup> ion, a on tvori kompleks ljubičastog obojenja s bicinkoničnom kiselinom. Koncentracija proteina proporcionalna je jakosti obojenja.

Kako bih pripremio standardnu krivulju u pločicu s 96 bunarića prvo sam otpipetirao razrjeđenja BSA u re H<sub>2</sub>O, ukupnog volumena 20  $\mu$ L i 20  $\mu$ L reH<sub>2</sub>O kao negativnu kontrolu. Potom sam otpipetirao po 20  $\mu$ L uzoraka razrijeđenih 10 puta s reH<sub>2</sub>O, nanio sam ih u duplikatima. U svaki sam bunarić dodao 200  $\mu$ L radnog reagensa BCA koji se sastoji od otopine A (sadrži natrijev karbonat, natrijev hidrogenkarbonat, bicinkoničnu kiselinu i natrijev tartarat u 0,1 mol/L natrijevom hidroksidu) i otopine B (sadrži bakrov(II) sulfat (w = 4%)) u omjeru 50:1. Kako bi se uzorci dobro promiješali, pločicu sam stavio na tresilicu 1 min, zatim sam ju inkubirao 30 min pri 37 °C. Rezultate sam očitao spektrofotometrijski pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems). Izmjerio sam apsorbanciju na 570 nm.

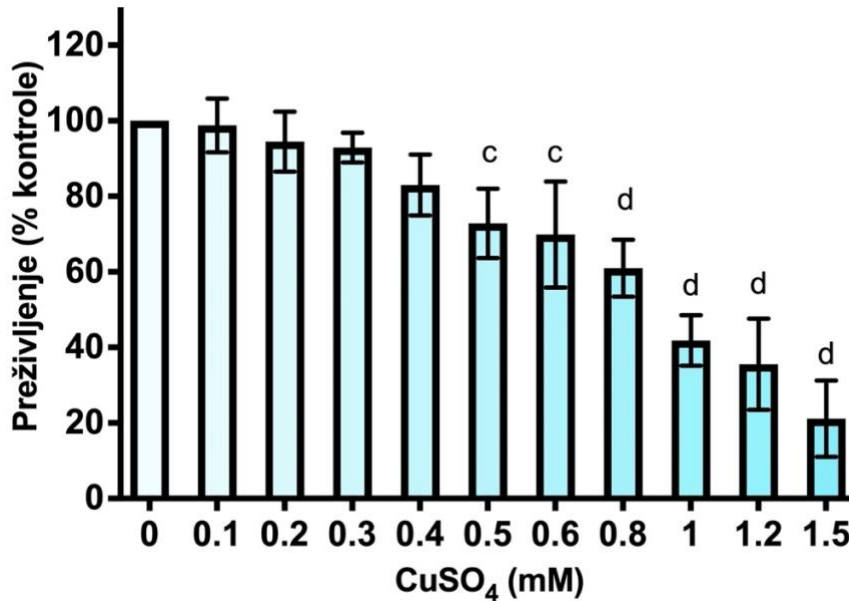
### 3.2.14. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka, kao i sve pripadajuće grafičke prikaze koristili smo program GraphPad Prism. Svi rezultati dobiveni su iz najmanje tri pokusa. Izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultate bojanja s Hoechstom 33342 i PI dobio sam manualnim prebrojavanjem stanica pomoću programa ImageJ. Za određivanje statističke značajnosti dobivenih rezultata koristio sam Student *t*-test (za usporedbu rezultata između dvije skupine) i jednostruku analizu varijance (ANOVA). Za usporedbu s kontrolnim uzorkom koristio sam Dunnettov test višestruke usporedbe, a za usporedbu vrijednosti više skupina Tukeyev test. Razlike srednjih vrijednosti po skupinama smatrao sam značajnima pri  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y nakon tretmana bakrom i miricitrinom

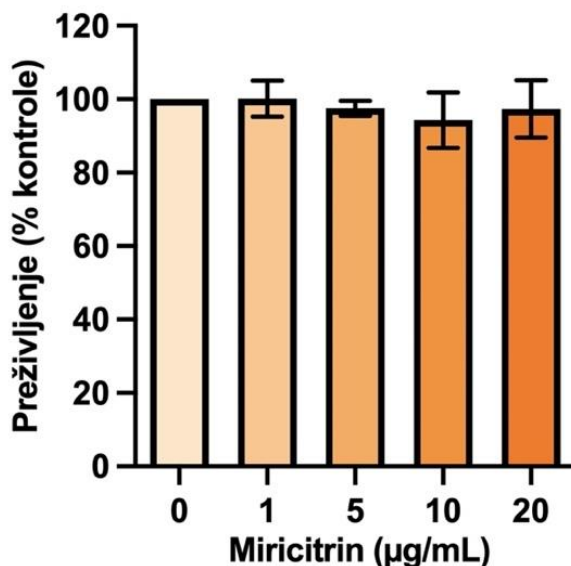
Na početku istraživanja odredio sam krivulju doza-odgovor stanica SH-SY5Y tretiranih rastućim koncentracijama  $\text{CuSO}_4$  tijekom 24 sata. Primjenom testa MTT utvrdio sam da tretman stanica s  $\text{CuSO}_4$  smanjuje preživljenje u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji (Dunnnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e; Slika 3). Najmanja je koncentracija koja je izazvala statistički značajno smanjenje preživljenja 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  i tu sam koncentraciju zbog svog umjerenog učinka na odumiranje stanica koristio za daljnja istraživanja učinka miricitrina u prisutnosti suviška iona bakra. Primjenom 0,5 mM koncentracije  $\text{CuSO}_4$  preživljenje je smanjeno na  $72,83 \pm 9,1$  % u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ).



**Slika 3.** Učinak bakra na preživljenje stanica SH-SY5Y. Stanice SH-SY5Y tretirao sam rastućim koncentracijama  $\text{CuSO}_4$  (0-1,5 mM) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana, preživljenje stanica odredio sam pomoću testa MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 4 neovisna pokusa provedena u triplicatu. <sup>c</sup> $p < 0,001$ , <sup>d</sup> $p < 0,0001$  u usporedbi s kontrolnom skupinom (Dunnnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e)

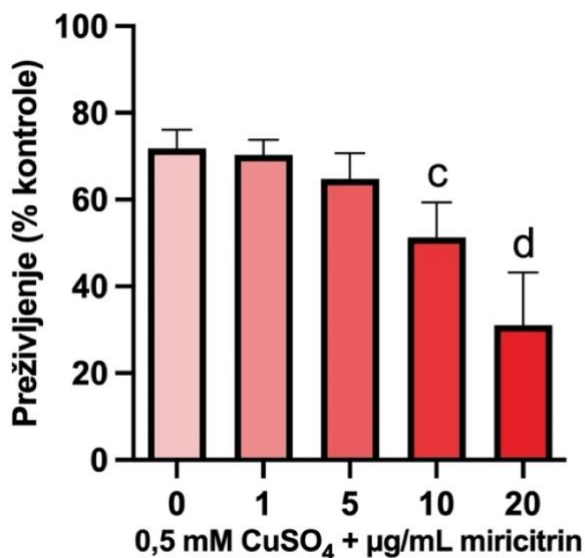


Učinak flavonoida miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog suviškom iona bakra ispitaio sam samo za one koncentracije miricitrina koje primijenjene samostalno nisu utjecale na vijabilnost stanica SH-SY5Y, odnosno u rasponu od 1-20  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 4)



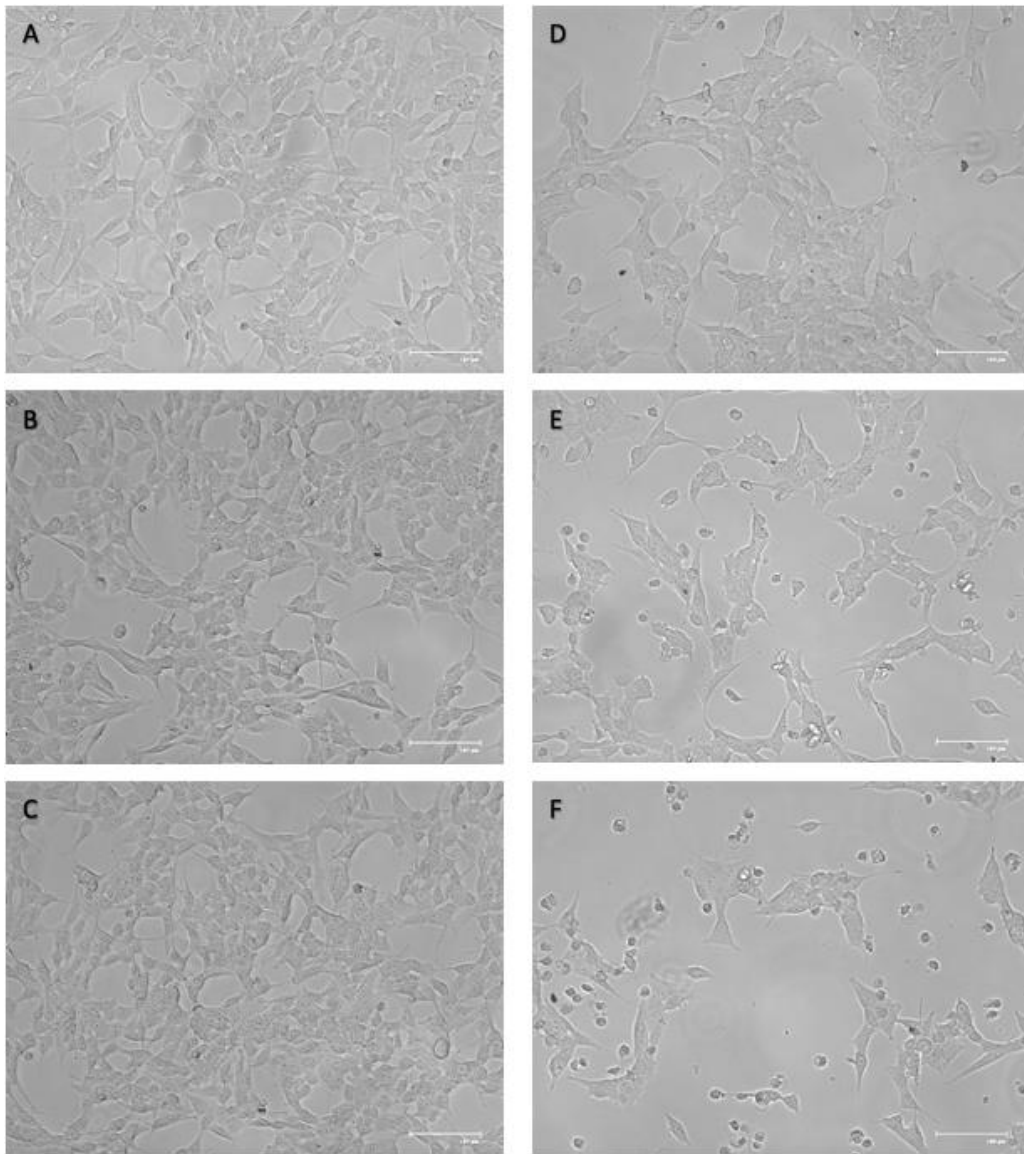
**Slika 4.** Učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija iz 5 neovisnih pokusa provedenih u triplicatu.

U stanicama SH-SY5Y koje su istovremeno tretirane bakrom i miricitrinom, miricitrin je povećao toksično djelovanje bakra. Kao što je prikazano na Slici 5, primjenom testa MTT utvrdio sam da 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  smanjuje preživljenje stanica na  $71,82 \pm 4,3 \%$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok su koncentracije miricitrina od 5, 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  smanjile preživljenje na 64,76 %, 51,30 % i 31,07 %, pri čemu je promjena nakon tretmana s 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina bila statistički značajna ( $p < 0,001$ , odnosno  $p < 0,0001$ ; Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e).



**Slika 5.** Učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti suviška bakra. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s rastućim koncentracijama miricitrina i 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana, preživljenje stanica je određeno pomoću testa MTT. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija srednje vrijednosti iz 6 neovisnih pokusa provedenih u triplikatu. <sup>c</sup>*p* < 0,001, <sup>d</sup>*p* < 0,0001 u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test).

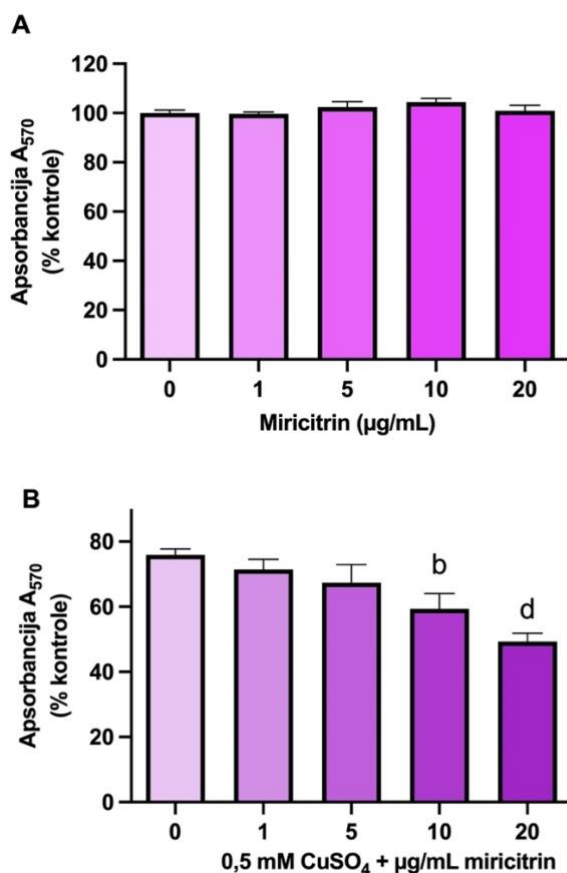
Toksični učinak miricitrina bio je vidljiv promatranjem stanica pod mikroskopom. Kao što je prikazano na Slici 6, u usporedbi s kontrolom, koncentracije od 10 i 20 µg/mL miricitrina nisu utjecale na preživljenje stanica. Prilikom tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> povećao se broj zaokruženih stanica te stanica koje plutaju u staničnom mediju, te smanjio ukupan broj stanica u vidnom polju. Broj okruglih i plutajućih stanica dodatno se povećao dodatkom 10 i 20 µg/mL miricitrina.



**Slika 6.** Morfološke promjene stanica SH-SY5Y nakon izlaganja bakru i miricitirnu. Prikazane su slike stanica nakon završetka tretmana dobivene na mikroskopu EVOS Flouid Cell Imaging System. Prikazane su stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima (A), stanice tretirane s 10 (B) i 20 (C) µg/mL miricitrina, stanice tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (D), te kombinirani tretman stanica s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 10 (E) i 20 (F) µg/mL miricitrina.

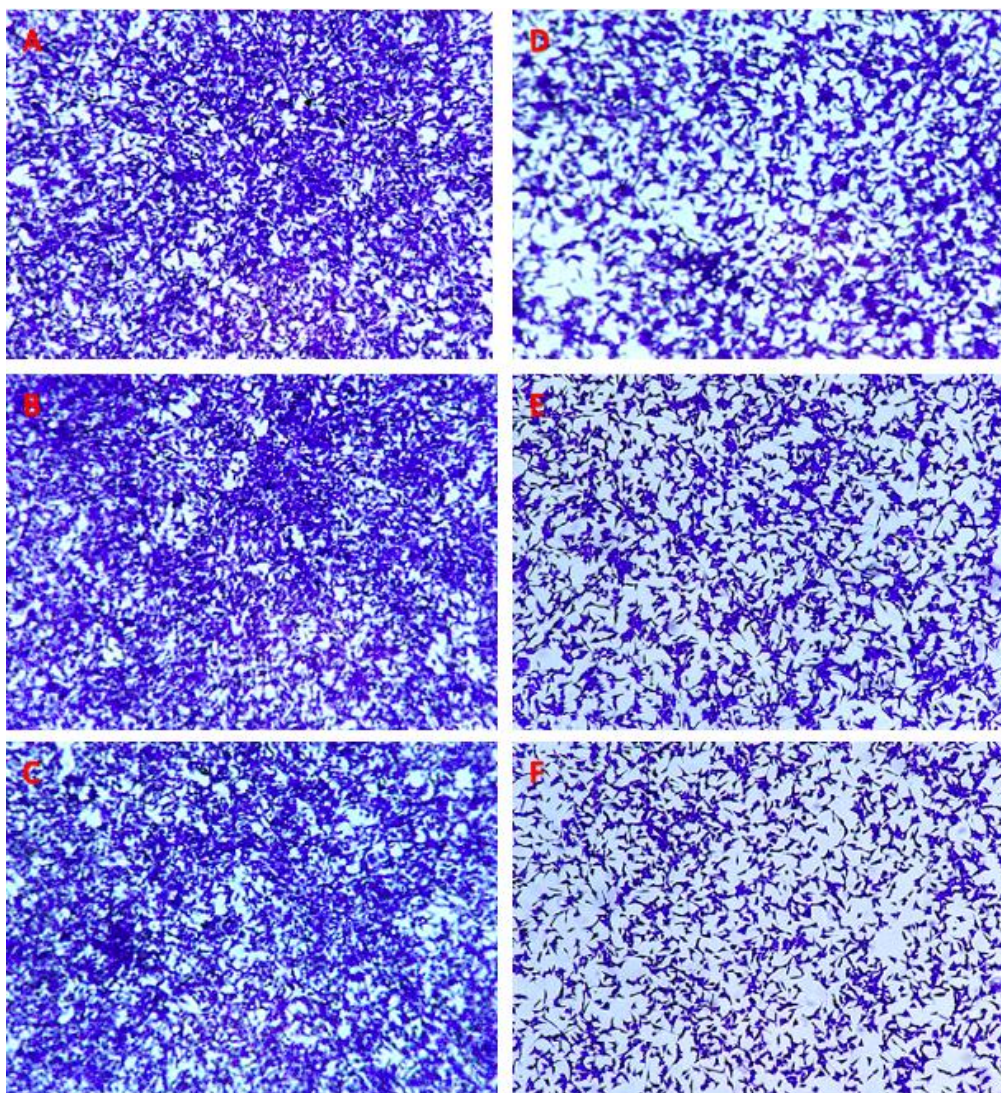
Osim pomoću testa MTT, toksični učinak miricitrina potvrdio sam bojanjem kristal violetom. Kvantifikacijom intenziteta bojanja također je utvrđeno da koncentracije miricitrina 10 i 20 µg/mL nemaju toksičnog djelovanja tijekom samostalne primjene, ali da pojačavaju toksične učinke

izazvane ionima bakra (Slika 7A i 7B). Toksični učinak vidljiv je i pod svjetlosnim mikroskopom (Slika 8).



**Slika 7.** Određivanje učinka miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti  $\text{CuSO}_4$  pomoću kristal violeta. Nakon završetka tretmana stanice su bojane kristal violetom. Kvantifikacija obojenja provedena je nakon otapanja u metanolu i određivanja apsorbancije na 570 nm. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija iz 3 neovisna pokusa provedena u duplikatu. U svim istraživanim koncentracijama (1, 5, 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$ ) tretman samim miricitrinom nije mijenjao preživljenje stanica (A), ali je u dvije najveće koncentracije pojačao toksične učinke tretmana s 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  (B). Slika C prikazuje fotografije stanica SH-SY5Y nakon bojanja kristal violetom. <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>d</sup> $p < 0,0001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test).

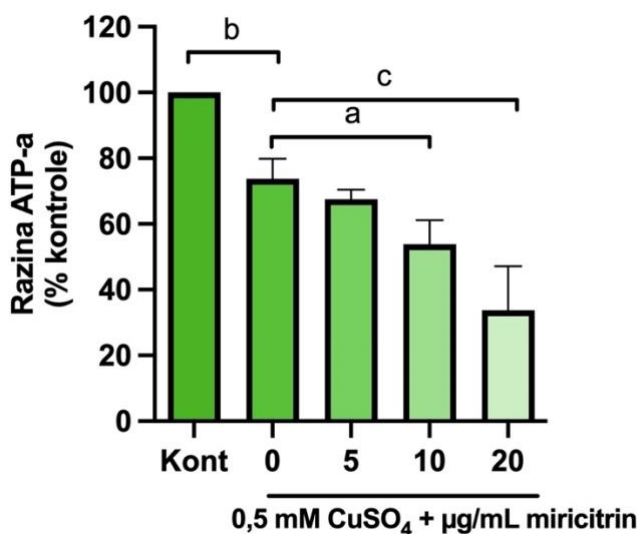




**Slika 8.** Stanice bojane kristal violetom. Prikazane su slike stanica nakon završetka tretmana slikane pod svjetlosnim mikroskopom. Prikazane su stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima (A), stanice tretirane s 10 (B) i 20 (C) µg/mL miricitrina, stanice tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (D), te kombinirani tretman stanica s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 10 (E) i 20 (F) µg/mL miricitrina.

Naposljetku, analizirao sam kako tretman bakrom i miricitrinom utječe na razinu unutarstaničnog ATP-a. Određivanje unutarstaničnog ATP-a smatra se pouzdanom metodom za procjenu preživljenja (Riss i sur. 2016). Tijekom oštećenja, stanice više ne mogu sintetizirati ATP, a stanične ATP-aze razgrađuju već stvoreni ATP pa je smanjenje ATP-a proporcionalno s oštećenjem stanica. Tretman s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> smanjio je razinu unutarstaničnog ATP-a na 73,7 % vrijednosti

izmjerene u kontrolnim stanicama ( $p < 0,01$ , Dunnett-ov test nakon jednosmjerne ANOVA-e), dok je u prisutnosti 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina ukupna količina unutarstaničnog ATP-a iznosila 53,8 %, odnosno 33,8 % vrijednosti u kontrolnim stanicama ( $p < 0,05$  za 10  $\mu\text{g/mL}$  miricitrin i  $p < 0,001$  za 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrin; jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test) (Slika 9)

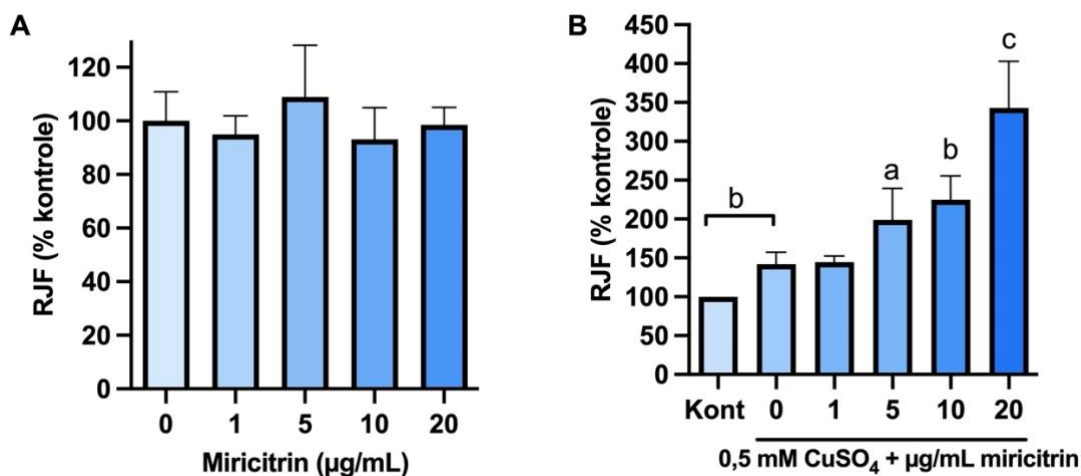


**Slika 9.** Razina ATP-a nakon tretmana bakrom i miricitrinom u stanicama SH-SY5Y. Nakon završetka tretmana s CuSO<sub>4</sub> (0,5 mM) i miricitrinom (5, 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$ ), odredio sam promjene u razinama unutarstaničnog ATP-a pomoću komercijalno dostupnog kompleta. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija iz 3 neovisna pokusa provedena u duplikatu. Miricitrin u koncentracijama 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  pojačava učinak bakra na smanjenje unutarstaničnog ATP-a. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,001$  (jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test).

#### 4.2. Učinak bakra i miricitrina na stvaranje RKV-a, omjer reduciranog i oksidiranog glutationa te aktivnost akonitaze i superoksid dismutaze

Budući da je toksični učinak bakra većinom posredovan porastom proizvodnje RKV-a i izazivanjem oksidacijskog stresa, analizirao sam učinak bakra i miricitrina na nakupljanje RKV-a u stanicama. Tretman stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> povećao je proizvodnju RKV-a za 41,9 % ( $p < 0,01$ , Student *t*-test). Iako miricitrin primijenjen samostalno (1-20  $\mu\text{g/mL}$ ) nije utjecao na nakupljanje RKV-a (Slika 10A), u prisutnosti bakra pokazao je prooksidacijsko djelovanje i povećao ukupnu količinu RKV-a u stanici. U usporedbi s kontrolnom skupinom, povećanje

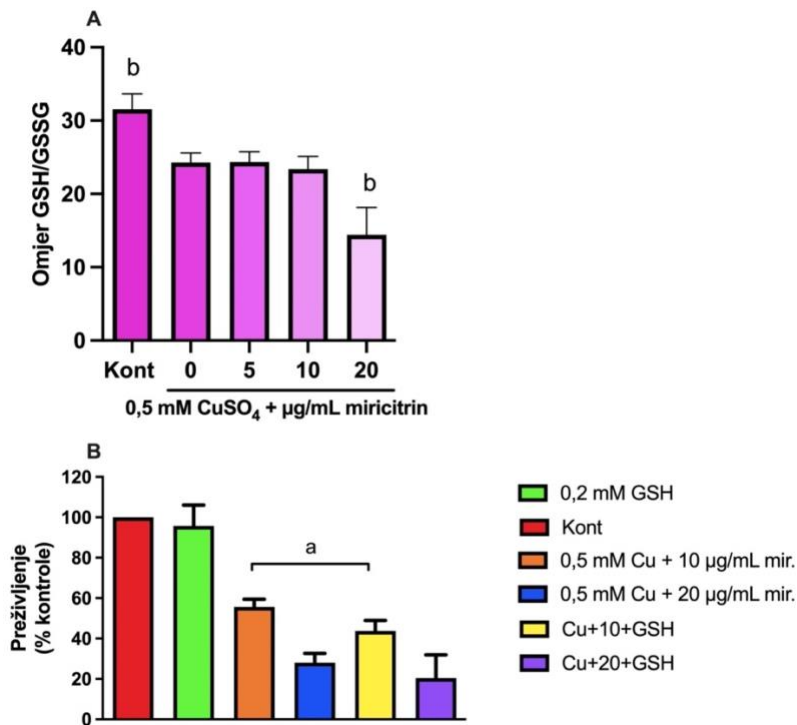
proizvodnje RKV-a u stanicama koje su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 5, 10 i 20 µg/mL miricitrina iznosilo je redom 98,8 % ( $p < 0,05$ ), 124,9 % ( $p < 0,01$ ) i 242,8 % ( $p < 0,001$ , Slika 10B).



**Slika 10.** Učinak miricitrina na proizvodnju RKV-a. Stanice SH-SY5Y tretirane su s 1-20 µg/mL miricitrina samostalno (A) te u prisutnosti 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (B). Nakon 24 sata tretmana količina RKV-a u stanicama određena je pomoću 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetata. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija iz 3 (A) ili 4 (B) neovisna pokusa provedena u kvadrilikatu. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (Student *t*-test).

U nastavku istraživanja odredio sam omjer reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) glutationa. Reducirani glutation ima vrlo važnu ulogu kao ključni hvatač unutarstaničnih RKV-a, a njegov omjer s GSSG često se koristi kao marker oksidacijskog stresa. Tretman stanica s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> smanjio je omjer GSH/GSSG s 31,5 na 24,3 što je promjena od 22,9 %. Dodatno smanjenje omjera GSH/GSSG izazvao je tretman s 20 µg/mL miricitrina. U stanicama tretiranim s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 20 µg/mL miricitrina, omjer reduciranog i oksidiranog glutationa iznosio je 14,4 (Slika 11A). Potom sam odredio utječe li egzogeni dodatak GSH na preživljenje stanica. Tretman sam proveo dodatkom 0,2 mM GSH koji primijenjen samostalno nije modificirao preživljenje stanica. Kao što je prikazano na Slici 11B, kod stanica koje su istovremeno tretirane s 0,2 mM GSH i 10 µg/mL miricitrina, preživljenje je smanjeno s 55,6 % na 43,7 % ( $p < 0,5$ ; Student *t*-test). Pri većoj koncentraciji miricitrina, dodatak GSH nije imao učinka.

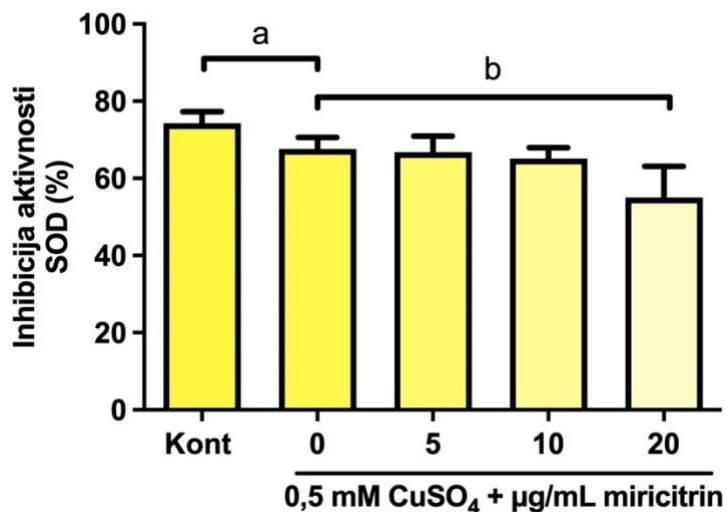




**Slika 11.** Učinak miricitrina i bakra na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (A). Nakon tretmana stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 5-20 μg/mL miricitrina odredio sam omjer reduciranog i oksidiranog glutationa pomoću komercijalnog kompleta (GSH/GSSG-Glo™ Assay, Promega). Tretman bakrom smanjio je omjer GSH/GSSG i to je smanjenje dodatno povećano kod istovremenog tretmana s 20 μg/mL miricitrina. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 3 neovisna pokusa provedena u triplikatu. <sup>b</sup>*p* < 0,01 u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e). Potom sam izmjerio učinak egzogeno dodanog GSH na preživljenje stanica (B). Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 ili 20 μg/mL miricitrina te 0,2 mM GSH. Po završetku tretmana preživljenje stanica analizirao sam metodom MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 4 neovisna pokusa provedena u triplikatu. <sup>a</sup>*p* < 0,05 (Student *t*-test).

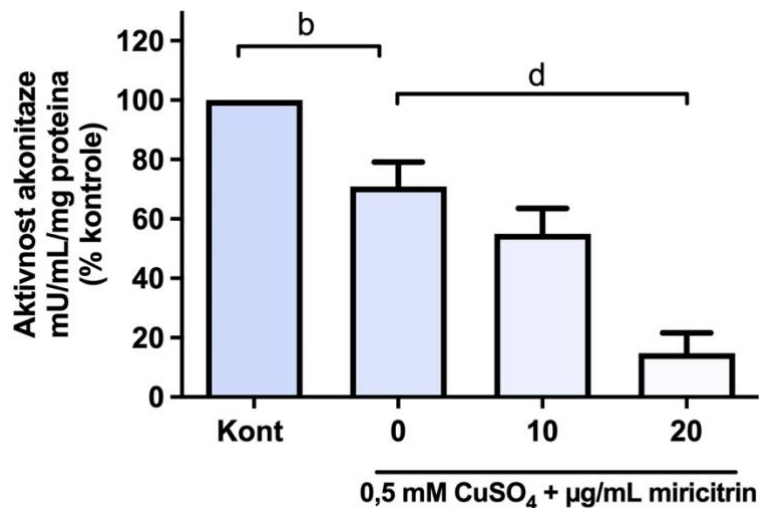
Potom sam odredio kako tretman bakrom i miricitrinom utječe na aktivnost enzima akonitaze i SOD-e. SOD je antioksidacijski enzim koji ima značajnu ulogu u sprječavanju oksidacijskog oštećenja. Nakon tretmana stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> došlo je do smanjenja njene aktivnosti sa 74,32 % na 67,61 %. Dodatak miricitrina u koncentraciji 20 μg/mL izazvao je daljnje smanjenje aktivnosti na 55,03 % (Slika 12).





**Slika 12.** Učinak bakra i miricitrina na aktivnost superoksid dismutaze. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, te 5, 10 ili 20 µg/mL miricitrina tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana aktivnost SOD-e je određena pomoću komercijalnog testa. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 4 neovisna eksperimenta. <sup>a</sup>*p* < 0,05, <sup>b</sup>*p* < 0,01 (Dunnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

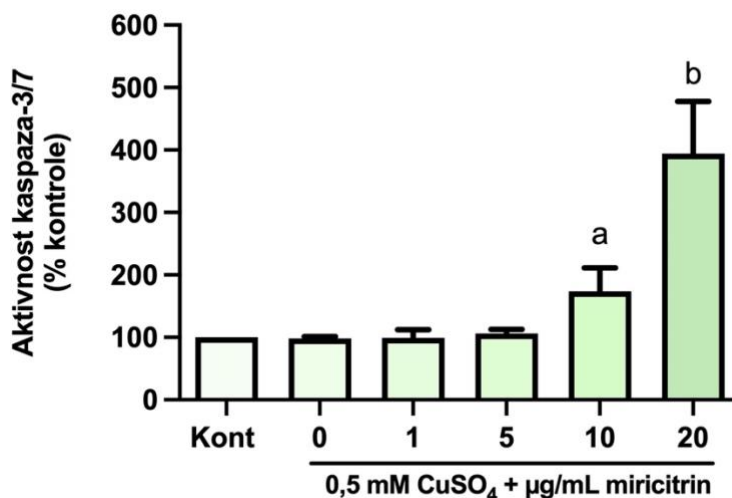
Akonitaza je prisutna u citoplazmi i mitohondrijima, osjetljiva je na oksidacijsko oštećenje i njena inaktivacija često se koristi kao pokazatelj oksidacijskog stresa. Na Slici 13 prikazano je da tretman stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> inaktivira akonitaze za 29,1 % (*p* < 0,01), dok je tretman s 10 i 20 µg/mL miricitrina izazvao daljnje smanjenje aktivnosti na 55,0% (promjena bez statističke značajnosti), odnosno 14,8 % aktivnosti izmjerene u kontrolnoj skupini (*p* < 0,0001, jednosmjerna ANOVA, Dunnett-ov test).



**Slika 13.** Učinak bakra i miricitrina na aktivnost akonitaze. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, te 10 ili 20 µg/mL miricitrina tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana aktivnost citoplazmatske akonitaze je određena pomoću komercijalnog testa. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 3 neovisna eksperimenta. <sup>b</sup>*p* < 0,01, <sup>d</sup>*p* < 0,0001 (Dunnnett-ov test višestruke usporedbe nakon jednosmjernje ANOVA-e).

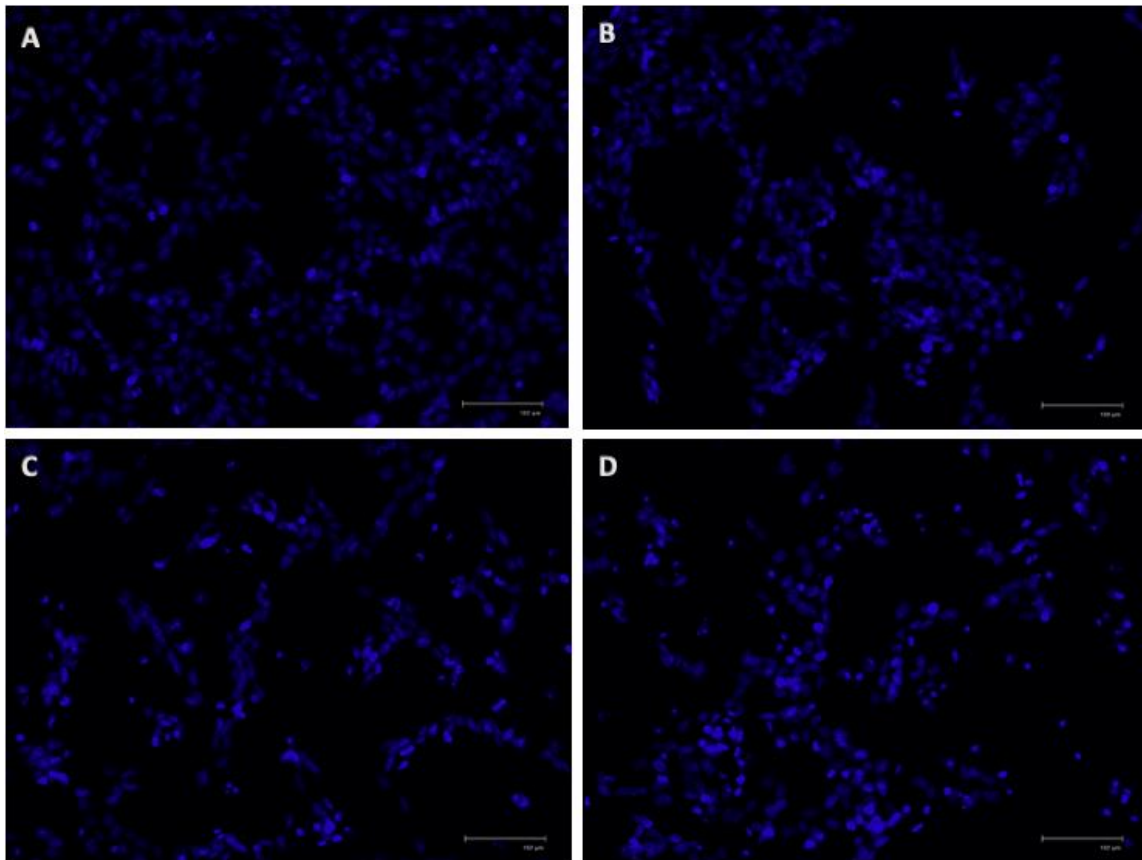
#### 4.3. Učinak bakra i miricitrina na aktivaciju kaspaza i kondenzaciju kromatina

Budući da stanje oksidacijskog stresa može izazvati različite oblike stanične smrti, ovisno o aktivaciji unutarstaničnih signalnih puteva i intenzitetu oštećenja, u nastavku istraživanja pokušao sam utvrditi dolazi li do odumiranja stanica SH-SY5Y nakon tretmana bakrom i miricitrinom procesima apoptoze i nekroze. Apoptoza kao oblik programirane stanične smrti može biti ovisna ili neovisna o aktivaciji kaspaza, ali je u oba slučaja popraćena nuklearnim promjenama tj. kondenzacijom kromatina. Budući da su kaspaze 3 i 7 glavni medijatori klasične apoptoze, izmjerio sam njihovu aktivaciju nakon tretmana bakrom i miricitrinom (Slika 14). Nakon tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> aktivnost kaspaza bila je jednaka kao i u kontrolnoj skupini. Dodatkom miricitrina, porast aktivacije kaspaza 3 i 7 izmjeren je za koncentraciju 10 µg/mL (74 %), kao i za 20 µg/mL (294 %).

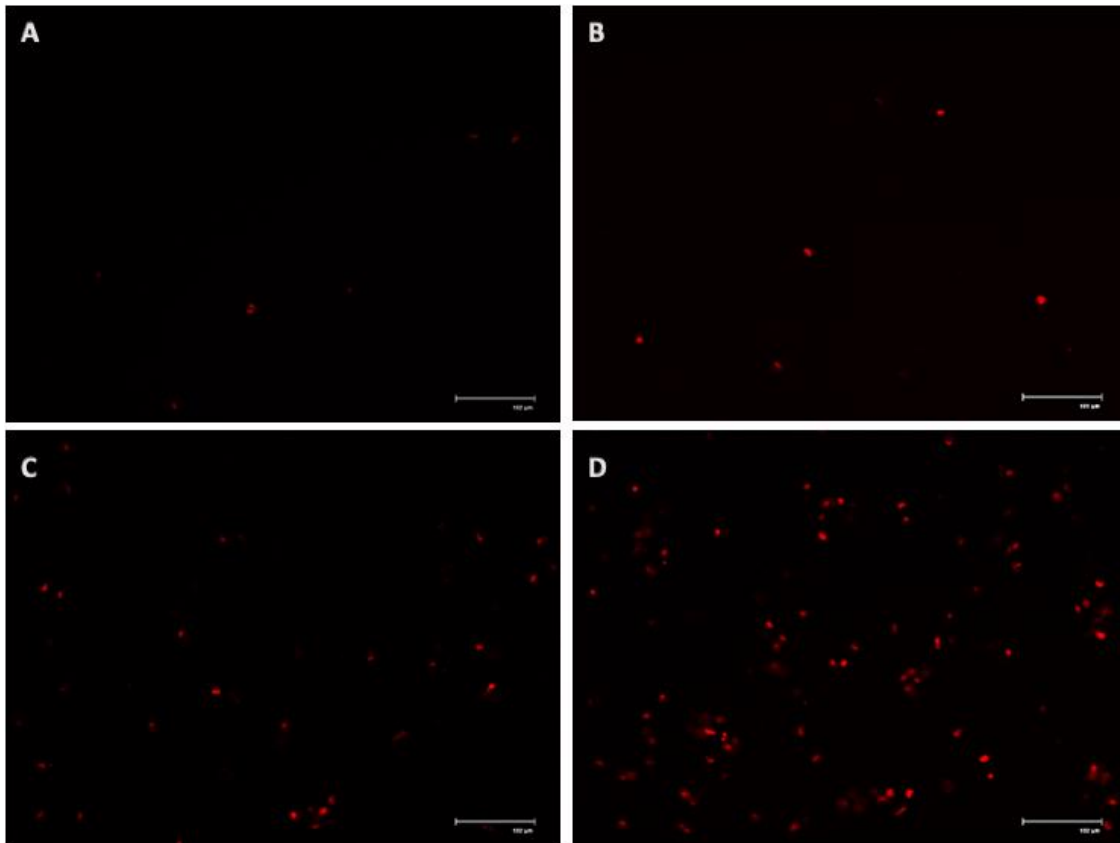


**Slika 14.** Učinak bakra i miricitrina na aktivnost kaspaza 3 i 7. Nakon tretmana stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i miricitrinom (1-20 µg/mL), aktivnost kaspaza 3 i 7 izmjerena je pomoću komercijalnog testa. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija iz 3 neovisna mjerenja provedena u triplikatu. <sup>a</sup>*p* < 0,05, <sup>b</sup>*p* < 0,01 u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (Student *t*-test).

Promjene u kondenzaciji kromatina pratio sam bojanjem s fluorescentnom bojom Hoechst 33342. Istovremeni tretman stanica s bakrom i miricitrinom povećao je broj jezgara s kondenzacijom kromatina (Slika 15). Također, stanice sam nakon tretmana bojava i s PI. PI je fluorescentna boja koja se interkalira u DNA onih stanica koje su u kasnim fazama apoptoze ili koje odumiru nekrozom, a njihov je broj također bio najveći pri kombiniranom tretmanu s bakrom i miricitrinom (Slika 16).

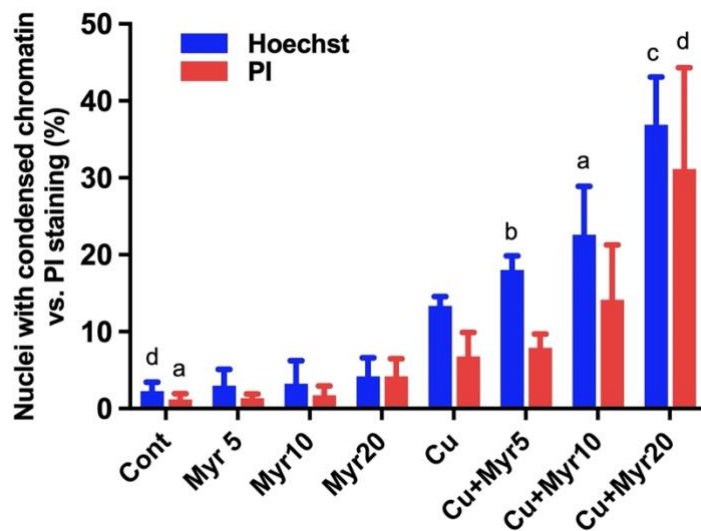


**Slika 15.** Jezgre stanica SH-SY5Y obojene s fluorescentnom bojom Hoechst 33342. Prikazane su slike dobivene nakon završetka tretmana na mikroskopu EVOS Fluid Cell Imaging System u fiziološkim uvjetima (A), u stanicama tretiranim s 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  (B), te kombinirani tretman s 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  i 10 (C) i 20 (D)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  miricitrina.



**Slika 16.** Jezgre stanica SH-SY5Y obojene s propidijevim jodidom. Prikazane su slike dobivene nakon završetka tretmana na mikroskopu EVOS Fluid Cell Imaging System u fiziološkim uvjetima (A), u stanicama tretiranim s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (B), te kombinirani tretman stanica s CuSO<sub>4</sub> i 10 (C) i 20 (D) µg/mL miricitrina.

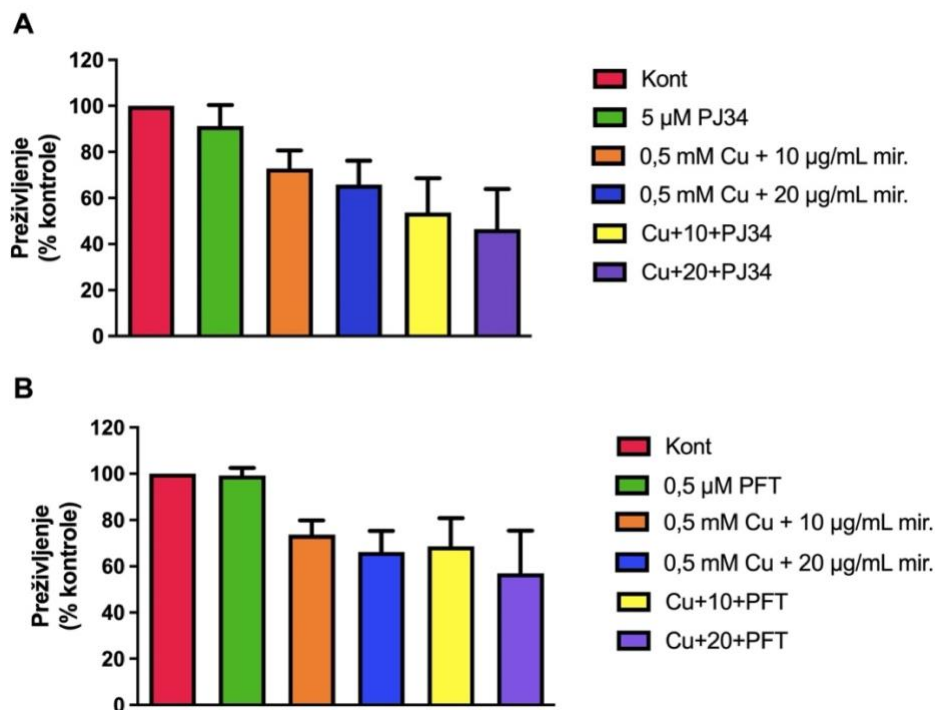
Na slici 17 prikazan je učinak bakra i miricitrina na apoptotske i nekrotične promjene u stanicama SH-SY5Y. Broj jezgri s kondenzacijom kromatina povećan je s 2,26 % na 13,35 % nakon tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>. Istovremeni tretman s 5, 10 i 20 µg/mL miricitrina povećao je njihov udio na 18,02 %, 22,59 % te 36,9 %. Tretman bakrom također je povećao udio jezgri obojenih s PI , a njihov je broj dodatno povećan prilikom istovremenog tretmana s 20 µg/mL miricitrina.



**Slika 17.** Učinak tretmana bakrom i miricitrinom na apoptotske i nekrotične promjene u stanicama SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija srednje vrijednosti iz dva neovisna pokusa u biološkom duplikatu. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,001$ , <sup>d</sup> $p < 0,0001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim samo bakrom (Student *t*-test).

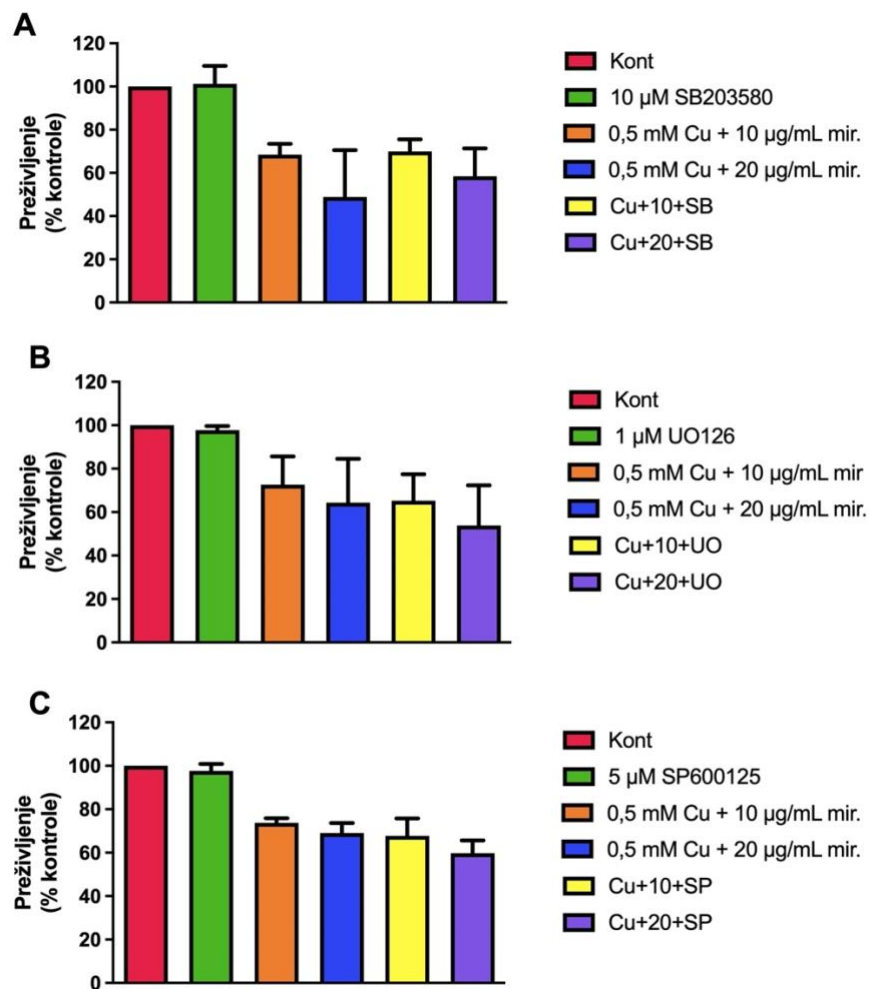
#### 4.4. Učinak bakra i miricitrina na aktivaciju signalnih puteva povezanih s odgovorom na oksidacijski stres i pokretanje stanične smrti

U zadnjem dijelu istraživanja, primjenom specifičnih inhibitora pojedinih signalnih puteva koji su uključeni u odgovor na oksidacijski stres i preživljenje stanice, pokušao sam utvrditi molekularne mehanizme u podlozi neurotoksičnog djelovanja miricitrina u uvjetima bakrom izazvanog oksidacijskog stresa. Proteini PARP i p53 važni su u odgovoru stanice na oksidacijsko oštećenje DNA. Primjena PARP inhibitora VIII (PJ34) neznatno je pojačala toksični učinak 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno (Slika 18A). Primjena pifitrina- $\alpha$ , inhibitora transkripcijske aktivnosti p53, također nije utjecala na preživljenje stanica tretiranih bakrom i miricitrinom (Slika 18B).



**Slika 18.** Učinak PARP inhibitora VIII (PJ34) i pifitrina- $\alpha$  na toksični učinak miricitrina u prisutnosti iona bakra. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 ili 20  $\mu$ g/mL miricitrina te 5  $\mu$ M PJ34 (A) ili 0,5  $\mu$ M pifitriinom- $\alpha$  (B). Po završetku tretmana preživljenje stanica analizirano je metodom MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 4 neovisna pokusa provedena u triplikatu.

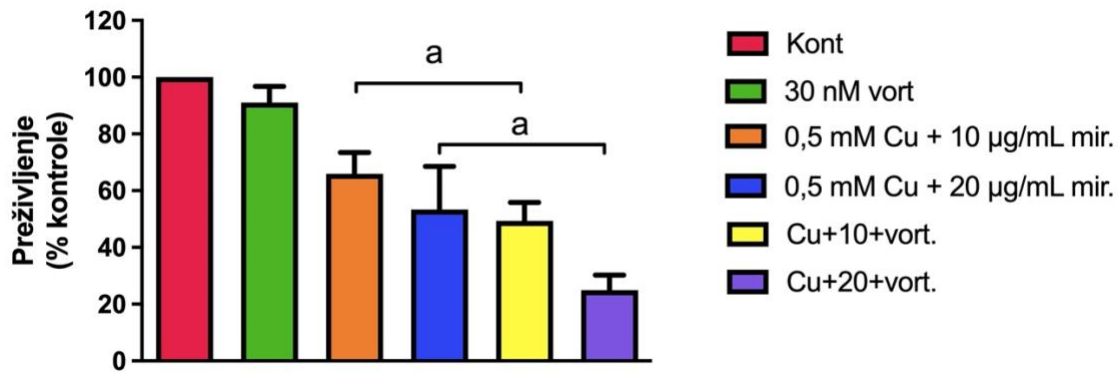
Nakon toga sam provjerio utječu li inhibitori signalnih puteva MAP kinaza na preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i miricitrinom (10 i 20  $\mu$ g/mL) budući da su te kinaze često uključene u odgovor na okolišne stresore i pokretanje stanične smrti. Koristio sam SB203580, inhibitor kinaze p38, UO126 koji je visoko selektivan inhibitor kinaze MEK1/2 koja fosforilira i aktivira kinaze ERK1/2, te SP600125 koji djeluje kao inhibitor kinaze JNK. Na temelju analize pomoću jednosmjerne ANOVA-e i Tukey testa višestruke usporedbe, niti jedan od ovih inhibitora nije utjecao na preživljenje stanica SH-SY5Y koje su tretirane bakrom i miricitrinom (Slika 19).



**Slika 19.** Učinak inhibitora MAP kinaza na toksični učinak miricitrina u prisutnosti iona bakra. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 ili 20  $\mu$ g/mL miricitrina te 10  $\mu$ M SB203580 (A), 1  $\mu$ M UO126 (B) ili 5  $\mu$ M SP600125 (C). Po završetku tretmana preživljenje stanica analizirano je metodom MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena u triplikatu.

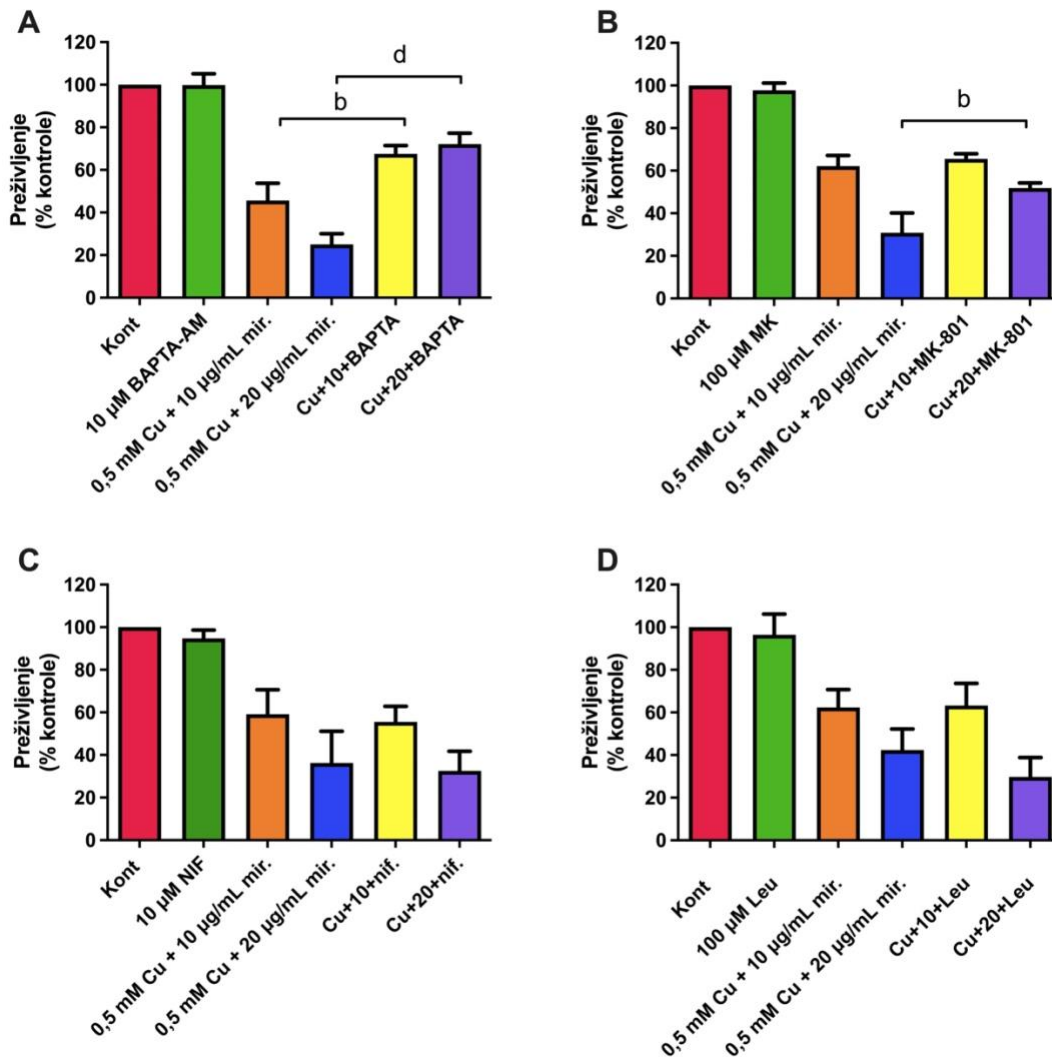
Nakon toga sam istražio učinak vortmanina, inhibitora kinaze PI3K koja je uzvodno od kinaze Akt (PKB). Primjena vortmanina (30 nM) dodatno je pojačala toksični učinak tretmana s bakrom i obje koncentracije miricitrina (10 i 20  $\mu$ g/mL) (Slika 20,  $p < 0,05$ , Student  $t$ -test). Preživljenje je smanjeno s 65,9 % na 49,4 % nakon tretmana stanica SH-SY5Y s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 10  $\mu$ g/mL miricitrina, odnosno s 53,4 % na 25,0% nakon tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 20  $\mu$ g/mL miricitrina.





**Slika 20.** Učinak vortmanina na toksični učinak miricitrina u prisutnosti iona bakra. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 ili 20 µg/mL miricitrina te 30 nM vortmaninom. Po završetku tretmana preživljenje stanica analizirano je metodom MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz 3 neovisna pokusa provedena u triplikatu. <sup>a</sup>*p* < 0,05 (Student *t*-test).

Budući da ioni kalcija mogu biti uključeni u aktivaciju signalnih puteva i pokretanje stanične smrti, istražio sam učinak nekoliko inhibitora koji moduliraju aktivnost proteina povezanih sa signalizacijom kalcija. BAPTA-AM je za stanice propusan kelator iona kalcija koji na sebe veže unutarstanične ione Ca<sup>2+</sup>. Primjena BAPTA-AM smanjila je toksični učinak nakon miricitrina (Slika 21A). U prisutnosti BAPTA-AM, preživljenje stanica SH-SY5Y je povećano s 45,6 % na 67,6 % kod tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 10 µg/mL miricitrina (*p* < 0,01), odnosno s 25,0 % na 72,2 % prilikom tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 20 µg/mL miricitrina (*p* < 0,0001). Nakon toga sam koristio inhibitore MK-801, koji blokira prolazak iona kalcija kroz N-metil-D-aspartat receptore za glutamat, i nifedipin, koji blokira kalcijeve kanale ovisne o naponu (L tip). MK-801 pokazao je protektivno djelovanje kod tretmana s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i 20 µg/mL miricitrina (Slika 21B), dok je 10 µM nifedipin bio bez učinka kod obje koncentracije miricitrina (Slika 21C). Preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti 100 µM MK-801 povećano je s 30,8 % na 51,9 % (*p* < 0,01, Tukey test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e). Naposljetku, istražio sam utječe li leupeptin na preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih bakrom i miricitrinom. Leupeptin je inhibitor kalpaina, proteaza koje su aktivirane ionima kalcija i potiču staničnu smrt. Međutim, dodatak 100 µM leupeptina nije utjecao na preživljenje stanica SH-SY5Y koje su istovremeno tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> i miricitrinom (Slika 21D).



**Slika 21.** Učinak BAPTA-AM, MK-801, nifedipina i leupeptina na toksični učinak miricitrina u prisutnosti iona bakra. Stanice SH-SY5Y istovremeno su tretirane s 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 ili 20  $\mu$ g/mL miricitrina te 10  $\mu$ M BAPTA-AM (A), 100  $\mu$ M MK-801 (B), 10  $\mu$ M nifedipinom (C) i 100  $\mu$ M leupeptinom (D). Po završetku tretmana preživljenje stanica analizirano je metodom MTT. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena u triplikatu. <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>d</sup> $p < 0,0001$  (Tukey test višestruke usporedbe nakon jednosmjerne ANOVA-e).

## 5. RASPRAVA

U fiziološkim su koncentracijama RKV-e važne za normalnu kognitivnu funkciju i sinaptičku plastičnost u središnjem živčanom sustavu (Massaad i Klann 2011) te je njihova količina precizno regulirana sustavom antioksidacijske zaštite. U slučaju prekomjernog stvaranja i nakupljanja RKV-a dolazi do iscrpljivanja antioksidansa i stanja oksidacijskog stresa (Krumova i Cosa 2016). Dugotrajna izloženost oksidacijskom stresu može dovesti do lipidne peroksidacije, narušavanja strukture i funkcije staničnih proteina i oštećenja DNA, te u konačnici prestanka normalnog funkcioniranja neurona.

Aktivno se radi na otkrivanju i sintezi učinkovitih lijekova koji bi mogli ublažiti simptome, usporiti napredak ili čak spriječiti progresiju neurodegenerativnih bolesti budući da trenutačne terapije nisu adekvatne već samo usmjerene na ublažavanje simptoma bolesti (Poddar i sur. 2021). Brojna istraživanja okrenuta su proučavanju prirodnih spojeva kao potencijalnih terapeutika. Tu se osobito ističu flavonoidi, vrlo raznolika skupina sekundarnih biljnih metabolita koje u organizam primarno unosimo prehranom. Imaju dugačak niz fiziološki povoljnih učinaka, među kojima je i antioksidacijski (Maher 2019). Miricitrin je flavonoid iz skupine flavonola s utvrđenim antioksidacijskim, kao i neuroprotektivnim djelovanjem (Wang i sur. 2014b; Gong i sur. 2019; Yang i sur. 2019). U našem istraživanju, na stanicama SH-SY5Y, miricitrin samostalno primijenjen u koncentracijama do 20 µg/mL nije utjecao na preživljenje stanica SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima. Stoga su te koncentracije korištene u daljnjim eksperimentima za proučavanje njegovih učinaka u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog suviškom iona bakra.

Dosadašnja istraživanja upućuju na doprinos promijenjene homeostaze metala, uključujući i iona bakra, na nastanak oksidacijskog stresa u različitim neurodegenerativnim oboljenjima. Primjenom sve većih koncentracija bakra na stanicama SH-SY5Y očekivano je došlo do značajnog pada preživljenja (Slika 3). Najmanja koncentracija koja je imala značajan neurotoksičan učinak, a ujedno i koncentracija koja je korištena u nastavku istraživanja, bila je 0,5 mM, što otprilike odgovara koncentraciji pronađenoj u amiloidnim plakovima oboljelih od Alzheimerove bolesti (0,4 mM) (Dong i sur. 2003).

Suprotno očekivanjima i postavljenoj hipotezi, u stanicama SH-SY5Y tretiranim i bakrom i miricitrinom, nije došlo do očekivanog porasta preživljenja stanica, već do dodatnog smanjenja preživljenja (Slika 5). Pad preživljenja utvrđen je za dvije najveće koncentracije miricitrina (10 i 20

$\mu\text{g/mL}$ ). Pad preživljenja potvrđen je testom MTT i bojanjem kristal violetom (Slike 5 i 7). Dodatni pokazatelj vijabilnosti stanica je koncentracija unutarstaničnog ATP-a. Na oksidacijski stres u stanicama su osobito osjetljivi mitohondriji koji su glavno mjesto sinteze ATP-e. Stoga u uvjetima oksidacijskog stresa stanica ne može učinkovito sintetizirati ATP, dok istovremeno stanične ATP-aze razgrađuju već sintetizirani ATP što dovodi do njegovog iscrpljenja (Teepker i sur. 2007). Budući da je toksični učinak bakra uglavnom posljedica povećane proizvodnje RKV-a i time izazivanja oksidacijskog stresa, ovi rezultati upućuju na prooksidativno djelovanje miricitrina u kombinaciji s bakrom. Istraživanje Azmi i sur. (2006) pokazalo je da polifenoli, poput resveratrola, djeluju prooksidacijski u prisutnosti iona bakra. Slično tome, pokazano je da flavonoli miricetin (Sadžak i sur. 2021) i kvercetin (Zubčić i sur. 2020b) te propolis, koji sadrži različite flavonoide (Radovanović i sur. 2019), mogu djelovati neurotoksično u prisutnosti iona bakra, te da je neurotoksično djelovanje bilo popraćeno povećanom proizvodnjom RKV-a i izraženijim stanjem oksidacijskog stresa.

Stanje oksidacijskog stresa u stanicama SH-SY5Y dokazano je mjerenjem količine RKV-a, omjera reduciranog i oksidiranog glutationa te mjerenjem aktivnosti akonitaze i SOD-e. Tretman bakrom značajno je povišio količinu RKV-a u usporedbi s kontrolnim stanicama, a dodatna povećanja izazvana su nakon tretmana s bakrom i miricitrinom u koncentracijama 5, 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 10). Koncentracija miricitrina od 5  $\mu\text{g/mL}$  izazvala je statistički značajno povišenje RKV-a, ali ne i smanjenje preživljenja stanica. Mogući je razlog što su unutar 24 sata, koliko su trajali tretmani u svim eksperimentima, stanice izložene bakru i 5  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina još uvijek relativno uspješne u neutralizaciji i odstranjenju RKV-a zahvaljujući tome što nije došlo do značajnijeg iscrpljenja antioksidacijskih obrambenih mehanizama. Dodatni je indikator oksidacijskog stresa omjer GSH/GSSG. Glutacion je najvažniji unutarstanični antioksidans. U zdravim se stanicama pojavljuje uglavnom u reduciranom obliku (GSH) koji je ključan za antioksidacijsku obranu. Prilikom izloženosti stanice oksidacijskom stresu dolazi do iscrpljenja GSH, a raste udio njegovog oksidiranog oblika (GSSG) te pada omjer GSH/GSSG (Chai i sur. 1994). Pad omjera GSH/GSSG nakon tretiranja stanica 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$ , te potom dodatan pad u stanicama tretiranim bakrom i miricitrinom, dodatno ukazuje da bakar dovodi do oksidacijskog stresa i iscrpljenja GSH, te da miricetin djeluje prooksidativno u prisutnosti iona bakra (Slika 11A). Iscrpljenje GSH zabilježili su i Sadžak i sur. (2021) u stanicama SH-SY5Y pri tretmanu s bakrom i miricetinom. Egzogeno dodani GSH smanjio je preživljenje stanica u stanicama tretiranim s bakrom i 10  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina,

a sličan trend je uočen i kod stanica tretiranih s 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina (Slika 11B). U uvjetima suviška bakra pokazalo se da GSH tvori Cu(I)-GSH komplekse s bakrom (Borchard i sur. 2018). Ti kompleksi mogu djelovati prooksidativno jer lako stvaraju superoksidne radikale (Speisky i sur. 2008). Lakša dostupnost GSH za stvaranje kompleksa nakon dodatka egzogenog GSH potencijalno je objašnjenje pojačanog smanjenja preživljenja nakon dodatka ovog antioksidansa.

SOD ima ključnu ulogu u sprječavanju oksidacijskog oštećenja neutraliziranjem superoksidnih aniona i njezina je aktivnost vrlo često smanjena u uvjetima oksidacijskog stresa (Wang i sur. 2018). U stanicama tretiranim s bakrom i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina došlo je do pada aktivnosti ovog enzima (Slika 12). To upućuje na iscrpljenje endogenih antioksidacijskih mehanizama zaštite te vjerojatno doprinosi značajnijem oksidacijskom oštećenju koje u konačnici korelira sa značajnim padom preživljenja. Akonitaza je Fe-S protein koji katalizira reverzibilnu pretvorbu citrata u izocitrat. Osjetljiva je na oksidacijski stres pri kojem dolazi do njezine inaktivacije, stoga se mjerenje njezine aktivnosti često koristi kao biljeg oksidacijskog stresa. Štoviše, pokazalo se da akonitaza u uvjetima oksidacijskog stresa otpušta slobodne ione željeza koji mogu katalizirati nastajanje hidroksilnih radikala sudjelovanjem u Fentonovoj reakciji (Vásquez-Vivar i sur. 2000). Smanjena aktivnost akonitaze uočena je u Parkinsonovoj bolesti (Liang i Patel 2004). U ovom istraživanju značajan pad aktivnosti akonitaze izmjeren je u stanicama tretiranim bakrom, te ponovo snažan pad aktivnosti u stanicama tretiranim s bakrom i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina (Slika 13). Ovaj rezultat također potvrđuje da bakar svoj neurotoksični učinak postiže uglavnom posredovanjem nastanka RKV-a i dovođenjem stanica u stanje oksidacijskog stresa, te da miricitrin u prisutnosti iona bakra djeluje prooksidativno i tako pospješuje njegov neurotoksični učinak.

Prekomjerna proizvodnja i nakupljanje RKV-a preopterećuje stanične sustave antioksidacijske obrane i dovodi do lipidne peroksidacije, oštećenja DNA i promijenjene funkcije brojnih staničnih proteina. Opsežna oksidacijska oštećenja onemogućuju normalno funkcioniranje stanice, a kada je intenzitet oštećenja prevelik da bi se mogao sanirati, dolazi do stanične smrti. Primarno razlikujemo dva oblika stanične smrti: apoptozu (ovisnu ili neovisnu o kaspazama) i nekrozu. Kako bih utvrdio koji oblik stanične smrti prevladava u stanicama SH-SY5Y, koristio sam fluorescentne boje PI i Hoechst 33342 koje se vežu za DNA. Do porasta broja stanica s kondenziranim jezgrom, najvjerojatnije apoptotskih stanica, došlo je nakon tretmana s 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$ , te zatim dodatnog porasta pri istovremenom tretmanu s bakrom i miricitrinom. Značajni

porast broja jezgara obojanih s PI, odnosno nekrotičnih stanica ili stanica u završnim fazama apoptoze uočen je pri tretmanu s 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina (Slika 17). S obzirom da nekroza obično nastupa pri jačim oksidacijskim oštećenjima, ovaj rezultat dodatno upućuje na jako prooksidacijsko djelovanje najveće primijenjene koncentracije miricitrina. Budući da je kondenzacija kromatina obilježje apoptoze i ovisne i neovisne o kaspazama, izmjerio sam aktivnost kaspaza 3 i 7, najčešćih medijatora puta ovisnog o kaspazama, kako bih pokušao razjasniti do kojeg oblika apoptoze dolazi prilikom tretmana stanica s bakrom i miricitrinom. Porast aktivnosti kaspaza 3 i 7 izazvan je tretmanima s bakrom uz 10 i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina (Slika 14). Istraživanje Radovanović i sur. (2019) pokazalo je kako dolazi do pojačane aktivacije kaspaza 3 i 7 u neuronima P19 tretiranim bakrom i etanolnim ekstraktom propolisa, što upućuje na staničnu smrt ovisnu o kaspazama. S druge strane, Sadžak i sur. (2021) su, u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog neurotoksičnim koncentracijama bakra i miricetina zabilježili apoptozu neovisnu o kaspazama. S obzirom na snažniju aktivaciju kaspaza prilikom tretmana s bakrom i 10, odnosno 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina, a izostanak aktivnosti prilikom tretmana s bakrom te bakrom i 1 i 5  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina, u stanicama SH-SY5Y tretiranim bakrom i miricitrinom dolazi do apoptoze i ovisne i neovisne o kaspazama u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji miricitrina. Pri jačem intenzitetu oksidacijskog stresa prevladava apoptoza ovisna o kaspazama, a vjerojatno dio stanica kod jakog oksidacijskog oštećenja odumire i nekrozom.

Kako bih razjasnio molekularne mehanizme neurotoksičnog djelovanja miricitrina kojima dolazi do stanične smrti u prisutnosti iona bakra, koristio sam selektivne inhibitore odabranih signalnih puteva uključenih u preživljenje stanica i odgovor na oksidacijski stres. Proteini PARP i p53 važni su enzimi za popravak DNA i preživljenje stanice, stoga sam koristio PARP inhibitor VIII (PJ34) te inhibitor transkripcijske aktivnosti p53, pifitrin- $\alpha$ . PARP je jezgreni enzim važan za popravak DNA lanaca prilikom oksidacijskih oštećenja preko poli ADP-ribozilacije na mjestu lezije (Morales i sur. 2014), a ključan je i u pokretanju apoptoze neovisne o kaspazama. Primjenom PJ34 nije došlo do značajne promjene u preživljenju stanica (Slika 18A). Ovaj rezultat sugerira da PARP, ako i je aktiviran, nema značajniju ulogu u procesima ključnim za preživljenje stanice. Osim toga, prilikom apoptoze ovisne o kaspazama efektorske kaspaze vrlo rano cijepaju i inaktiviraju PARP (Ko i Ren 2012). Kako je učinak PJ34 ispitan u stanicama tretiranim s bakrom u kombinaciji s 10 ili 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina gdje stanična smrt nastupa uglavnom apoptozom ovisnom o kaspazama, vrlo je vjerojatno da je u tim stanicama ionako došlo do njegovog cijepanja i

inaktivacije. Tumor supresor p53 transkripcijski je faktor koji u neuronima ima važnu ulogu u određivanju smrti ili preživljenja stanice prilikom odgovora na brojne stresore, uključujući oštećenje DNA, hipoksiju i oksidacijski stres. Regulira DNA popravak, metabolizam i stanični ciklus stanice, a ima i ulogu u pokretanju apoptoze. Pri slabijim oštećenjima potiče popravak DNA, a pri jačima staničnu smrt (Wang i sur. 2018). Dodatak inhibitora p53 pifitrina- $\alpha$  nije utjecao na preživljenje stanica tretiranih bakrom i miricitrinom (Slika 18B), što upućuje na izostanak uloge transkripcijske aktivacije p53 u preživljenju i smrti stanica u ovom istraživanju. MAP kinaze enzimi su unutarstaničnih signalnih puteva. Reguliraju odgovor stanice na brojne signale, među kojima je i oksidacijski stres (Son i sur. 2011), a uključene su i u poticanje stanične smrti. Kako bih provjerio sudjeluju li MAP kinaze u preživljenju stanica koristio sam selektivne inhibitore kinaza ERK1/2, p38 i JNK. Niti jedan od ovih inhibitora nije pokazao učinak na preživljenje stanica SH-SY5Y što sugerira da MAP kinaze nemaju ključnu ulogu u pokretanju stanične smrti prilikom tretmana s bakrom i miricitrinom (Slika 19). Istražio sam i učinak vortmanina, inhibitora PI3K. PI3K je unutarstanična kinaza uključena u signalne puteve koji reguliraju primjerice proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica. Utvrđena je njezina uloga u preživljenju oštećenih neurona te u uvjetima oksidacijskog stresa (Tiong i sur. 2010; Zubčić i sur. 2020b). Dodatak vortmanina smanjio je preživljenje stanica u obje tretirane grupe (Slika 20). Ovaj je rezultat analogan rezultatima Wang i sur. (2008) koji su utvrdili da dodatak vortmanina u kulturu epitelnih stanica retine iscrpljuje GSH i dovodi do snažnijeg oksidacijskog stresa. To bi moglo upućivati da u stanicama tretiranim bakrom i miricitrinom inhibicijom puta PI3K/Akt dolazi do pojačavanja intenziteta oksidacijskog stresa, a samim time i dodatnog pada preživljenja. Aktivacija Akt također je često povoljna za stanice i potiče njihovo preživljenje. U radu Cai i sur. (2022) pojačana ekspresija Akt povećala je preživljenje stanica u uvjetima oksidacijskog stresa.

Ioni kalcija također mogu biti uključeni u aktivaciju raznih signalnih puteva i pokretanje apoptoze, stoga sam istražio djelovanje inhibitora BAPTA-AM, koji za sebe veže unutarstanične ione kalcija, potom MK-801, koji onemogućava prolazak iona kalcija kroz N-metil-D-aspartat receptore za glutamat, te nifedipina koji blokira kalcijeve kanale ovisne o naponu. BAPTA-AM povećao je preživljenje stanica u obje tretirane grupe (Slika 21A), MK-801 imao je protektivno djelovanje pri tretmanu s 0,5  $\text{CuSO}_4$  i 20  $\mu\text{g/mL}$  miricitrina (Slika 21B), a nifedipin nije pokazao učinak na preživljenje stanica (Slika 21C). Iz ovih se rezultata vidi kako ioni kalcija imaju značajnu ulogu u odumiranju stanica SH-SY5Y. Jedan od važnih signalnih puteva kalcija je aktivacija kalpaina,

proteaza aktiviranih kalcijevim ionima, koje potiču staničnu smrt (Momeni 2011). Kako bih ispitao njihovu uključenost, stanice sam tretirao leupeptinom, inhibitorom kalpaina. Tretman leupeptinom međutim nije imao učinak na preživljenje stanica, što sugerira da kalcij djeluje preko nekog drugog signalnog puta (Slika 21D). Mogući je mehanizam djelovanja kalcija povećanje permeabilnosti mitohondrijske membrane (*engl. mitochondrial permeability transition, MPT*). To dovodi do otpuštanja citokroma c koji može potaknuti apoptozu ovisnu o kaspazama, stoga je apoptoza ovisna o kaspazama češća prilikom tretmana SH-SY5Y stanica bakrom i miricitrinom. BAPTA-AM na sebe veže unutarstanični kalcij i tako sprječava njegovu signalizaciju i povećava preživljenje stanica. Protektivni učinak BAPTA-AM na SH-SY5Y stanice u uvjetima oksidacijskog stresa utvrdili su i Xu i sur. (2013). Veći dio kalcijevih iona u SH-SY5Y vjerojatno ulazi preko NMDA receptora, stoga je zabilježeno neuroprotektivno djelovanje MK-801. Moguće je da se inhibicijom NMDA receptora sprječava aktivacija signalnog puta protein kinaze C (PKC) i time povećava preživljenje stanica, no točni mehanizam treba dodatno istražiti. U istraživanju Jung i sur. (2004) inhibicija PKC u uvjetima oksidacijskog stresa povećavala je preživljenje stanica.

Bakar je esencijalan mikroelement u ljudskom tijelu, ali je vrlo reaktivan metal. Ima ulogu u razvoju brojnih neurodegenerativnih bolesti, a njegov je suvišak prisutan u mozgu oboljelih. Zbog svojih poznatih antioksidacijskih učinaka flavonoidi su jedna od najistraživanijih skupina prirodnih spojeva kao potencijalni terapeutici u prevenciji i olakšavanju niza bolesti, među kojima su i neurodegenerativne. Međutim, u prisutnosti iona prijelaznih metala flavonoidi mogu imati prooksidativno djelovanje. Miricitrin je u ovom radu djelovao kao prooksidans, pojačao je neurotoksično djelovanje bakra. Daljnja bi istraživanja njegovog učinka mogla biti usmjerena na druge stanične linije (primjerice P19) te *in vivo* uvjete. Općenito, učinak flavonoida na preživljenje stanica i modulaciju signalnih puteva ovisi o vrsti flavonoida, pri čemu je posebno važan broj hidroksilnih skupina, te staničnom modelu i primijenjenoj koncentraciji flavonoida, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se detaljnije razumjeli njihovi mehanizmi djelovanja u uvjetima oksidacijskog stresa što je od velikog značaja zbog uvriježenog mišljenja o isključivo pozitivnim učincima antioksidansa na zdravlje ljudi.



## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da u stanicama SH-SY5Y:

- miricitrin u koncentracijama do 20  $\mu\text{g/mL}$  nema učinka na preživljenje stanica
- netoksične koncentracije miricitrina pojačavaju neurotoksični učinak bakra, dodatno smanjujući preživljenje stanica
- toksični učinak miricitrina posredovan je pojačanom akumulacijom RKV-a što upućuje na njegovo prooksidacijsko djelovanje
- stanična smrt odvija se procesima apoptoze i nekroze
- udio stanica u kojima dolazi do apoptoze ovisne o kaspazama i nekroze povećava se sa stupnjem oksidacijskog oštećenja
- signalni put PI3K/Akt ima važnu ulogu u preživljenju stanica tijekom oksidacijskog stresa
- ioni kalcija i NMDA receptori za glutamat imaju ključnu ulogu u aktivaciji signalnih puteva koji dovode do pokretanja stanične smrti
- signalni putevi MAP kinaza vjerojatno ne posreduju u pokretanju stanične smrti

## 7. LITERATURA

- Agholme L., Lindström T., Kgedal 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. *J. Alzheimers Dis.* 20: 1069–1082.
- Azmi A.S., Bhat S.H., Hanif S., Hadi S.M. (2006): Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 580: 533–538.
- Bayir H. (2005): Reactive oxygen species. *Crit. Care. Med.* 33 (12 Suppl): S498-501.
- Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L.S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38: 3751-3757.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5: 9-19
- Borchard S., Bork F., Rieder T., Eberhagen C., Popper B., Lichtmanegger J., Schmitt S., Adamski J., Klingenspor M., Weiss K.H., Zischka H. (2018): The exceptional sensitivity of brain mitochondria to copper. *Toxicol. In Vitro.* 51: 11–22.
- Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J.F., Margaritis I. (2016): Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35: 107–115.
- Brunet A., Datta S.R., Greenberg M.E. (2001): Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 297–305.
- Cai Y., Xiao R., Zhang Y., Xu D., Wang N., Han M., Zhang Y., Zhang L., Zhou W. (2022): DHPA Protects SH-SY5Y Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis via Mitochondria Apoptosis and the Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Antioxidants.* 11: 1794.
- Chai Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston R.B., Thomas J.A. (1994): S-Thiolation of Individual Human Neutrophil Proteins Including Actin by Stimulation of the Respiratory Burst: Evidence against a Role for Glutathione Disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 273–281.

- Chen Q., Kang J., Fu C. (2018): The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct. Target Ther.* 3: 18.
- Chi H., Chang H.Y., Sang T.K. (2018): Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3082.
- Cobley J.N., Fiorello M.L., Bailey D.M. (2018): 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox. Biol.* 15: 490–503.
- Domitrović R., Rashed K., Cvijanović O., Vladimir-Knežević S., Škoda M., Višnić A. (2015): Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chem. Biol. Interact.* 230: 21-29.
- Dong J., Atwood C.S., Anderson V.E., Siedlak S.L., Smith M.A., Perry G., Carey P.R. (2003): Metal binding and oxidation of amyloid- $\beta$  within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry.* 42: 2768–2773.
- Farhan M., Rizvi A. (2022): Understanding the Prooxidant Action of Plant Polyphenols in the Cellular Microenvironment of Malignant Cells: Role of Copper and Therapeutic Implications. *Front. Pharmacol.* 13: 929853.
- Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. (2004): Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* 10: 1055–1063.
- 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. *Arch. Toxicol.* 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. *Mol. Pharm.* 15: 808–820.
- Gong J., Luo S., Zhao S., Yin S., Li X., Mou T. (2019): Myricitrin attenuates memory impairment in a rat model of sepsis-associated encephalopathy via the NLRP3/Bax/Bcl pathway. *Folia. Neuropathol.* 57: 327–334.

- Gromadzka G., Tarnacka B., Flaga A., Adamczyk A. (2020): Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—therapeutic implications. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1–35.
- Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. (2001): Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29:345-350.
- Hongmei Z. (2012): Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. Ur: Ntuli T. *Apoptosis and Medicine*. London, IntechOpen, <http://dx.doi.org/10.5772/50129>.
- Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J. (2014): The many “faces” of copper in medicine and treatment. *BioMetals*. 27: 611–621.
- Hwang I.W., Chung S.K. (2018): Isolation and identification of myricitrin, an antioxidant flavonoid, from Daebong persimmon peel. *Prev. Nutr. Food Sci.* 23: 341–346.
- Jazvinščak Jembrek M., Vlainić J., Radovanović V., Erhardt J., Oršolić N. (2014): Effects of copper overload in P19 neurons: Impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *Biometals*. 27: 1303–1322.
- Jia Z., Misra H.P. (2007): Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFκB and caspase-3. *Free. Radic. Biol. Med.* 42: 288–298.
- Jung Y.S., Ryu B.R., Lee B.K., Mook-Jung I., Kim S.U., Lee S.H., Baik E.J., Moon C.H. (2004): Role for PKC-ε in neuronal death induced by oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 789–794.
- Kim G.H., Kim J.E., Rhie S.J., Yoon S. (2015): The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* 24: 325–340.
- Ko H.L., Ren E.C. (2012): Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules*. 2: 524–548.
- Kovalevich J., Langford D. (2013): Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol.* 1078: 9–21.

- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M. v., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. (2009): Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16: 3–11.
- Krumova K., Cosa G. (2016): Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species, str. 1–21
- Liang L.P., Patel M. (2004): Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 90: 1076–1084.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4: 118–126.
- Lutsenko S., Washington-Hughes C., Ralle M., Schmidt K. (2019): Copper and the brain noradrenergic system. *J. Biol. Inorg. Chem.* 24: 1179–1188.
- Maher P. (2019): The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20(12):3056.
- Mansuri M.L., Parihar P., Solanki I., Parihar M.S. (2014): Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr.* 9 (3):400.
- Massaad C.A., Klann E. (2011): Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* 14(10):2013-2054.
- Medeiros L.M. de, Bastiani M.A. de, Rico E.P., Schonhofen P., Pfaffenseller B., Wollenhaupt-Aguiar B., Grun L., Barbé-Tuana F., Zimmer E.R., Castro M.A.A., Parsons R.B., Klamt F. (2019): Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. *Mol. Neurobiol.* 56: 7355–7367.
- Momeni H.R. (2011): Role of calpain in apoptosis. *Cell. J.* 13: 65–72.
- Morales J., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. (2014): Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* 24: 15–28.

- Mutha, R.E., Tatiya, A.U. & Surana, S.J. (2021): Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci* 7: 25
- Niedzielska E., Smaga I., Gawlik M., Moniczewski A., Stankowicz P., Pera J., Filip M. (2016): Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol* 53: 4094–4125.
- Nisar R., Hanson P.S., He L., Taylor R.W., Blain P.G., Morris C.M. (2015): Diquat causes caspase-independent cell death in SH-SY5Y cells by production of ROS independently of mitochondria. *Arch. Toxicol.* 89: 1811–1825.
- Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. (2003): Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 552–565.
- Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016): Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* 5: 47.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017:8416763.
- Poddar M. K., Chakraborty A., Banerjee S. (2021): Neurodegeneration: Diagnosis, Prevention, and Therapy. Ur: Mansour MA. Oxidoreductase. London, IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/intechopen.94950>.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1997): A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 1997;389(6648):300-305.
- Radovanović V., Vlanić J., Hanžić N., Ukić P., Oršolić N., Baranović G., Jazvinščak Jembrek M. (2019): Neurotoxic effect of ethanolic extract of propolis in the presence of copper ions is mediated through enhanced production of ROS and stimulation of caspase-3/7 activity. *Toxins (Basel).* 11(5): 273.
- Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. (2012): Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24: 981–990.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7):933-956.

- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. (2016): Cell Viability Assays. Ur: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, i sur. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: 2004-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Ryter S.W., Kim H.P., Hoetzel A., Park J.W., Nakahira K., Wang X., Choi A.M.K. (2007): Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxid. Redox. Signal.* 9(1): 49-89.
- Sadžak A., Vlačić I., Kiralj Z., Batarelo M., Oršolić N., Jazvinščak Jembrek M., Kušen I., Šegota S. (2021): Neurotoxic effect of flavonol myricetin in the presence of excess copper. *Molecules.* 26 (4): 845.
- Scheiber I.F., Mercer J.F.B., Dringen R. (2014): Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.* 116: 33–57.
- Shukla V., Mishra S.K., Pant H.C. (2011): Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2011: 572634.
- Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. (2019): Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24 (8): 1583.
- Son Y., Cheong Y.-K., Kim N.-H., Chung H.-T., Kang D.G., Pae H.-O. (2011): Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* 2011: 1–6.
- Speisky H., Gómez M., Carrasco-Pozo C., Pastene E., Lopez-Alarcón C., Olea-Azar C. (2008): Cu(I)-Glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation. *Bioorg. Med. Chem.* 16: 6568–6574.
- Taylor J.P., Hardy J., Fischbeck K.H. (2002): Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science.* 296: 1991–1995.
- Teepker M., Anthes N., Fischer S., Krieg J.C., Vedder H. (2007): Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicology.* 28: 19–26.

- Tiong C.X., Lu M., Bian J.S. (2010): Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *Br. J. Pharmacol.* 161: 467–480.
- Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M.C. (2000): Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J. Biol. Chem.* 275: 14064–14069.
- Wang D.B., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R.S. (2014a): P53 and mitochondrial function in neurons. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* 1842: 1186–1197.
- Wang L., Chen Y., Sternberg P., Cai J. (2008): Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 1671–1678.
- Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. (2018): Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217: 1915–1928.
- Wang Y.H., Yu H.T., Pu X.P., Du G.H. (2014b): Myricitrin alleviates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation in SH-SY5Y cells. *J. Mol. Neurosci.* 53: 562–570.
- Wells C., Brennan S., Keon M., Ooi L. (2021): The role of amyloid oligomers in neurodegenerative pathologies. *Int. J. Biol. Macromol.* 181: 582–604.
- Xicoy H., Wieringa B., Martens G.J.M. (2017): The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* 12: 1–11.
- Xu Z., Xu B., Xia T., He W., Gao P., Guo L., Wang Z., Niu Q., Wang A. (2013): Relationship between intracellular Ca<sup>2+</sup> and ROS during fluoride-induced injury in SH-SY5Y cells. *Environ. Toxicol.* 28: 307–312.
- Yang Y.L., Liu M., Cheng X., Li W.H., Zhang S.S., Wang Y.H., Du G.H. (2019): Myricitrin blocks activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways to protect nigrostriatum neuron in LPS-stimulated mice. *J. Neuroimmunol.* 337 :577049.
- Zubčić K., Hof P.R., Šimić G., Jazvinščak Jembrek M. (2020a): The Role of Copper in Tau-Related Pathology in Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 13:572308.



Zubčić K., Radovanović V., Vlainić J., Hof P.R., Oršolić N., Šimić G., Jazvinščak Jembrek M.  
(2020b): PI3K/Akt and ERK1/2 Signalling Are Involved in Quercetin-Mediated  
Neuroprotection against Copper-Induced Injury. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020: 9834742

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobne informacije:

Ime i prezime: Antonio Krstačić-Galić

Datum rođenja: 18.10.1998.

### Obrazovanje:

2020 – 2023: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije

2017 – 2020: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Preddiplomski studij biologije

2013 – 2017: Srednja škola Markantuna de Dominsa, Rab, Opća gimnazija

### Dodatno:

Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; LabAnim A Kategorija (60 sati)

Vozačka dozvola (B kategorija)

Sudjelovanje u organizaciji konferencije Brain-Gut Axis Conference (2022)

Sudjelovanje u projektu popularizacije bioloških znanosti Biolog-i-Ja (radionica) (2019)

Demonstratura na vježbama, Odjel za biologiju (2018, 2019)