

Učinak kvercetina na oksidacijski stres u neuronima P19 u prisutnosti iona bakra

Zubčić, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:319448>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Klara Zubčić

**UČINAK KVERCETINA NA OKSIDACIJSKI STRES U
NEURONIMA P19 U PRISUTNOSTI IONA BAKRA**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Jazvinšćak Jembrek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvale

Prije svega hvala mojoj mentorici Maji na predloženoj temi te na beskrajnom strpljenju i blagosti, svom prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala izv. prof. dr. sc. Biljani Balen na susretljivosti, svim sugestijama i pomoći pri pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se na savjetima, pomoći i prijateljskoj atmosferi svim zaposlenicima Laboratorija za proteinsku dinamiku, a posebno Martini, Tini i Nikolini.

Hvala mojim prijateljicama Danieli, Ana-Mariji i Marti što su mi godinama oslonac u mojim usponima i padovima. Hvala Carmen, Marini, Nini, Josipu i Dominiku koji su moje studentske dane učinili zabavnijima i ljepšima. Hvala Nathanielu i Tini što su uvijek za pivu. Hvala Ivanu što je uvijek uz mene.

Najveće hvala mami, tati, braći i sestrama zbog čije ljubavi i podrške sam sve što jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK KVERCETINA NA OKSIDACIJSKI STRES U NEURONIMA P19 U PRISUTNOSTI IONA BAKRA

Klara Zubčić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Mnoga istraživanja pokazala su povezanost promijenjene regulacije homeostaze bakra s nastankom i progresijom neurodegenerativnih bolesti. Toksična svojstva bakra uglavnom se pripisuju povećanoj proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta i posljedičnom oksidacijskom stresu. Cilj istraživanja bio je analizirati učinak biljnog flavonoida kvercetina na neurone P19 u kojima je stanje oksidacijskog stresa izazvano suviškom iona bakra. U najvećoj primijenjenoj koncentraciji (150 μ M) kvercetin je povećao preživljenje neurona P19 tretiranih s 0,5 mM CuSO₄ te smanjio bakrom izazvan porast nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta. Analiza metodom *Western blotting* pokazala je da suvišak bakra dovodi do porasta ekspresije proapoptotskog proteina PUMA, te da je u prisutnosti kvercetina taj porast smanjen. Ovakvi rezultati upućuju na antiapoptotski mehanizam djelovanja kvercetina. U neuronima P19 kvercetin je također inducirao ekspresiju nukleozid difosfat kinaze NME1. Promjene u ekspresiji proteina p53 i Bax nisu nađene. Dobiveni rezultati pokazuju neuroprotektivni učinak kvercetina u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog ionima bakra i upućuju na antioksidacijski i antiapoptotski mehanizam njegova djelovanja.

(50 stranica, 9 slika, 3 tablice, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oksidacijski stres, flavonoidi, neurotoksičnost, apoptoza, PUMA

Voditelj: dr. sc. Maja Jazvinščak Jembrek, znan. suradnik

Suvoditelj: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Ocjenjitelji: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

dr. sc. Tomislav Ivanković, doc. (zamjena)

Rad prihvaćen: 14. veljače 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EFFECT OF QUERCETIN ON OXIDATIVE STRESS IN P19 NEURONS IN THE PRESENCE OF COPPER IONS

Klara Zubčić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

A growing number of studies suggest that the deregulation of copper homeostasis is an important factor in the onset and progression of neurodegenerative diseases. Toxic effects of copper are mainly attributed to the increased production of reactive oxygen species (ROS) and subsequent oxidative stress. The aim of this study was to analyse the effect of the plant-derived flavonoid quercetin on P19 neurons, in which the oxidative stress was induced by exposure to the excess copper ions. In the highest applied concentration (150 μ M) of quercetin the viability of P19 neurons treated with 0.5 mM CuSO₄ was increased and the copper-induced accumulation of reactive oxygen species was prevented. Western blotting analysis showed that copper increases expression of proapoptotic protein PUMA, whereas in the presence of quercetin the obtained increase was diminished. These results indicate anti-apoptotic mechanism of quercetin action. In P19 neurons quercetin also induced the expression of nucleoside diphosphate kinase NME1. The expression of p53 and Bax remained unchanged at the protein level. The obtained results demonstrate neuroprotective effect of quercetin against oxidative stress induced by exposure to copper ions, and suggest antioxidative and antiapoptotic mechanism of its action.

(50 pages, 9 figures, 3 tables, 74 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: oxidative stress, neurotoxicity, flavonoids, apoptosis, PUMA

Supervisor: dr. Maja Jazvinščak Jembrek, Res. Assoc.

Cosupervisor: dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof. (Replacement)

Thesis accepted: February 14th, 2018

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Oksidacijski stres	1
1.2	Oksidacijski stres i neurodegenerativni poremećaji	2
1.3	Programirana stanična smrt	2
1.4	Bakar	5
1.5	Kvercetin	7
1.5.1	Antioksidacijska svojstva kvercetina	8
1.5.2	Neuroprotektivno djelovanje kvercetina	8
1.6	Cilj istraživanja	10
2	MATERIJAL I METODE	11
2.1	Materijal	11
2.1.1	Kemikalije	11
2.1.2	Sastav korištenih otopina i pufera	12
2.1.3	Stanična kultura	13
2.1.4	Hranjive podloge	13
2.1.5	Protutijela	14
2.1.6	Ostali materijal	16
2.2	Metode	17
2.2.1	Rad sa staničnom kulturom	17
2.2.2	Određivanje preživljenja neurona P19 primjenom testa MTT	20
2.2.3	Unutarstanično stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta	21
2.2.4	Izolacija proteina iz stanica	21
2.2.5	Određivanje koncentracije proteina metodom BCA	22
2.2.6	Analiza metodom <i>Western blotting</i>	22
2.2.7	Analiza rezultata	26
3	REZULTATI	27
3.1	Učinak bakra na preživljenje neurona P19	27
3.2	Učinak kvercetina na preživljenje neurona P19 izloženih toksičnim koncentracijama bakra ...	28
3.3	Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u prisutnosti iona bakra i kvercetina	29
3.4	Učinak bakra i kvercetina na ekspresiju proteina vezanih uz apoptozu	30
4	RASPRAVA	36

5	ZAKLJUČAK.....	41
6	LITERATURA.....	42
7	ŽIVOTOPIS.....	50

1 UVOD

1.1 Oksidacijski stres

Slobodni radikali su molekule s jednim ili više nesparenih elektrona. Zbog nesparenih elektrona kemijski su vrlo nestabilni i reaktivni. Radikali zato lako reagiraju međusobno, a spajanjem s drugim molekulama, ili njihovim raspadanjem, nastaju novi radikali koji opet mogu dalje reagirati. Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) uključuju slobodne radikale nastale iz O₂: superoksidni anion (O₂⁻) i hidroksilni radikal (·OH), ali i vodikov peroksid (H₂O₂), koji nije slobodni radikal (Ryter i sur., 2007). Stvaranje ROS-a je produkt brojnih fizioloških procesa u svim aerobnim organizmima (Knight, 1998). ROS djeluju kao regulatori ekspresije gena, aktivatori receptora i transkripcijskih faktora, induktori adaptivnog odgovora, odgovora na stimulaciju faktorima rasta i upalnog odgovora (Radi i sur., 2014). U fiziološkim koncentracijama ROS imaju važnu ulogu u stanici i djeluju kao regulatori signalnih putova uključenih u procese diferencijacije, proliferacije, apoptoze, imuniteta, obrane od mikroorganizama, melanogenezi i starenju (Kannan i Jain, 2000; Mao i sur., 2017).

Oksidacijski stres posljedica je nakupljanja ROS-a iznad fizioloških potreba, a nastaje zbog poremećaja ravnoteže prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa. Oksidacijski stres može nastupiti kad se poveća nastajanje ROS-a, smanji uklanjanje ROS-a i popravak oksidacijski modificiranih makromolekula, ili oboje. Do pomaka oksidacijsko-redukcijske ravnoteže može doći uslijed brojnih faktora, kao što su zračenje, ulazak patogena, starenje, temperaturni stres i dr. (Sun i Chen, 1998). Negativnim djelovanjem ROS-a dolazi do oštećenja DNA, oštećenja i gubitka funkcije proteina, lipidi stanične membrane podliježu lipidnoj peroksidaciji, opada razina ATP-a i glutationa u stanici, povećava se razina citosolnog Ca²⁺, dolazi do pogrešaka u lancu prijenosa elektrona, modulacije upalnog odgovora i promjena u staničnoj signalizaciji. Ovi štetni utjecaji mogu dovesti do gubitka funkcije stanice ili stanične smrti, te posljedično do niza patoloških stanja (Knight, 1998; Mao i sur., 2017).

1.2 Oksidacijski stres i neurodegenerativni poremećaji

Središnji živčani sustav (SŽS) posebno je osjetljiv na oksidacijska oštećenja zbog više razloga: (i) s obzirom na veličinu ima visoku metaboličku aktivnost u usporedbi s drugim tkivima (na mozak otpada 20% ukupne tjelesne potrošnje kisika na 2% tjelesne mase); (ii) razina antioksidansa i zaštitnih enzima je relativno niska; (iii) velik je udio nezasićenih masnih kiselina koje su podložne lipidnoj peroksidaciji; (iv) endogeno stvaranje ROS-a putem nekoliko specifičnih reakcija; (v) neuroni središnjeg živčanog sustava se ne obnavljaju pa su posljedice oštećenja teže; (vi) funkcionalna povezanost neurona unutar neuronskih mreža SŽS-a lako se prekida (Knight, 1998).

Oksidacija membranskih fosfolipida u plazmatskoj membrani i membrani staničnih organela kao što je mitohondrij, dovodi do biofizičkih promjena koje narušavaju integritet membrane i funkciju organela. Iako ovakvi procesi mogu stimulirati unutarstanične signalne putove, oni se primarno povezuju s inicijacijom stanične smrti (Ryter i sur., 2007). Degenerativne bolesti živčanog sustava kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i amiotrofična lateralna skleroza, ali i fiziološko starenje, karakterizirani su progresivnom atrofijom i odumiranjem neurona. Iako su karakteristične morfološke oznake drugačije za svaku od navedenih bolesti, brojni dokazi upućuju na važnu ulogu slobodnih radikala u degenerativnim procesima i odumiranju neurona u ovim bolestima (Sun i Chen, 1998; Vonk i Klomp, 2008).

1.3 Programirana stanična smrt

Stanice mogu aktivirati proces svoje smrti na kontrolirani način – procesom zvanim programirana stanična smrt. Na ovaj način, stanice koje su nepovratno oštećene, nisu više potrebne ili su prijetnja organizmu, mogu biti brzo i kontrolirano uklonjene. U većini slučajeva, programirana stanična smrt nastupa apoptozom. Ona je temeljni proces neuralnog razvoja jer u vrijeme diferencijacije progenitorskih stanica približno polovica proizvedenih neurona odumire apoptozom kao dio mehanizma koji osigurava uspostavljanje funkcionalnih neuronskih veza (Elmore, 2007). Apoptoza se događa i u postmitotičkim neuronima koji nisu uspostavili funkcionalne veze nakon migracije. Osim uz razvoj, neuronalna apoptoza veže se i uz patološka stanja nakon ozljeda živčanog sustava. Istraživanja su pokazala da se značajan udio neuronske

smrti nakon ekscitotoksične, ishemijske ili traumatske ozljede živčanog sustava događa apoptozom, koja se povezuje i s patofiziologijom neurodegenerativnih bolesti (Miller i sur., 2000).

Glavni izvršitelji apoptoze su proteolitički enzimi kaspaze koji razgrađuju više od stotinu različitih ciljnih proteina u stanici (Timmer i Salvesen, 2007). Kaspaze su u stanicama prisutne u obliku prekursora – prokaspaza i trebaju biti aktivirane da bi izvodile svoju funkciju. Postoje unutarnji i vanjski putovi kojima stanice mogu aktivirati inicijatorske kaspaze i potaknuti kaskadu efektorskih kaspaza, što vodi u apoptozu. Vanjski put potaknut je izvanstaničnim ligandima, malim molekulama (npr. faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*, TNF) i Fas ligand) koje se vežu na „receptore smrti“ stanične membrane. Unutarnji put aktiviran je unutarstaničnim signalima koji se stvaraju kad je stanica pod nekom vrstom stresa (nedostatak faktora rasta, tretmani lijekovima koji izazivaju oštećenje molekule DNA ili aktivaciju onkogeni, kao i oksidacijski stres).

Glavna skupina unutarstaničnih regulatora apoptoze je evolucijski visoko konzervirana obitelj proteina Bcl-2, koja uključuje i proapoptotske i antiapoptotske proteine. Oni reguliraju integritet mitohondrijske membrane, odnosno otpuštanje citokroma c i drugih mitohondrijskih proteina u citosol. Pro- i antiapoptotski proteini iz obitelji Bcl-2 mogu stupati u interakcije tvoreći heterodimere, čime se međusobno inhibiraju (Alberts i sur., 2008). Svi proteini iz obitelji Bcl-2 dijele jednu ili više od ukupno 4 homologne domene Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 i BH4). Proapoptotski proteini iz ove obitelji mogu se podijeliti u dvije skupine: proteini koji imaju samo domenu BH3 (Bim, Bid, PUMA, NOXA, Bik, Bad, Bmf, i Hrk) i oni koji imaju domene BH1, BH2 i BH3 (Bax, Bak, Bok i Bcl-x_s). Antiapoptotski proteini imaju sve 4 homologne domene (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1) (Hardwick i Soane, 2013). Predložena su dva mehanizma djelovanja proteina koji imaju samo domenu BH3. Oni mogu direktno aktivirati proapoptotske proteine Bax i Bak, ili mogu inaktivirati antiapoptotske proteine i time potaknuti stanicu na aktivaciju proteina Bax i Bak (Yee i Vousden, 2008). Povećanom ekspresijom proteina Bax i Bak, njihovom konformacijskom promjenom i premještanjem na vanjsku membranu mitohondrija stvaraju se kanali u membrani mitohondrija, dolazi do redukcije membranskog potencijala i povećane permeabilnosti membrane te otpuštanja citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c u citoplazmi aktivira inicijatorsku kaspazu 9 i apoptotski aktivirajući faktor (Apaf-1),

koji formiraju proteinski kompleks apoptosom te dolazi do lančane aktivacije niza efektorskih kaspaza i u konačnici do razgradnje stanice (Elmore, 2007).

Protein p53 je jedan od najproučavanijih tumor supresor proteina koji ima značajnu ulogu u pokretanju apoptoze (Parrales i Iwakuma, 2015; Vijayakumaran i sur., 2015; Lucchesi i sur., 2016). Podložan je brojnim posttranslacijskim modifikacijama, većinom na amino i karboksilnom kraju, što uključuje fosforilaciju, acetilaciju, glikozilaciju, sumoilaciju, nedilaciju i ubikvitinaciju. Te modifikacije omogućavaju da protein p53 posreduje u širokom rasponu različitih funkcionalnih ishoda, koji se kontroliraju specifičnim transkripcijski-ovisnim učincima (Tedeschi i Di Giovanni, 2009). Protein p53 djeluje u odgovoru na raznovrsne oblike staničnog stresa kako bi posredovao različite antiproliferativne procese. Stoga se p53 može aktivirati oštećenjem molekule DNA, hipoksijom ili promijenjenom ekspresijom onkogeno, kako bi zaustavio stanični ciklus te potaknuo popravak DNA, stanično odumiranje i apoptozu. Primarno je smješten u jezgri gdje može djelovati kao transkripcijski faktor i potaknuti ekspresiju proapoptotskih proteina iz obitelji Bcl-2, ali može djelovati i unutar mitohondrija gdje stupa u interakcije sa samim proteinima iz obitelji Bcl-2 (Fridman i Lowe, 2003). Međutim, za razliku od proliferirajućih stanica, pokazano je da protein p53 u zrelih neuronima posreduje apoptozu samo preko transkripcijske aktivnosti u jezgri, a ne preko izravnih interakcija u citosolu ili mitohondrijima (Cregan i sur., 2004; Uo i sur., 2007).

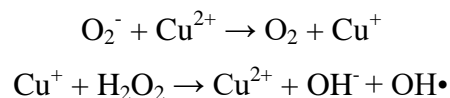
U različitim vrstama stanica je pokazano da indukcija stanične smrti nakon aktivacije proteina p53 značajno ovisi o proteinu PUMA (Yee i Vousden, 2008). Protein PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) pripada obitelji proteina Bcl-2 sa samo jednom domenom BH3. Osim p53, drugi transkripcijski faktori također mogu aktivirati protein PUMA te inducirati p53-neovisnu apoptozu. PUMA može djelovati direktnom aktivacijom proapoptotskih proteina Bak i Bax ili inhibirajući antiapoptotske članove obitelji Bcl-2. Domena BH3 proteina PUMA može tvoriti amfipatsku α -zavojnica kojom PUMA direktno veže antiapoptotske članove obitelji Bcl-2, dok C-terminalni kraj proteina PUMA sadrži hidrofobnu domenu koja usmjerava njegovu lokalizaciju u mitohondrij (Yu i Zhang, 2008). Dok je uloga proteina PUMA u apoptozi ovisnoj o p53 prilično jasna, njegova uloga u posredovanju apoptoze neovisne o aktivaciji p53 ostaje nepotpuno razjašnjena (Yee i Vousden, 2008).

Protein NME1 (engl. *nonmetastatic expressed 1*) je prvi otkriveni protein iz obitelji proteina Nm23/NME. Ovi proteini su nukleozid-difosfat kinaze (engl. *nucleoside diphosphate kinase*, NDPK), čija je enzimska aktivnost neophodna u sintezi nukleinskih kiselina i energetsom metabolizmu (Hsu, 2011). Pored svoje osnovne funkcije, ovi proteini sudjeluju i u staničnoj diferencijaciji, proliferaciji, razvoju i apoptozi (Boissan i sur., 2009). Obitelj je dobila ime po proteinu NME1 koji je prvi otkriveni supresor metastaziranja mnogih vrsta tumora (Ćetković i sur., 2014). Protein NME1 se smatra potencijalnim biljgom neuronalne degeneracije, s obzirom da je *post mortem* uočen njegov porast u cerebrospinalnoj tekućini nakon moždanog udara. S druge strane, pokazana su i neuroprotektivna djelovanja na staničnim modelima ishemične ozljede (Romani i sur., 2017). Također je pokazano da NME1 u interakciji s proteinom STRAP (engl. *serine-threonine kinase receptor-associated protein*) može pozitivno regulirati signalni put p53 tako što razdvajaju kompleks proteina p53 i njegovog negativnog regulatora Mdm2 (Jung i sur., 2007).

1.4 Bakar

Bakar (Cu) je esencijalni mikroelement iz skupine prijelaznih metala. Ljudsko tijelo sadrži oko 70-80 mg bakra, a ta brojka varira u ovisnosti o dobi i spolu (Angelova i sur., 2011). Prisutan je u svim tkivima i važan je za biokemijske metaboličke procese svih aerobnih organizama. Nakon jetre, mozak je organ s najvećim udjelom bakra. U ljudskom mozgu najveći udio bakra nađen je unutar moždanog debla, u jezgrama *locus coeruleus* i crna tvar, dvjema strukturama bogatim neuromelaninom, ali također i dijelovi hipokampusa obiluju bakrom (Bulke i sur., 2017). U ljudskom organizmu postoji u dva oblika – kao jednovalentan i dvovalentan, a većinom ga nalazimo u dvovalentnom stanju. Bakar funkcionira kao prostetička skupina koja omogućava lako prenošenje elektrona u ključnim enzimskim putovima (Cox i Nelson, 2000). Sposobnost bakra da jednostavno veže i prihvaća elektrone objašnjava njegovu važnost u oksidacijsko-redukcijskim procesima te u uklanjanju slobodnih radikala iz organizma (Angelova i sur., 2011). Osim u prenošenju elektrona, proteini koji sadrže bakar sudjeluju i u prenošenju molekularnog kisika (Messerschmidt, 2010). Naime, evolucija većih, višestaničnih životinja ovisila je o evoluciji proteina koji će moći prenositi i skladištiti kisik. Međutim, nijedan bočni ogranak aminokiselina u proteinima nije prikladan za reverzibilno vezanje molekula kisika. Ta

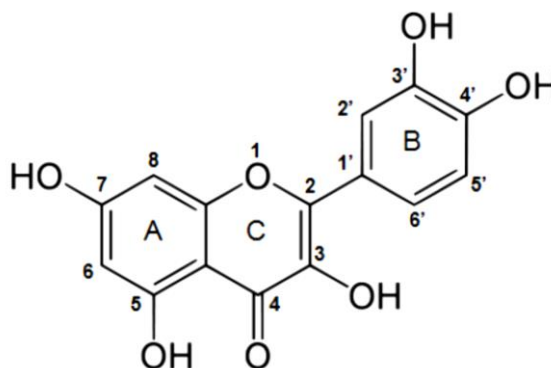
uloga ostvarena je pomoću određenih prijelaznih metala, među kojima je i bakar, koji imaju jaku tendenciju vezanja kisika. Bakar je funkcionalna komponenta više esencijalnih enzima: citokrom c oksidaze, feroksidaze, lizil-oksidaze, amin-oksidaze, katehol-oksidaze, fenol-oksidaze, tirozinaze, dopamin- β -monooksigenaze, D-galaktozoksidaze, superoksid dismutaze i dr. (Angelova i sur., 2011). Nadalje, bakar je povezan s važnim biološkim procesima uključujući angiogenezu, odgovor na hipoksiju i neuromodulaciju (Bulke i sur., 2017). S druge strane, istraživanja su pokazala povezanost povišene koncentracije bakra u cerebrospinalnoj tekućini i serumu s razvojem i progresijom neurodegenerativnih bolesti (Manto, 2014). Postoje hipoteze da je akumulacija β amiloidnih plakova u mozgu, karakteristično histopatološko obilježje Alzheimerove bolesti, zaštitni odgovor na oksidacijski stres izazvan bakrom zbog sposobnosti plakova da vežu i izdvajaju ione bakra u oba oksidacijska stanja (Eskici i Axelsen, 2012). Suvišak bakra može biti toksičan s obzirom da kao prijelazni metal, ako nije prisutan u vezanom obliku već slobodan u ioniziranoj formi, može katalizirati oksidacijsko redukcijske reakcije i nastanak ROS-a putem Fentonove i Haber-Weissove reakcije. U ovim reakcijama dolazi do redukcije bakra superoksidnim anionom i nastajanja hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida u prisutnosti reduciranog bakra (Greenough i sur., 2013):



Stoga je potrebna stroga stanična regulacija unosa, distribucije, pohrane i izlučivanja iona bakra (Waggoner i sur., 1999; Vonk i Klomp, 2008). Unatoč brojnim mehanizmima koji sudjeluju u regulaciji njegove homeostaze, čimbenici kao što su nasljedni poremećaji metabolizma bakra, preveliki unos putem hrane te izloženost bakrom onečišćenom okolišu, mogu premašiti granice kapaciteta pohrane te dovesti do neželjenih učinaka na stanicu. Ipak, Jazvinšćak Jembrek i sur. (2014) su u kulturi neurona P19 pokazali da su potrebne relativno visoke koncentracije iona bakra da bi došlo do smanjenja vijabilnosti neurona i promjena na molekularnoj i biokemijskoj razini, što upućuje na vrlo učinkovit homeostatski sustav u zdravim neuronima.

1.5 Kvercetin

Kvercetin [2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on] je polifenol, jedan od danas najproučavanijih flavonoida iz podgrupe flavona. Sekundarni je biljni metabolit te spada u antoksansine, žute biljne pigmente (Li i sur., 2016). Ime je dobio po rodu *Quercus* iz kojeg je prvi put izoliran. Tvori svjetlo-žute igličaste kristale, netopljive u hladnoj i slabo topljive u toploj vodi, ali topljive u alkoholu i lipidima. Osnovnu strukturu svih flavonoida čine dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana piranskim prstenom (C) (slika 1).



Slika 1 Kemijska struktura kvercerina. Preuzeto iz D'Andrea (2015).

Na mjesta hidroksilnih skupina mogu se vezati glikozilne skupine pa nastaju različiti glikozidi. U prirodi je kvercetin najčešće prisutan kao glikozid koji se sastoji od aglikona konjugiranog s glukozom (izokvercetin) ili rutinozom (rutin). Glikozilirane forme kvercetina imaju drugačija svojstva od aglikona, slabo se apsorbiraju u probavnom sustavu te prije apsorpcije moraju biti hidrolizirane do aglikonske forme (Dajas i sur., 2015). Kvercetin je sveprisutan u biljkama pa ga tako možemo naći u povrću iz porodice *Brassicaceae* (kupus, brokula, kelj), rajčicama, jabukama, marelicama, trešnjama, bobičastom voću, grožđu, čaju itd., a u iznimno visokim koncentracijama prisutan je u kaparima i biljkama iz roda *Allium* (Mlcek i sur., 2016). Posebno je zanimljiv zbog svog širokog spektra bioloških učinaka. Pokazano je da kvercetin može djelovati antioksidacijski, antivirusno, protuupalno, protualergijski, imunosupresivno, kardioprotektivno, antikancerogeno i neuroprotektivno (Jazvinščak Jembrek i sur., 2012; Miles i sur., 2014; Li i sur., 2016). Mehanizmi koji stoje iza svih tih djelovanja još nisu do kraja razjašnjeni, ali velikim dijelom temelje se na izravnom antioksidacijskom učinku, kao i na modulaciji signalnih putova (Russo i sur., 2012).

1.5.1 Antioksidacijska svojstva kvercetina

Kvercetin je jedan od najjačih antioksidansa. Ima izrazitu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i inaktivacije iona prijelaznih metala keliranjem, čime potiskuje superoksidom vođenu Fentonovu reakciju koja se smatra najvažnijim putem stvaranja ROS-a (Haleagrahara i sur., 2011). Iznimna učinkovitost u uklanjanju slobodnih radikala proizlazi iz njegove strukture flavonoida (slika 1); kateholna struktura u prstenu B daje stabilnost radikalima i omogućuje delokalizaciju elektrona, 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom u prstenu C omogućuje delokalizaciju elektrona iz B prstena i veliku rezonanciju, a hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Mlcek i sur., 2016).

Osim što direktno djeluje hvatajući slobodne radikale, kvercetin može povećati razinu staničnog glutaciona čime se indirektno sprječava stvaranje slobodnih radikala (D'Andrea 2015). No, kao i svi antioksidansi, kvercetin može pri određenim uvjetima, u vrlo visokim koncentracijama, imati i štetno prooksidacijsko djelovanje (Jembrek i sur., 2012; D'Andrea, 2015).

1.5.2 Neuroprotektivno djelovanje kvercetina

Da bi se moglo raspravljati o neuroprotektivnom djelovanju kvercetina, preduvjet je njegova biodostupnost u središnjem živčanom sustavu, odnosno sposobnost prelaska krvno-moždane barijere. To je dokazano na različitim modelima u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Youdim i sur., 2004; Spencer, 2008; Ishisaka i sur., 2011). Smatra se da kvercetin i ostali flavonoidi povoljno djelovanje na mozak ostvaruju različitim učincima: mogu zaštititi neurone od oštećenja izazvanih različitim neurotoksinima, suprimirati upalni odgovor i aktivaciju mikroglije, inducirati neurogenezu, te poticati procese vezane uz učenje, pamćenje i ostale kognitivne funkcije (Spencer, 2009).

Dugo se smatralo da su pozitivni učinci flavonoida, uključujući i kvercetin, primarno povezani s njihovim snažnim antioksidacijskim djelovanjem. S obzirom da je kvercetin u središnjem živčanom sustavu prisutan u puno manjim koncentracijama od endogenih neenzimskih antioksidansa, poput glutaciona i vitamina E, danas se sve veća značajnost pripisuje njegovom djelovanju kao signalne molekule u različitim staničnim signalnim putovima

(D'Andrea, 2015). Citoprotektivni učinak kvercetina mogao bi biti povezan s njegovim antiapoptotskim sposobnostima, pokazanima na nekoliko modela *in vitro* (Ishikawa i Kitamura, 2000; Cai i sur., 2015; Lei i sur., 2015). Također, pokazano je da kvercetin može aktivirati stanične kinaze, koje onda mogu potaknuti kaskade koje potiču ekspresiju signala za preživljenje stanice (Dajas i sur., 2003).

1.6 Cilj istraživanja

Oksidacijski stres smatra se glavnim pokretačem smrti neurona kod moždanog udara i nekoliko kroničnih neurodegenerativnih bolesti. Za liječenje ovih bolesti još uvijek ne postoji učinkovita i zadovoljavajuća terapija. Stoga je važan korak u razvoju novih farmakoloških pristupa identifikacija molekularnih regulatora apoptoze uzrokovane oksidacijskim stresom. Aktivacija kaspaza događa se relativno kasno u procesu stanične smrti pa specifična inhibicija ovih proteaza nije dovoljna da bi se spriječila smrt neurona (Steckley i sur., 2007). Također, postoje i oblici programirane stanične smrti neovisni o kaspazama (Andrabi i sur., 2008). Zato je potrebno istražiti molekularne mehanizme regulacije programirane stanične smrti koji se odvijaju prije aktivacije kaspaza, kao i razjasniti učinak kvercetina na unutarstanične procese povezane s pokretanjem apoptoze.

Ciljevi ovog diplomskog rada bili su: (1) diferencirati neurone P19, (2) izazvati oksidacijski stres u neuronima P19 primjenom određenih koncentracija iona bakra, (3) utvrditi može li flavonoid kvercetin u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog ionima bakra spriječiti ili umanjiti oštećenje i odumiranje neurona P19 te (4) djelomično razjasniti molekularne mehanizme potencijalno neuroprotektivnog djelovanja kvercetina praćenjem nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta i ekspresije proteina uključenih u proces apoptoze.

2 MATERIJAL I METODE

2.1 Materijal

2.1.1 Kemikalije

- ✓ 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H2DCF-dA) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ 2-propanol (Kemika, Hrvatska)
- ✓ akrilamid (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ bakarov (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ bisakrilamid (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ dimetil-sulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ ditiotreitrol (DTT) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ etanol (Kemika, Hrvatska)
- ✓ etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ glicerol (Kemika, Hrvatska)
- ✓ glicin (Kemika, Hrvatska)
- ✓ kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ kalijev klorid (KCl) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ kvercetin dihidrat (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ L-glutamin (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ metanol (Kemika, Hrvatska)
- ✓ naftol modriilo (Kemika, Hrvatska)
- ✓ natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ natrijev klorid (NaCl) (Kemika, Hrvatska)
- ✓ N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, SAD)

- ✓ obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska)
- ✓ octena kiselina (Kemika, Hrvatska)
- ✓ penicilin (Gibco™, SAD)
- ✓ redestilirana voda (reH₂O)
- ✓ retinoična kiselina (RA) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Gibco™, SAD)
- ✓ streptomicin (Gibco™, SAD)
- ✓ tripsin (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ Tris-baza (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD)

2.1.2 Sastav korištenih otopina i pufera

- ✓ 30% matična otopina akrilamida: 30% akrilamid; 0,8% bisakrilamid
- ✓ 1,5 M Tris (pH 8,8): 90,885 g Tris; reH₂O do 500 mL
- ✓ 1 M Tris (pH 6,8): 60,57 g Tris; reH₂O do 500 mL
- ✓ 10% SDS (pH 7,2): 10 g SDS; reH₂O do 100 mL
- ✓ Pufer za nanošenje uzoraka, 4 × LB (engl. *Laemmli buffer*): 2 mL 1 M Tris, pH 6,8; 617,2 mg 100 mM DTT; 800 mg 10% SDS; 4 mL glicerol; 40 mg bromfenol plavo
- ✓ Pufer za elektroforezu (10 ×): 25 mM Tris-baza; 190 mM glicin; 0,1% SDS
- ✓ Pufer za prijenos (10 ×): 184 mM Tris-baza; 140 mM glicin; 20% metanol
- ✓ Otopina za odbojavanje membrane: 40% metanol, 7% octena kiselina, reH₂O
- ✓ Otopina za bojanje membrane: 0,5 g naftol modriilo, 50 mL metanol, 10 mL octena kiselina, reH₂O do 500mL
- ✓ Pufer TBST (10 ×) (engl. *Tris buffer saline tween*): 150 mM NaCl; 50 mM Tris; 5 mL Tween-20, reH₂O do 1000 mL
- ✓ Otopina za blokiranje membrane: 5 g obrano mlijeko u prahu, pufer TBST do 100 mL
- ✓ Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS): 4 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,72 g Na₂HPO₄; 0,12 g KH₂PO₄; reH₂O do 500 mL
- ✓ APS: 10 g amonijev persulfat, reH₂O do 100 mL

- ✓ pufer RIPA (engl. *radio immunoprecipitation assay*): 50 mM Tris, pH 8.0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Igepal CA-630; 0,5% deoksikolat

2.1.3 Stanična kultura

- ✓ Kultura stanica embrionalnog karcinoma miša P19 dobivena ljubaznošću dr. J. Pachernika (Prag, Češka)

2.1.4 Hranjive podloge

- ✓ Tekuća hranjiva podloga DMEM, koja se koristi za **održavanje nediferenciranih stanica P19** u kulturi, s dodatkom:

- 10% FBS
- 2 mM L-glutamina
- 100 U mL⁻¹ penicilina i 0,1 mg mL⁻¹ streptomicina;

- ✓ Tekuća hranjiva podloga DMEM, koja se koristi za **indukciju diferencijacije**, s dodatkom:

- 5% FBS
- 2 mM L-glutamina
- 100 U mL⁻¹ penicilina i 0,1 mg mL⁻¹ streptomicina;

- ✓ Tekuća hranjiva podloga DMEM, koja se koristi **za rast neurona**, bez seruma koji inhibira rast neurona, a potiče rast astrocita i fibroblasta, s dodatkom:

- 0,5 mM L-glutamina
- 10 μM citozin arabinofuranozida – sprječava proliferaciju stanica koje imaju sposobnost diobe (astrocita i fibroblasta)
- 100 U mL⁻¹ penicilina i 0,1 mg mL⁻¹ streptomicina;
- otopine ITS-X (engl. *insulin-transferrin-selenium-ethanolamine*) (Gibco™, SAD) koja sadrži:

- 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inzulin – potiče unos glukoze i aminokiselina, lipogenezu, prijenos jednovalentnih kationa i fosfata te sintezu proteina i nukleinskih kiselina
- 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ transferin – protein potreban za prijenos željeza, a može pomoći u reduciranju toksičnih razina kisikovih radikala
- 30 nM natrij-selenit – esencijalni element u tragovima koji je inače prisutan u serumu, kofaktor glutathion-peroksidaze i drugih proteina
- 20 μM etanolamin – masna kiselina, prekursor za sintezu fosfolipida

2.1.5 Protutijela

Za analizu metodom *Western blotting* korištena su primarna i sekundarna protutijela čiji se popis nalazi u tablici 1. i 2.

Tablica 1. Korištena primarna protutijela

Ciljani protein	Naziv i porijeklo protutijela	Radna koncentracija	Izvor
Anti-p53	Pab 240: sc-99; monoklonsko, iz miša	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SAD
	Pab 1801: sc-98; monoklonsko, iz miša		
	Pab 421; monoklonsko, iz miša	1:200	Dobiveno ljubaznošću prof. Bourdona
Anti-PUMA α/β	G-3: sc-374223; monoklonsko, iz miša	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-Bax	B-9: sc-7480; monoklonsko, iz miša		
Anti-NME1/NM E2	Poliklonsko, afinitetno pročišćeno, iz kunića	1:3000	proizvedeno u suradnji I. Lascu, M. Herak Bosnar i S. Volarević
Anti-GAPDH	14C10: monoklonsko, iz kunića	1:1000	Cell Signaling Technology (CST), Nizozemska
Anti- β - aktin	AC-15: monoklonsko, iz miša	1:5000	Sigma-Aldrich, SAD

Tablica 2. Korištena sekundarna protutijela

Ciljani protein	Naziv i porijeklo protutijela	Radna koncentracija	Izvor
Protumišje	<i>ECLTM</i> protumišje protutijelo IgG konjugirano s peroksidazom iz hrena, iz ovce	1:5000	GE Healthcare, UK
Protukunićje	7074 protukunićje IgG protutijelo, konjugirano s peroksidazom iz hrena iz kože	1:3000	Cell Signaling Technology (CST), Nizozemska

2.1.6 Ostali materijal

Biljezi molekularnih masa proteina

- ✓ *Precision plus protein standards dual color*, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD)

Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina

- ✓ *Pierce™ BCA protein assay kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD) i kao standardi otopine proteina albumina iz goveđeg seruma, (engl. *bovine serum albumine*, BSA) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Nitrocelulozna membrana za prijenos proteina

- ✓ *GE Healthcare Amersham™ Protran™ NC nitrocellulose membrane*, pora promjera 0,2 μm

Komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom

- ✓ *Western lightening® chemiluminescence reagent Plus* supstrat za detekciju proteina na membrani metodom vezanja peroksidaze hrena na sekundarno protutijelo

Inhibitor proteaza

- ✓ *Complete™, mini, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets* je korišten kako ne bi došlo do razgradnje proteina proteazama prilikom izolacije proteina

Inhibitor fosfataza

- ✓ *PhosSTOP™, phosphatase inhibitor tablets* je korišten kako bi se održao fosforilacijski status proteina prilikom izolacije

Uredaji

- ✓ Uređaj za oslikavanje *Alliance 4.7* (UVItec Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ✓ Magnetska miješalica *MSH Basic* (Ika, Njemačka)
- ✓ Vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip *1083* (GFL, Njemačka)
- ✓ Vaga, tip *PM 4000* (Mettler Toledo, SAD)

- ✓ Centrifuga, tip *51445 R* i *5403* (Eppendorf, Njemačka)
- ✓ Centrifuga, *Harrier 18/80* (MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ✓ Centrifuga *Sorvall Lynx 4000* (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- ✓ Inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija)
- ✓ Sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD)
- ✓ Uređaj za napajanje *Power pac basic power supply* i *PowerPac 300* (BioRad, SAD)
- ✓ Termoblok, *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka)
- ✓ Čitač pločica *ELISA* (Multiscan MS Labsystems, Finska)
- ✓ Tresilica za mikrotitarske pločice, tip *715* (Asal, Italija)
- ✓ Fluorescencijski spektrofotometar *Fluoroscan Ascent FL* (Thermo Scientific)
- ✓ Invertni mikroskop *Wilovert S* (Hund Wetzlar, Njemačka)
- ✓ Tresilica *PMR-30 Rocking shaker* (Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ✓ Kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija)
- ✓ Pločica Bürker-Türk za brojanje stanica (Brand, Njemačka)

2.2 Metode

2.2.1 Rad sa staničnom kulturom

Rad sa stanicama izvođen je u sterilnim uvjetima, u laminaru s okomitim strujanjem zraka, u blizini plamena pri čemu su sav korišteni laboratorijski pribor, puferi i otopine bili sterilni. Stanice su rasle u inkubatoru, u vlažnoj atmosferi, pri koncentraciji ugljikovog dioksida od 5% i temperaturi od 37 °C. Radna površina dezinficirana je alkoholom i sterilizirana UV svjetlom na početku i kraju rada sa staničnim kulturama.

2.2.1.1 Odmrzavanje stanica

Stanice su čuvane zamrznute u kriotubicama u krioprotektivnom mediju (45% kompletirani DMEM, 45% FBS, 10% DMSO) i pohranjene na -80 °C. Kod odmrzavanja pripremljen je medij DMEM s dodatkom antibiotika, 10% FBS-a i 2 mM L-glutamina. Stanice su otopljene u kupelji, pazeći da se ne uroni čep u vodu. Otopljene stanice prenesene su u sterilnu epruvetu s 5 mL pripremljenog medija. Stanice su centrifugirane 5 min na 250 g. Supernatant je odliven, a talog stanica resuspendiran u 5 mL svježeg medija te je sve skupa preneseno u posudu Falcon za staničnu kulturu prije polaganja stanica u inkubator na 37 °C.

2.2.1.2 Održavanje stanica u kulturi

Nediferencirane stanice P19 uzgajane su u posudama Falcon za staničnu kulturu (površine 25 cm²), u 5 ml DMEM medija s dodatkom 10% FBS-a, 2 mM L-glutamina, 100 U mL⁻¹ penicilina i 0,1 mg mL⁻¹ streptomicina u inkubatoru na 37 °C pri 5% CO₂ i uz relativnu vlažnost 95%.

2.2.1.3 Presađivanje stanica

Nediferencirane stanice P19 presađuju se svaka dva dana. Ove stanice je potrebno održavati u optimalnoj gustoći. Ako se pregusto nasade, smanjuje im se sposobnost diferencijacije, dok prerijetko nasadene stanice mogu diferencirati spontano. Stanicama je odsisan medij, isprane su dva puta s 2 mL PBSA, a potom s 0.5-1 mL otopine koja sadrži 0,05% tripsin i 1 mM EDTA u PBSA. Otopina s tripsinom je odmah odsisana te su stanice stavljene u inkubator kako bi se pod djelovanjem tripsina odvojile od podloge. Aktivnost tripsina inhibirana je nakon 7 minuta dodatkom 2 mL kompletiranog medija. Nakon resuspendiranja, stanična suspenzija je razrijeđena u omjeru 1:15 i nasadena u novu posudicu za staničnu kulturu.

2.2.1.4 Određivanje broja stanica

Stanice je potrebno prebrojati kako bi se uzeo broj stanica potreban za eksperiment. Za brojanje stanica korištena je otopina tripanskog modrila koja boji mrtve stanice u plavo zbog oštećenja membrane, dok žive stanice ostaju nebojene. Volumen od 20 μL prethodno tripsinizirane i resuspendirane stanične suspenzije pomiješan je s 50 μL otopine tripanskog modrila i 30 μL DMEM-a te prebačen pod pokrovno stakalce Bürker-Türk pločice za brojanje stanica. Pod svjetlosnim mikroskopom u četiri kvadratića komorice prebrojane su žive stanice. Broj stanica u mililitru suspenzije izračunat je, uzevši u obzir volumen komorice i razrjeđenje stanične suspenzije tripanskim modrilom, prema sljedećoj formuli:

$$\text{br.st. mL}^{-1} = (\text{ukupan broj stanica/broj polja}) \times 5 (\text{razrjeđenje}) \times 250 \times 10^3$$

2.2.1.5 Diferencijacija stanica P19 u neurone

Postupak diferencijacije prilagođen je prema protokolu Jones-Villeneuve i sur. (1983). Za diferencijaciju se koristi retinoična kiselina koja inducira nastanak miješane kulture neurona, fibroblasta i astroglije pa je kulturu potrebno pročišćavati od neželjenih proliferirajućih stanica. Diferencijacija stanica P19 u neurone inducirana je u neprijanjajućim Petrijevim posudicama za uzgoj bakterija (10 cm) kroz ukupno 4 dana. 10^6 stanica nasadeno je u 10 mL kompletiranog DMEM medija sa smanjenim udjelom fetalnog goveđeg seruma (5%) i uz dodatak 1 μM retinoične kiseline. U takvim uvjetima stanice P19 rastu u suspenziji i tvore postepeno rastuće nakupine – embrionalna tjelešca. Rast u suspenziji je ključan korak za učinkovitu diferencijaciju u neurone. Nakon dva dana stanicama je promijenjen medij. Stanice (u formi embrionalnih tjelešaca) zajedno s medijem odpipetirane su u sterilnu epruvetu i istaložene kroz 10-ak minuta. Supernatant je potom odstranjen pipetom, na stanice je dodano 10 mL svježeg medija s dodatkom retinoične kiseline, prenesene su nazad u petrijevku i položene u inkubator kroz iduća 2 dana.

Embrionalna tjelešca prije nasađivanja za daljnju diferencijaciju potrebno je tripsinizirati. S medijem su prenesena u sterilnu epruvetu i ostavljena 10-ak minuta da se istalože. Medij je odstranjen i embrionalna tjelešca isprana su s 10 mL PBSA te ponovno ostavljena da se istalože.

Potom su inkubirana u 2 mL 0,05% tripsina i 1 mM EDTA uz povremeno protresanje, u inkubatoru. Nakon 7 minuta tripsin je inaktiviran dodatkom 5 mL kompletiranog medija, tjelešca su resuspendirana pipetiranjem, uklonjeni su eventualno formirani gelovi DNA, te je suspenzija centrifugirana 5 min na 250 g. Supernatant je dekantiran, a pojedinačne stanice resuspendirane u kompletiranom mediju i izbrojane.

Kroz iduća 4 dana neuroni su uzgajani u posebno tretiranim posudicama za staničnu kulturu (za lakše prijanjanje) do potpuno diferenciranog fenotipa. Stanice su nasađene u različite posude ovisno o pokusu: za mjerenje nastanka ROS-a i za određivanje preživljenja (test MTT), stanice su uzgajane u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Sigma), a za analizu metodom *Western blotting* u pločama za stanične kulture sa šest jažica (Sarstedt). Stanice su nasađene u gustoći 10^5 stanica cm^{-2} i uzgajane 2 dana u kompletiranom mediju DMEM. Nakon 2 dana medij je promijenjen i dodan novi posebno optimiziran za rast neurona.

2.2.1.6 Tretman neurona P19 bakrom i kvercetinom

Neuroni P19 tretirani su bakrovim (II) sulfatom (CuSO_4) i kvercetinom osmi dan od početka indukcije diferencijacije. Ispitan je učinak rastućih koncentracija bakra (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 i 1,5 mM CuSO_4) na preživljenje neurona P19. Za ispitivanje učinka kvercetina na preživljenje neurona izloženih djelovanju toksične koncentracije bakra, stanice su tretirane kombinacijom 0,5 mM CuSO_4 i kvercetina u različitim koncentracijama (3; 30 i 150 μM). Tretman je trajao 24 sata, u inkubatoru na 37 °C.

2.2.2 Određivanje preživljenja neurona P19 primjenom testa MTT

Učinak navedenih rastućih koncentracija iona bakra na preživljenje neurona P19 ispitan je primjenom kolorimetrijske metode, u kojoj se aktivnošću mitohondrijskih dehidrogenaza svjetložuti supstrat metiltiazoliltetrazolium bromid (MTT) razgrađuje do formazana, tamnoljubičasto obojenog produkta. Količina nastalog formazana proporcionalna je broju vijabilnih stanica (Mosmann, 1983). Intenzitet nastalog obojenja može se odrediti spektrofotometrijski.

Stanice su nasade u pločicu s 96 jažica. Nakon obrade neurona P19 otopinom CuSO_4 i kvercetina, tijekom 24 sata, u svaku jažicu dodano je po 40 μL medija s 20 μg boje MTT, a zatim je pločica vraćena u inkubator na 3 sata. Nakon isteklog vremena u svaku jažicu je dodano po 160 μL DMSO-a kako bi se otopio formazan. Apsorbancija je očitana na valnoj duljini od 570 nm pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica.

2.2.3 Unutarstanično stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta

Ukupna količina unutarstaničnog ROS-a pokazatelj je oksidacijskog statusa stanice. Prooksidacijski učinak bakra, odnosno antioksidacijski učinak kvercetina, određen je mjerenjem stvaranja ROS-a korištenjem spoja 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H2DCF-dA) koji u prisutnosti ROS-a daje fluorescentni produkt, proporcionalno intenzitetu oksidacijskog oštećenja (Rosenkranz i sur., 1992). Spoj H2DCF-dA je reagens koji se koristi za kvantifikaciju ROS-a. Ova fluorogena proba difundira u stanicu te ostaje bezbojna dok ju ne hidroliziraju stanične esterase, nakon čega ju stanični ROS oksidira te nastaje fluorescentni spoj diklorofluorescein koji se može detektirati fluorimetrom. Neuroni P19 su inkubirani sa 100 μM reagensa H2DCF-dA u PBS-u tijekom 1 sata, a potom su isprani i inkubirani u PBS-u 1 sat. Nastajanje ROS-a, odnosno razina fluorescencije, mjerena je na fluorescencijskom spektrofotometru pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm i emisijskoj od 538 nm.

2.2.4 Izolacija proteina iz stanica

Cijeli postupak izolacije proteina izvodio se na ledu. Stanice su odvojene od podloge strugalicom i skupa s medijem prenesene iz ploče sa šest jažica u epruvetu Falcon od 15 mL. Centrifugirane su 5 min na 250 g, nakon čega je supernatant odstranjen a talog stanica ispran s PBS-om i ponovo centrifugiran 5 min na 250 g. Supernatant je aspiriran pipetom, a na talog je dodan hladni pufer RIPA s inhibitorima proteaza i fosfataza (25 μL pufera za svaku jažicu), te su stanice lizirane 5 min na ledu. Sadržaj je centrifugiran 15 minuta na 14 000 g pri 4 °C. Supernatant u kojemu su proteini je prenesen u čistu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL i pohranjen na -80 °C do daljnjeg korištenja.

2.2.5 Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Određivanje koncentracije proteina među najčešćim je biokemijskim metodama. Metoda BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*) je metoda za određivanje ukupne koncentracije svih proteina u uzorku. Princip metode bicinkonične kiseline temelji se na stvaranju proteinskih kompleksa s Cu^{2+} , odnosno keliranju bakra s proteinima, u lužnatim uvjetima pri čemu dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^{1+} . U ovoj reakciji, koja se zove biuretska reakcija, peptidi koji sadrže tri ili više aminokiselinskih ostataka tvore svjetlo obojeni kelatni kompleks s bakrovim ionima u lužnatom okruženju u prisustvu natrij kalijevog tartrata. Koncentracija proteina proporcionalna je redukciji. U drugoj reakciji bicinkonična kiselina reagira s reduciranim ionom bakra Cu^+ u lužnatim uvjetima i nastaje produkt intenzivne ljubičaste boje, koji je topiv u vodi i ima apsorpcijski maksimum pri 562 nm (<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>). Intenzitet obojenja izmjeren je spektrofotometrijski. Koncentraciju proteina određena je s obzirom na standardne otopine, u ovom slučaju su to razrijeđenja albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA).

U jažice mikrotitarske pločice otpipetirano je 20 μL standardnih otopina BSA u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 μL reH_2O kao negativna kontrola te 20 μL uzoraka u duplikatima, 10 \times razrijeđenih s reH_2O . Zatim je u svaku jažicu nanoseno 200 μL radnog reagensa BCA pripremljenog miješanjem otopina A (otopina natrijevog karbonata, natrijevog bikarbonata, bicinkonične kiseline i natrijevog tartarata u 0.1 M natrijevom hidroksidu) i B (4%-tni bakrov sulfat) u omjeru 50:1. Pločica je promiješana na tresilici za mikrotitarske pločice 1 min te je inkubirana 30 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, pločica je ohlađena na sobnu temperaturu te je izmjerena apsorbanacija pri 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Iz apsorbanacija otopina BSA nacrtan je baždarni pravac prema kojem su interpolacijom određene koncentracije proteina u uzorcima.

2.2.6 Analiza metodom *Western blotting*

Metoda *Western blotting* je analitička metoda za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju proteina u određenom uzorku primjenom specifičnih protutijela. Metoda se može koristiti za

procjenu razine proteinske ekspresije u stanicama ili usporedbu ekspresije određenog proteina u različitim tkivima. Tehniku je 1979. uvela skupina švicarskih znanstvenika, a sastoji se od niza metoda koje se temelje na prepoznavanju i stvaranju kompleksa između protutijela i proteina koji se nalazi na sintetskoj membrani. Analiza se sastoji od nekoliko koraka koji uključuju razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, prijenos proteina iz gela na sintetsku membranu, provjeru uspješnosti prijenosa bojanjem, sprječavanje nespecifičnog vezanja na membranu, vezanje specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela te detekciju i vizualizaciju specifičnih proteina od interesa na membrani (Towbin i sur., 1979).

2.2.6.1 Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima

Elektroforeza je metoda razdvajanja proteina na temelju njihove veličine i elektroforetske pokretljivosti. U natrijevoj dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforezi (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) razdvajanje proteina se provodi u denaturirajućim uvjetima. U poliakrilamidni gel dodaje se SDS koji denaturira proteine. Denaturirane molekule imaju konstantan omjer mase i naboja pa njihova elektroforetska pokretljivost ovisi isključivo o njihovoj molekulskoj masi (Al-Tubuly, 2000).

Za razdvajanje proteina korištena je diskontinuirana SDS-PAG elektroforeza s 5%-tnim gelom za sabijanje i 10%-tnim gelom za razdvajanje čije su otopine pripremljene prema tablici 3.

Tablica 3. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje

Sastojak	Gel za sabijanje (5%) Volumen (mL)	Gel za razdvajanje (10%) Volumen (mL)
ReH ₂ O	2,7	4,0
30% matična otopina akrilamida	0,67	3,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5
1 M Tris (pH 6,8)	0,5	-
10%-tni SDS	0,04	0,1
10%-tni APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Prije pripreme otopina za gelova, stakla su oprana u deterdžentu te isprana s reH₂O i etanolom. Sklopljena su u sustav da dobro prijanjaju. Gel za razdvajanje izliven je između stakala i na njega je nanescna reH₂O, kako bi se spriječio kontakt otopine gela sa zrakom i na taj način ubrzala polimerizacija gela. Neposredno prije nanošenja gela za sabijanje, reH₂O je odlivena. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, izliven je gel za sabijanje i umetnut je češljíc za formiranje jažica pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka. Nakon polimerizacije, uklonjen je češljíc i stakla s gelovima složena su u sustav za elektroforezu. Pufer za elektroforezu (1×) uliven je između stakala do sredine kadice.

Za svaki uzorak izračunat je volumen koji sadrži 30-50 µg proteina te volumen pufera potrebnog za nanošenje uzoraka na gel (4 × LB). Uzorci su zagrijani 5 min na 95 °C te kratko centrifugirani. Uzorci i biljeg molekulskih masa su nanescni na gel, a kadica je do vrha napunjena puferom za elektroforezu te spojena na uređaj za napajanje. Elektroforeza je provedena 30 min pri konstantnom naponu od 90 V kroz gel za sabijanje te još 90 min pri 110 V kroz gel za razdvajanje sve dok pufer za praćenje tijekom elektroforeze koji sadrži boju bromfenol plavo nije došao do donjeg ruba gela.

2.2.6.2 Prijenos proteina na membranu

Nakon elektroforetskog razdvajanja proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu, primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela. Učinkovitost prijenosa ovisi o sastavu gela, kompaktnosti kontakta gela s membranom, poziciji elektroda, vremenu prijenosa, veličini i sastavu proteina, jačini električnog polja i prisutnosti deterdženata.

Nakon elektroforeze gel je izvađen iz sustava te je uklonjen gornji gel za sabijanje. Nitrocelulozna membrana s porama veličine 0,2 µm izrezana je na veličinu gela za razdvajanje. Korištena je tehnika „mokrog“ prijenosa pri kojoj su svi dijelovi sustava za prienos namočeni u pufer. Membrana je složena u „sandwich“ između katode i anode: počevši od dijela bližeg katodi, na crni dio kazete za prienos slažu se spužvica, dva filter papira, gel, nitrocelulozna membrana, dva filter papira i spužvica te se zatvara bijelim dijelom kazete pazeći pritom da niti u jednom sloju nema mjehurića koji bi mogli ometati prienos proteina na membranu. „Sandwich“ je sagan u plastičnoj kadici u koju je uliven pufer za prienos. Kazeta je potom

stavljena u kadicu za elektroforezu zajedno s puferom za prijenos, posudicom s ledom (kako se sustav ne bi pregrijavao) i magnetom. Kadica za prijenos stavljena je na magnetsku miješalicu, a cijeli sustav je spojen na izvor napajanja pod uvjetima stalne jakosti struje od 200 mA kroz 2 sata ili pod stalnim naponom od 13 V preko noći.

2.2.6.3 Analiza proteina

Za detekciju proteina od interesa korištena je indirektna metoda koja uključuje primarno i sekundarno protutijelo. Primarno protutijelo veže se na antigen na membrani. Slijedi vezanje sekundarnog protutijela koje je usmjereno protiv primarnog protutijela. Sekundarna protutijela su u kompleksu s enzimom (u ovom slučaju peroksidaza iz hrena), koji omogućuje vidljivost signala nakon dodavanja odgovarajućeg supstrata i uzastopne enzimske reakcije.

Nakon prijenosa, sustav za prijenos je rastavljen i membrana izvađena te su kemijskom olovkom na njoj označeni položaji proteina iz standarda. Učinkovitost prijenosa proteina s gela na membranu provjerena je bojanjem u otopini za bojanje membrane koja nespecifično boji proteine, nekoliko sekundi na tresilici. Proteini su bili vidljivi u obliku plavih vrpca. Boja s membrane je isprana u otopini za odbojavanje, a potom je membrana isprana 3 × po 10 min u puferu TBST na tresilici kako bi se uklonili ostaci metanola i octene kiseline iz otopine za odbojavanje. Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na površinu membrane, membrana je inkubirana pola sata na sobnoj temperaturi u reagensu za blokiranje (5% nemasno mlijeko u prahu otopljeno u puferu TBST). Proteini iz mlijeka vežu se na sva potencijalna mjesta nespecifične interakcije. Primarna i sekundarna protutijela razrijeđena su u istom reagensu za blokiranje prema radnoj koncentraciji preporučenoj od proizvođača. Inkubacija membrane u primarnom protutijelu odvijala se preko noći na 4 °C ili 2 sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon inkubacije membrana je isprana 3 × po 10 min u puferu TBST te potom inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi u sekundarnom protutijelu na tresilici. Višak nevezanih protutijela potom je ispran s membrane u puferu TBST, 3 × po 10 min. Zatim je uslijedila vizualizacija membrane i detekcija proteina.

Sekundarno protutijelo je vezano za enzim peroksidazu iz hrena koji omogućava vizualizaciju djelovanjem na kemiluminiscentni supstrat. Proteini su vizualizirani otopinom za

detekciju kemiluminiscencije *Western lightening chemiluminiscence reagent plus* koja je pripremljena miješanjem jednakih udjela supstrata A (otopina luminola) i B (otopina za oksidaciju). Oko 1 ml pripremljenog supstrata nanesen je na membranu i inkubiran jednu minutu u mraku. Višak otopine je odstranjen pomoću papirnatoг ubrusa te je membrana zamotana u prozirnu plastičnu foliju. Membrana je potom prenesena u uređaj za kemiluminiscenciju (Alliance 4.7), gdje je detektiran signal. Nakon detekcije, uspoređivan je intenzitet signala pomoću programa UVIband (UVItec Limited, UK). Rezultati denzitometrije normalizirani su prema intenzitetu signala za β -aktin ili GAPDH, proteina čija se ekspresija u stanicama smatra konstantnom, odnosno neovisnom od učinka različitih tretmana. β -aktin je protein veličine 42 kDa, a GAPDH 37 kDa. Radi uštede na materijalu i vremenu, prilikom analize više proteina na istoj membrani, membrana je prije inkubacije s primarnim protutijelom odrezana između 37 i 42 kDa, te je svaki dio membrane inkubiran s jednim od ova dva primarna protutijela. Na taj način se nanošenje proteina na svaku membranu provjerilo s oba protutijela. S obzirom da je mišji protein p53 slične molekulske mase kao β -aktin i GAPDH, te se stoga na gelu njegova vrpca nalazi blizu vrpcama proteina β -aktin i GAPDH, nakon analize ekspresije proteina p53 primarno i sekundarno antitijelo su uklonjeni inkubacijom membrane u 0,2 M NaOH 15 min na tresilici. Nakon inkubacije u NaOH membrana je isprana s puferom TBST 3×5 min. Prije inkubacije s novim primarnim protutijelom prethodio je korak blokiranja membrane. Uspješnost uklanjanja je provjerena otopinom za detekciju kemiluminiscencije, a za normalizaciju je odabran β -aktin jer se primarno protutijelo za njegovu detekciju koristi u većem razrjeđenju.

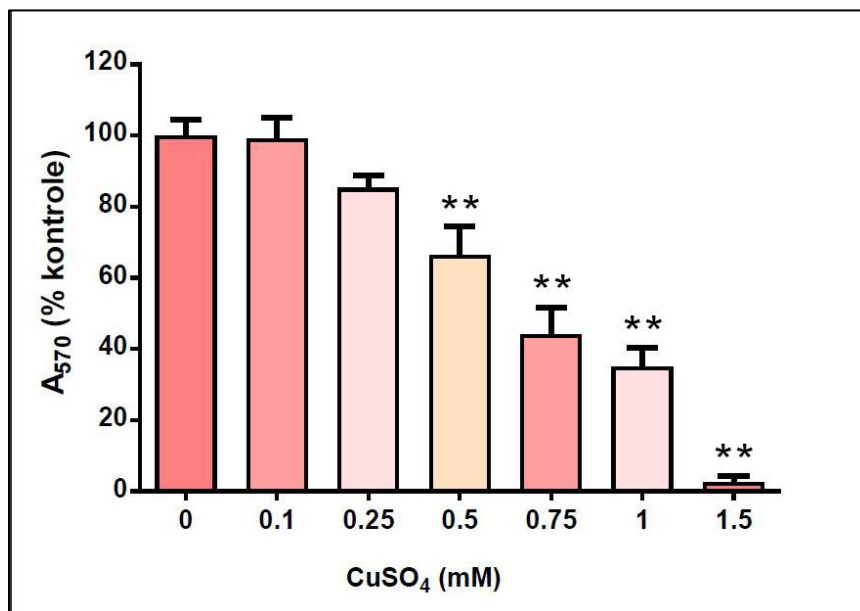
2.2.7 Analiza rezultata

Za statističku obradu podataka i pripadajuće grafičke prikaze korišten je program GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., SAD). Rezultati dobiveni iz najmanje tri pokusa izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Provedena je jednostruka analiza varijance (*one-way ANOVA*) kako bi bile određene značajne razlike rezultata i nakon toga *post hoc* Tukey-ev test višestruke usporedbe za međusobnu usporedbu svih skupina ili Dunnett-ov test višestruke usporedbe za usporedbu tretmana s kontrolnom skupinom. Razlike srednjih vrijednosti između skupina smatrane su statistički značajnima kada je vjerojatnost pogreške (P) bila manja od 0,05.

3 REZULTATI

3.1 Učinak bakra na preživljenje neurona P19

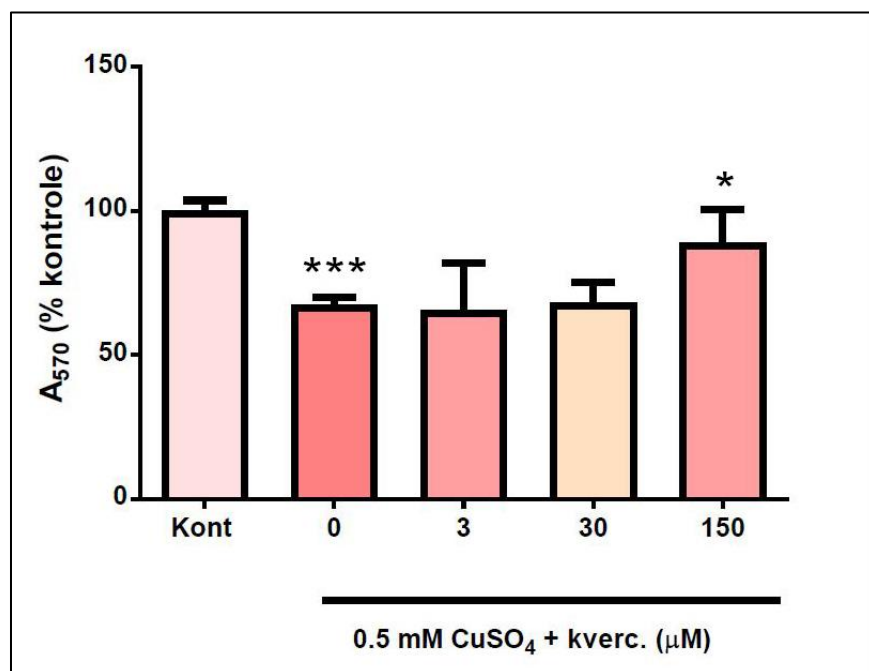
Učinak različitih koncentracija (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 i 1,5 mM) CuSO₄ na preživljenje neurona P19, neposredno nakon tretmana koji je trajao 24 sata, određen je pomoću testa MTT i prikazan na slici 2. Utvrđeno je da dvije najniže primijenjene koncentracije nisu utjecale na preživljenje neurona P19, dok je najveća primijenjena koncentracija gotovo u potpunosti dokinula njihovo preživljenje. Pri koncentraciji od 0,5 mM CuSO₄ utvrđen je statistički značajan pad vijabilnosti, a preživljenje je iznosilo $66,5 \pm 4,2\%$, odnosno smanjeno je za 33,5%. Koncentracija od 0,75 mM smanjila je preživljenje na $44,1 \pm 7,1\%$, dok je pri 1 mM koncentraciji preživljenje neurona P19 iznosilo $35,0 \pm 8,2\%$ u odnosu na kontrolnu skupinu. Za daljnje eksperimente odabrana je koncentracija od 0,5 mM CuSO₄ kao najniža koncentracija koja statistički značajno smanjuje preživljenje.



Slika 2 Učinak različitih koncentracija CuSO₄ na preživljenje neurona P19, određeno pomoću testa MTT. Postotak vijabilnih stanica izražen je kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju netretirane kontrole. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna greška (**P < 0,01 u usporedbi s kontrolnom skupinom tretiranom samo otapalom, prema Dunett-ovom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

3.2 Učinak kvercetina na preživljenje neurona P19 izloženih toksičnim koncentracijama bakra

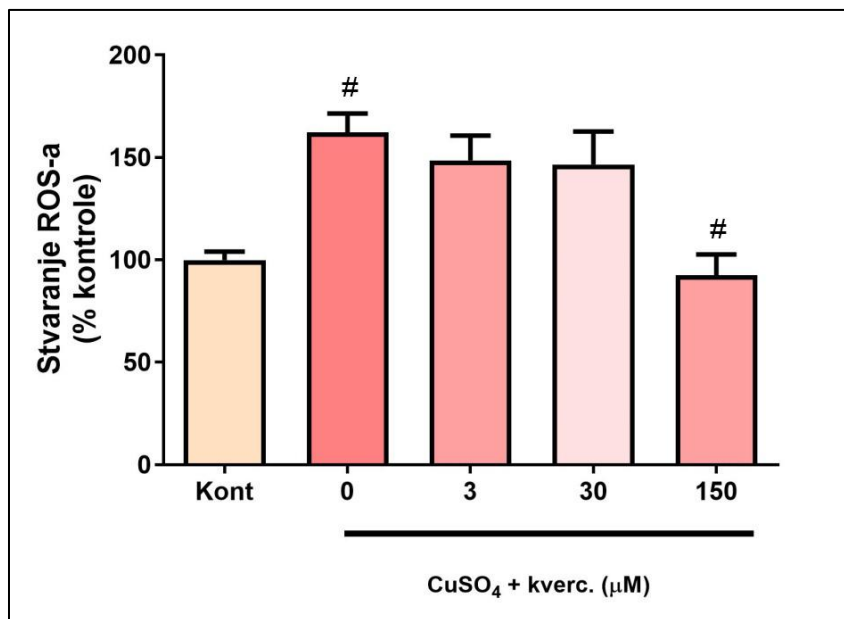
Nakon što je određen učinak samostalno primijenjenih koncentracija CuSO_4 , istraženo je kako kvercetin utječe na preživljenje neurona P19 koji su istovremeno izloženi toksičnim koncentracijama iona bakra. Određivanje preživljenja također je provedeno testom MTT. Korištene su 3 različite koncentracije kvercetina (3, 30 i 150 μM) i izabrana koncentracija bakra (0,5 mM CuSO_4), za koju je prethodno utvrđeno da je najniža koja statistički značajno smanjuje preživljenje. Statistička obrada rezultata dobivenih primjenom MTT testa pokazala je da koncentracije manje od 150 μM ne utječu na preživljenje neurona P19, dok 150 μM kvercetin povećava preživljenje na $88,9 \pm 4,2\%$ kontrolne skupine (slika 3).



Slika 3 Učinak različitih koncentracija kvercetina na preživljenje neurona P19 izloženih 0,5 mM CuSO_4 , određeno pomoću testa MTT. Postotak vijabilnih stanica izražen je kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju netretirane kontrole. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška (***) $P < 0,001$ u odnosu na kontrolnu skupinu, * $P < 0,05$ u odnosu na skupinu tretiranu samo bakrom; prema Tukey-evom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

3.3 Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u prisutnosti iona bakra i kvercetina

Nakupljanje ROS-a kao mjera za razinu oksidacijskog stresa u stanici određeno je mjerenjem fluorescencije primjenom spoja spoja 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H₂DCF-dA). Nakon ulaska u stanicu navedeni spoj se hidrolizira te u reakcijama sa staničnim ROS-om daje snažno fluorescirajući produkt. Nakon tretmana neurona P19 s 0,5 mM CuSO₄ te kombinacijom 0,5 mM CuSO₄ i triju izabranih koncentracija kvercetina (3, 30 i 150 μM), izmjereno je stvaranje ROS-a. U stanicama tretiranim samo sa 0,5 mM CuSO₄ uočen je porast stvaranja ROS-a od 62,3 ± 11,3% u odnosu na kontrolnu skupinu. U prisutnosti 0,5 mM CuSO₄, kvercetin primijenjen u dvjema nižim koncentracijama (3 i 30 μM) nije utjecao na nakupljanje ROS-a, dok je 150 μM kvercetin izazvao smanjenje ROS-a na razinu kontrolne skupine, odnosno na 92,6 ± 12,6% (slika 4).

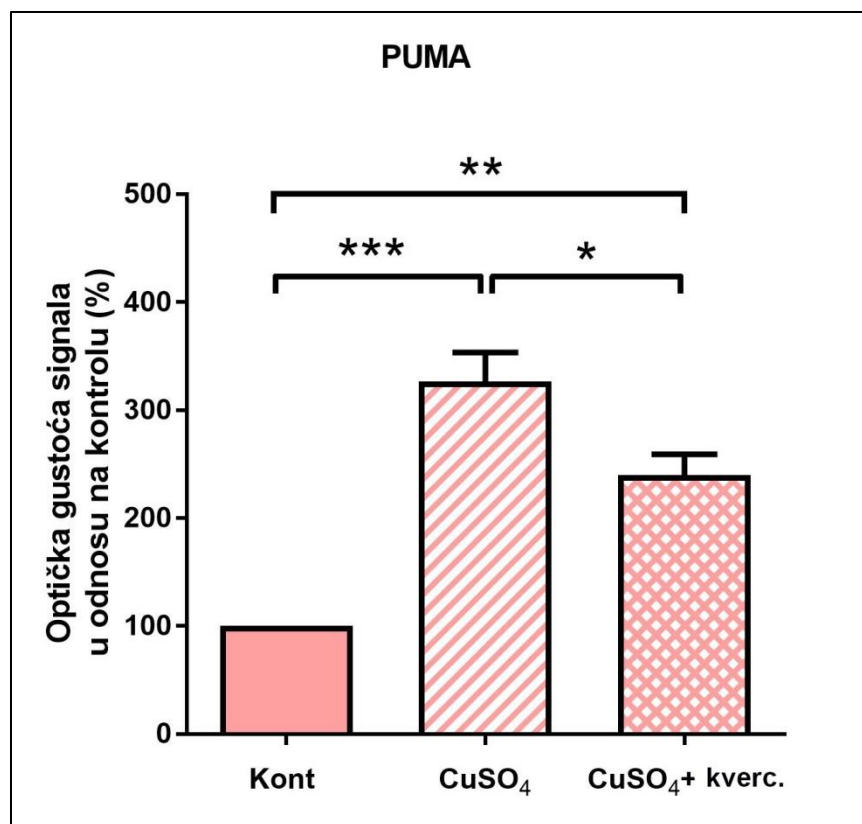


Slika 4 Razina ROS-a u neuronima P19 izloženim 0,5 mM CuSO₄ i različitim koncentracijama kvercetina. Rezultati su prikazani kao intenzitet fluorescencije u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti. ([#]P < 0.0001 za tretman 0,5 mM CuSO₄ u odnosu na kontrolu, te za tretman kombinacijom CuSO₄ i 150 μM kvercetina u odnosu na tretman samo CuSO₄; prema Tukey-evom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

3.4 Učinak bakra i kvercetina na ekspresiju proteina vezanih uz apoptozu

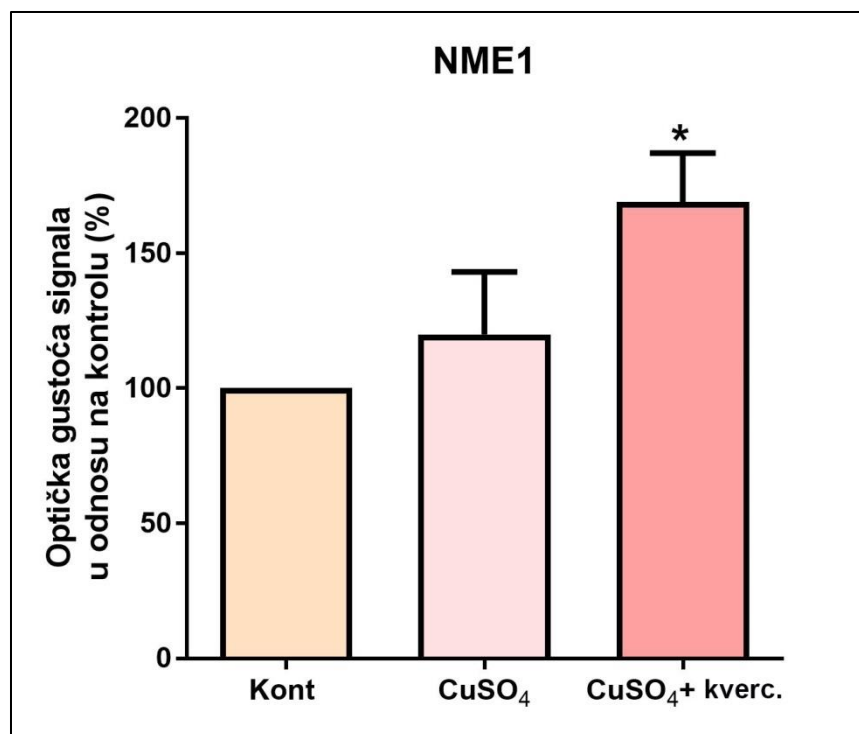
Da bi razjasnili molekularni mehanizam neuroprotektivnog djelovanja kvercetina u prisutnosti iona bakra, analizirana je ekspresija proteina koji sudjeluju u regulaciji apoptoze ili su povezani s oksidacijskim promjenama u stanicama. Istraženo je dolazi li do promjena u ekspresiji proteina p53, Bax, PUMA i NME1 u prisutnosti otopine samog 0,5 mM CuSO₄, kao i u njegovoj kombinaciji s kvercetinom. S obzirom da kvercetin u koncentracijama od 3 i 30 μM nije imao učinka na preživljenje i stvaranje ROS-a, analizirana je ekspresija proteina nakon kombiniranog tretmana s 0,5 mM CuSO₄ i 150 μM kvercetina.

Na slici 5 prikazani su rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina PUMA u neuronima P19. Ekspresija proteina PUMA u stanicama tretiranim samo s 0,5 mM CuSO₄ porasla je za $226,7 \pm 11,9\%$ u odnosu na kontrolnu skupinu. U prisutnosti kvercetina porast ekspresije proteina PUMA značajno je smanjen za 26,6% (s 326,7% na 239,7%) u usporedbi s vrijednostima dobivenim nakon tretmana sa samim CuSO₄, iako je i dalje ostao značajno povećan ($139,7 \pm 7,4\%$) u odnosu na kontrolnu skupinu.



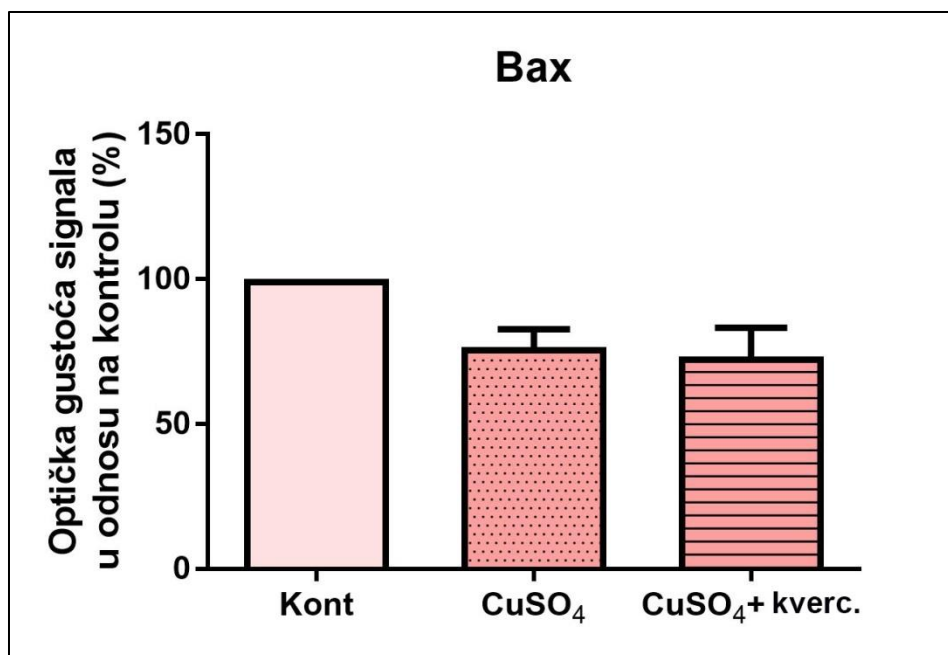
Slika 5 Ekspresija proteina PUMA nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄ te 0,5 mM CuSO₄ u kombinaciji sa 150 μM kvercetinom, izražena kao promjena u odnosu na netretirani uzorak kontrolnih neurona P19. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti. (**P<0.01, ***P<0.001 u odnosu na kontrolu; *P<0.05 u odnosu na stanice tretirane bakrom, prema Tukey-evom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

Na slici 6 prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina NME1. Ekspresija ovog proteina u neuronima P19 tretiranim s 0,5 mM CuSO₄ nije značajno promijenjena u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, u prisutnosti 150 μM kvercetina dolazi do indukcije ekspresije proteina NME1. Utvrđeni porast iznosi 69,0 ± 4,1% u odnosu na kontrolu.



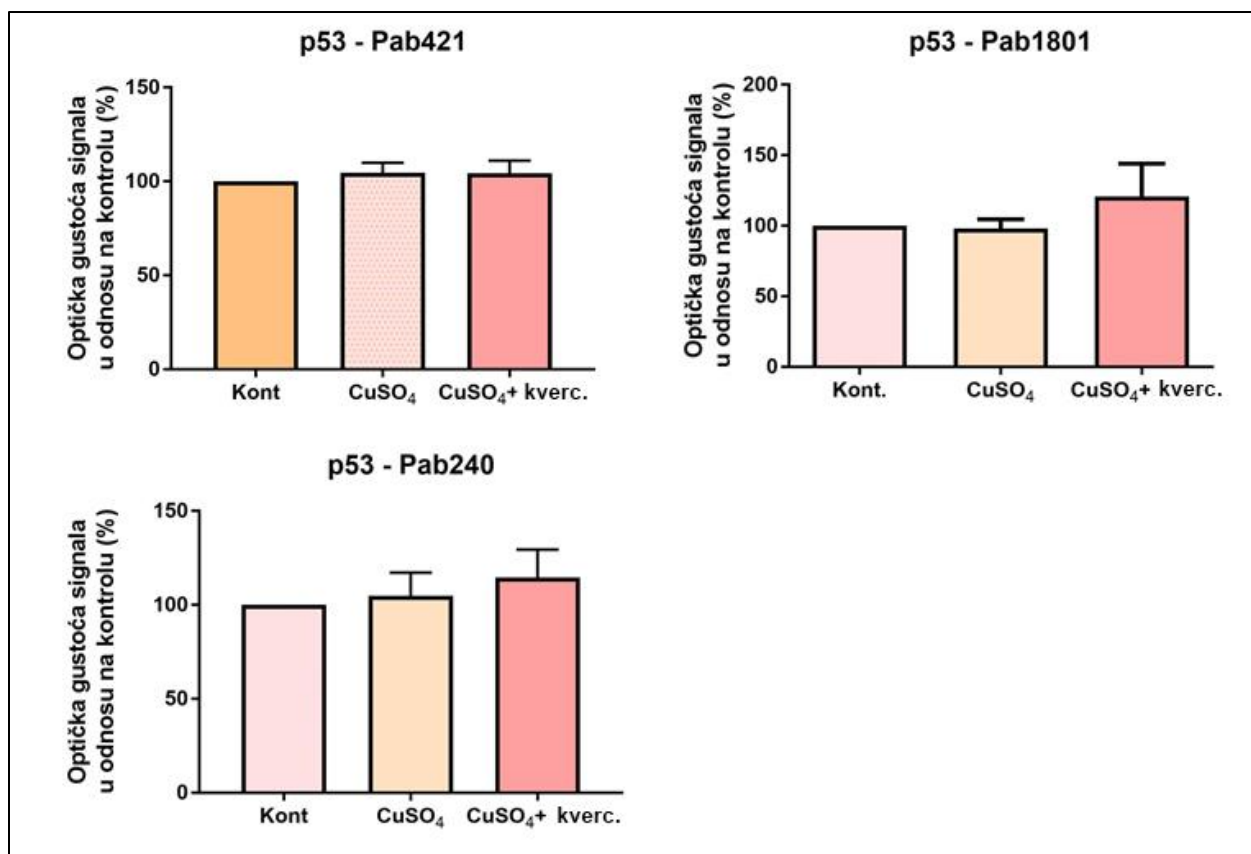
Slika 6 Ekspresija proteina NME1 nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄ te 0,5 mM CuSO₄ u kombinaciji sa 150 μM kvercetinom, izražena kao promjena u odnosu na netretirani uzorak kontrolnih neurona P19. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti. (*P<0.05 u odnosu na kontrolnu grupu, prema Tukey-evom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

Denzitometrijska analiza pokazala je da tretman s 0,5 mM CuSO₄ ne utječe na ekspresiju proteina Bax. Ekspresija proteina Bax ostala je nepromijenjena i u prisutnosti 150 μM kvercetina (slika 7).



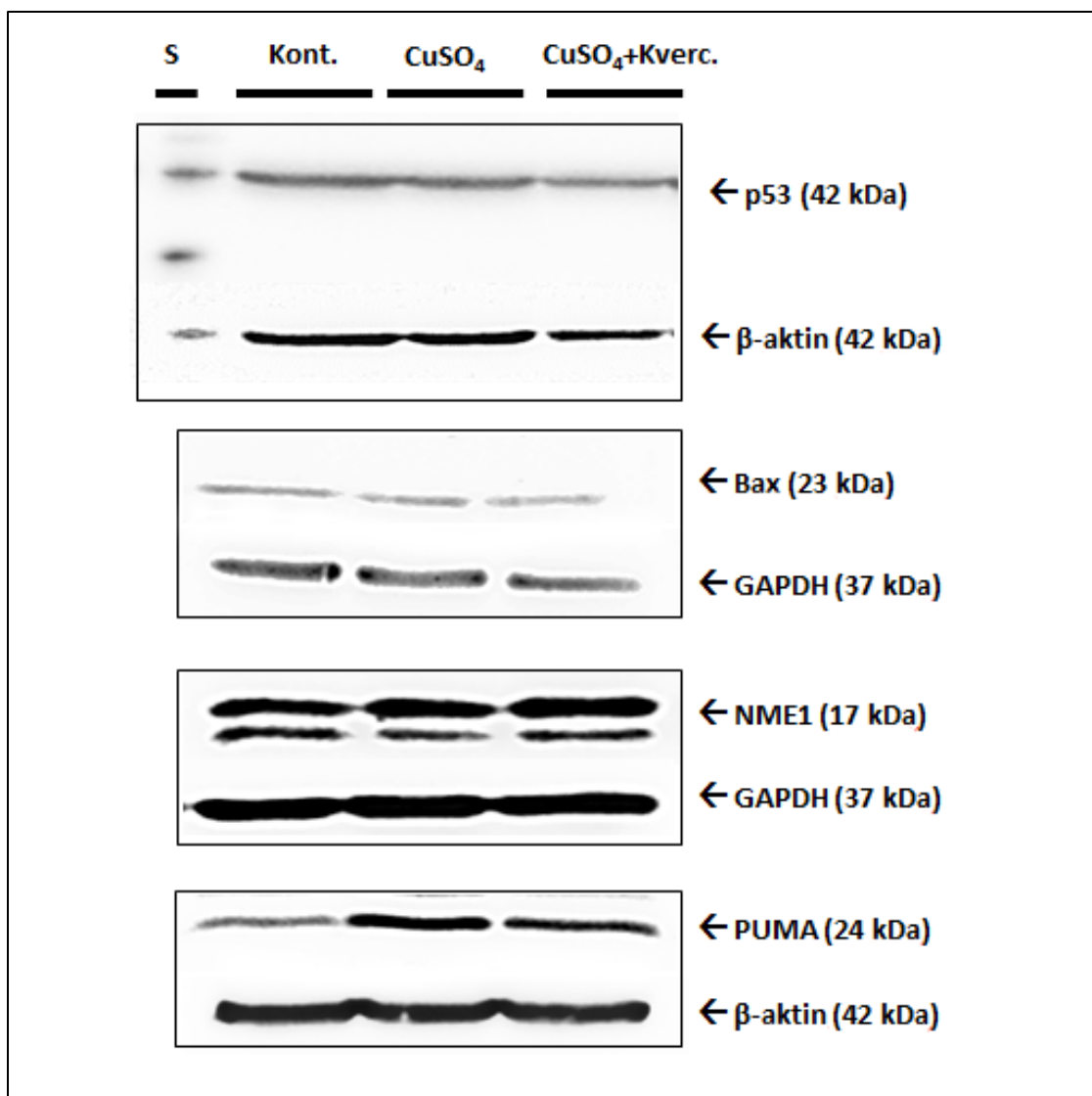
Slika 7 Ekspresija proteina Bax nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄ te 0,5 mM CuSO₄ u kombinaciji sa 150 μM kvercetinom, izražena kao promjena u odnosu na netretirani uzorak kontrolnih neurona P19. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti. Promjene u ekspresiji proteina Bax nisu detektirane.

Ekspresija proteina p53 provjerena je primjenom tri različita primarna protutijela, od kojih su dva komercijalna (Pab240 i Pab1801, Tablica 1) i jedno nekomercijalno (Pab421, Tablica 1), s ciljem potvrde rezultata i uklanjanja eventualnih nespecifičnih vrpca na membrani. Kao pozitivna kontrola korišten je standard za p53 s tri izoforme humanog proteina p53: p53 α , Δ 133p53 α i Δ 40p53 α . Sva tri protutijela pokazala su približno jednake rezultate, odnosno nisu detektirane značajne promjene u ekspresiji proteina p53 u neuronima P19 nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄, samim ili u kombinaciji s 150 μM kvercetinom (slika 8).



Slika 8 Ekspresija proteina p53, analizirana s 3 različita primarna protutijela, nakon tretmana s 0,5 mM CuSO₄ te 0,5 mM CuSO₄ u kombinaciji sa 150 μM kvercetinom, izražena kao promjena u odnosu na netretirani uzorak kontrolnih neurona P19. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti.

Na slici 9 prikazana je ekspresija svih analiziranih proteina na reprezentativnim membranama. Kao što je prethodno navedeno, analizom pomoću metode *Western blotting* detektiran je porast ekspresije proteina PUMA u neuronima tretiranim s 0,5 mM CuSO₄, a taj je porast smanjen u prisutnosti 150 μM kvercetina. U lizatu neurona P19 tretiranih s kombinacijom CuSO₄ i kvercetina uočena je povišena razina ekspresije proteina NME1 u odnosu na kontrolu. Za proteine p53 i Bax nisu nađene promjene u ekspresiji.



Slika 9 Detekcija metodom *Western blotting* proteina p53, Bax, NME1 i PUMA iz lizata netretiranih neurona P19 (Kont.), neurona tretiranih 0,5 mM CuSO₄ (CuSO₄) i neurona tretiranih 0,5 mM CuSO₄ i 150 μM kvercetinom (CuSO₄+kverc.), S je standard za 3 izoforme humanog proteina p53, rezultati su normalizirani prema intenzitetu za β-aktin i GAPDH.

4 RASPRAVA

Neurodegenerativne bolesti, kao i određena akutna oštećenja živčanog sustava, poput traume ili ishemijskog moždanog udara, karakterizira odumiranje živčanih stanica. Kao posljedica kontinuiranog odumiranja neurona u procesu neurodegeneracije javljaju se različiti poremećaji kognitivnih i/ili motoričkih funkcija, npr. demencija (karakteristična za Alzheimerovu bolest) i nemogućnost koordinacije i izvođenja pokreta (karakteristična za Parkinsonovu bolest). Rezultati brojnih istraživanja upućuju na značajnu ulogu oksidacijskog stresa u pokretanju odumiranja neurona u neurodegenerativnim bolestima (Gorman i sur., 1996; Knight, 1998; Vonk i Klomp, 2008). Učinkovita terapija koja bi spriječila ili usporila odumiranje neurona, odnosno očuvala funkciju središnjeg živčanog sustava, još uvijek ne postoji za ove bolesti.

U posljednja dva desetljeća došlo je do velikog napretka u razumijevanju odnosa bakra, oksidacijskog stresa i neurodegenerativnih bolesti, a djelovanje na oksidacijski stres jedan je od potencijalnih pristupa u liječenju. Svojstvo bakra da lako mijenja oksidacijska stanja koje koriste mnogi enzimi čiji je sastavni dio, ujedno je ono što ga čini štetnim. Novija istraživanja upućuju da je suvišak slobodnog bakra izravno uključen u nastanak i progresiju neurodegenerativnih procesa. Wilsonova, Alzheimerova i Parkinsonova bolest glavni su neurodegenerativni poremećaji povezani s narušenom homeostazom bakra (Manto, 2014). Toksični učinak bakra uglavnom je posljedica njegove uloge u proizvodnji slobodnih radikala (Valko i sur., 2005), pa bi prevencija nastanka ROS-a mogla biti djelotvoran terapijski pristup protiv neurotoksičnosti izazvane ionima bakra.

Farmakološki potencijal i učinkovitost „lijekova iz prirode“, odnosno spojeva biljnog porijekla, intenzivno se istražuje u današnje vrijeme. Kvercetin, jedan od najzastupljenijih biljnih flavonoida u ljudskoj prehrani, pokazao je brojne pozitivne farmakološke učinke među kojima u kontekstu neurodegenerativnih procesa posebno treba istaknuti antioksidacijsko, antiapoptotsko i neuroprotektivno djelovanje (Haleagrahara i sur., 2011; D'Andrea, 2015; Lei i sur., 2015).

U ovom istraživanju, koje je bilo usmjereno na razjašnjavanje molekularnog mehanizma neuroprotektivnog djelovanja kvercetina u uvjetima oksidacijskog oštećenja izazvanog toksičnim koncentracijama iona bakra, korišten je jedan od najpristupačnijih modela za istraživanje

neurona - stanice P19, pluripotentna linija stanica dobivena iz mišjeg teratokarcinoma. Indukcijom s retinoičnom kiselinom, stanice P19 diferencirane su u funkcionalne i morfološki zrele neurone, koji svojim karakteristikama odgovaraju neuronima *in vivo* te se smatraju korisnim modelom za razna neurobiološka i farmakološka istraživanja (McBurney, 1993; Jazvinščak Jembrek i sur., 2012).

Ukratko, u ovom istraživanju utvrđeno je da pri umjerenom oksidacijskom stresu izazvanom povišenim koncentracijama bakra flavonoid kvercetin smanjuje nakupljanje ROS-a i povećava preživljenje neurona P19. Njegov neuroprotektivni učinak može se povezati s antioksidacijskim djelovanjem, kao i djelovanjem na proteine unutarnjeg puta apoptoze.

Treba istaknuti da su u ovom istraživanju za postizanje biološkog učinka bile potrebne relativno visoke koncentracije kvercetina. Iako je poznato da antioksidansi u visokim koncentracijama mogu djelovati prooksidacijski, s posljedičnim učinkom na smanjenje preživljenja, neuroni P19 pokazali su otpornost na visoke koncentracije kvercetina i nije zabilježen prooksidacijski ili neurotoksični učinak u koncentracijama koje su korištene u ovom istraživanju.

U istraživanju koje su proveli Jazvinščak Jembrek i sur. (2012b) pokazano je da kvercetin primijenjen samostalno u kulturi zdravih neurona P19 smanjuje nakupljanje ROS-a, a da pritom ne utječe na vijabilnost niti na morfološki izgled neurona. Istraživanja na stanicama neuroblastoma SH-SY5Y (Ossola i sur., 2008) te na stanicama PC-12 porijeklom iz feokromocitoma (Bao i sur., 2017) također su pokazala visoku toleranciju stanica neuronalnog porijekla na kvercetin.

Kvercetin u interakciji s bakrom može imati prooksidacijski učinak pri visokim koncentracijama bakra i niskim koncentracijama kvercetina, što proizlazi iz njegove strukture flavonoida. Naime, flavonoidi mogu djelovati i kao antioksidansi i kao prooksidansi. No pri većim koncentracijama kvercetina antioksidacijska aktivnost nadvladava prooksidacijski učinak (Filipe i sur., 2004).

U ovom istraživanju pokazano je da CuSO_4 smanjuje vijabilnost neurona P19 u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji. Želeći izazvati umjereno oštećenje neurona, odabrana je koncentracija od 0,5 mM CuSO_4 , koja je smanjila preživljenje neurona za 33,5%. U tim

uvjetima pozitivan učinak na preživljenje imala je samo najveća primijenjena koncentracija kvercetina (150 μM), dok dvije niže koncentracije (3 i 30 μM) nisu mijenjale oksidacijski status niti vijabilnost neurona. Da bi utvrdili je li u pozadini neuroprotektivnog djelovanja kvercetina njegov antioksidacijski učinak, u tretiranim stanicama izmjereno je nakupljanje ROS-a primjenom fluorescentne probe 2',7'-diklorofluorescin diacetata. U skladu s dosada opisanim mehanizmima djelovanja bakra i kvercetina, utvrdili smo da toksične koncentracije bakra povećavaju nakupljanje ROS i tako dovode neurone u stanje oksidacijskog stresa. Kvercetin je, također u skladu s očekivanjima, smanjio razinu unutarstaničnog ROS-a. Ovakav rezultat upućuje na to da je antioksidacijsko djelovanje kvercetina, koje se vrlo vjerojatno može pripisati izravnom učinku na hvatanje slobodnih radikala, u pozadini učinka kvercetina na preživljenje neurona u uvjetima u ovom istraživanju. I druga su istraživanja pokazala da se protektivni učinak kvercetina u uvjetima oksidacijskog stresa može povezati s njegovim snažnim antioksidacijskim djelovanjem (Dajas i sur. 2003, 2015; Jazvinščak Jembrek i sur. 2012a).

S obzirom da molekularni mehanizmi u pozadini neuroprotektivnog djelovanja kvercetina nisu posve razjašnjeni, u ovom radu je istražen učinak kvercetina na ekspresiju proteina koji su direktno ili indirektno uključeni u pokretanje programirane stanične smrti, odnosno u odgovor stanice na prisutnost oksidacijskog stresa. Modulacija unutarstaničnih putova može imati važnu ulogu u pokretanju procesa stanične smrti. Smatra se da metali izazivaju apoptozu uglavnom preko unutarnjeg (mitohondrijskog) puta uslijed izazvanog oksidacijskog stresa (Caito i Aschner, 2015; Sinha i sur., 2013).

U prethodnim istraživanjima pokazano je da kvercetin može modulirati unutarstanične signalne putove preživljenja ili stanične smrti. Ishikawa i Kitamura (2000) su u primarnoj kulturi mezangijalnih stanica štakora (SM43) izazvali apoptozu primjenom vodikovog peroksida (H_2O_2), te pokazali da kvercetin djeluje antiapoptotski inhibicijom signalnog puta JNK-c-Jun/AP-1 i puta ERK-c-Fos/AP-1. Na modelu oksidacijskog stresa izazvanog H_2O_2 u kulturi neurona P19 pokazano je da kvercetin inhibira aktivnost kaspaza 3/7, promjene u kondenzaciji kromatina kao i ekspresiju proteina poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP), koji je aktiviran oksidacijskim oštećenjem molekule DNA (Jazvinščak Jembrek i sur. 2012a). Na modelu dopaminergičkih neurona MN9D, kvercetin je značajno inducirao aktivaciju dviju glavnih kinaza za regulaciju staničnog preživljenja, proteinske kinaze D1 (PKD1) i kinaze Akt (Ay i sur., 2017).

Obitelj proteina Bcl-2 ima važnu ulogu u apoptozi i povezana je s oštećenjem stanica u neurodegenerativnim poremećajima. Ovi proteini sudjeluju u apoptozi ovisnoj i neovisnoj o kaspazama. Omjer unutarstanične razine proapoptotskih i antiapoptotskih članova obitelji Bcl-2 ključan je za održavanje membranskog potencijala mitohondrijske membrane i sudbinu stanice. Protein p53 u zrelih kortikalnim neuronima djeluje u jezgri kao transkripcijski faktor za proapoptotske proteine Bcl-2. Njegova pretjerana aktivacija povezuje se s mnogim degenerativnim bolestima kao što su artritis, multipla skleroza i neuropatije (Fridman i Lowe, 2003). Međutim, odumiranje neurona P19 izazvano ionima bakra u ovom istraživanju nije povezano s promjenama u ekspresiji p53 što je utvrđeno s tri različita protutijela.

Protein PUMA prepoznat je kao jedan od glavnih medijatora unutarnjeg puta apoptoze. Pri bazalnim uvjetima eksprimiran je u jako malim količinama, no indukcija njegove transkripcije je vrlo brza pri raznim oblicima stresora u stanicama svih tkiva (Yu i Zhang, 2009). Dok se aktivnost ostalih proteina iz iste skupine obitelji proteina Bcl-2 može regulirati na više načina, kao na primjer posttranslacijskim modifikacijama, aktivnost proteina PUMA regulirana je isključivo transkripcijom (Yu i Zhang, 2008). Steckley i sur. (2007) pokazali su da p53 ima značajnu ulogu u regulaciji ekspresije proteina PUMA i apoptoze inducirane oksidacijskim stresom. No iako je značajan, nije i jedini transkripcijski faktor pa u neuronima koji imaju *knock-out* mutaciju za p53 ne dolazi do potpune inhibicije aktivnosti proteina PUMA pri oksidacijskom stresu. Promotor proteina PUMA sadrži vezna mjesta za nekoliko transkripcijskih faktora osim za p53 (p73, c-Myc, FoxO3A, CHOP, E2F1), koji su različito aktivni u različitim vrstama tkiva i pri različitim oblicima staničnog stresa. Dakle, PUMA ima ulogu i u oblicima programirane stanične smrti koji ne ovise o proteinu p53. Time se mogu objasniti dobiveni rezultati u neuronima P19 koji pokazuju različitu ekspresiju proteina PUMA u ovisnosti o tretmanu, dok je razina proteina p53 ostala nepromijenjena.

Protein Bax je jedan od ključnih aktivatora apoptoze. Pod utjecajem je transkripcijskog faktora p53. Da bi djelovao proapoptotski mora biti premješten iz citosola u vanjsku membranu mitohondrija. U neuronima je širok raspon podražaja (npr. povišene koncentracije glutamata, nakupljanje amiloida β , kao i oksidacijski stres) povezan s translokacijom proteina Bax na membranu mitohondrija, nakon čega slijedi poremećaj mitohondrijskog membranskog potencijala, oslobađanje citokroma c i aktivacija kaspaza (Culmsee i Mattson, 2005). U ovom

istraživanju nije uočena promjena u ekspresiji ukupnog staničnog proteina Bax. Iako se u nekim radovima navodi povećanje ekspresije uslijed oksidacijskog stresa (Ryter i sur., 2007), u literaturi postoje podatci o izostanku povećane ekspresije Bax prilikom apoptoze (Fortin i sur., 2001) te se ključnim smatra njegova konformacijska promjena, aktivacija i preseljenje u membranu mitohondrija (Vela i sur., 2013).

Pored svoje najpoznatije uloge u supresiji metastaziranja, pokazano je da je protein NME1 uključen i u stanični odgovor na stres. Stanična linija BAF3 s pojačano eksprimiranim proteinima NME1 ili NME2 bila je otpornija na oksidacijski stres izazvan s H₂O₂ u odnosu na roditeljske stanice s nižom ekspresijom (Arnaud-Dabernat i sur., 2004). Peuchant i sur. (2017) pokazali su na miševima *in vivo* i na fibroblastima *in vitro* da proteini NME1/NME2 ostvaruju protektivni učinak u uvjetima akutnog oksidacijskog stresa inhibicijom aktivnosti kinaze JNK. I u ovom je istraživanju pokazano da je protektivno djelovanje kvercetina povezano s povećanom ekspresijom proteina NME1. Iako nije istraživano, moguće je da je kvercetinom potaknuta aktivacija kinaze NME1 inhibirala signalni put JNK-c-Jun/AP-1, kao što je pokazano u radu Ishikawa i Kitamura (2000). Pregledom literature nisu pronađena istraživanja koja povezuju kvercetin i NME1, te su potrebna daljnja istraživanja. Ovu bi vezu posebno zanimljivo bilo istražiti na tumorskim modelima zbog moguće povezanosti kemopreventivnog učinka kvercetina i utjecaja NME1 na oksidacijski stres i inhibiciju metastaziranja.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja su pokazali da kvercetin u prisutnosti umjerenih koncentracija iona bakra može značajno pospješiti preživljenje neurona P19. Jednim dijelom neuroprotektivni učinak kvercetina može se pripisati njegovom antioksidacijskom potencijalu i sprječavanju nakupljanja ROS, kao i modulaciji ekspresije proteina koji su povezani s apoptozom i oksidacijskim stresom kao što su PUMA i NME1. Mehanizmi djelovanja kvercetina još nisu razjašnjeni te je potrebno provesti daljnja istraživanja, no on bi mogao biti dobar prekursor za razvoj neuroprotektivnih lijekova. U razvijenom društvu neupitno je starenje populacije. Ono ima za posljedicu povećanje broja ljudi treće životne dobi, što implicira i veći broj neuroloških bolesnika, prvenstveno oboljelih od neurodegenerativnih bolesti. Zato je razvoj lijekova za ove trenutno neizlječive bolesti modernom društvu od velikog interesa.

5 ZAKLJUČAK

Na temelju ovog diplomskog rada mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- CuSO_4 primijenjen kroz 24 sata smanjuje preživljenje neurona P19 u koncentracijama $\geq 0,5$ mM, što pokazuje toksičnost iona Cu u primijenjenoj koncentraciji
- $0,5$ mM CuSO_4 izaziva povećano stvaranje ROS u neuronima P19, što pokazuje da primijenjena koncentracija izaziva stanje oksidacijskog stresa.
- Tretman neurona P19 s $0,5$ mM CuSO_4 izaziva pojačanu ekspresiju proteina PUMA, što upućuje na proapoptotsko djelovanje iona Cu.
- Tretman neurona P19 s $0,5$ mM CuSO_4 ne mijenja ekspresiju proapoptotskih proteina Bax i p53 u odnosu na bazalne uvjete, što zajedno s prethodnim zaključkom upućuje na pokretanje apoptoze neovisne o ekspresiji ovih proteina.
- 150 μM kvercetin povećava preživljenje neurona P19 u prisutnosti $0,5$ mM CuSO_4 , što pokazuje njegovo neuroprotektivno djelovanje.
- 150 μM kvercetin smanjuje ROS u neuronima P19 u prisutnosti $0,5$ mM CuSO_4 , što pokazuje njegovo antioksidacijsko djelovanje.
- 150 μM kvercetin inhibira ekspresiju proteina PUMA u neuronima P19 u prisutnosti $0,5$ mM CuSO_4 , što upućuje na antiapoptotski mehanizam djelovanja kvercetina.
- 150 μM kvercetin pojačava ekspresiju proteina NME1 u neuronima P19 u prisutnosti $0,5$ mM CuSO_4 , što pokazuje da je neuroprotektivni učinak kvercetina posredovan aktivnošću ovog proteina na za sada neutvrđen način.
- Kvercetin u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog ionima bakra ne utječe na ekspresiju proapoptotskih proteina p53 i Bax, što upućuje da antiapoptotski učinak kvercetina nije posredovan mijenjanjem ekspresije ovih dvaju proteina.
- Dobiveni rezultati upućuju na neuroprotektivno djelovanje kvercetina, no mehanizam djelovanja kvercetina nije u potpunosti razjašnjen te su potrebna daljnja istraživanja u tom području.

6 LITERATURA

- Al-Tubuly, A. A. (2000). SDS-PAGE and Western blotting. U: George, A. J. T., Urch, C. E. (ur.) *Methods in molecular medicine*, 40, Humana Press, New York, 391–405.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2008). *Molecular biology of the cell*, (5th ed.). Garland Science. New York.
- Andrabi, S. A., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: Parthanatos. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 233–241.
- Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V. (2011). Copper in the human organism. *Trakia journal of sciences*, 9(1), 88–98.
- Arnaud-Dabernat, S., Masse, K., Smani, M., Peuchant, E., Landry, M., Bourbon, P. M., Le Floch, R., Daniel, J. Y., Larou, M. (2004). Nm23-M2/NDP kinase B induces endogenous c-myc and nm23-M1/NDP kinase a overexpression in BAF3 cells. Both NDP kinases protect the cells from oxidative stress-induced death. *Experimental cell research*, 301(2), 293–304.
- Ay, M., Luo, J., Langley, M., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A. G. (2017), Molecular mechanisms underlying protective effects of quercetin against mitochondrial dysfunction and progressive dopaminergic neurodegeneration in cell culture and MitoPark transgenic mouse models of Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry*, 141, 766–782.
- Bao, D., Wang, J., Pang, X., Liu, H. (2017). Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *Molecules*, 22(7), 1122
- Boissan, M., Dabernat, S., Peuchant, E., Schlattner, U., Lascu, I., Lacombe, M. L. (2009). The mammalian Nm23/NDPK family: From metastasis control to cilia movement. *Molecular and cellular biochemistry*, 329(1–2), 51–62.
- Bulcke F., Dringen R., Scheiber I.F. (2017) Neurotoxicity of copper. U: Aschner M., Costa L. (ur.) *Neurotoxicity of metals. Advances in neurobiology*, (18). Springer, Cham, 313–343.

- Cai, X., Bao, L., Dai, X., Ding, Y., Zhang, Z., Li, Y. (2015). Quercetin protects RAW264.7 macrophages from glucosamine-induced apoptosis and lipid accumulation via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7545–7553.
- Caito, S., Aschner, M. (2015). Chapter 11 - Neurotoxicity of metals. U: Lotti, M., Bleecker, M. L. (ur.) *Handbook of clinical neurology*, 131, Elsevier, Amsterdam, 169–189.
- Cox, M. M. i Nelson, D. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed.). W.H. Freeman. New York.
- Cregan, S. P., Arbour, N. A., Maclaurin, J. G., Callaghan, S. M., Fortin, A., Cheung, E. C. C., Guberman, D. S., Slack, R. S. (2004). p53 activation domain 1 is essential for PUMA upregulation and p53-mediated neuronal cell death, *Journal of neuroscience*, 24(44), 10003–10012.
- Culmsee, C., Mattson, M. P. (2005). P53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(3), 761–777.
- Ćetković, H., Perina, D., Harcet, M., Mikoč, A., Herak Bosnar, M. (2014). Nme family of proteins - Clues from simple animals. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 388(2), 133–142.
- D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256–271.
- Dajas, F., Abin-Carriquiry, J. A., Arredondo, F., Blasina, F., Echeverry, C., Martínez, M., Rivera, F., Vaamonde, L. (2015). Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochemistry international*, 89, 140–148.
- Dajas, F., Rivera, F., Blasina, F., Arredondo, F., Echeverry, C., Lafon, L., Morquio, A., Heizen, H. (2003). Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotoxicity research*, 5(6), 425–432.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516.

- Eskici, G., Axelsen, P. H. (2012). Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 51(32), 6289–6311.
- Filipe, P., Haigle, J., Silva, J. N., Freitas, J., Fernandes, A., Mazière, J. C., Mazière, C., Santus, R., Morlière, P. (2004). Anti- and pro-oxidant effects of quercetin in copper-induced low density lipoprotein oxidation: Quercetin as an effective antioxidant against pro-oxidant effects of urate. *European journal of biochemistry*, 271(10), 1991–1999.
- Fortin, A., Cregan, S. P., MacLaurin, J. G., Kushwaha, N., Hickman, E. S., Thompson, C. S., Hakim, A., Albert, P. R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D. S., Slack, R. S. (2001). APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *Journal of cell biology*, 155(2), 207–216.
- Fridman, J. S., Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030–9040.
- Gorman, A. M., McGowan, A., O'Neill, C., Cotter, T. (1996). Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences*, 139(96), 45–52.
- Greenough, M. A., Camakaris, J., Bush, A. I. (2013). Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 62(5), 540–555.
- Haleagrahara, N., Siew, C. J., Mitra, N. K., & Kumari, M. (2011). Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neuroscience letters*, 500(2), 139–143.
- Hardwick, J. M., Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), 1–22.
- Hsu, T. (2011). NME genes in epithelial morphogenesis. *Naunyn-Schmiedeberg's arch pharmacol*, 384(4-5), 363–372
- Ishikawa, Y., Kitamura, M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney international*, 58(3), 1078–1087.
- Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Piskula, M. K., Nakamura, T., Kato, Y., Ito, M., Miyamoto, K., Tsuji, A., Kawai, Y., Terao, J. (2011). Accumulation of orally administered

- quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free radical biology and medicine*, 51(7), 1329–1336.
- Jazvinščak Jembrek, M., Vuković, L., Puhović, J., Erhardt, J., Oršolić, N. (2012a). Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *Journal of molecular neuroscience*, 47(2), 286–299.
- Jazvinščak Jembrek, M., Gašparović, A. Č., Vuković, L., Vlainić, J., Žarković, N., Oršolić, N. (2012b). Quercetin supplementation: Insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 385(12), 1185–1197.
- 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(6), 1303–1322.
- Jones-Villeneuve E. M. V., Rudnicki M. A., Harris J. F., McBurney M. W. (1983): Retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molecular and cellular biology*, 3, 2271-2279.
- Jung, H., Seong, H. A., Ha, H. (2007). NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function. *Journal of biological chemistry*, 282(48), 35293–35307.
- Kannan, K., Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153–163.
- Knight, J. A. (1998). Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Annals of clinical and laboratory science*, 28(6), 331–346.
- Lei, X., Chao, H., Zhang, Z., Lv, J., Li, S., Wei, H., Xue, R., Li, F., Li, Z. (2015). Neuroprotective effects of quercetin in a mouse model of brain ischemic/reperfusion injury via anti-apoptotic mechanisms based on the Akt pathway. *Molecular medicine reports*, 12(3), 3688–3696.
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8(3), 1–14.

- Lucchesi, C., Zhang, J., Chen, X. (2016). Modulation of the p53 family network by RNA-binding proteins. *Translational cancer research*, 5(6), 676–684.
- Manto, M. (2014). Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and roles in neurodegeneration. *Toxics*, 2(2), 327–345.
- Mao, X., Gu, C., Chen, D., Yu, B., He, J. (2017). Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget*, 8(46), 81649–81661.
- McBurney, M. W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *International journal of developmental biology*, 37(1), 135–140.
- Messerschmidt, A. (2010). Copper Metalloenzymes, U: Mander, L., Liu, H. W. (ur.) *Comprehensive natural products II*, 8, Elsevier, Amsterdam, 489–545.
- Miles, S. L., Mcfarland, M., Niles, R. M. (2014). Molecular and physiological actions of quercetin: Need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutrition reviews*, 72(11), 720–734.
- Miller, F. D., Pozniak, C. D., Walsh, G. S. (2000). Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. *Cell death and differentiation*, 7(10), 880–888.
- Mlcek, J., Jurikova, T., Skrovankova, S., Sochor, J. (2016). Quercetin and its anti-allergic immune response. *Molecules*, 21(5), 1–15.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1–2), 55–63.
- Ossola, B., Kääriäinen, T. M., Raasmaja, A., Männistö, P. T. (2008). Time-dependent protective and harmful effects of quercetin on 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Toxicology*, 250(1), 1–8.
- Parrales, A., Iwakuma, T. (2015). Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in oncology*, 5, 1–13.
- Peuchant, E., Bats, M. L., Moranvillier, I., Lepoivre, M., Guitton, J., Wendum, D., Lacombe, M. L., Moreau-Gaudry, F., Bossian, M., Dabernat, S. (2017). Metastasis suppressor NM23

- limits oxidative stress in mammals by preventing activation of stress-activated protein kinases/JNKs through its nucleoside diphosphate kinase activity. *FASEB Journal*, 31(4), 1531–1546.
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, 42, 125–152.
- Romani, P., Ignesti, M., Gargiulo, G., Hsu, T., Cavaliere, V. (2017). Extracellular NME proteins: a player or a bystander?. *Laboratory investigation*, 1–10.
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W. (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, *Journal of immunological methods*, 156, 39–45.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical pharmacology*, 83(1), 6–15.
- 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. *Antioxidants & redox signaling*, 9(1), 49–89.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*, 87(7), 1157–1180.
- Spencer, J. P. E. (2008). Flavonoids: Modulators of brain function?. *British journal of nutrition*, 99, 60–77.
- Spencer, J. P. E. (2009). Flavonoids and brain health: Multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes and nutrition*, 4(4), 243–250.
- Steckley, D., Karajgikar, M., Dale, L. B., Fuerth, B., Swan, P., Drummond-Main, C., Poulter, M. O., Ferguson, S. S. G., Strasser, A., Cregan, S. P. (2007). Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *Journal of neuroscience*, 27(47), 12989–12999.

- Sun A. Y., Chen Y. (1998). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Journal biological medicine*, 5(6), 401–414.
- Tedeschi, A., Di Giovanni, S. (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: Enlightening the dark side of the moon. *EMBO reports*, 10(6), 576–583.
- Timmer, J. C., Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell death and differentiation*, 14(1), 66–72.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National academy of sciences*, 76(9), 4350–4354.
- Uo, T., Kinoshita, Y., & Morrison, R. S. (2007). Apoptotic actions of p53 require transcriptional activation of PUMA and do not involve a direct mitochondrial/cytoplasmic site of action in postnatal cortical neurons. *Journal of neuroscience*, 27(45), 12198–12210.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161–1208.
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., Marzo, I. (2013). Direct interaction of bax and bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *Journal of biological chemistry*, 288(7), 4935–4946.
- Vijayakumaran, R., Tan, K. H., Miranda, P. J., Haupt, S., Haupt, Y. (2015). Regulation of mutant p53 protein expression. *Frontiers in oncology*, 5, 3–10.
- Vonk, W. I., Klomp, L. W. (2008). Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical society transactions*, 36(6), 1322–1328.
- Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B., Gitlin, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiology of disease*, 6(4), 221–230.
- Yee, K. S., Vousden, K. H. (2008). Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis*, 13(1), 87–95.
- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., Abbott, N. J. (2004). Flavonoid

permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free radical biology and medicine*, 36(5), 592–604.

Yu, J., i Zhang, L. (2009). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27(1), 71–83.

<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>

7 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. lipnja 1993. godine u Zadru. Osnovnu školu završila sam 2008. godine u Zadru, nakon čega sam upisala prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Jurja Barakovića te maturirala 2012. godine. Iste godine upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stekavši zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije, 2015. g. na istom fakultetu upisala sam diplomski studij molekularne biologije.

Tijekom studija sudjelovala sam na mnogim stručnim i znanstvenim skupovima kao slušatelj, a na 6. Hrvatskom kongresu neuroznanosti i s posterskim priopćenjem Neuroprotective effect of quercetin against copper-induced toxicity via PI3K/Akt and ERK signalling in P19 neurons (Klara Zubčić; Josipa Vlainić; Nada Oršolić; Maja Jazvinščak Jembrek). 2016. godine volontirala sam na izolaciji makrozoobentosa na projektu Multisek na Zoologijskom zavodu. Sudjelovala sam na 6. Tjednu botaničkih vrtova kao volonter u Botaničkom vrtu PMF-a. Od 2012. do 2017. godine bila sam stipendist Grada Zadra za deficitarna zvanja. Tijekom studija bila sam član sekcije za šišmiše Udruge studenata biologije - BIUS te član veslačke sekcije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta s kojom sam osvojila nekoliko odličja na studentskim i međunarodnim natjecanjima.