

Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta u ljudskoj plazmi primjenom fluorescentnih sondi dihidroetidij i 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat

Maskalan, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:018375>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Nina Maskalan

**Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta u ljudskoj
plazmi primjenom fluorescentnih sonda
dihidroetidij i 2',7'-diklordihidrofluorescein-
diacetat**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s osnovama genetike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za prehranu i dijetoterapiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i doc. dr. sc. Davora Šakića.

Srdačno se zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Ani-Mariji Domijan i doc. dr. sc. Davoru Šakiću na velikoj pomoći, uloženom trudu i vremenu pri pisanju ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi pružili podršku tijekom cijelog studija i bez kojih danas ne bih bila tu gdje jesam.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Reaktivne kisikove vrste | 2 |
| 1.1.1. Oksidacijski stres..... | 4 |
| 1.1.2. Regulacija reaktivnih kisikovitih vrsta u organizmu..... | 7 |
| 1.1.3. Reaktivne kisikove vrste u razvoju bolesti..... | 9 |
| 1.2. Fluorescencijska spektrometrija..... | 11 |
| 1.2.1. Osnovni dijelovi fluorescentnog spektrometra..... | 13 |
| 1.3. Fluorescentne sonde | 14 |
| 1.3.1. 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat | 14 |
| 1.3.2. Dihidroetidij | 155 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 156 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 17 |
| 3.1. Kemikalije | 18 |
| 3.2. Aparatura..... | 18 |
| 3.3. Biološki uzorci | 18 |
| 3.4. Određivanje reaktivnih kisikovitih vrsta pomoću fluorescentne sonde DCF-DA..... | 18 |
| 3.5. Određivanje reaktivnih kisikovitih vrsta pomoću fluorescentne sonde DHE | 19 |
| 3.6. Priprema uzoraka za ispitivanje metoda..... | 19 |
| 3.7. Statistička obrada rezultata..... | 22 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 23 |
| 4.1. DCF-DA fluorescentna sonda | 24 |
| 4.1.1. Ispitivanje stabilnosti reakcije primjenom DCF-DA fluorescentne sonde..... | 24 |
| 4.1.2. Ispitivanje linearnosti metode mjerenja reaktivnih kisikovitih vrsta primjenom DCF-DA fluorescentne sonde | 25 |
| 4.1.3. Osjetljivost metode mjerenja reaktivnih kisikovitih vrsta primjenom fluorescentne sonde DCF-DA..... | 28 |
| 4.2. DHE fluorescentna sonda..... | 29 |
| 4.2.1. Ispitivanje stabilnosti reakcije primjenom DHE fluorescentne sonde | 29 |
| 4.2.2. Ispitivanje linearnosti metode mjerenja reaktivnih kisikovitih vrsta primjenom DHE fluorescentne sonde | 30 |
| 4.2.3. Osjetljivost metode mjerenja reaktivnih kisikovitih vrsta primjenom fluorescentne sonde DHE | 32 |
| 4.3. Praćenje razine reaktivnih kisikovitih vrsta u punoj krvi primjenom DHE fluorescentne sonde..... | 33 |
| 4.4. Primjena metode korištenjem DCF-DA na uzorcima plazme..... | 34 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 38 |
| 7. LITERATURA..... | 41 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 45 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |

1.1. Reaktivne kisikove vrste

Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su visokopotentni oksidansi koji sadrže kisik te imaju ključnu ulogu u nizu unutarstaničnih i izvanstaničnih procesa kao što su diferencijacija i proliferacija stanica, stanična signalizacija te obrana od patogena. U njih ubrajamo visoko reaktivne slobodne radikale uključujući superoksidni anionski radikal ($O_2^- \cdot$) i hidroksilni radikal ($\cdot OH$), te neradikalne vrste kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik ($1O_2$) (Andrés i sur., 2023) (tablica 1).

Tablica 1. Popis reaktivnih kisikovih vrsta.

| Neradikalne vrste | | Reaktivni slobodni radikali | |
|--------------------------|----------|-----------------------------|----------------|
| Hidrogen peroksid | H_2O_2 | Superoksid | $O_2^- \cdot$ |
| Sigletni kisik | $1O_2$ | Hidroksil | $\cdot OH$ |
| Ozon | O_3 | Hidroperoksil | $HO_2 \cdot$ |
| Hipobromasta kiselina | $HBrO$ | Peroksil | $RO_2 \cdot$ |
| Hipoklorasta kiselina | $HClO$ | Alkoksil | $RO \cdot$ |
| Organski peroksid | $ROOH$ | Karbonat | $CO_3^- \cdot$ |
| Peroksinitrit | $ONOO^-$ | Ugljikov dioksid | $CO_2 \cdot$ |
| Peroksinitrozna kiselina | $ONOOH$ | | |

Glavni izvor staničnih ROS-ova je mitohondrijski respiratorni lanac u kojem nastaju kao nusprodukti u sintezi ATP-a tijekom normalnog metabolizma kisika. Jedan od enzimskih sustava koji je zaslužan za njihovu proizvodnju u respiratornom lancu je enzim NADH-ubikinon oksidoreduktaza koja uključuje kao kofaktore ubisemikinon, flavin mononukleotid, Fe-S klaster i NAD^+ . Taj enzimski kompleks ima važnu ulogu u povećanoj proizvodnji ROS-ova u stanju različitih bolesti, dok je manja proizvodnja ROS-ova, i posljedično manje oksidativno oštećenje kada je organizam zdrav. Enzimski kompleks sukcinat dehidrogenaza ima važnu ulogu u Krebsovom ciklusu, a građen je od hidrofilnih i hidrofobnih proteina vezanih na ubikinon. On katalizira oksidaciju sukcinata u fumarat, a pretjeranom proizvodnjom fumarata dolazi do akumulacije ROS-ova u mitohondrijima. Također, važno je

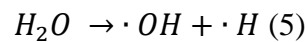
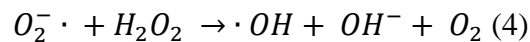
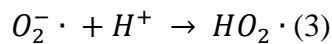
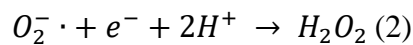
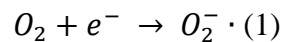
spomenuti i ubikinol–citokrom c oksidoreduktazu kao jedan od kompleksa koji sudjeluje u proizvodnji ROS-ova u respiratornom lancu (Yang i Lian, 2020).

Enzimi poput NADPH oksidaze (NOX), ksantin oksidaze (XO), mijeloperoksidaze, lipoksigenaze, ciklooksigenaze i citokrom P450 (CYP) su važni izvori ROS-ova. Glavna funkcija enzima NADPH oksidaze, koji je uključen u respiratorni lanac i stanični metabolizam, je stvaranje ROS-ova u svim vrstama stanica. NADPH koji nastaje pentofosfatnim putem tijekom oksidativne faze reducira molekularni kisik u superoksidni radikal putem NADPH oksidaze. Ksantin oksidaza koristi molekularni kisik umjesto NAD^+ kao akceptor elektrona i na taj način proizvodi superoksid i vodikov peroksid. Oksidacijom hipoksantina u ksantin, te zatim ksantina u mokraćnu kiselinu, ksantin oksidaza proizvodi dvije molekule vodikovog peroksida i dvije molekule superoksida. Tijekom sinteze leukotriena, tromboksana i prostaglandina, drugi enzimi kao što su lipooksigenaze i ciklooksigenaze također generiraju ROS-ove. CYP enzimi kataliziraju širok spektar reakcija u kojima, u aktivnom mjestu enzima, kao nusprodukti nastaju ROS-ovi. Monoooksigenaze miješane funkcije također stvaraju superoksidne anione. Superoksid može nastati i različitim neenzimskim putevima poput glikozilacije u uvjetima hiperglikemije. Peroksisomi u reakcijama β -oksidacije dugolančanih masnih kiselina pomoću acil-CoA oksidaze i reakcijama koje uključuju oksidazu d-aminokiselina i druge oksidaze sudjeluju u proizvodnji vodikova peroksida (Andrés i sur., 2023; Bucher, 2019).

Iako ROS-ovi u organizmu uglavnom nastaju iz endogenih izvora, mogu se stvarati i kao odgovor na vanjske podražaje. Njihov nastanak može biti potaknut ultraljubičastim zračenjem, ionizirajućim zračenjem, konzumacijom alkohola i duhana, primjenom lijekova i toksičnih tvari (Andrés i sur., 2023).

Dodatno, enzimskim ili neenzimskim mehanizmom različiti ROS-ovi mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi. Jedan primjer prikazan je shemom 1. Primarni reaktivni kisikov radikal je superoksidni anion koji nastaje redukcijom molekularnog kisika jednim elektronom uz pomoć mitohondrijskih reduktaza (1.1). Osim kao nusprodukt mitohondrijskog respiratornog lanca, nastaje i u drugim metaboličkim reakcijama koje troše kisik u endoplazmatskom retikulumu, peroksisomima, jezgrinoj i citoplazmatskoj membrani. Superoksidni anion je nestabilna molekula i jak oksidans te se brzo reducira u vodikov peroksid spontano ili pomoću superoksid dismutaza (1.2). Također, zato što kisik u superoksidnom anionu ima oksidacijski broj -1, ima i dva standardna redoks potencijala, te može djelovati i kao reducens te ponovno prijeći u molekularni kisik. Protonacijom superoksidnog aniona nastaje hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2 \cdot$), a njihova raspodjela ovisi o pH

stanice (1.3). Hidroperoksilni radikal je reaktivniji i više oksidira, ali pri fiziološkom pH prevladava superoksid. Protonirani oblik prevladava u blizini stanične membrane zbog niže pH vrijednosti te može ući u nju i potaknuti procese lipidne peroksidacije. Hidroksilni radikal primarno nastaje iz superoksidnog anionskog radikala i vodikova peroksida kataliziran željeznim ionima kroz Haber-Weissov reakciju (1.4). On je, također, jak oksidans s relativno kratkim vremenom raspada te glavni uzročnik oksidativnog oštećenja baza DNA. Hidroksilni radikal također može nastati fotolitičkom razgradnjom alkilhidroperoksida te razgradnjom vode djelovanjem ionizirajućeg zračenja (1.5) (Andrés i sur., 2023; Zorov i sur., 2014).



Shema 1. Nastanak pojedinih ROS-ova.

1.1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je porast ROS-ova iznad normalne razine što posljedično može uzrokovati štetne učinke na organizam. S druge strane, pretjerano niske razine ROS-ova nazivamo redukcijski stres. Ravnoteža između stvaranja i uklanjanja ROS-ova u organizmu je kontrolirana. Neregulirani oksidacijski i redukcijski stres mogu rezultirati ozbiljnim oštećenjem stanica, neželjenom staničnom smrću te otkazivanjem cijelih organa i organizma. ROS-ovi djeluju kao štetne reaktivne čestice oštećujući unutarstanične proteine, lipide i nukleinske kiseline. Reakcije ROS-ova s DNA rezultiraju jednolančanim i dvolančanim lomovima, stvaranjem poprečnih veza i modificiranjem baza. Kao biomarker oksidativnog oštećenja DNA koristi se oksidacijski produkt 8-okso-2'-deoksigvanozin. Povećana razina ROS-ova može inducirati njihovu dodatnu proizvodnju što rezultira oštećenjem susjednih mitohondrija i staničnom smrću, a taj se fenomen naziva "ROS-inducirano oslobađanje ROS-a (engl. *ROS induced release of ROS, RIRR*)" (Bucher, 2019; Zorov i sur., 2014; Bae i sur., 2011).

Međutim, regulirani oksidacijski stres neophodan je za niz bioloških funkcija. Ima ulogu u preživljavanju i rastu stanica te u njihovoj proliferaciji i diferencijaciji. Dokazano je

da superoksidni radikal može popraviti oksidiranu DNA prijenosom elektrona na gvanozilni radikal jednolančane DNA te time sudjelovati u sprječavanju samog oksidativnog oštećenja. ROS-ovi sudjeluju u napredovanju staničnog ciklusa iz G1 u S fazu te njihove smanjene endogene koncentracije mogu uzrokovati zaustavljanje staničnog ciklusa. Na taj način može doći do inhibicije proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica. ROS-ovi djeluju i kao faktori rasta u stanicama. Tijekom tjelovježbe također dolazi do povećane razine ROS-ova što rezultira s nekoliko adaptivnih odgovora u organizmu. Dolazi do povećane oksidacijske obrane, povećane osjetljivosti mišića na inzulin i biogenezu mitohondrija, što pokazuje utjecaj oksidacijskog stresa na korisne učinke vježbanja (Stone i sur., 2024; Andrés i sur., 2023; Bae i sur., 2011; Paur i sur., 2011).

Među nepoželjne učinke ROS-a je mogućnost nepovratne inaktivacije proteina. Tiolne skupine cisteina (Cys-SH) u citosolu se deprotoniraju u tiolatne skupine (Cys-S-) koje su podložne oksidaciji, a pri visokim koncentracijama vodikova peroksida dolazi do reverzibilne oksidacije tiolatne skupine u sulfensku skupinu (Cys-SOH). Na taj način vodikov peroksid može utjecati na afinitet vezanja proteina na supstrate i na samu enzimsku funkciju proteina. Iako su većinom mete cisteinski ostatci, mete mogu biti i druge aminokiseline poput tirozina i metionina. Oksidacijom proteina poput tioredoksina dolazi do izravne promjene aktivnosti proteina. Brojne fosfataze i kinaze su podložne oksidaciji nakon koje mogu promijeniti svoju aktivnost putem posttranslacijskih modifikacija. Proteinske tirozin fosfataze često se inaktiviraju na taj način. Još jedan od načina utjecaja na proteine je oksidacijom proteasoma koji zatim postaju neaktivni, ne mogu razgraditi proteine te dolazi do povećane razine proteina. ROS-ovi mogu utjecati na proizvodnju, stabilnost ili funkciju proteina oksidacijom transkripcijskih faktora. Oksidirani transkripcijski faktor neće se moći vezati za DNA i na taj način pospješiti samu transkripciju. S druge strane, oksidacijski stres može i povoljno utjecati na transkripciju gena. ROS-ovi mogu inhibirati njihovu razgradnju što rezultira povećanim stvaranjem transkripcijskih faktora. Jedan od takvih primjera je sprječavanje degradacije hipoksijom inducibilnog faktora 1α (HIF 1α), koji je glavni faktor transkripcije za prilagodbu stanica na stanje hipoksije. Osim utjecajem na transkripcijske faktore, ROS-ovi mogu pospješiti transkripciju oksidacijom same DNA. Oksidacijom specifičnih baza u promotoru faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) pojačavaju vezanje HIF 1α na VEGF promotor. Na taj način sudjeluju u signalizaciji između jezgre i mitohondrija. Još jedan od primjera regulacije gena putem oksidacije DNA je oksidacija baza posredovana vodikovim peroksidom u ciljnim regulacijskim regijama gena pritom stvarajući 8-oksoguanin. Proizvedeni 8-oksoguanin regrutira 8-oksoguanin DNA glikozilazu 1 koja uzrokuje prekide jednolančane

DNA i na taj način omogućuje topoisomerazi IIb da prilikom popravka lezija savije DNA. Savijanjem DNA omogućeno je kompleksima inicijacije pristup ciljnom promotoru. Takvi jednolančani prekidi potrebni su za aktivaciju transkripcije gena putem estrogenskog receptora, androgenog receptora, receptora retinoične kiseline i receptora tiroksina. Osim kinaza i fosfataza, još neki od proteina koji su fiziološki regulirani oksidacijskim stresom su histon deacetilaze, kaspaze, metaloproteinaze, α 1-antitripsin, α 2-makroglobulin, prolilin hidroksilaze, GTP ciklohidrolaze i brojni drugi (Herb i Schramm, 2021; Nathan i Cunningham-Bussel, 2013; Paur i sur., 2011).

Tumor nekrotizirajući faktor α (TNF- α) igra važnu ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i staničnoj smrti te je njegova signalizacija strogo kontrolirana. Važnu ulogu u njegovoj kontroli imaju ROS-ovi. Smatra se kako ROS-ovi djeluju kao posrednici u preživljavanju stanica TNF- α signalizacijom i aktivacijom NF- κ B. (Bae i sur., 2011; Bao i sur., 2009)

Bitno je spomenuti važnu ulogu oksidacijskog stresa u obrani protiv patogena. ROS-ovi su ključna komponenta antimikrobne obrane. Kada dođe do prepoznavanja bakterija od strane makrofaga, dolazi do brze i snažne proizvodnje ROS-a u različitim staničnim odjeljcima s različitom antimikrobnom funkcijom. Jedna od glavnih uloga je inaktivacija bakterija oksidacijskim praskom koji stvara NADPH oksidoreduktaza 2 (NOX2). NOX2 je jedini enzim koji sudjeluje u stvaranju izvanstaničnog ROS-a koje proizvode makrofazi kao odgovor na bakterijsku infekciju. Bitna uloga NOX2 u obrani od patogena vidi se kod osoba kod kojih je došlo do mutacije gena koji kodiraju za NOX2. Makrofazi neće uspjeti proizvesti dovoljne količine ROS-a za obranu od patogena te je osoba povećano osjetljiva na infekcije. Aktivacija NOX2 je strogo regulirana i ovisi o površinskim receptorima na stanicama urođene imunosti. Neki receptori poput Toll-like receptora (TLR), G-protein-coupled receptora (GPCR) i TNF receptora (TNFR) mogu pokrenuti aktivaciju NOX2 dok stimulacijom Fc receptora i integrina dolazi do njezine izravne aktivacije. NOX2 prvobitno proizvodi superoksidni anion s jakim antimikrobnim svojstvima. Superoksid ima sposobnost inducirati lizu bakterije u fagosomu oštećenjem bakterijskih biomolekula oksidacijom željeznih i sumpornih skupina u raznim enzimima. Jedna od reaktivnih kisikovih vrsta koja uvelike doprinosi razgradnji mikroba je hipoklorasta kiselina (*HClO*) koja nastaje u granulocitima iz vodikova peroksida djelovanjem enzima mijeloperoksidaze (MPO). *HClO* oksidira tirozinske ostatke te na taj način ispoljava baktericidna svojstva jače od superoksida. Oksidativni prasak regulira upalni odgovor pokrećući sintezu citokina što rezultira priljevom aktiviranih neutrofila i makrofaga. Nakon prepoznavanja kemotaktičnih signala, neutrofil napuštaju perifernu cirkulaciju transmigracijom kroz endotelnu stijenku te dolaze na mjesto infekcije i

fagocitiraju invazivne mikroorganizme. Neutrofili oslobađaju MPO koja stupa u interakcije s makrofaznim manoznim receptorima (MMR) što dovodi do otpuštanja ROS-a i proupalnih citokina (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1, GM-CSF) od strane makrofaga. Prekomjernom aktivnosti neutrofili uzrokuju oštećenje tkiva te je njihova aktivnost strogo regulirana, a također ovisi o aktivnosti NOX2. Oksidacijski stres osim što sudjeluje u borbi protiv patogena posredovanoj urođenom imunosti, ima veliku ulogu i u regulaciji stečene imunosti. Tako neutrofili otpuštanjem ROS-a mogu inhibirati aktivaciju T-stanica uskraćujući izvanstanične razine L-arginina. Proizvodnja ROS-a funkcionalno je važna u limfocitima. Oni inaktiviraju fosfataze povezane s B-staničnim receptorom (BCR) nakon njegovog povezivanja i djeluju sinergistički s prolaznim kalcijem kako bi pojačali signal. Također, superoksid i vodikov peroksid proizvedeni uključivanjem T-staničnog receptora (TCR) reguliraju pro-apoptotske i proliferativne puteve. Preko akvaporina 3, ROS-ovi mogu ući u T-limfocite i utjecati na citosolne fosfataze u stanici. ROS-ovi u debelom crijevu mogu pridonijeti suživotu domaćina s mikrobiotom. Oni potiču popravak epitela i suzbijanje upale supresijom rasta mikroba, no mogu prouzročiti i oštećenje samog epitela. Bitno je napomenuti da osim kod bakterijskih infekcija, oksidacijski stres je uključen i u obranu protiv virusnih infekcija i parazita (Andrés i sur., 2023; Herb i Schramm, 2021; Bae i sur., 2011).

Mehanizam stvaranja ROS-ova se koristi i u farmakoterapiji, iako mnogi mehanizmi nisu do kraja istraženi. Antibiotici kao što su β -laktami i aminoglikozidi potiču proizvodnju oksidacijskog stresa što je jedan od mehanizama njihovog baktericidnog djelovanja. Također, citostatici doksorubicin i bleomicin izravno proizvode oksidacijski stres, a statini djeluju protuupalno smanjujući proizvodnju oksidacijskog stresa u endotelnim stanicama (Nathan i Cunningham-Bussel, 2013).

Ovisno o okolnostima u stanici i u organizmu, možemo reći da oksidacijski stres ima svoje pozitivne i negativne učinke. Ako je redoks status reguliran, on pridonosi staničnoj signalizaciji i imunitetu, čišćenju abnormalnih mitohondrija i stanica te brojnim drugim procesima, no ako dođe do narušavanja homeostaze oksidacijskog i redukcijskog stresa može doći do ozbiljnih posljedica na cijeli organizam (Zorov i sur., 2014).

1.1.2. Regulacija reaktivnih kisikovih vrsta u organizmu

Za kontrolu i regulaciju oksidacijskog stresa u organizmu, tijelo koristi nekoliko antioksidativnih mehanizama koje možemo podijeliti na enzimske i neenzimske.

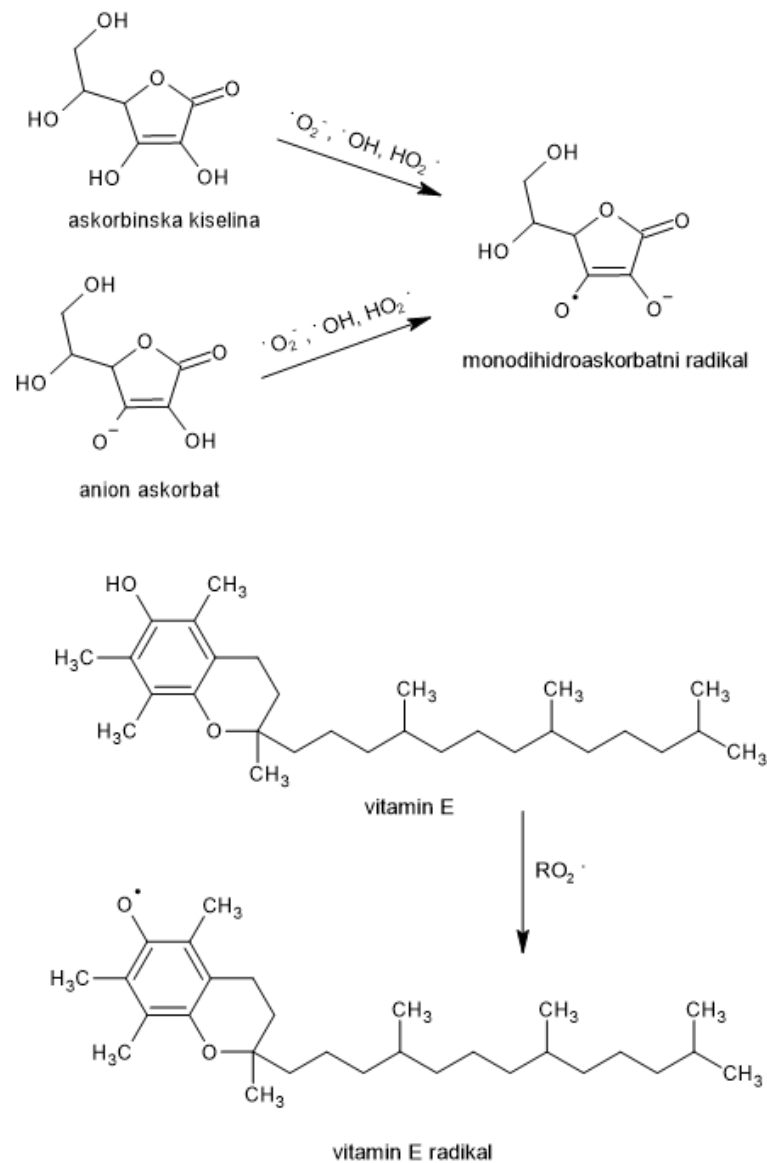
Antioksidansom se smatra svaka tvar koja, kada je prisutna u nižim koncentracijama u odnosu na supstrat koji može oksidirati, značajno odgađa ili inhibira oksidaciju supstrata (Andrés i sur., 2023; Sies, 1993).

Neki od antioksidativnih enzima uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu, glutation reduktazu i glutation peroksidazu. SOD su redoks-aktivni metaloenzimi koji učinkovito kataliziraju dismutaciju superoksidnih aniona u manje toksičan vodikov peroksid, koji zatim drugi enzimi pretvaraju u vodu. SOD je prva linija obrane stanice od proizvodnje superoksidnih aniona, a u obrani sudjeluju tri različita enzima iz SOD porodice, SOD1, SOD2 i SOD3. SOD1 nalazi se u citoplazmi i u svojem katalitičkom središtu sadrži cink i bakar, dok se drugi enzim, SOD2, nalazi u blizini unutarnje membrane mitohondrija i sadrži mangan. SOD3 nalazi se u izvanstaničnom matriksu, u svojem središtu sadrži bakar i cink i jedini je izvanstanični enzim koji može ukloniti superoksidne anione.

Katalaza i glutation peroksidaza kataliziraju redukciju vodikova peroksida do vode i na taj način uklanjaju rizik oksidativnog oštećenja. Tioredoksini, tioredoksin reduktaze, peroksiredoksini i metionin sulfoksid reduktaze su također prepoznati kao važni enzimi u regulaciji oksidacijskog stresa. Piruvat kinaza je enzim koji je uključen u glikolizu i glukoneogenezu, a sudjeluje u regulaciji oksidacijskog stresa mehanizmom negativne povratne sprege što posljedično uzrokuje održavanje homeostaze ROS-ova. NRF2-EpRE (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2- electrophile-responsive element*) signalizacija regulira ekspresiju gena koji kodiraju proteine uključene u antioksidacijsku obranu. Disregulacijom signalizacije NRF2 proteina dolazi do smanjene proizvodnje ciljanih antioksidativnih enzima te povećane osjetljivosti na oksidativna oštećenja. Na ekspresiju antioksidativnih enzima utječe i PPAR γ koaktivator 1 α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α* , PGC-1 α) koji je potreban za djelovanje glutation peroksidaze i SOD2. Rastezanje srčanih stanica moglo bi aktivirati NOX2 na proizvodnju ROS-a putem rijanodinskih receptora, a njihovu razinu može povećati i transkripcijski faktor UPBEAT1 potiskivanjem djelovanja peroksidaza (Andrés i sur., 2023; Forman i Zhang, 2021; Yang i Lian, 2020; Nathan i Cunningham-Bussel, 2013).

U neenzimske antioksidativne spojeve ubrajamo vitamin C i E, polifenole, β -karoten, glutation i mokraćnu kiselinu. Vitamin C, koji obuhvaća askorbinsku kiselinu i anion askorbat, djeluje kao reducens donirajući elektrone ROS-ovima te na taj način djeluje kao tvar koja eliminira oksidacijski stres (slika 1). Vitamin E je lipofilna molekula integrirana u biološke membrane koja predstavlja glavnu obranu protiv peroksidacije lipida u stanicama na način da učinkovito hvata ROS-ove, a najviše peroksil radikale ($RO_2 \cdot$) (slika 1). Polifenoli su

antioksidanski koje redovito unosimo konzumacijom voća i povrća, a obuhvaćaju fenolne kiseline, flavanoide, stilbene i lignane. Karakterizira ih njihova struktura u kojoj sadrže nekoliko hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a dosadašnja istraživanja ukazuju na njihovu ulogu u prevenciji raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti modulacijom staničnih signalnih puteva reguliranih ROS-om (Andrés i sur., 2023; Herb i Schramm, 2021).



Slika 1. Reakcija vitamina C i vitamina E s ROS-ovima.

1.1.3. Reaktivne kisikove vrste u razvoju bolesti

Oksidacijski stres može se povezati s brojnim patološkim stanjima kao što su tumori, ateroskleroza, hipertenzija, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, šećerna bolest tipa 2,

glaukom, kronično opstruktivna bolest pluća, idiopatska plućna fibroza, reumatoidni artritis, itd. Oksidacijski stres uključen je u različite faze tumorigeneze kao što su transformacija normalnih stanica u tumorske stanice, rast tumorskih stanica, proliferacija, invazija, angiogeneza i metastaziranje tumora. Dugotrajno nakupljanje DNA oštećene oksidacijskim stresom smatra se glavnim uzrokom tumora. Tumorske stanice za svoj razvoj i metastaziranje zahtijevaju veće količine energije od normalnih stanica što rezultira i povećanom proizvodnjom oksidacijskog stresa. Jedan od mehanizama kojim tumorske stanice izbjegavaju imunološku obranu je tolerancijom na oksidacijski stres. Stanice tumora mogu proizvesti dovoljnu količinu NADPH potrebnu za snažnu proliferaciju uz održavanje homeostaze ROS-a putem glutationa. Na taj način stanice tumora mogu preživjeti akutni oksidacijski stres uz daljnju proliferaciju stanica. Također, povećano stvaranje ROS-ova moglo bi potaknuti pojačanu signalizaciju receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) i pospješiti progresiju tumora. S druge strane, oksidacijski stres može spriječiti nastanak tumora poticanjem apoptoze i ferroptoze te smanjivanjem mogućnosti transformacije. Glavni mehanizam djelovanja zračenja u terapiji tumora je proizvodnja ROS-a i povećanje oksidacijskog stresa što pokazuje uključenost ROS-a u svim fazama razvoja i liječenja tumora. Protein supresor tumora p53, koji regulira stanični ciklus, starenje i apoptozu stanice, ima ulogu u održavanju redoks homeostaze kontrolirajući ekspresiju antioksidativnih gena. Pretpostavlja se da je ovo jedan od ključnih mehanizama na koji p53 suzbija nastanak i proliferaciju tumorskih stanica. Također, pojačana aktivnost p53 povećava oksidacijski stres što rezultira apoptozom stanice (Forman i Zhang, 2021; Yang i Lian, 2020; Bae i sur., 2011).

Značajan broj dokaza pokazuje da ROS-ovi imaju presudnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti. Ateroskleroza nastaje nakupljanjem plaka, dolazi do sužavanja arterija što može dovesti do srčanog i moždanog udara. Mnoge studije ukazuju na porast oksidiranih lipida i drugih markera oksidacijskog stresa u ateroskleroznim plakovima. Vodikov peroksid ima ulogu u razvoju i napredovanju hipertenzije utječući na signalizaciju u staničnim procesima (Forman i Zhang, 2021).

Kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, također je prisutan oksidacijski stres. Metabolizmom dopamina pomoću monoamino oksidaze nastaje vodikov peroksid koji doprinosi oksidacijskom stresu u sporu degeneraciji dopaminergičnih neurona u razvoju Parkinsonove bolesti. Isto tako, mnoga istraživanja su pokazala povećani oksidacijski stres u mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolesti (Forman i Zhang, 2021; Bao i sur., 2009).

Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 oksidacijski stres proizlazi iz disfunkcionalnih mitohondrija aktiviranih dijabetičkim stanjima hiperglikemije i dislipidemije. Tijekom razdoblja ishemije, hipoksije, anoksije i reperfuzije dolazi do oštećenja stanica proizvodnjom ROS-a, a jedan od primjera je njihov doprinos ishemijskoj ozljedi mozga. Oksidacijski stres ima važnu ulogu u patogenezi glaukoma stimulirajući apoptozu i upalne putove na razini trabekularne mreže, a vodikov peroksid, koji nastaje nakon ishemije, glavni je uzrok ozljede retine (Forman i Zhang, 2021; McMonnies, 2018; Abramov i sur., 2007).

1.2. Fluorescencijska spektrometrija

Fluorescencijska spektrometrija je tehnika kojom se mjeri fluorescencija koju emitiraju tvari kada su izložene ultraljubičastom, vidljivom ili drugom elektromagnetskom zračenju. Apsorpcijom zračenja elektron prelazi iz osnovnog u elektronsko pobuđeno stanje te se zatim vraća natrag u osnovno stanje gubeći elektronsku energiju pretvaranjem u vibracijsku energiju. Ako molekula može fluorescirati, gubitak elektronske energije pretvorbom u vibracijsku energiju je relativno spor i postoji mogućnost emitiranja elektronske energije u obliku ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Na taj način emitirana energija je niža od apsorbirane energije te je emisija fluorescencije pomaknuta 50 do 150 nm prema dužim valnim duljinama s obzirom na valnu duljinu koju apsorbira. Emitirana energija je niža od apsorbirane energije iz nekoliko razloga, a jedan od njih je da se fluorescentno zračenje emitira nakon što je dio vibracijske energije već odbačen u okolinu (Watson i Edrada-Ebel, 2012; Atkins i de Paula, 2006; <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

Intenzitet fluorescencije ovisi o sposobnosti molekula otapala da prihvate električne i vibracijske kvante, a molekule otapala koje imaju široko razmaknute razine vibracija (kao što ima voda) mogu prihvatiti veliku količinu elektronske energije i tako smanjiti intenzitet fluorescencije. Intenzitet fluorescencije može ovisiti o optičkoj gustoći uzorka i preciznoj geometriji osvjjetljenja uzorka što može rezultirati smanjenjem intenziteta ekscitacije na točki promatranja ili smanjenjem opažene fluorescencije apsorbiranjem emitirane fluorescencije. Takav utjecaj na detektirani intenzitet fluorescencije nazivamo efekt unutarnjeg filtera (engl. *inner filter effect*, IFE) (Weitner i sur., 2022). Ostali čimbenici koji utječu na intenzitet fluorescencije su temperatura, viskoznost otapala i stvaranje kompleksa s drugim molekulama

u otopini. Fluorescencija ovisi o temperaturi jer temperatura može potaknuti gubitak pobude sudarom molekula i/ili vibracijama veza. Tako će molekule više fluorescirati na nižoj temperaturi. Što je veća viskoznost otopala, intenzitet fluorescencije će biti veći jer će doći do manje sudara molekula otopala. Stvaranjem kompleksa s drugim molekulama u otopini dolazi do promjene fluorescencije, a primjer toga je smanjenje fluorescencije riboflavina u prisutnosti kofeina u otopini (Watson i Edrada-Ebel, 2012; <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

Fluorescencijsku spektrometriju koriste brojni znanstvenici zbog njezine jednostavnosti i povoljne cijene. Izrazito je visoke osjetljivosti te je stoga idealna za identifikaciju malih količina analita kao što su biološke molekule i onečišćenja. Korištenjem pravih valnih duljina pobude i emisije može se koristiti za selektivno otkrivanje molekula ili malih skupina molekula. Fluorescencijska spektrometrija može služiti za otkrivanje više molekula paralelno te *in vivo* za prikaz biomolekula u pokretu koristeći fluorescentne sonde. Fluorescencijska spektrometrija osim svojih pozitivnih strana ima i svoje nedostatke. Tako je njezino glavno ograničenje to što se može primjenjivati na mali broj molekula koje moraju sadržavati kromofor i rigidnu strukturu kako bi mogle fluorescirati. Osim toga, s vremenom dolazi do slabljenja fluorescentnog signala kada su molekule izložene svjetlosti. Raspršenje, apsorpcija i autofluorescencija mogu promijeniti rezultate eksperimenta i na taj način otežati razumijevanje podataka. Fluorescencijska spektrometrija može detektirati koncentracije unutar uskog raspona, a potrebno je i pažljivo puferiranje otopine zbog značajnog utjecaja pH vrijednosti na intenzitet fluorescencije (Watson i Edrada-Ebel, 2012; <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

U farmaciji fluorescencijska spektrometrija ima veliku primjenu. Koristi se za određivanje fluorescentnih lijekova u formulacijama kada je lijek prisutan u maloj dozi u prisutnosti nefluorescentnih pomoćnih tvari, ispitivanja nečistoća kada je nečistoća fluorescentna, proučavanje vezanja lijekova na komponentne u složenim formulacijama, u bioanalizi za mjerenje malih količina lijekova i za proučavanje vezanja lijekova na proteine. Kemijska primjena fluorescentne spektroskopije je u proizvodnji nanočestica s potencijalnom medicinskom primjenom, kao što je isporuka lijekova. U bioznanosti fluorescencijska spektrometrija se koristi za precizno mjerenje molekula poput DNA i RNA. Osim u znanosti, primjenjuje se u industriji za procjenu kontaminacije i u poljoprivredi za identifikaciju vrsta

usjeva (Watson i Edrada-Ebel, 2012; <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

1.2.1. Osnovni dijelovi fluorescentnog spektrometra

Fluorescentni spektrometar građen je od izvora zračenja, primarnog i sekundarnog monokromatora s pukotinom, spremnika za uzorak i detektora.

- **Izvor zračenja**

Kao izvor zračenja prvobitno se koristila kvarcna halogena ili ksenonova žarulja. Ona proizvodi zračenje visokog intenziteta kako bi povećala intenzitet fluorescencije povećanjem broja apsorbiranih fotona. Osim ksenonove žarulje može se koristiti i živina žarulja. Također, laseri raznih vrsta mogu biti jaki izvori pobude uzorka zbog njihovog širokog raspona valnih duljina. Trenutačno su diode koje emitiraju svjetlost (LED) nova generacija izvora zračenja zbog uske širine spektra emitiranog svjetla, manjih energetske zahtjeva i bez potrebe za dodatnim hlađenjem same lampe (Watson i Edrada-Ebel, 2012; <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

- **Monokromatori s pukotinama**

Fluorescentni spektrometar sadrži dva monokromatora. Primarni monokromator s pukotinom služi za odabir valne duljine koja će se koristiti za pobuđivanje uzorka dok sekundarni monokromator s pukotinom služi za skeniranje raspona valnih duljina emitiranog zračenja (Watson i Edrada-Ebel, 2012).

- **Spremnik za uzorak**

Spremnik za uzorak najčešće je kiveta, protočna ćelija ili mikrotitarska pločica. Kiveta je spremnik koji je usmjeren izravno u izvor zračenja, a može biti okruglog, kvadratnog ili pravokutnog oblika. U visoko-protočnoj analizi (engl. *high-throughput screening*, HTS) koriste se mikrotitarske pločice sa 6, 8, 16, 24, 96 i 384 jažica. (<https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

- **Detektor**

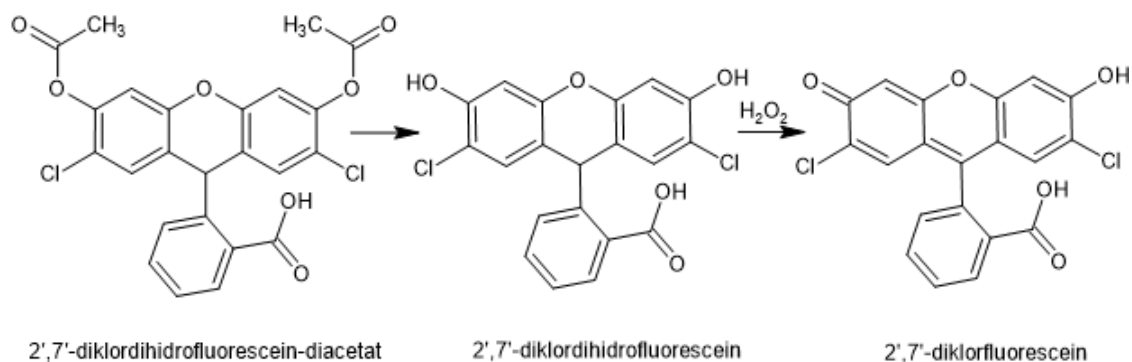
Ovisno o situaciji mogu se koristiti različiti fotodetektor. Detektor mora biti velike osjetljivosti u odgovarajućem spektralnom području kako bi uspješno detektirao fluorescenciju uzorka (<https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>).

1.3. Fluorescentne sonde

Fluorescentne sonde koriste se prilikom određivanja analita koji ne fluorescira. To su široko dostupni reagensi koji specifično reagiraju s analitom pri čemu nastaje produkt čiju fluorescenciju je moguće izmjeriti. Za mjerenje ROS-ova fluorescentne sonde možemo podijeliti na difuzijske i nedifuzijske sonde. Difuzijske sonde nisu specifične za određeni stanični odjeljak već mjere ukupne razine ROS-a u stanici, a neke od njih su dihidroetidij (DHE), 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat (DCF-DA), luminol i lucigenin. Nedifuzijske sonde služe za detekciju ROS-a u određenom staničnom odjeljku ili za detekciju izvanstaničnih ROS-ova ako su stanice nepropusne za njih. To im omogućuje detaljniji i specifičniji pristup u analizi. U nedifuzijske sonde svrstavamo izoluminol i Amplex Red koji ne ulaze u stanice te MitoSOX Red koji se zadržava u matriksu mitohondrija. Fluorescentne sonde možemo podijeliti i prema njihovoj specifičnosti. Tako one mogu biti nespecifične i detektirati sve ROS-ove ili specifične za određenu vrstu ROS-a koju primarno detektiraju (Herb i Schramm, 2021).

1.3.1. 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat

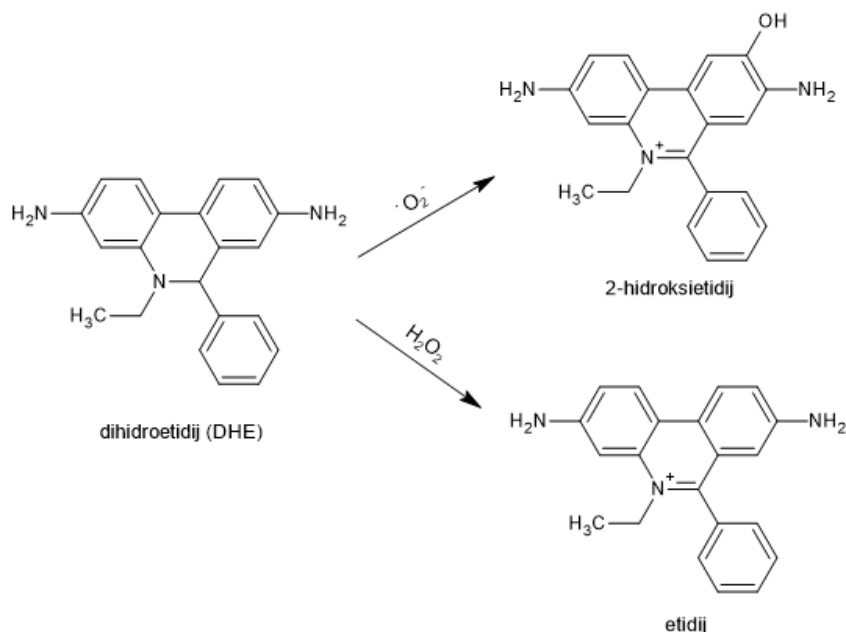
DCF-DA je derivat fluoresceina i jedna od najčešće korištenih sondi za detekciju ROS-a. Esteraze cijepaju dvije acetatne skupine DCF-DA te nastaje 2',7'-diklordihidrofluorescein kojega onda oksidiraju ROS-ovi (slika 2). Kao završni produkt nastaje zeleno fluorescentni 2',7'-diklorfluorescein. Iako DCF-DA oksidiraju svi ROS-ovi, najspecifičnija reakcija je s hidroksilnim radikalima, a ako se dodatno obradi s prijelaznim metalom može se koristiti za detekciju vodikova peroksida. Prednost DCF-DA sonde je što i niske koncentracije sonde proizvode vrlo jak signal (Gardiner i sur., 2020; Herb i Schramm, 2021).



Slika 2. Prijelaz DCF-DA u 2',7'-diklorfluorescin.

1.3.2. Dihidroetidij

Dihidroetidij (DHE) je difuzijska fluorescentna sonda koja se koristi za detekciju unutarstaničnog superoksidnog aniona ($O_2^- \cdot$). U citosolu DHE fluorescira plavo, a nakon njegove oksidacije sa superoksidnim anionom kao produkt nastaje 2-hidroksietidij koji fluorescira crveno (slika 3). DHE specifično reagira sa superoksidom, no mogu ga oksidirati i drugi ROS-ovi kao što je vodikov peroksid te pritom kao produkt nastaje etidij koji također fluorescira. Prednosti su što je financijski povoljna i izrazito korisna sonda čija fluorescencija produkata polako opada te time omogućava široki vremenski okvir za analizu (Andrés i sur., 2023; Gardiner i sur., 2020).



Slika 3. Prijelaz DHE u 2-hidroksietidij (u reakciji sa superoksidom) i etidij (u reakciji s vodikovim peroksidom).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

ROS-ovi su vrlo značajni za ljudski organizam budući da sudjeluju u brojnim staničnim procesima poput stanične signalizacije. Njihova ravnoteža, odnosno homeostaza izrazito je bitna (Zorov i sur., 2014). Oksidacijski stres, kao poremećaj u ravnoteži razine ROS-ova, ima značajnu ulogu u patogenezi većine bolesti. Usprkos brojnim istraživanjima oksidacijskog stresa i njegovog utjecaja na organizam, uloga i mehanizmi djelovanja ROS-ova i dalje nisu potpuno istraženi (Bae i sur., 2011).

Određivanje razine ROS-ova osim što bi omogućilo razjašnjavanje uloge ROS-ova u patogenezi bolesti, može biti ključno u terapijama usmjerenim na oksidacijski stres i njegovu kontrolu. Za razvoj nove generacije lijekova bitno je razlučiti na koji način se može prevenirati oksidacijski stres. Značajan napredak u medicini i farmaciji mogao bi proizaći iz boljeg razumijevanja kako poticati i inhibirati proizvodnju ROS-a, a za što je potrebna metoda koja će moći pratiti takve intervencije. Upravo zbog toga postoji potreba za točnim i preciznim određivanjem razine ROS-ova u stanicama i tkivima.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati primjenjivost postojećih metoda za određivanje ROS-ova u ljudskoj plazmi. Ispitat će se dvije metode praćenja razine ROS-ova u ljudskoj plazmi. Jedna metoda za praćenje razine ROS-ova koristi fluorescentnu sondu DCF-DA, a druga DHE. Ispitivanje će se provesti s uzorcima plazme zdravih pojedinaca te će se ispitati stabilnost reakcijske smjese, linearnost i osjetljivost. Također, ispitat će se može li se fluorescentna sonda DHE primjenjivati u određivanju ROS-ova u punoj krvi. Nakon što se ispituju parametri stabilnosti, linearosti i osjetljivosti metoda, bolja metoda će se primijeniti na 7 uzoraka plazme zdravih pojedinaca.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Korištene su kemikalije:

- dihidroetidij, DHE, Sigma, St. Louis, SAD
- 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat, DCF-DA, Sigma, St. Louis, SAD.

Za pripremu otopina korištena je destilirana voda (de-voda).

3.2. Aparatura

Korištena aparatura:

- Čitač pločica SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, CA, SAD)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Danska)
- miješalica/vorteks (IKA, Sigma, St. Louis, SAD)
- centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

3.3. Biološki uzorci

Uzorci ljudske plazme (n=8) i pune krvi (n=1) prikupljeni su od zdravih dobrovoljaca. Držani su zaštićeni od svjetlosti u zamrzivaču pri -20 °C do pripreme za analizu. Istraživanje je napravljeno u sklopu istraživačkog HRZZ projekta (HUMNap, IP-2020-02-1192) te ima potvrdu Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu za rad s ljudskim uzorcima.

3.4. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću fluorescentne sonde DCF-DA

Princip metode

Ova metoda određivanja ROS-ova koristi fluorescentnu sondu DCF-DA koju u biološkom sustavu prvo cijepaju esterase u 2',7'-diklordihidrofluorescein kojega potom oksidiraju ROS-ovi (Gardiner i sur., 2020). 2',7'-diklordihidrofluorescein oksidiraju superoksid, vodikov peroksid i ostali ROS-ovi pri čemu nastaje fluorescentni produkt 2',7'-

diklorfluorescein (zelena fluorescencija). Ako su u uzorku prisutni ROS-ovi dolazi do pojave zelene fluorescencije, a veća količina ROS-ova rezultira i većim intenzitetom fluorescencije zelene boje. Intenzitet fluorescencije uzoraka, koji odgovara razini ROS-ova u uzorku, mjeri se na valnoj duljini (λ) ekscitacije od 485 nm i emisije na 535 nm pri temperaturi od 22 °C (Wojtala i sur., 2014).

Priprema fluorescentne sonde

50 μ M DCF-DA

U epruvetu se otpipetira 0,7 mL 2 mM DCF-DA te doda 27,3 mL deionizirane vode. Otopina se promiješa na miješalici.

3.5. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću fluorescentne sonde DHE

Princip metode

Ova metoda određivanja ROS-ova temelji se na mjerenju intenziteta fluorescentnog produkta koji nastaje kada ROS-ovi oksidiraju fluorescentnu sondu DHE (Zhang i Soldati, 2013). Superoksidni radikal oksidira fluorescentnu sondu DHE pri čemu nastaje 2-hidroksietidij. Veća razina crvene fluorescencije uzorka odgovara većoj razini superoksidnog radikala. Intenzitet fluorescencije mjeri se pri uvjetima valnih duljina ekscitacije od 520 nm i pri emisiji od 600 nm. Intenzitet fluorescencije uzoraka se mjeri pri temperaturi od 22 °C (Wojtala i sur., 2014).

Priprema fluorescentne sonde

50 μ M DHE

U epruvetu se otpipetira 1,4 mL 1 mM DHE te doda 26,6 mL deionizirane vode. Otopina se promiješa na miješalici.

3.6. Priprema uzoraka za ispitivanje metoda

Priprema uzoraka plazme za ispitivanje stabilnosti

Uzorak plazme razrijeđen je kako je prikazano tablicom 2. Potom se 50 μL uzorka plazme i svakoga od razrijeđenja plazme otpipetira u dvije replike (u dvije jažice) na mikrotitarskoj pločici. Na mikrotitarsku pločicu se u dvije replike otpipetira i slijepa proba (50 μL de-vode). U svaki uzorak doda se 50 μL fluorescentne sonde DCF-DA u koncentraciji od 50 μM . Fluorescencija je izmjerena odmah nakon stavljanja mikrotitarske pločice u čitač pločica ($t=0$ min), 18 minuta nakon stavljanja u čitač pločica i 30 minuta nakon stavljanja u čitač pločica. Uređaj je podešen na λ ekscitacija: 482 nm i λ emisija: 535 nm, 20 bljesaka (engl. *flash*) i čitanje s gornje strane.

Postupak pripreme uzorka ponovljen je za ispitivanje stabilnosti primjenom DHE fluorescentne sonde. Fluorescencija je izmjerena odmah nakon stavljanja mikrotitarske pločice u čitač pločica ($t=0$ min), 10 minuta nakon stavljanja u čitač pločica i 1 h nakon stavljanja mikrotitarske pločice u čitač. Uređaj je podešen na λ ekscitacija: 520 nm i λ emisija: 600 nm, 20 bljeskova i čitanje s gornje strane.

Tablica 2. Postupak pripreme uzorka plazme za ispitivanje stabilnosti reakcijske smjese.

| Ukupno razrjeđenje | Plazma (μL) | De-voda (μL) | Udio plazme u otopini |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 0x | 100 | 0 | 1,00 |
| 5x | 40 | 160 | 0,20 |
| 10x | 20 | 180 | 0,10 |

Priprema uzoraka plazme za izradu baždarnih krivulja

Isti uzorak plazme korišten je za izradu baždarnih krivulja necentrifugirane plazme i centrifugirane plazme. Uzorci plazme prvo su razrijeđeni s de-vodom kako bi se pripremio koncentracijski niz kako je prikazano tablicom 3. Nakon dodavanja de-vode u plazmu, uzorci su promiješani na miješalici. Potom se 50 μL uzorka svakog od razrijeđenja otpipetiralo u tri replike na mikrotitarsku pločicu te se dodalo 50 μL fluorescentne sonde. Na mikrotitarsku pločicu se u tri replike otpipetirala i slijepa proba (50 μL de-vode i 50 μL fluorescentne sonde). Postupak je izveden sveukupno četiri puta, dva puta za svaku fluorescentnu sondu (DHE i DCF-DA) te za centrifugiranu i za necentrifugiranu plazmu. Za određivanje ROS-ova s fluorescentnom sondom DCF-DA valne duljine su bile podešene na λ ekscitacija: 482 nm i λ

emisija: 535 nm, a za određivanje ROS-ova s fluorescentnom sondom DHE λ ekscitacija: 520 nm i λ emisija: 600 nm, 20 bljesaka i čitanje s gornje strane.

Tablica 3. Postupak pripreme koncentracijskog niza uzorka plazme za ispitivanje linearnosti metode.

| Ukupno razrjeđenje | Plazma (μ L) | De-voda (μ L) | Udio plazme u otopini |
|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| 0x | 200 | 0 | 1,00 |
| 1,25x | 160 | 40 | 0,80 |
| 2,25x | 100 | 125 | 0,44 |
| 5x | 40 | 160 | 0,20 |
| 10x | 20 | 180 | 0,10 |
| 20x | 10 | 190 | 0,05 |
| 50x | 4 | 196 | 0,02 |
| 100x | 2 | 198 | 0,01 |

Priprema uzorka pune krvi

Uzorak pune krvi razrijeđen je s de-vodom kako bi se pripremio koncentracijski niz analita kako je prikazano tablicom 4. 50 μ L svakog od pripremljenih uzoraka otpipetiralo se u pet replika na mikrotitarsku pločicu te je dodano 50 μ L fluorescentne sonde DHE (50 μ M). Na mikrotitarsku pločicu se u pet replika otpipetirala i slijepa proba (50 μ L de-vode i 50 μ L fluorescentne sonde DHE). Za određivanje ROS-ova valne duljine su bile podešene na λ ekscitacija: 520 nm i λ emisija: 600 nm, 20 bljeskova i čitanje s gornje strane.

Tablica 4. Postupak pripreme koncentracijskog niza uzorka krvi za ispitivanje linearnosti metode.

| Ukupno razrjeđenje | Krv (μ L) | De-voda (μ L) | Udio krvi u otopini |
|--------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| 0x | 300 | 0 | 1,00 |
| 1,5x | 200 | 100 | 0,67 |

| | | | |
|------|-----|-----|-------|
| 2x | 150 | 150 | 0,50 |
| 3x | 100 | 200 | 0,33 |
| 4x | 75 | 225 | 0,25 |
| 5x | 44 | 176 | 0,20 |
| 10x | 30 | 270 | 0,10 |
| 50x | 6 | 294 | 0,02 |
| 100x | 3 | 297 | 0,01 |
| 150x | 3 | 447 | 0,007 |
| 200x | 2 | 398 | 0,005 |

Priprema uzoraka plazme za primjenu metode

Necentrifugirani uzorci plazme (n=7) su razrijeđeni s de-vodom u omjeru 1:1 te promiješani na miješalici (tablica 5). Potom se 50 μL svakog od pripremljenih uzorka otpipetiralo u tri replike na mikrotitarsku pločicu te dodalo 50 μL fluorescentne sonde DCF-DA (50 μM). Uz uzorke pripremljena je i slijepa proba (50 μL de-vode i 50 μL DCF-DA). Uređaj je podešen na λ ekscitacija: 482 nm i λ emisija: 535 nm, 20 bljeskova i čitanje s gornje strane.

Tablica 5. Postupak pripreme uzorka plazme (n=7) za određivanje ROS-ova.

| Ukupno razrjeđenje | Plazma (μL) | Voda (μL) | Udio plazme u otopini |
|--------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| 2x | 100 | 100 | 0,50 |

3.7. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu MS Excel. Prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije (SD). Pri ispitivanju stabilnosti, razlika između grupa ispitana je *t*-testom uz razinu značajnosti alpha 0.05. Baždarna krivulja izrađena je pomoću MS Excel, te je linearnom regresijom izračunat korelacijski koeficijent (R^2).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Povećana razina ROS-ova povezuje se s nastankom raznih bolesti kao što su tumori, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Forman i Zhang, 2021). Iako brojna istraživanja pokazuju da ROS-ovi imaju veliki utjecaj na ljudsko zdravlje, njihovi mehanizmi djelovanja nisu još potpuno istraženi. S obzirom na to, metode određivanja ROS-ova mogu puno doprinijeti shvaćanju njihove uloge u razvoju bolesti te praćenju terapija koje su usmjerene na oksidacijski stres.

Za određivanje ROS-ova u biološkom uzorku pa tako i krvi i plazmi koriste se fluorescentne sonde (Wojtala i sur. 2014). ROS-ovi oksidiraju fluorescentne sonde pri čemu nastaje produkt koji fluorescira i čiji se intenzitet fluorescencije može izmjeriti. Za izradu ovog diplomskog rada odabrane su dvije fluorescentne sonde, DCF-DA i DHE te je ispitana njihova primjenjivost za određivanje prisustva ROS-ova u uzorcima plazme i pune krvi. DCF-DA je fluorescentna sonda koja omogućuje određivanje razine svih ROS-ova (odnosno oksidira je većina ROS-ova). Fluorescentnu sondu DHE također oksidira većina ROS-ova pri čemu nastaje etidij. No, kada superoksidni radikal oksidira DHE nastaje 2-hidroksietidij čiji intenzitet fluorescencije se može pratiti pri specifičnim valnim duljinama. Pripremom koncentracijskih nizova plazme ispitana je linearnost, stabilnost i osjetljivost metoda praćenja ROS-ova pomoću fluorescentnih sondi DCF-DA i DHE.

4.1. DCF-DA fluorescentna sonda

4.1.1. Ispitivanje stabilnosti reakcije primjenom DCF-DA fluorescentne sonde

U prvom dijelu istraživanja ispitana je stabilnost reakcijske smjese kako bi se utvrdilo potrebno vrijeme inkubacije uzorka plazme s fluorescentnom sondom DCF-DA. Prvo su pripremljena razrjeđenja plazme (5x i 10x). U mikrotitarsku pločicu u jažice za slijepu probu pipetirano je po 50 μL de-vode, a u jažice za uzorak ili po 50 μL razrijeđene plazme ili po 50 μL plazme sve u duplikatu te je potom u svaku od tih jažica dodano 50 μL DCF-DA (50 μM). Čitač pločica podešen je na λ ekscitacije: 485 nm i λ emisije: 535 nm te je vrijednost fluorescencije čitana odmah po stavljanju mikrotitarske pločice s uzorcima u čitač pločica ($t=0$ minuta), nakon 18 minuta i nakon 30 minuta. Rezultati su prikazani tablicom 6.

Tablica 6. Utjecaj vremena inkubacije uzorka plazme i fluorescentne sonde DCF-DA na promjenu intenziteta fluorescencije.

| Ukupno razjedenje plazme | Intenzitet fluorescencije t=0 min (RFU) | Intenzitet fluorescencije t=18 min (RFU) | Intenzitet fluorescencije t=30 min (RFU) |
|--------------------------|---|--|--|
| 10x | 388027 ± 42078 | 536089 ± 2998 | 588805 ± 4323* |
| 5x | 471403 ± 119552 | 520271 ± 108714 | 527729 ± 115072 |
| 0x | 1914502 ± 105064 | 1850145 ± 55287 | 1667676 ± 22441 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. * statistički značajno različito od t=0 minuta.

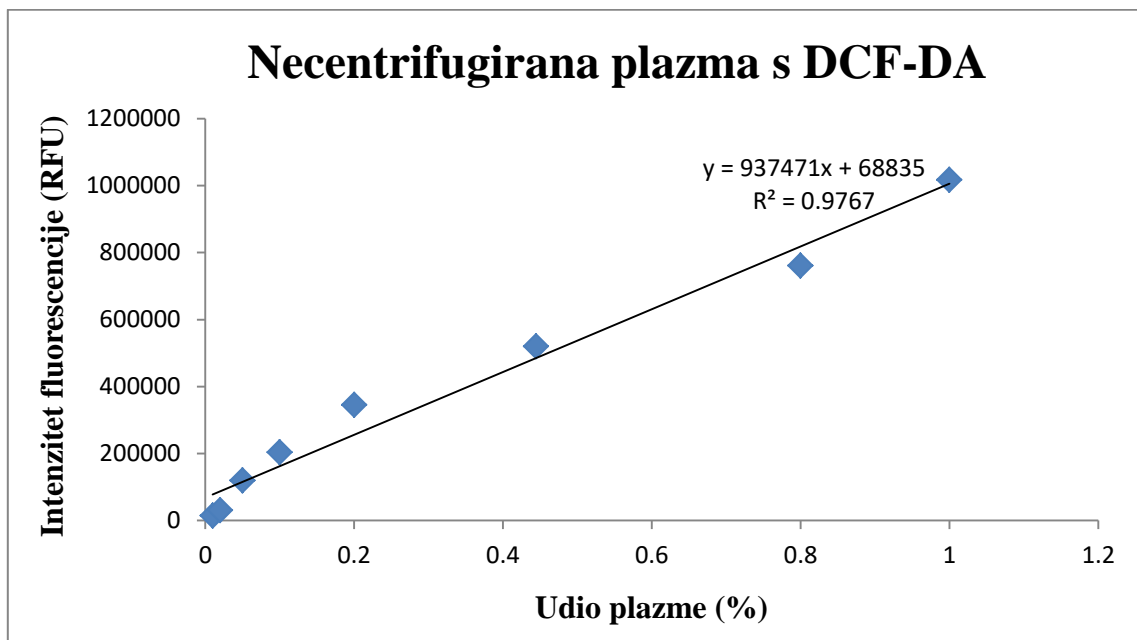
Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se intenzitet fluorescencije za nerazrijeđenu plazmu smanjuje s vremenom (s 1914502 ± 105064 RFU u t=0 minuta na 1667676 ± 22441 RFU u t=30 minuta). Pad fluorescencije za nerazrijeđenu plazmu može se objasniti efektom unutarnjeg filtera. Zbog visoke koncentracije ROS-ova u nerazrijeđenoj plazmi nastaje velika koncentracija produkta te zbog toga nema porasta fluorescencije, već fluorescencija pada. U uzorcima plazme koji su razrijeđeni 5x i 10x vidljiv je porast intenziteta fluorescencije s vremenom. Intenzitet fluorescencije uzoraka plazme razrijeđenih 10x porastao je s 388027 ± 42078 RFU u t=0 min na 588805 ± 4323 RFU u t=30 min. Kada je plazma razrijeđena 5x intenzitet fluorescencije porastao je s 471403 ± 119552 RFU (t=0 min) na 527729 ± 115072 RFU (t=30 min). Ovi rezultati pokazuju veliku nestabilnost sustava pri čemu s vremenom dolazi i do pada i do porasta intenziteta fluorescencije, a što ovisi o razrjeđenju plazme, odnosno razini analita. Stoga je prilikom mjerenja ROS-ova s DCF-DA vrlo važno paziti na vrijeme, odnosno na vrijeme inkubacije uzorka s fluorescentnom sondom.

4.1.2 Ispitivanje linearnosti metode mjerenja reaktivnih kisikovih vrsta primjenom DCF-DA fluorescentne sonde

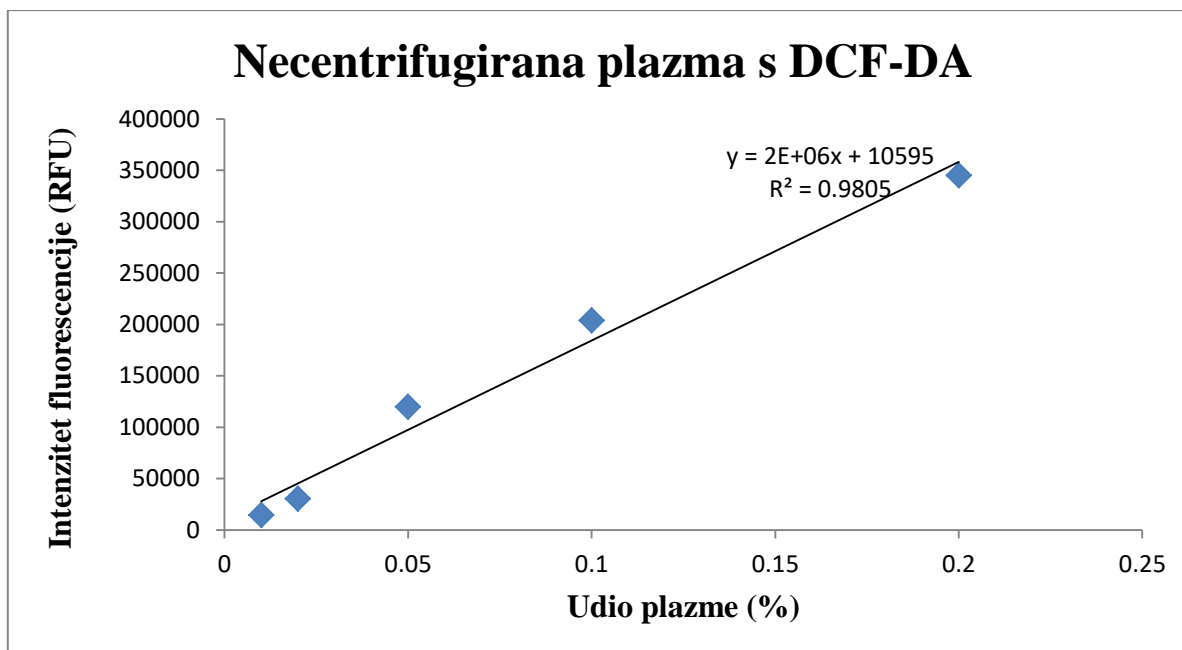
S obzirom na to da su ROS-ovi nestabilni, za određivanje linearnosti nije bilo moguće koristiti standard poznate koncentracije ROS-ova. Stoga je ispitana linearnost metode tako da su pripravljena razrjeđenja plazme. Plazma je razrijeđena s de-vodom u rasponu od 1,25x do 100x. Na mikrotitarsku pločicu je u svaku od jažica pipetirano ili 50 µL de-vode (slijepa

proba) ili 50 μ L razrijeđene plazme ili 50 μ L plazme (nerazrijeđene) u tri replike. Potom je u sve uzorke u mikrotitarskoj pločici dodano 50 μ L DCF-DA (u koncentraciji 50 μ M). Intenzitet fluorescencije očitao je na čitaču pločica odmah po pipetiranju pri valnim duljinama ekscitacije: 482 nm i emisije: 535 nm.

Dobivena baždarna krivulja prikazan je grafom 1. Jednadžba baždarne krivulje bila je $y = 937471x + 68835$, a korelacijski koeficijent $R^2 = 0,9767$. Pri većim razinama analita, pri udjelu plazme većim od 0,2 (20%), vidljivo je veće odstupanje od linearnosti, odnosno metoda je manje linearna što je veći udio plazme u reakcijskoj smjesi. Stoga je pripremljena baždarna krivulja koja nije uključivala razrjeđenja plazme koja odstupaju od linearnosti (graf 2). Jednadžba pravca te baždarne krivulje bila je $y = 2E+06x + 10596$, a korelacijski koeficijent je $R^2 = 0,9805$.



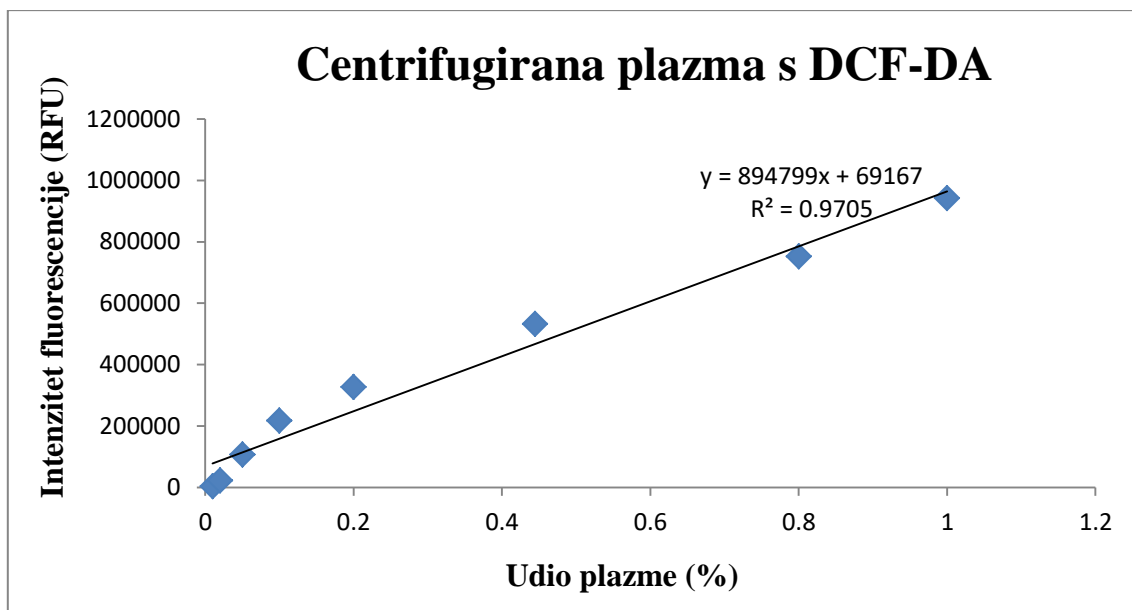
Graf 1. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije necentrifugirane plazme o razrijeđenju plazme primjenom DCF-DA fluorescentne sonde.



Graf 2. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije necentrifugirane plazme o razrjeđenju plazme primjenom DCF-DA fluorescentne sonde unutar područja linearnosti.

S obzirom na to da uzorci plazme mogu sadržavati i interferencije, ispitana je linearnost metode kada je uzorak plazme centrifugiran. Uzorak plazme je centrifugiran te su pripremljena razrjeđenja plazme kao i u prethodnom postupku u rasponu od 1,25x do 100x. Na mikrotitarsku pločicu je u svaku od jažica pipetirano ili 50 μ L de-vode (slijepa proba) ili 50 μ L razrijeđene plazme ili 50 μ L nerazrijeđene plazme u tri replike. Zatim je u svaki uzorak dodano 50 μ L DCF-DA (50 μ M). Intenzitet fluorescencije očitao je na čitaču pločica odmah po pipetiranju kao i za necentrifugiranu plazmu pri valnim duljinama ekscitacije: 482 nm i emisije: 535 nm.

Baždarna krivulja prikazana je grafom 3. Baždarna krivulja imala je jednadžbu pravca $y = 894799x + 69167$ i korelacijski koeficijent $R^2 = 0,9705$. Kao i kod necentrifugirane plazme kod viših razina analita veće je odstupanje od linearnosti. Stoga se može reći da se metoda određivanja ROS-ova u plazmi pomoću fluorescentne sonde DCF-DA može upotrijebiti samo ako je plazma razrijeđena 5x ili više, što vrijedi i kada je plazma centrifugirana i kada nije centrifugirana.



Graf 3. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije centrifugirane plazme o razrjeđenju plazme primjenom fluorescentne sonde DCF-DA.

4.1.3. Osjetljivost metode mjerenja reaktivnih kisikovih vrsta primjenom fluorescentne sonde DCF-DA

Kao mjere osjetljivosti analitičke metode koriste se granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ). LOD je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, dok je LOQ najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću. LOD i LOQ vrijednosti izračunate su prema formulama:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{a}$$

gdje je „ σ “ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, dok je „ a “ nagib baždarne krivulje (Nigović i sur., 2022).

Iz baždarne krivulje, dobivene određivanjem intenziteta fluorescencije primjenom DCF-DA fluorescentne sonde za necentrifugiranu plazmu prema formuli, izračunata je relativna LOD vrijednost od 2 % što govori da plazma može biti razrijeđena i do 2% udjela plazme, a da će se u njoj detektirati ROS-ovi. Izračunati relativni LOQ je 6 %, odnosno plazma može biti razrijeđena da je u uzorku samo 6% udjela plazme, a ROS-ovi će se

kvantificirati pomoću DCF-DA. Za centrifugiranu plazmu relativna LOD je 9 % udjela plazme, a relativna LOQ je 26% udjela plazme. Dobivene vrijednosti pokazuju da je metoda određivanja ROS-ova primjenom DCF-DA fluorescentne sonde dovoljno osjetljiva te da se može primjenjivati i kod velikog razrjeđenja plazme, odnosno za određivanje niskih razina ROS-ova.

4.2. DHE fluorescentna sonda

4.2.1. Ispitivanje stabilnosti reakcije primjenom DHE fluorescentne sonde

Prvo je ispitana stabilnost reakcijske smjese kako bi se utvrdilo potrebno vrijeme inkubacije uzorka plazme s fluorescentnom sondom DHE. Plazma je razrijeđena 5x i 10x te je na mikrotitarsku pločicu pipetirano u jažice ili 50 μ L de-vode (slijepa proba) ili 50 μ L razrijeđene plazme ili 50 μ L nerazrijeđene plazme u dvije replike. Zatim je u svaku jažicu mikrotitarske pločice s uzorkom dodano 50 μ L DCF-DA (50 μ M). Intenzitet fluorescencije očitao je na čitaču pločica odmah po pipetiranju ($t=0$), nakon 10 min i nakon 1 h pri valnim duljinama ekscitacija: 520 nm i emisija: 600 nm.

Tablica 7. Utjecaj vremena inkubacije uzorka plazme i fluorescentne sonde DHE na promjenu intenziteta fluorescencije.

| Ukupno razjedenje plazme | Intenzitet fluorescencije $t=0$ min (RFU) | Intenzitet fluorescencije $t=10$ min (RFU) | Intenzitet fluorescencije $t=1$ h (RFU) |
|--------------------------|---|--|---|
| 10x | 26519 \pm 1675 | 27904 \pm 7831 | 45440 \pm 2814* |
| 5x | 81340 \pm 9801 | 80123 \pm 14628 | 99850 \pm 12862 |
| 0x | 358230 \pm 32461 | 340115 \pm 20302 | 384992 \pm 36350 |

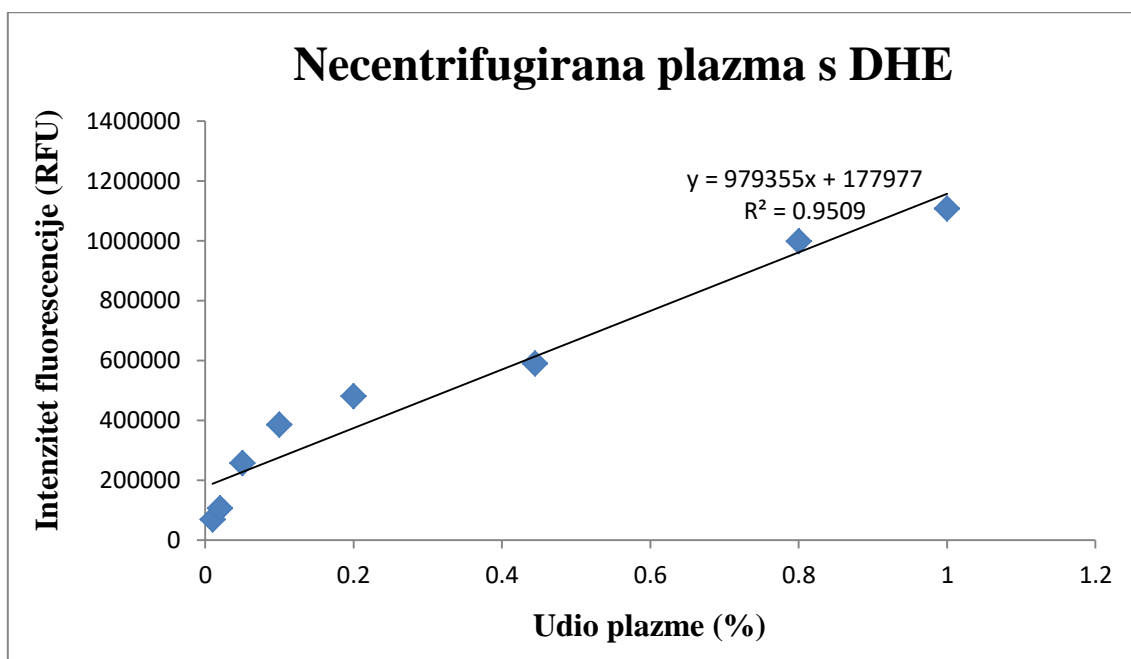
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. *statistički značajno različito od $t=0$ minuta.

U razdoblju od 0 minuta do 10 minuta za nerazrijeđenu plazmu te plazmu razrijeđenu 5x i 10x intenzitet fluorescencije ostao je skoro ne promijenjen. Za plazmu razrijeđenu 5x fluorescencija je bila 81340 \pm 9801 RFU u $t=0$ min, a 80123 \pm 14628 RFU u $t=10$ min. Veće promijene u intenzitetu fluorescencije u odnosu na vrijeme $t=0$ min zabilježene su tek nakon 1

sat inkubacije. Nakon sat vremena inkubacije značajniji porast intenziteta fluorescencije zabilježen je kada je plazma bila razrijeđena 10x. Ovo ispitivanje provedeno je kako bi se utvrdila stabilnost reakcijske smjese i koliko brzo nakon dodatka reagensa (fluorescentne sonde) treba izmjeriti fluorescenciju. Rezultati ispitivanja pokazuju da je reakcijska smjesa plazme i fluorescentne sonde DHE relativno stabilna unutar 10 minuta. Dobiveni rezultati su u skladnosti s literaturom u kojoj je stabilnost navedena kao prednost ove metode (Gardiner i sur., 2020).

4.2.2. Ispitivanje linearnosti metode mjerenja reaktivnih kisikovih vrsta primjenom DHE fluorescentne sonde

Linearnost metode mjerenja ROS-ova primjenom DHE fluorescentne sonde ispitana je pripremanjem koncentracijskog niza razrjeđenja plazme kao kod ispitivanja linearnosti metode primjenom DCF-DA fluorescentne sonde. Plazma je razrijeđena s de-vodom u rasponu od 1,25x do 100x te je na mikrotitarsku pločicu pipetirano ili 50 μ L de-vode u tri replike, ili 50 μ L razrijeđene plazme u tri replike ili 50 μ L nerazrijeđene plazme u tri replike. U svaki uzorak je dodano 50 μ L DCF-DA (50 μ M). Intenzitet fluorescencije očitao je na čitaču pločica odmah po pipetiranju pri valnim duljinama ekscitacije: 520 nm i emisije: 600 nm.

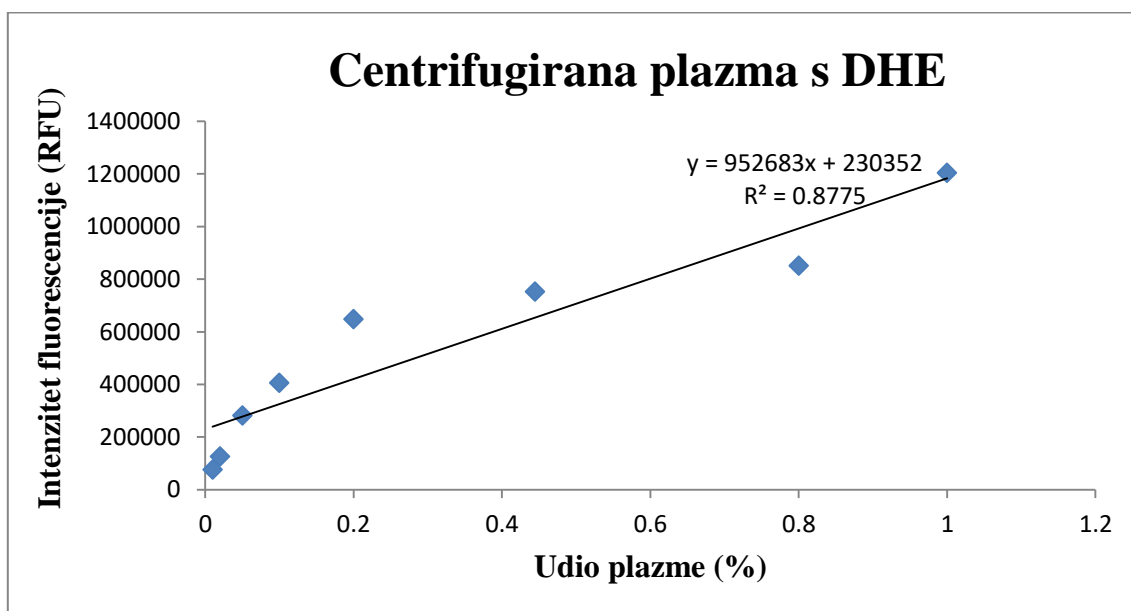


Graf 4. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije necentrifugirane plazme o razrjeđenju plazme primjenom fluorescentne sonde DHE.

Dobivena baždarna krivulja prikazana je grafom 4. Baždarna krivulja imala je jednadžbu pravca $y = 979355x + 177977$ i korelacijski koeficijent $R^2 = 0,9509$. Kao i kod ispitivanja linearnosti primjenom DCF-DA fluorescentne sonde, uočeno je veće odstupanje od linearnosti pri manjim razrjeđenjima plazme. Najveće odstupanje od linearnosti je kada je udio plazme u otopini veći od 0,2 (20%).

Ispitana je linearnost mjerenja ROS-ova primjenom DHE fluorescentne sonde i na uzorku centrifugirane plazme. Nakon centrifugiranja uzorka plazme pripravljena su razrjeđenja plazme kao i u prethodnom postupku u rasponu od 1,25x do 100x. Na mikrotitarsku pločicu je pipetirano ili 50 μL de-vode ili 50 μL razrijeđene plazme ili 50 μL nerazrijeđene plazme svaki uzorak u tri replike te u svaki uzorak dodano 50 μL DCF-DA (50 μM). Intenzitet fluorescencije očitana je na čitaču pločica odmah po pipetiranju pri valnim duljinama ekscitacije: 520 nm i emisije: 600 nm.

Graf 5 prikazuje baždarnu krivulju. Jednadžba pravca baždarne krivulje bila je $y = 952683x + 230352$, a korelacijski koeficijent $R^2 = 0,8775$. Iz grafa je vidljivo veće odstupanje od linearnosti kod viših razina analita (više od 20% udjela plazme). Također, centrifugiranje nema značajnijeg utjecaja na linearnost metode.



Graf 5. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije centrifugirane plazme o razrjeđenju plazme primjenom fluorescentne sonde DHE.

Iz provedenog istraživanja vidljivo je da se obje fluorescentne sonde mogu koristiti za određivanje ROS-ova u plazmi. Pri određivanju ROS-ova u plazmi s fluorescentnim sondama DHE i DCF-DA vrlo je važno paziti na koncentraciju analita, odnosno vrlo je važno utvrditi linearno područje metode i ispitati razrjeđenja uzorka. Objе metode pokazale su lošiju linearnost pri većim razinama analita, tj. pri udjelu plazme većem od 20% što možemo prepisati efektu unutarnjeg filtera. Pri većem udjelu plazme u ispitivanoj otopini optička gustoća otopine je veća te može doći do apsorpcije emitirane energije zračenja i smanjenja intenziteta fluorescencije. S obzirom na to, intenzitet fluorescencije i razina analita su proporcionalni samo u ograničenom rasponu optičkih gustoća.

4.2.3. Osjetljivost metode mjerenja reaktivnih kisikovih vrsta primjenom fluorescentne sonde DHE

Osjetljivost metode mjerenja ROS-ova iskazuje se LOD i LOQ vrijednostima. LOD je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, dok je LOQ najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću.

Prema formuli izračunata relativna LOD vrijednosti iz baždarne krivulje dobivene određivanjem intenziteta fluorescencije primjenom DHE fluorescentne sonde za necentrifugiranu plazmu iznosi 1% udjela plazme, tj. udio plazme u otopini može biti 1%, a da se ROS-ovi u njoj mogu detektirati. Relativna LOQ vrijednosti za necentrifugiranu plazmu iznosi 3 %, tj. plazma može biti razrijeđena i do 3% udjela plazme, a da se može odrediti razina ROS-ova pomoću DHE fluorescentne sonde. Za centrifugiranu plazmu relativni LOD je 8 % udjela plazme, a relativan LOQ je 25% udjela plazme. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da je metoda određivanja ROS-ova primjenom DHE fluorescentne sonde velike osjetljivosti.

4.3. Praćenje razine reaktivnih kisikovih vrsta u punoj krvi primjenom DHE fluorescentne sonde

U sljedećem dijelu istraživanja ispitana je mogućnost određivanja ROS-ova u punoj krvi s fluorescentnom sondom DHE. Pripremljena su razrjeđenja pune krvi u rasponu od 1,5x do 200x te je na mikrotitarsku pločicu pipetirano ili 50 μ L de-vode (slijepa proba), ili 50 μ L razrijeđene krvi ili 50 μ L nerazrijeđene krvi svakog od uzoraka u pet replika. Potom je u sve uzorke dodano 50 μ L DHE (50 μ M) te je očitana intenzitet fluorescencije na čitaču pločica pri valnim duljinama ekscitacije: 520 nm i emisije: 600 nm. Dobiveni rezultati prikazani su tablicom 7.

Tablica 7. Intenzitet fluorescencije u koncentracijskom nizu pune krvi primjenom DHE.

| Ukupno razrjeđenje | Replika 1 | Replika 2 | Replika 3 | Replika 4 | Replika 5 | Srednja vrijednost \pm SD |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------------|
| 200x | 16325 | 125006 | 74592 | 52029 | 47767 | 63143 \pm 40342 |
| 150x | 51105 | 100182 | 66384 | 87461 | 53287 | 71683 \pm 21512 |
| 100x | 13186 | 3635 | 142029 | 100255 | 91711 | 70163 \pm 59596 |
| 50x | 30625 | 43880 | 80988 | 127339 | 53307 | 67227 \pm 38345 |
| 10x | 107917 | 46565 | 54389 | 60173 | 37279 | 61264 \pm 27460 |
| 5x | 11172 | 29104 | 15034 | 23470 | -5068 | 14742 \pm 13112 |
| 4x | 28599 | 51489 | 9542 | 38400 | -23324 | 20941 \pm 29095 |
| 3x | 65151 | 55089 | 19466 | 71209 | 17175 | 45618 \pm 25588 |
| 2x | 49178 | 20296 | -33049 | 69635 | -7120 | 19788 \pm 41426 |
| 1,5x | 115237 | 51773 | -45482 | 83537 | 115473 | 64107 \pm 66694 |

| | | | | | | |
|----|--------|-------|--------|-------|-------|-------------------|
| 0x | 140650 | 76507 | 177246 | 81017 | 59187 | 106921 ± 49894 |
|----|--------|-------|--------|-------|-------|-------------------|

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da intenziteti fluorescencija replika istog uzorka (istog razrjeđenja pune krvi) previše odstupaju jedan od drugog. Također vidljivo je da intenzitet fluorescencije ne ovisi o razini analita u punoj krvi, odnosno s razrjeđenjem uzorka krvi ne dolazi do značajnijeg pada intenziteta fluorescencije. S obzirom na dobivene rezultate fluorescentna sonda DHE ne može se primijeniti za određivanje ROS-ova u punoj krvi.

4.4. Primjena metode korištenjem DCF-DA na uzorcima plazme

U sljedećem dijelu istraživanja ispitana je primjena metode korištenjem DCF-DA fluorescentne sonde na 7 necentrifugiranih uzoraka plazme zdravih dobrovoljaca. Svi necentrifugirani uzorci su bili bistri osim uzorka 2 koji je bio mutan (lipemičan). Uzorci plazme razrijeđeni su s de-vodom u omjeru 1:1. Potom su nanoseni na mikrotitarsku pločicu svaki od uzoraka u tri replike u volumenu od 50 µL. Na pločicu je nanšeno i 50 µL de-voda (slijepa proba). Zatim je u sve uzorak dodano 50 µL DCF-DA fluorescentne sonde (50 µM) te je intenzitet fluorescencije očitao odmah nakon pipetiranja pri λ ekscitaciji: 485 nm i λ emisiji: 535 nm. Rezultati intenziteta fluorescencije prikazani su tablicom 8.

Tablica 8. Rezultati mjerenja intenziteta fluorescencije u uzorcima ljudske plazme (n = 7) primjenom DCF-DA fluorescentne sonde.

| | Srednja vrijednosti intenziteta fluorescencije ± SD (RFU) |
|----------|--|
| Uzorak 1 | 524076 ± 22857 |
| Uzorak 2 | 410687 ± 11653 |
| Uzorak 3 | 541343 ± 97029 |
| Uzorak 4 | 576626 ± 113974 |
| Uzorak 5 | 255648 ± 152454 |
| Uzorak 6 | 498198 ± 227165 |
| Uzorak 7 | 553722 ± 58842 |

Raspon intenziteta fluorescencije u plazmi zdravih pojedinaca bio je 255648 ± 152454 RFU do 576626 ± 113974 RFU. Uzorak 2 koji je bio mutan nije značajnije odstupao od ostalih izmjerenih vrijednosti. Veliki raspon vrijednosti intenziteta fluorescencije u uzorcima plazme 7 zdravih pojedinaca može se objasniti brojnim unutarnjim i vanjskim faktorima koji utječu na proizvodnju ROS-ova u organizmu. Neki od vanjskih faktora koji utječu na razinu ROS-ova su izloženost UV zračenju, konzumacija duhana i alkohola. Kao unutarnji faktori glavnu ulogu u regulaciji ROS-ova imaju antioksidansi čija koncentracija u organizmu direktno utječe na razinu ROS-ova (Andrés i sur., 2023).

Dosadašnja istraživanja razine ROS-ova u biološkim uzorcima uglavnom su koristila DCF-DA fluorescentnu sondu za određivanje ROS-ova u stanicama prilikom *in vitro* istraživanja. Tako je istraživanje koje je ispitalo utjecaj antocijanina iz vina na izoliranim eritrocitima pokazalo da antocijanini snizuju razinu ROS-ova izmjerenu DCF-DA fluorescentnom sondom (Tedesco i sur., 2001). Sljedeće istraživanje na ljudskim stanicama leukemije ispitalo je učinak fenolnih kiselina na razinu ROS-ova te je pokazano korištenjem DCF-DA fluorescentne sonde da fenolne kiseline snizuju razinu ROS-ova u stanicama leukemije (Zambonin i sur., 2012). Istraživanja su provedena i s ljudskim uzorcima sperme. U uzorcima sperme također su ROS-ovi detektirani pomoću DCF-DA (Benedetti i sur., 2022). To istraživanje pokazalo je da pacijenti koji imaju poremećaj u broju spermija imaju u uzorcima sperme višu razinu ROS-ova od pacijenata s normalnim brojem spermija. Točnije, u pacijenta s poremećajem u broju sperme u uzorcima sperme izmjeren je raspon intenziteta fluorescencije $3407 - 12769$ RFU u usporedbi s pacijentima s normalnim brojem spermija u čijim je uzorcima sperme izmjeren intenzitet fluorescencije $470 - 2711$ RFU. S obzirom na to da je plazma puno kompleksniji uzorak od uzorka sperme, očekivano je niža vrijednost intenziteta fluorescencije u uzorcima sperme u odnosu na vrijednost intenziteta fluorescencije u uzorcima plazme dobiveni ovim istraživanjem.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata ispitivanja metoda za određivanje ROS-ova u ljudskoj plazmi mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Fluorescentne sonde DCF-DA i DHE mogu se koristiti za određivanje ROS-ova u uzorcima ljudske plazme. Metode su osjetljive i omogućuju detekciju niskih razina analita, no nastali produkt nije stabilan te se prilikom praćenja razine ROS-ova fluorescentnim sondama DCF-DA i DHE u plazmi treba paziti na vrijeme inkubacije.
2. Prilikom određivanja razine ROS-ova u ljudskoj plazmi fluorescentnim sondama DCF-DA i DHE vrlo je važno ispitati razrjeđenje uzorka i utvrditi područje u kojem je metoda linearna. Pri tome se osim utvrđivanja linearnog područja preporučuje korištenje i unutarnjeg standarda.
3. Fluorescentna sonda DHE ne može se primijeniti za određivanje razine ROS-ova u punoj krvi.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ATP - adenzin trifosfat

BCR - B-stanični receptor (engl. *B-cell receptor*)

CYP - citokrom P450

DCF-DA - 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat

DHE – dihidroetidij

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocitnih makrofaga (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

GPCR - G-protein-coupled receptor

GTP - gvanozin trifosfat

HClO - hipoklorasta kiselina

HIF1 α - faktor inducibilan hipoksijom 1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1 α*)

IL - interleukin

LED - svjetleća dioda (engl. *light-emitting diode*)

LOD – granica dokazivanja (engl. *limit of detection*)

LOQ – granica određivanja (engl. *limit of quantitation*)

MMR - makrofagni manozni receptor

MPO - mijeloperoksidaza

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid hidrid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

NF - κ B - nuklearni faktor kappa-pojačivač lakog lanca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NOX - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat oksidaza

NRF2 - nuklearni faktor eritroidni 2-srodni faktor 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NRF2-EpRE - nuklearni faktor eritroidni 2-srodni faktor 2-element koji reagira na elektrofili (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2- electrophile-responsive element*)

OX - ksantin oksidaza

PGC-1 α - koaktivator receptora aktiviran proliferatorom peroksisoma 1 α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α*)

RNA - ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SOD - superoksid dismutaza

TCR - T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*)

TLR - toll-like receptori (engl. *toll- like receptors*)

TNF- α - faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumour necrosis factor alpha*)

TNFR - receptor faktora tumorske nekroze (engl. *tumour necrosis factor receptor*)

VEGF - faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

7. LITERATURA

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation. *J. Neurosci.*, 2007., 27(5), 1129–1138.

Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Andrés Juan C, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Superoxide Anion Chemistry—Its Role at the Core of the Innate Immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023., 24, 1841.

Atkins P, de Paula J. Physical Chemistry for the Life Sciences. Oxford, Oxford University Press, 2006.

Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. *Mol. Cells.*, 2011., 32(6), 491-509.

Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, Rice ME. Mitochondria Are the Source of Hydrogen Peroxide for Dynamic Brain-Cell Signaling. *J. Neurosci.*, 2009., 29(28), 9002–9010.

Benedetti S, Catalani S, De Stefani S, Primiterra M, Fraternali A, Palma F, Palini S. A microplate-based DCFH-DA assay for the evaluation of oxidative stress in whole semen. *Heliyon*, 2022., 8, e10642.

Bucher JR. Oxidative stress and radical-induced signalling. U: Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis. Baan RA, Stewart BW, Straif K, urednici, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2019.

Fluorescence Spectroscopy: Principle, Instrumentation, Uses, 2023., <https://scienceinfo.com/fluorescence-spectroscopy-principle/#the-fluorescence-spectroscopy-principle>, pristupano dana: 22.5.2024.

Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2021., 20(9), 689–709.

- Gardiner B, Dougherty JA, Ponnalagu D, Singh H, Angelos M, Chen CA, Khan M. Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits. U: Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems. Berliner LJ, Parinandi NL, urednici, Cham, Springer, 2020.
- Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*, 2021., 10, 313.
- McMonnies C. Reactive oxygen species, oxidative stress, glaucoma and hyperbaric oxygen therapy. *Aust. J. Optom.*, 2018., 11(1), 3-9.
- Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013., 13(5), 349–361.
- Nigović B, Mornar Turk A, Sertić M, Amidžić Klarić D. Analitika lijekova. Priručnik za vježbe za studente farmacije. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, 2022., str. 130-131.
- Paur I, Carlsen MH, Halvorsen BL. Antioxidants in Herbs and Spices: Roles in Oxidative Stress and Redox Signaling. U: Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Benzie IFF, Wachtel-Galor S, urednici, Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
- Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 1993., 215(2), 213–219.
- Stone WL, Leavitt L, Varacallo M. Physiology, Growth Factor. StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island, 2024.
- Tedesco I, Russo GL, Nazzaro F, Russo M, Palumbo R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 2001., 12, 505–511.
- Watson DG, Edrada-Ebel R. Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone Elsevier, 2012.

Weitner T, Friganović T, Šakić D. Inner Filter Effect Correction for Fluorescence Measurements in Microplates Using Variable Vertical Axis Focus. *Anal. Chem.*, 2022., 94 (19), 7107-7114.

Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.*, 2014., 542, 243-262.

Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol. Cell. Biochem.*, 2020., 467, 1–12.

Zambonin L, Caliceti C, Vieceli Dalla Sega F, Fiorentini D, Hrelia S, Landi L, Prata C. Dietary Phenolic Acids Act as Effective Antioxidants in Membrane Models and in Cultured Cells, Exhibiting Proapoptotic Effects in Leukaemia Cells. *Oxidative Med. Cell. Longevity*, 2012., Article ID 839298, 12 str.

Zhang X, Soldati T. Detecting, visualizing and quantitating the generation of reactive oxygen species in an amoeba model system. *J. Vis. Exp.*, 2013., 81: e50717.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol. Rev.*, 2014., 94(3), 909–950.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Reaktivne kisikove vrste (ROS-ovi) su visoko reaktivni spojevi koji igraju ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima, ali njihova prekomjerna proizvodnja može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja stanica, što je povezano s razvojem mnogih bolesti. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati dvije fluorescentne sonde 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat (DCF-DA) i dihidroetidij (DHE) i procijeniti njihovu primjenjivost u mjerenju razine ROS-ova u ljudskoj plazmi. Više vrsta ROS-ova oksidira DCF-DA sondu pri čemu nastaje fluorescentni produkt 2',7'-diklorofluorescein što omogućuje detekciju svih ROS-ova. S druge strane kada superoksidni radikal oksidira DHE sondu nastaje 2-hidroksietidij te je tako moguće specifično odrediti razinu superoksidnog radikala u biološkom uzorku. Kako bi se odredila promjenjivost ovih dviju sondi, prvo je određena stabilnost produkta, a potom linearnost i osjetljivost metoda. Također, metoda određivanja ROS-ova pomoću DCF-DA fluorescentne sonde ispitana je i na različitim uzorcima ljudske plazme (n=7).

Rezultati istraživanja pokazali su da se obje fluorescentne sonde DCF-DA i DHE mogu koristiti za utvrđivanje razine ROS-ova u ljudskoj plazmi pri čemu treba paziti na vrijeme inkubacije fluorescentne sonde i uzorka jer nastali produkti nisu stabilni. Zbog utjecaja unutarnjeg filtera prije mjerenja potrebno je utvrditi razrjeđenje plazme u kojem je odaziv detektora linearan, a također preporučuje se korištenje unutarnjeg standarda. Ispitivanje promjene DHE sonde za mjerenje razine ROS-ova u ljudskoj krvi pokazalo je da DHE sonda nije prikladna za mjerenje ROS-ova u punoj krvi. Dobiveni rezultati ovoga istraživanja mogu pomoći znanstvenicima prilikom odabira fluorescentne sonde za praćenje ROS-ova u ljudskim uzorcima, prvenstveno plazmi.

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive compounds that play a crucial role in many biological processes, but their excessive production can lead to oxidative stress and cell damage, which is associated with the development of many diseases. The aim of this study was to test two fluorescent probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) and dihydroethidium (DHE) in the assessment of ROS level in human plasma. The DCF-DA probe is oxidised by majority of ROS to produce 2',7'-dichlorofluorescein, thus detection of 2',7'-dichlorofluorescein level in sample indicate the presence of majority of ROS. DHE probe is oxidised by superoxide radical producing fluorescent 2-hydroxyethidium, therefore an increase in 2-hydroxyethidium fluorescence can be used to quantify superoxide radicals in biological sample. To evaluate two methods, firstly stability of the product is estimated, followed by determination of linearity and sensitivity of the methods. In addition, the method using the DCF-DA fluorescent probe is tested on different human plasma samples (n=7).

The results of this study showed that both fluorescent probes DCF-DA and DHE are suitable for assessment of ROS level in human plasma. Since the products are not stable, careful management of incubation time of fluorescent probe and sample is necessary. Due to inner filter effect, it is necessary to establish linearity of the method, and use of internal standard is recommended. Testing of DHE probe for assessment of ROS level in human blood showed that the DHE probe is not suitable for measuring ROS in blood samples. The results of this study can help scientist in selecting appropriate fluorescence probe for assessment of ROS level in human samples, in particular in human plasma.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Kovačićeva 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta u ljudskoj plazmi primjenom fluorescentnih sonda dihidroetidij i 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat

Nina Maskalan

SAŽETAK

Reaktivne kisikove vrste (ROS-ovi) su visoko reaktivni spojevi koji igraju ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima, ali njihova prekomjerna proizvodnja može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja stanica, što je povezano s razvojem mnogih bolesti. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati dvije fluorescentne sonde 2',7'-diklordihidrofluorescein-diacetat (DCF-DA) i dihidroetidij (DHE) i procijeniti njihovu primjenjivost u mjerenju razine ROS-ova u ljudskoj plazmi. Više vrsta ROS-ova oksidira DCF-DA sondu pri čemu nastaje fluorescentni produkt 2',7'-diklorofluorescein što omogućuje detekciju svih ROS-ova. S druge strane kada superoksidni radikal oksidira DHE sondu nastaje 2-hidroksietidij te je tako moguće specifično odrediti razinu superoksidnog radikala u biološkom uzorku. Kako bi se odredila promjenjivost ovih dviju sonda, prvo je određena stabilnost produkta, a potom linearnost i osjetljivost metoda. Također, metoda određivanja ROS-ova pomoću DCF-DA fluorescentne sonde ispitana je i na različitim uzorcima ljudske plazme (n=7).

Rezultati istraživanja pokazali su da se obje fluorescentne sonde DCF-DA i DHE mogu koristiti za utvrđivanje razine ROS-ova u ljudskoj plazmi pri čemu treba paziti na vrijeme inkubacije fluorescentne sonde i uzorka jer nastali produkti nisu stabilni. Zbog utjecaja unutarnjeg filtera prije mjerenja potrebno je utvrditi razrjeđenje plazme u kojem je odziv detektora linearan, a također preporučuje se korištenje unutarnjeg standarda. Ispitivanje promjene DHE sonde za mjerenje razine ROS-ova u ljudskoj krvi pokazalo je da DHE sonda nije prikladna za mjerenje ROS-ova u punoj krvi. Dobiveni rezultati ovoga istraživanja mogu pomoći znanstvenicima prilikom odabira fluorescentne sonde za praćenje ROS-ova u ljudskim uzorcima, prvenstveno plazmi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 47 stranice, 5 grafičkih prikaza, 8 tablica, 3 slike i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Oksidacijski stres, reaktivne kisikove vrste, fluorescentne sonde

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Kristina Pavić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Kovačićeva 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Assessment of reactive oxygen species in human plasma by use of fluorescent probes dihydroethidium and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate

Nina Maskalan

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive compounds that play a crucial role in many biological processes, but their excessive production can lead to oxidative stress and cell damage, which is associated with the development of many diseases. The aim of this study was to test two fluorescent probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) and dihydroethidium (DHE) in the assessment of ROS level in human plasma. The DCF-DA probe is oxidised by majority of ROS to produce 2',7'-dichlorofluorescein, thus detection of 2',7'-dichlorofluorescein level in sample indicate the presence of majority of ROS. DHE probe is oxidised by superoxide radical producing fluorescent 2-hydroxyethidium, therefore an increase in fluorescence can be use to quantify superoxide radicals in biological sample. To evaluate two methods, firstly stability of the product is estimated, followed by determination of linearity and sensitivity of the methods. In addition, the method using the DCF-DA fluorescent probe is tested on different human plasma samples (n=7).

The results of this study showed that both fluorescent probes DCF-DA and DHE are suitable for assessment of ROS level in human plasma. Since the products are not stable, careful management of incubation time of fluorescent probe and sample is necessary. Due to inner filter effect, it is necessary to establish linearity of the method, and use of internal standard is recommended. Testing of DHE probe for assessment of ROS level in human blood showed that the DHE probe is not suitable for measuring ROS in blood samples. The results of this study can help scientist in selecting appropriate fluorescence probe for assessment of ROS level in human samples, in particular in human plasma.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 47 pages, 5 graphs, 8 tables, 3 figures and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Oxidative stress, reactive oxygen species, fluorescent probes

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2024.