

Optimiziranje uvjeta mjerenja superoksidnog radikala fluorescentnom mikroskopijom

Režan, Luka

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:435264>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Luka Režan

**Optimiziranje uvjeta mjerenja superoksidnog
radikala fluorescentnom mikroskopijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za prehranu i dijetoterapiju i Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan. Za izradu diplomskog rada korištena je oprema nabavljena projektom FarmInova.

Zahvaljujem svojoj mentorici na pomoći, strpljenju, pažnji i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Beskrajno sam zahvalan svojim roditeljima, braći i kumovima na konstantnoj podršci kroz čitavo obrazovanje, kao i svojim prijateljima, na svim uspomenama koje su ovaj period mog života učinile najljepšim.

Ovaj rad posvećujem svojim bakama i gradu Brnu.

SADRŽAJ

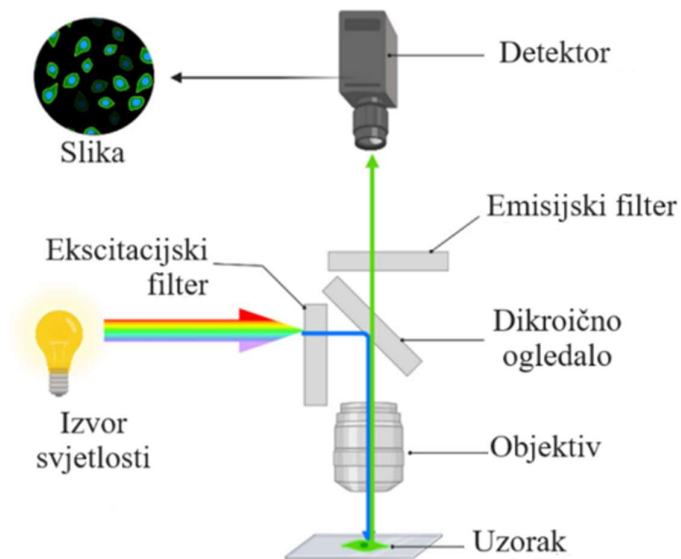
1. UVOD.....	1
1.1. Fluorescentna mikroskopija.....	1
1.2. Reaktivne kisikove vrste.....	3
1.2.1. Izvori ROS-ova.....	4
1.2.2. Vrste ROS-ova.....	5
1.2.3. Praćenje ROS-ova.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.1.1. Dihidroetidij.....	12
3.1.2. Oprema.....	13
3.1.2.1. Invertni fluorescentni mikroskop.....	13
3.1.3. Biološki uzorak.....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Određivanje superoksidnog radikala dihidroetidijem.....	15
3.2.1.1. Priprema otopina.....	15
3.2.1.2. Postupak mjerenja superoksidnog radikala u stanicama.....	17
3.3. Statistička obrada rezultata.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. Optimizacija metode.....	20
4.2. Primjena metode.....	24
5. ZAKLJUČCI.....	28
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	29
7. LITERATURA.....	30
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	34
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Fluorescentna mikroskopija

Mikroskopija igra važnu ulogu u određivanju aktivnosti stanica, a fluorescentna mikroskopija (FM) moćan je alat za praćenje njihove fiziologije (Sanderson i sur., 2014). Od početka upotrebe fluorescentnih mikroskopa ranih 1900-ih, ova svestrana tehnika omogućuje izravnu vizualizaciju fizioloških procesa koji se događaju unutar žive stanice ili tkiva te je njome moguće proučavanje raznovrsnih staničnih procesa (Combs, 2010).

Fluorescenciju, pojavu kod koje određene tvari emitiraju svjetlost nakon što apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, najčešće u ultraljubičastom ili vidljivom dijelu spektra, prvi je put opisao Stokes, 1852. godine, nakon što je Herschel, sedam godina prije, uočio da otopina kinina, sama po sebi bezbojna i prozirna, fluorescira svijetloplavu boju kad se osvijetli i promatra pod određenim kutom upada sunčeve svjetlosti (Renz, 2013). Zbog toga što se dio energije tijekom fluorescencije izgubi, emitirana svjetlost ima nižu energiju od apsorbirane svjetlosti. Svjetlost niže energije ima veću valnu duljinu u odnosu na svjetlost više energije. Pojava koja označava razliku u valnoj duljini ili energiji između apsorbirane i emitirane svjetlosti kod fluorescentnih tvari naziva se Stokesov pomak. Tvari sa svojstvom fluorescencije nazivaju se fluorofore ili fluorokromi i svaka ima vlastiti spektar valnih duljina apsorpcije i emisije. Zbog toga što ekscitacijska i emitirana svjetlost imaju različite energije, cilj FM je razdvojiti te dvije svjetlosti i samo emitiranoj svjetlosti omogućiti da dođe do detektora. Osnovna je funkcija FM svjetlošću ozračiti uzorak sa, za njega karakterističnim, pojasom valnih duljina i potom razdvojiti emitiranu svjetlost od ekscitacijske. Zbog toga što ekscitacijska svjetlost ima višu energiju, nužno ju je isfiltrirati kako bi se mogla vidjeti relativno slaba fluorescencija. Separacija tih dviju svjetlosti, odnosno filtriranje, obično se vrši optičkim filterima. Ekscitacijski filter na kojeg dolazi svjetlost iz izvora omogućava prolaz isključivo svjetlosti karakteristične valne duljine. Svjetlost se potom odbije o dikroično ogledalo do uzorka. Emisijski filter blokira prolaz ekscitacijskoj svjetlosti, propušta emitiranu svjetlost i jedino njoj omogućava da dođe do detektora. Emitirana svjetlost može se vidjeti očima ili elektronički (Wang i Lai, 2021). Osnovni dijelovi fluorescentnog mikroskopa prikazani su na slici 1.



Slika 1. Osnovni sastav fluorescentnog mikroskopa (preuzeto i prilagođeno prema Wang i Lai (2021) uz dopuštenje izdavača).

Postoje tri glavna tipa FM, sa sličnim osnovnim principom, ali različitim modifikacijama. Još uvijek široko upotrebljavani epifluorescentni mikroskopi širokog polja, koji su se javili početkom 20. stoljeća, osnovni su tip fluorescentne tehnologije (slika 2). Postepeni napredak u tehnologiji doveo je do razvitka konfokalnog mikroskopa 1955. godine. Njega obilježava veća prostorna rezolucija i sposobnost vizualizacije unutarstaničnih detalja koji su bili nedostižni za dotadašnji sistem širokog polja (Hickey i sur., 2021). Treći tip je mikroskopija totalne unutarnje refrakcije (TIRFM), koja se temelji na pobuđivanju fluorofora evanescentnim valom ili poljem kad se laserska zraka interno reflektira (Wang i Lai, 2021).



Slika 2. Primjer fluorescentnog mikroskopa (preuzeto s <https://www.zeiss.com/>).

1.2. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Izraz „oksidacijski stres“ prvi je put upotrijebljen 1985. godine, kad je Helmut Sies opisao oksidacijski stres (OS) kao neravnotežu između proizvodnje oksidansa i antioksidativnih obrambenih mehanizama unutar stanice, odnosno organizma, koja može rezultirati oštećenjem bioloških sustava (Forman i Zhang, 2021). U staničnim metaboličkim procesima stvaraju se slobodni radikali, kemijske vrste koje imaju barem jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali i uslijed toga vrlo veliku kemijsku reaktivnost s niskom specifičnošću za reaktante (Petlevski i Kutnjak, 2015). Najčešće prisutni slobodni radikali i reaktivne molekule u biološkim sustavima potječu od kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i dušika (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), a formiraju se tijekom reakcija prijenosa elektrona, gdje gube ili primaju elektron(e) (Jomova i sur., 2023). Reaktivne kisikove vrste (ROS-ovi) u zdravom organizmu nastaju neprekidno, kao posljedica brojnih enzimskih i neenzimskih biokemijskih reakcija (Petlevski i Kutnjak, 2015). U malim količinama, ROS-ovi obavljaju važne fiziološke funkcije. Nužni su za održavanje stanične homeostaze i imaju ključnu ulogu u redoks signalizaciji.

Veliku važnost u održavanju količine ROS-ova unutar fizioloških koncentracija imaju antioksidansi. Pojam „antioksidans“ odnosi se na bilo koju egzogenu ili endogenu supstancu, koja je, djelujući pri nižoj koncentraciji od supstrata kojeg štiti, sposobna spriječiti ili usporiti njegovu oksidaciju. Antioksidansi mogu biti enzimske ili neenzimske prirode. Organizam je razvio više razina obrane od ROS-ova, a time i od OS-a. Identificirane su četiri razine obrane temeljene na reaktivnosti: preventivni antioksidansi, hvatači radikala, popravljajući antioksidansi te antioksidansi koji se oslanjaju na mehanizme adaptacije (Pisoschi i sur., 2021; Sies, 1997).

U suvišku ROS-ovi mogu uzrokovati oksidativne modifikacije staničnih makromolekula, primjerice lipida, proteina, deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA). ROS-ovi mogu inicirati lipidnu peroksidaciju, a važnost se sve više pridaje i oksidaciji proteina, jer proteini uslijed oksidacije ROS-ovima mogu formirati citotoksične agregate. Nastala oštećenja i sama postaju izvori OS-a te su tako dio začaranog kruga koji pojačava oksidativna oštećenja stanica i tkiva (Pisoschi i sur., 2021; Li i sur., 2015; Tochigi i sur., 2013).

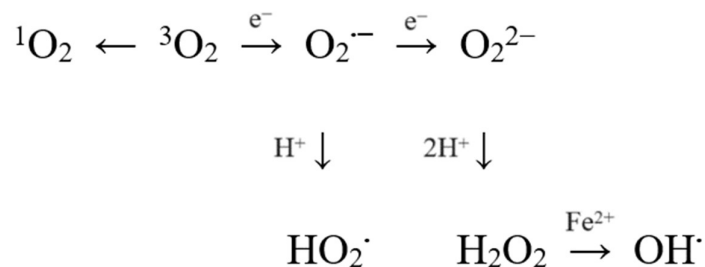
Oksidativne modifikacije staničnih makromolekula povezuju se s razvojem bolesti. Pokazano je da OS ima ulogu u patogenezi širokog raspona bolesti, uključujući aterosklerozu, kroničnu opstruktivnu bolest pluća (KOPB), neurodegenerativne bolesti, šećernu bolest, autoimune bolesti i rak, ali s varijabilnim opsegom sudjelovanja u patogenezi bolesti (Forman i Zhang, 2021). OS također igra ulogu u procesu starenja. Ustanovljeno je da je razina OS-a, koja se prati kvantifikacijom markera OS-a, povišena u starijih pojedinaca, pušača, ljudi koji se nezdravo hrane, nisu dovoljno fizički aktivni, konzumiraju alkohol te kod osoba koje imaju genetsku predispoziciju (Jomova i sur., 2023).

1.2.1. Izvori ROS-ova

Izvori ROS-ova primarno su endogeni, ali mogu biti i egzogeni. U organizmu, ROS-ovi poglavito nastaju uz pomoć ROS-producirajućih mitohondrijskih ili nemitohondrijskih enzima. Glavno mjesto nastanka ROS-ova su mitohondriji. ROS-ovi se stvaraju kao prirodni nusprodukt aerobnog staničnog metabolizma (slika 3). Tijekom staničnog disanja, elektron se ispušta iz lanca prijenosa elektrona i veže se za kisik, čime nastaje superoksidni radikal (O_2^-), a na to otpada oko 2% ukupnog kisika. U normalnim, zdravim stanicama, do 90% ROS-ova nastaje na ovaj način, a ostatak nastaje prvenstveno djelovanjem različitih enzima, kao nusprodukti metabolizma ksenobiotika. Neki od enzima koji sudjeluju u nastanku ROS-ova su ksantin oksidaza (XO), NADPH oksidaza (NOX), lipooksigenaza i ciklooksigenaza. Peroxisomi su stanični organeli koji proizvode najveću količinu H_2O_2 i O_2^- . U egzogene izvore ROS-ova ubrajaju se, na primjer, ionizirajuće zračenje, farmaceutski pripravci kojima je mehanizam djelovanja produkcija ROS-ova, cigaretni dim, teški metali i pesticidi (Teleanu i sur., 2022; Jelic i sur., 2021; Juan i sur., 2021).

Stvaranje O_2^- u mitohondrijima provodi se dvjema temeljnim reakcijama, a to su oksidacija ubikinola, reduciranog oblika koenzima Q_{10} , i autooksidacija flavina. U fagocitnim stanicama, NOX proizvodi velike količine O_2^- u svrhu obrane od patogena i drugih agresora. U ostalim tjelesnim stanicama, NOX katalizira nastanak O_2^- u manjoj količini, ali kontinuiranim ritmom, što je važno za staničnu signalizaciju. Lipooksigenaza i ciklooksigenaza produciraju O_2^- tijekom sinteze leukotriena, prostaglandina i tromboksana. XO je citosolni metaloflavoprotein koji proizvodi O_2^- i H_2O_2 oksidacijom hipoksantina do ksantina i zatim

ksantina do mokraćne kiseline. U endoplazmatskom retikulumu, $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 nastaju autooksidacijom flavoproteina NADPH te kao nusprodukti oksidacije raznovrsnih spojeva enzimima citokrom P450 (CYP) i citokrom P450 reduktaza (POR). Superoksidni radikal može nastati i brojnim neenzimskim reakcijama, primjerice u reakciji glikacije. Primjer nebiokemijskog izvora $O_2^{\cdot-}$ je reakcija fotolize (Andrés i sur., 2023; Bedard i Krause, 2007).



Slika 3. Prikaz nastanka ROS-ova redukcijom molekule kisika tijekom aerobnog staničnog metabolizma. Kratice: 1O_2 – singletni kisik; 3O_2 – molekularni kisik; $O_2^{\cdot-}$ - superoksidni radikal; O_2^{2-} - peroksidni ion; HO_2^{\cdot} - perhidroksil radikal; H_2O_2 – vodikov peroksid; OH^{\cdot} - hidroksilni radikal.

1.2.2. Vrste ROS-ova

Kisik je, zbog svoje elektronske strukture i dva nesparena elektrona, sklon formaciji radikala. ROS-ove obilježava kratak životni vijek i visoka reaktivnost zbog preostalih valentnih elektrona. Redukcijom kisika kroz adiciju elektrona nastaju različiti ROS-ovi, poput primjerice hidroksilnog radikala (OH^{\cdot}), za kojeg se smatra da je najreaktivniji (Teleanu i sur., 2022). Značajni su, osim hidroksilnog radikala, superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$) i peroksilni radikal (ROO^{\cdot}) (Petlevski i Kutnjak, 2015). ROS-ovi, dakle, sadrže jedan ili više atoma kisika s nesparenim elektronima. Međutim, u ROS-ove se ubrajaju i vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik (1O_2), iako po strukturi nisu radikali. Kad se promatraju pojedinačno, kemijska svojstva ovih vrsta značajno se razlikuju (Forman i Zhang, 2021).

SINGLETNI KISIK ($^1\text{O}_2$)

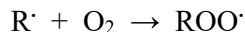
Singletni kisik vrlo je efikasan oksidans u biološkim sustavima i može oštetiti sve biomolekule, uključujući DNA. Singletni radikal ne sadrži nesparene elektrone. Premda lako reagira s raznim staničnim komponentama, primijećeno je da je najreaktivniji s konjugiranim dvostrukim vezama polinezasićenih masnih kiselina. Potencijalnu korist $^1\text{O}_2$ može pokazati u fotodinamičkoj terapiji, korištenoj primjerice u liječenju raka. U takvoj se terapiji $^1\text{O}_2$ formira svjetlošću induciranom ekscitacijom prikladnog fotosenzibilizatora i potom doprinosi oštećenju stanica raka (Jomova i sur., 2023; Gunaydin i sur., 2021).

VODIKOV PEROKSID (H_2O_2)

Vodikov peroksid jaki je endogeni oksidans, najstabilniji od svih ROS-ova, čiji je glavni izvor nastanka dismutacija superoksidnog radikala katalizirana enzimom superoksid dismutazom (SOD). Također, H_2O_2 može nastati dvovalentnom redukcijom kisika u reakcijama koje su katalizirane oksidazama. S obzirom da nema naboj, H_2O_2 može prolaziti kroz biološke membrane i premještati se u različite organele unutar stanice ili između stanica. Zbog relativne stabilnosti, difuzibilnosti i selektivne reaktivnosti, smatra se jednom od najvažnijih signalnih molekula u redoks signalizaciji u raznim biološkim procesima, uključujući staničnu diferencijaciju i proliferaciju, upalu, popravak tkiva, cirkadijani ritam te čak i starenje (Andrés i sur., 2022). H_2O_2 ima važnu ulogu u održavanju tiolne redoks homeostaze, funkcioniranju mitohondrija i u faktorima rasta-induciranoj transdukciji signala. H_2O_2 , kao esencijalni oksidativni agens, bitnu ulogu ima i u sintezi hormona štitne žlijezde (Jomova i sur., 2023; Szanto i sur., 2019). U uvjetima OS-a, zbog velike količine u stanicama, H_2O_2 oštećuje stanične makromolekule. H_2O_2 direktno oksidira mnoge molekule i inaktivira određene enzime koji u svom aktivnom mjestu sadrže tiolne skupine i metioninske ostatke (Andrés i sur., 2022). Održavanje fiziološke unutarstanične koncentracije H_2O_2 esencijalno je za staničnu vijabilnost i normalno funkcioniranje stanice (Zenin i sur., 2022).

PEROKSILNI RADIKAL (ROO[·])

Peroksilni radikal u biološkim sustavima nastaje reakcijom molekularnog kisika s organskim radikalom (R[·]):



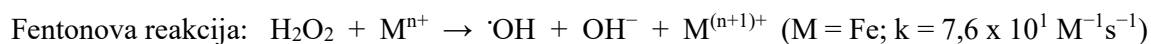
Također, razgradnjom alkil peroksida (ROOH) nastaju peroksilni (ROO[·]) i alkoksilni (RO[·]) radikali:



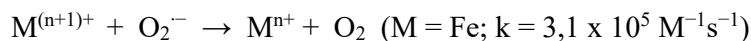
ROO[·] je jaki oksidans i ima sposobnost difuzije, odnosno prolaska kroz stanične membrane (Jomova i sur., 2023).

HIDROKSILNI RADIKAL (·OH)

Hidroksilni radikal jedan je od najreaktivnijih radikala prisutnih u biološkim sustavima i sposoban je oštetiti sve važne stanične makromolekule. Može nastati homolitičkim cijepanjem vode uz visokoenergetsko zračenje, ili, više vjerojatno, raspadom H₂O₂ koji je kataliziran željezo (II) ionom (Fentonova reakcija).



Učinkovito stvaranje hidroksilnih radikala postiže se kad su prisutne stehiometrijske količine redoks metala (željezo (II) ion) i kad je prisutan redukcijski agens (O₂⁻) koji može reciklirati metalne katione natrag u njihov aktivni reducirani oblik. Smatra se da je nastanak ·OH Fentonovom reakcijom glavni mehanizam kojim dolazi do oksidativnog oštećenja stanica i tkiva.

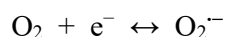


Premda rijetko, ·OH može nastati i kao nusprodukt imunskog sustava, a stvaraju ga mikroglija stanice i makrofagi kad su izloženi patogenima. Poznato je da hidroksilni radikal reagira sa svim komponentama DNA, oštećujući pritom purinske i pirimidinske baze, a i okosnicu DNA.

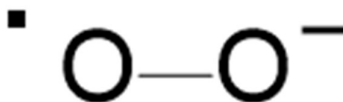
Najproučavaniji primjer oksidativnog oštećenja DNA s hidroksilnim radikalom je adukt purinske baze gvanina s $\cdot\text{OH}$, 8-hidroksigvanin (8-OH-G). 8-OH-G je izrazito značajna oksidirana lezija DNA uključena u mutagenezu i/ili karcinogenezu kod sisavaca i ljudi (Jomova i sur., 2023; Ransy i sur., 2020; Nishimura, 2006).

SUPEROKSIDNI RADIKAL (O_2^-)

Superoksidni radikal primarni je kisikov radikal, koji u glavnini nastaje tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, kad molekula kisika primi elektron koji je ispušten iz lanca prijenosa elektrona. Dakle, O_2^- reducirani je oblik molekularnog kisika (O_2) (slika 4).



U bazalnim uvjetima, jedna stanica dnevno proizvede oko dva trilijuna molekula O_2^- i H_2O_2 . O_2^- esencijalni je ROS koji prvi nastaje i potom pokreće kaskadu stvaranja drugih ROS-ova, od kojih se neki, poput H_2O_2 , ponašaju kao ključne molekule u staničnoj signalizaciji, a neki, poput primjerice $\cdot\text{OH}$, oštećuju stanice i tkiva. U konačnici, biološki učinak ROS-ova određen je njihovom količinom, razinom stanične obrane i sposobnošću za staničnom adaptacijom.

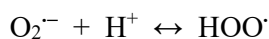


Slika 4. Prikaz kemijske strukture superoksidnog radikala.

O_2^- stvara se u svim živim aerobnim organizmima i sastoji se od dva atoma kisika sa 17 elektrona. Zbog svog negativnog naboja, O_2^- ima nisku permeabilnost membrane i prolazi kroz anionske kanale, ali neefikasno, stoga u velikoj mjeri ostaje i ulazi u daljnje reakcije u staničnom odjeljku u kojem i nastaje. Ima ulogu u staničnoj signalizaciji, može biti prolazni bezopasni intermedijer koji se spontano razgrađuje, a prisutan u prevelikim količinama djeluje toksično. Razinu O_2^- *in vivo* limitiraju dva enzima, superoksid reduktaza (SOR) i superoksid dismutaza (SOD), koji ga prevode do O_2 , odnosno do H_2O_2 .



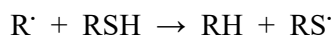
Superoksidni radikal relativno je mali anion, jako topljiv u vodi, gdje ga vodikovim vezama solvatiraju četiri molekule vode. Protoniranjem $O_2^{\cdot-}$ nastaje hidroperoksidni radikal (HOO^{\cdot}):



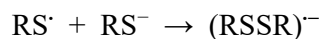
Superoksidni radikal konjugirana je baza slabe kiseline, HOO^{\cdot} ($pK_a = 4,88$). Vrijednost pH kontrolira distribuciju između $O_2^{\cdot-}$ i HOO^{\cdot} . U fiziološkim uvjetima, gotovo sav superoksidni radikal prisutan je u anionskom obliku ($O_2^{\cdot-}$), a svega oko 0,6% čini protonirani oblik radikala (HOO^{\cdot}). Zato što nema naboj, reaktivniji HOO^{\cdot} može prolaziti kroz staničnu membranu i pokrenuti proces lipidne peroksidacije.

$O_2^{\cdot-}$ relativno je nereaktivan prema biološkim molekulama, ali sklon je oštećivanju proteina koji u svom aktivnom mjestu sadrže željezo-sumpor kompleks, poput primjerice akonitaze. Posljedica toksičnog učinka $O_2^{\cdot-}$ na ove proteine je generiranje još toksičnijih reaktivnih vrsta od samog superoksidnog radikala, jer željezo koje se otpusti iz željezo-sumpor kompleksa katalizira nastanak sekundarnih produkata, poput $\cdot OH$, koji daju glavni doprinos toksičnosti $O_2^{\cdot-}$. Budući da $O_2^{\cdot-}$ ne reagira izravno s DNA, u kontekstu oštećenja DNA važna je reakcija dismutacije superoksidnog radikala, kojom nastaje H_2O_2 , a koji se Fentonovom reakcijom pretvara u $\cdot OH$ (Andrés i sur., 2023; Jomova i sur., 2023; Forman i Zhang, 2021).

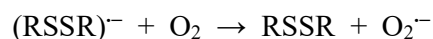
Jedan od načina formacije $O_2^{\cdot-}$ u biološkim sustavima je i tiolima (RSH)-posredovanom apstrakcijom vodika organskih radikala (R^{\cdot}), koja rezultira stvaranjem tiil radikala (RS^{\cdot}):



Potom tiil radikal u reakciji s nukleofilnim tiolatnim anionom (RS^-) formira disulfidni anionski radikal, $(RSSR)^{\cdot-}$:



Disulfidni anionski radikal zatim reducira molekularni kisik do superoksidnog radikala prema sljedećoj reakciji:



Ovaj slijed reakcija, koji u konačnici dovodi do formiranja superoksidnog radikala, pokazao se sveprisutnom i važnom komponentom u biološkim sustavima (Jomova i sur., 2023; Schöneich, 2016).

1.2.3. Praćenje ROS-ova

Direktno mjerenje ROS-ova u biološkim uzorcima kompleksni je zadatak uzimajući u obzir kratak životni vijek i veliku reaktivnost ovih molekula. Direktna mjerenja razine ROS-ova u stanicama provode se pomoću različitih kemiluminiscentnih, fluorescentnih i fluorogenih proba te metodama temeljenim na korištenju protutijela. Osim direktnog mjerenja ROS-ova, druga dva pristupa u procjeni OS-a u kliničkim uzorcima su određivanje markera OS-a koji ukazuju na oksidativna oštećenja staničnih makromolekula te procjena statusa antioksidansa (Katerji i sur., 2019; Dikalov i Harrison, 2014).

Markeri OS-a važni su za procjenu statusa bolesti i pružaju uvid u razinu obrambenog učinka antioksidansa. Mnogo je različitih markera OS-a koji pouzdano ukazuju na ROS-ovima inducirano oksidativno oštećenje lipida, proteina i DNA. Malondialdehid (MDA), toksični produkt lipidne peroksidacije, jedan je od najvažnijih markera OS-a, a koristi se u evaluaciji OS-a kod dijabetesa (Petlevski i sur., 2006). Osim MDA, važan marker OS-a, a također i karcinogeneze, je 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-OHdG), koji ukazuje na oksidativno oštećenje DNA. 8-OHdG koristan je prediktor rizika raka pluća i dojke, ateroskleroze i dijabetesa. Najraširenije korišteni marker OS-a koji ukazuje na oksidativna oštećenja proteina je mjerenje razine karbonilnih skupina u proteinima. Tkiva oštećena ROS-ovima općenito sadržavaju povećanu količinu karboniliranih proteina, pogotovo kod dijabetesa, pretilosti i neurodegenerativnih bolesti (Marrocco i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Neravnoteža između stvaranja ROS-ova i mogućnosti biološkog sustava da nastale oksidanse detoksificira i da popravljaju štetu koja je u nastanku, dovodi do OS-a (Tochigi i sur., 2013). U stanju OS-a, ROS-ovi oštećuju različite stanične strukture, uključujući membranske lipide, stanične proteine i DNA. Takva oštećenja važnih staničnih makromolekula dovode do razvoja mnogih bolesti. Istraživanja su potvrdila da mutacije DNA inducirane ROS-ovima dovode do razvoja raka (Hajam i sur., 2022). Također, mnogobrojna istraživanja povezuju povišenu razinu ROS-ova s patogenezi i progresijom neurodegenerativnih bolesti. Mozak je posebno osjetljiv na ROS-ove zbog vrlo aktivnog staničnog metabolizma, a malog kapaciteta obnove stanica (Xin i sur., 2022).

S obzirom na uključenost povišene razine ROS-ova u patogenezu mnogih bolesti, pojavila se potreba praćenja razine ROS-ova u biološkim uzorcima. Shodno tome, cilj ovog diplomskog rada je optimizirati metodu za mjerenje ROS-ova, prvenstveno superoksidnog radikala, u stanicama *in situ*. Za detekciju O_2^- korištena je fluorescentna proba dihidroetidij (DHE), koja omogućuje praćenje razine O_2^- u stanicama fluorescentnim mikroskopom. Istraživanje je provedeno na epitelnim stanicama usne šupljine, koje se lako prikupljaju jednostavnim brisom unutar usne šupljine i otporne su na vanjski stres. U prvom koraku istraživanja, metoda se optimizirala u svrhu određivanja optimalne koncentracije DHE-a i vremena inkubacije stanica s DHE-om. Nakon toga je optimizirana metoda primijenjena za mjerenje O_2^- u stanicama koje su tretirane s H_2O_2 kako bi se inducirao OS.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

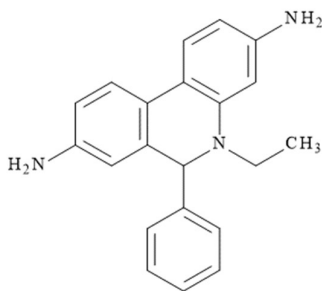
U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- dihidroetidij, DHE (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- dimetil-sulfoksid, DMSO (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- fosfatni pufer, PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- vodikov peroksid, H₂O₂ (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska).

Sve upotrijebljene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu radne koncentracije PBS-a korištena je destilirana voda.

3.1.1.1. Dihidroetidij (DHE)

DHE (slika 5) reducirani je oblik etidij-bromida, fluorokroma koji se interkalira u DNA. Zbog sposobnosti pasivne difuzije u stanice i visoke reaktivnosti, DHE se uobičajeno koristi za detekciju citosolnog superoksidnog radikala i najspecifičnija je poznata fluorescentna proba za detekciju O₂⁻. Produkt reakcije DHE i O₂⁻ je crveno fluorescirajući 2-hidroksietidij, s ekscitacijskim i emisijskim maksimumima od 500 nm, odnosno od 580 nm (Wojtala i sur., 2014).



Slika 5. Kemijska struktura DHE.

3.1.2. Oprema

U ispitivanju je korištena sljedeća oprema:

- automatske mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- invertni fluorescentni mikroskop, Zeiss Axio Observer 7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka),
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka),
- precizna analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD).

Za provođenje istraživanja korišteni su još: Eppendorf epruvete, kapalice, menzure, odmjerne tikvice, plastične epruvete, plastični stalci za epruvete, predmetna stakalca, sterilni drveni štapići za bris. Sva oprema nalazi se na Zavodu za farmakologiju i na Zavodu za prehranu i dijetoterapiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

3.1.2.1. Invertni fluorescentni mikroskop

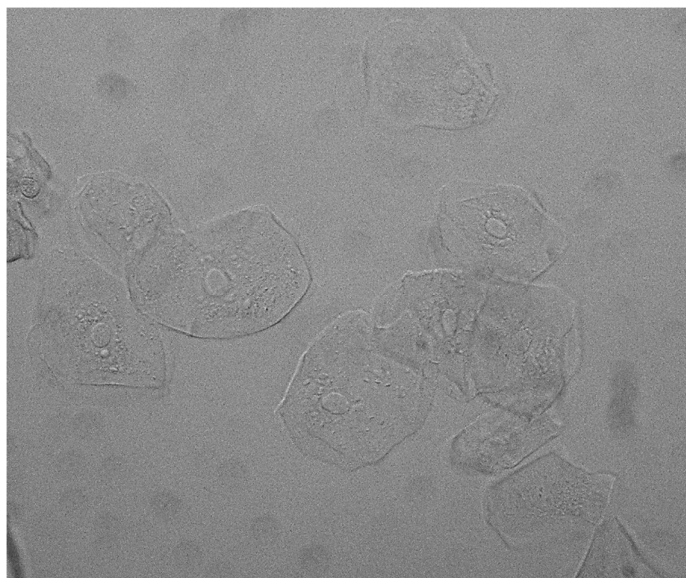
U istraživanju je korišten fluorescentni mikroskop Zeiss Axio Observer 7, proizvođača Carl Zeiss. Mikroskop je invertni, što znači da su mu objektivi smješteni ispod stolića za preparat. To je pogodno za proučavanje stanica koje se drže za podlogu prozirne posudice u kojoj se uzgajaju te omogućuje promatranje procesa unutar živih stanica. Mikroskop se podešava računalnim programom ZEN 3.5 (ZEN pro), univerzalnim korisničkim sučeljem za dobivanje i obradu slike. Mikroskop ima ugrađenu kameru AxioCam 305 color, koja prikazuje sliku u rezoluciji od 10 megapiksela i njome se dokumentiraju fotografije uzoraka (<https://www.zeiss.com/>).

U ovom istraživanju, stanice su promatrane s objektivom koji daje povećanje od 40 puta, dok ukupno povećanje dobivene slike mikroskopom (umnožak povećanja okulara i objektiva) iznosi 400 puta. Jačina izvora LED svjetla, Colibri 7, postavljena je na 10,0%, a korišten je set filtera 109 HE. Valna duljina ekscitacijskog filtera postavljena je na 567 nm.

3.1.3. Biološki uzorak

Istraživanje je provedeno na epitelnim stanicama usne šupljine (bukalne stanice; slika 6), koje su lako dostupne i otporne na vanjski stres. Stanice su prikupljene neinvazivnom metodom brisa usne šupljine sa sterilnim drvenim štapićem i potom je suspenzija stanica priređena u PBS-u (2 mL) te čuvana u kontroliranim uvjetima.

Plosnate i tanke, bukalne stanice sastavni su dio slojevitog pločastog epitela, koji je građom sličan epitelu drugih organa, a građen je od mitotički aktivnog sloja, iznad kojeg je niz od 40-50 slojeva stanica različitog stupnja diferencijacije te površinskog sloja s kojeg se stanice ljušte. Osim zaštite oralne sluznice, bukalne stanice u usnoj šupljini doprinose formiranju i održavanju oralne mikroflore, pružajući podlogu za kolonizaciju bakterija. Povrh toga, imaju ulogu i u imunosnoj obrani tako što sudjeluju u inicijaciji imunosnog odgovora organizma (Danga i Rath, 2024; Jug i Bećirević-Laćan, 2004).



Slika 6. Bukalne stanice u PBS-u; svijetlo polje, povećanje 400x.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje superoksidnog radikala dihidroetidijem

3.2.1.1. Priprema otopina

Priprema PBS-a:

PBS u koncentraciji 10x komercijalno je nabavljen, stoga ga je bilo potrebno razrijediti s destiliranom vodom na 1x PBS. Za pripremu 1 L 1x PBS-a, pomiješano je 100 mL 10x PBS-a s 900 mL destilirane vode.

PBS je korišten kao medij za suspenziju bukalnih stanica, za pripremu radne otopine DHE i njena daljnja razrjeđenja. Također, korišten je pri razrjeđivanju H₂O₂ u drugom dijelu istraživanja, kad se optimizirana metoda koristila za mjerenje O₂⁻ u bukalnim stanicama u kojima se OS inducirao s H₂O₂ u različitim koncentracijama.

Priprema DHE:

Za pripremu stock otopine DHE koncentracije 0,2 M prvo je na analitičkoj vagi odvagano 0,063 g DHE ($M_r = 315,41$ g/mol) te potom otopljeno u 1 mL DMSO-a. Kao otapalo se koristi DMSO jer DHE nije topljiv u vodenom mediju. Miješanjem na miješalici, DHE se otopi u DMSO-u. Za računanje količine DHE potrebne za postizanje željene koncentracije stock otopine, rabi se formula: m (g) = c (M) · V (L) · M_r (g/mol).

U sljedećem se koraku stock otopina DHE koncentracije 0,2 M razrjeđuje do koncentracije 1 mM, što je radna otopina DHE. Kako bi napravili radnu otopinu željene koncentracije, potrebno je 50 μL stock otopine prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti ju novim otapalom, PBS-om, do oznake. Za izračun volumena stock otopine DHE, koji se ulijeva u odmjernu tikvicu od 10 mL, korištena je formula $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$.

Tijekom prvog dijela istraživanja, u kojem se metoda optimizirala u svrhu određivanja optimalne koncentracije DHE-a za mjerenje razine superoksidnog radikala u bukalnim stanicama, napravljena su 3 razrjeđenja 1 mM otopine DHE u koncentracijama: 5, 10 i 20 μM . Razrjeđenje je napravljeno u PBS-u, a volumen razrijeđenih otopina iznosio je 1 mL. Za izračun je korištena formula $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$. Priprema otopina prikazana je tablicom 1.

Tablica 1. Priprema razrijeđenih otopina DHE za optimizaciju metode.

Koncentracija otopine DHE (μM)	Volumen 1 mM otopine DHE (μL)	Volumen dodanog PBS-a (μL)
5	5	995
10	10	990
20	20	980

Priprema H_2O_2 :

Pripremljene su otopine H_2O_2 u trima različitim koncentracijama: 10, 30 i 60 mM, u svrhu određivanja optimalne koncentracije H_2O_2 za induciranje OS-a u bukalnim stanicama, čime se bavilo u drugom dijelu istraživanja.

U prvom koraku je izračunata molarna koncentracija 30%-tne w/v otopine H_2O_2 ($M_r = 34,01 \text{ g/mol}$), koja u 100 mL otopine sadrži 30 g H_2O_2 . Molarna koncentracija H_2O_2 iznosi $\approx 8,82 \text{ M}$, a izračunata je prema formuli: $c = m / M_r \cdot V$.

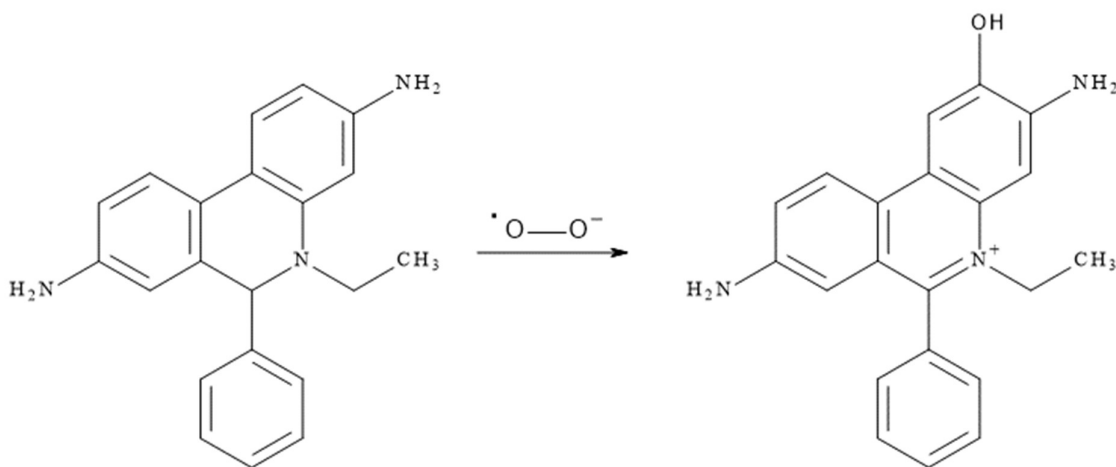
Koristeći formulu $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$, izračunat je volumen 30%-tne otopine H_2O_2 potreban za pripremu razrijeđenih otopina željenih koncentracija u volumenu od 1 mL. Priređene otopine razrijeđene su PBS-om, a priprema je prikazana tablicom 2.

Tablica 2. Priprema razrijeđenih otopina H₂O₂.

Koncentracija otopine H ₂ O ₂ (mM)	Volumen 30%-tne otopine H ₂ O ₂ (μL)	Volumen dodanog PBS-a (μL)
10	1,13	998,87
30	3,40	996,60
60	6,80	993,20

3.2.1.2. Postupak mjerenja superoksidnog radikala u stanicama

Reakcijom oksidacije DHE-a sa O₂^{•-} u stanici nastaje crveno-fluorescirajući produkt, 2-hidroksietidij (slika 7). U 100 μL suspenzije bukalnih stanica u Eppendorf epruveti, doda se 20 μL 20 μM otopine DHE te se epruveta pomiješa i zaštićena od svjetlosti ostavi inkubirati na sobnoj temperaturi u vremenu od 10 minuta. Nakon toga se kapljica suspenzije stanica prebaci na predmetno stakalce i prekrije pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni mikroskopski preparat promatra se pomoću fluorescentnog mikroskopa pod uvjetima opisanima u 3.1.2.1.



Slika 7. Prijelaz DHE u 2-hidroksietidij u reakciji sa superoksidnim radikalom.

Intenzitet fluorescencije 2-hidroksietidija, koji je proporcionalan količini O₂^{•-} u stanici, mjeri se korištenjem programa ZEN 3.5 (ZEN pro) fluorescentnog mikroskopa Zeiss Axio Observer 7 tako da se na mikroskopskom preparatu odabere 10 nasumičnih stanica i potom se svakoj od njih izmjeri intenzitet fluorescencije izražen u relativnim jedinicama fluorescencije (RFU, engl. *Relative fluorescence units*).

3.3. Statistička obrada rezultata

Kao alat za statističku analizu podataka u ovom diplomskom radu korišten je program Excel (MS Office). Za svaki od pripremljenih preparata, i tijekom optimizacije metode i tijekom primjene optimizirane metode, odabrano je 10 nasumičnih stanica kojima je izmjeren intenzitet fluorescencije izražen u RFU. Za svaki je od preparata vrijednost RFU izračunata kao srednja vrijednost 10 izmjerenih vrijednosti stanica iz uzorka \pm standardna devijacija.

Studentov t-test korišten je kao test za provjeru statističke značajnosti uzoraka bez dodatka H₂O₂ (optimiziranje metode) i uzoraka kojima je dodan H₂O₂. Kao statistički značajna razlika postavljena je p-vrijednost $\leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kontrolirana razina OS-a u određenim je fiziološkim stanjima zapravo korisna, no, koristan učinak ograničen je samo na specifične situacije i u većini drugih slučajeva velike količine ROS-ova i OS inducirat će staničnu smrt putem mehanizama apoptoze i/ili nekroze i dovesti do staničnog i tkivnog oštećenja (Li i sur., 2015). Povišena razina ROS-ova povezuje se s nastankom niza oštećenja, poput oštećenja DNA, pa time i s razvojem niza bolesti, primjerice dijabetesa, pretilosti, hepatorenalnih oštećenja, hipertrofije srca i reproduktivne disfunkcije (Hajam i sur., 2022), što ukazuje na potrebu razvijanja metoda za praćenje ROS-ova u biološkim uzorcima. U ovom je istraživanju za praćenje razine ROS-ova u bukalnim stanicama odabrana fluorescentna mikroskopija i fluorescentna proba DHE, koja difundira u stanicu i reagira s $O_2^{\cdot-}$. Premda je DHE najspecifičnija fluorescentna proba za detekciju $O_2^{\cdot-}$, u stanici je mogu nespecifično oksidirati i drugi ROS-ovi, na primjer $\cdot OH$. Pritom kao produkt nastaje etidij, koji također fluorescira i doprinosi ukupnom intenzitetu fluorescencije. Za određivanje unutarstanične količine $O_2^{\cdot-}$ važno je podesiti odgovarajuće valne duljine. Pri valnim duljinama $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 500\text{-}530$ nm i $\lambda_{\text{emisija}} = 590\text{-}620$ nm određuje se količina 2-hidroksietidija, a time i $O_2^{\cdot-}$, dok se pri valnim duljinama $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 480$ nm i $\lambda_{\text{emisija}} = 576$ nm mjeri intenzitet fluorescencije etidija, odnosno drugih ROS-ova (Wojtala i sur., 2014).

U odnosu na postojeće metode mjerenja ROS-ova, fluorescentna mikroskopija jednostavnija je za korištenje te omogućuje brzo prikupljanje rezultata. Također, fluorescentna mikroskopija omogućuje praćenje fluorescencije u živoj stanici, odnosno omogućuje detekciju smještaja $O_2^{\cdot-}$ unutar same stanice (Wojtala i sur., 2014).

4.1. Optimizacija metode

U prvom dijelu istraživanja optimizirala se metoda mjerenja ROS-ova u stanicama, u smislu koncentracije DHE i vremena inkubacije suspenzije stanica s DHE. Pripremljene su 3 različite koncentracije otopine DHE: 5, 10 i 20 μM . Priređena suspenzija epitelnih stanica usne šupljine alikvotirana je u volumenu od 100 μL u svaku od 3 Eppendorf epruvete, kako bi svaka epruveta imala jednak broj stanica. Fluorescentni mikroskop, Zeiss Axio Observer 7, podešen je na uvjete opisane u poglavlju 3.1.2.1. Sva su mjerenja načinjena pod istim uvjetima, s ciljem da se tijekom optimizacije metode uspoređuju isključivo utjecaj koncentracije otopine DHE i vremena inkubacije stanica s DHE.

Prvo je ispitana inkubacija suspenzije stanica s 5 μM otopinom DHE. Suspenzija stanica inkubirana je s 5 μM (20 μL) otopinom DHE te su ispitana tri vremena inkubacije: 25, 40 i 60 minuta na sobnoj temperaturi (25°C). Intenzitet fluorescencije praćen je u stanicama na fluorescentnom mikroskopu nakon svakog od 3 vremena inkubacije i za svako od vremena inkubacije zabilježene su vrijednosti intenziteta fluorescencije u 10 nasumičnih stanica koristeći program ZEN 3.5. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.

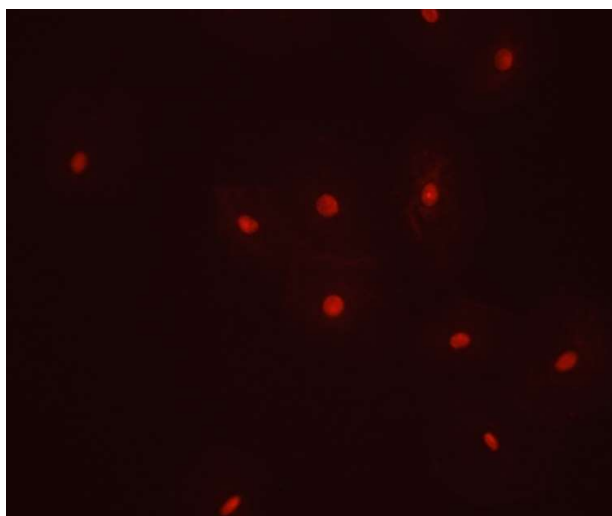
Tablica 3. Intenzitet fluorescencije izražen u RFU nakon različitih vremena inkubacije suspenzije bukalnih stanica s 5 μM otopinom DHE.

Vrijeme inkubacije	25 min	40 min	60 min
Intenzitet fluorescencije (RFU)	112,296 \pm 12,368	179,683 \pm 14,550*	135,770 \pm 7,538*

* statistički značajno različito u odnosu na inkubaciju od 25 minuta ($p < 0,05$)

Kako je vidljivo iz tablice 3, s odmicanjem vremena došlo je do porasta intenziteta fluorescencije u stanicama te je značajno veći intenzitet fluorescencije zabilježen nakon 40 i 60 minuta inkubacije u odnosu na 25 minuta inkubacije. Iako je intenzitet fluorescencije nakon inkubacije stanica s 5 μM DHE u trajanju od 60 minuta bio viši od 25-minutne inkubacije, ipak je taj intenzitet fluorescencije u odnosu na 40-minutnu inkubaciju bio niži. Na slici 8 prikazane su stanice inkubirane s DHE u vremenu od 40 minuta. Na slici je vidljivo da je intenzitet fluorescencije vrlo nizak u citoplazmi stanica, dok je jezgra jako obojena. Razlog tog

intenzivnog obojenja jezgre je interkaliranje fluorescentne probe DHE, koja je reducirani oblik etidij bromida, u DNA (Wojtala i sur., 2014).



Slika 8. Bukalne stanice inkubirane s 5 μM otopinom DHE 40 minuta; povećanje slike 400x.

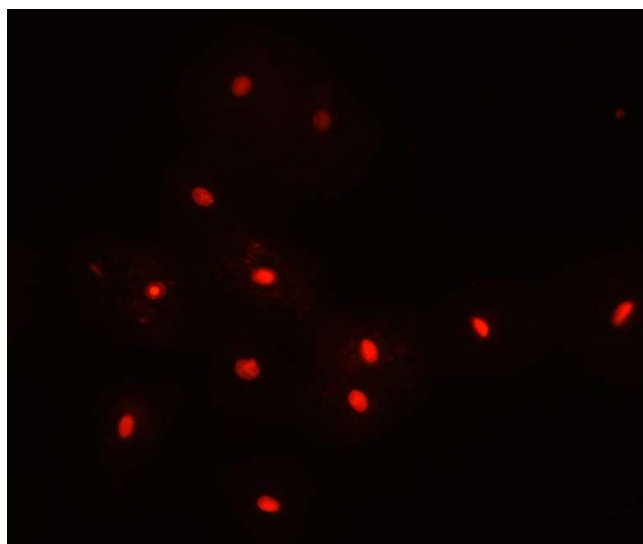
Potom je ispitana inkubacija suspenzije stanica s 10 μM otopinom DHE u vremenima od 10, 20, 30 i 40 minuta. Različita vremena inkubacije u usporedbi s prijašnjim ispitivanjem posljedica su primijećenog pada u intenzitetu fluorescencije s odmakom vremena, stoga je cilj bio naći nova optimalna vremena inkubacije s obzirom da je koncentracija otopine DHE u drugom ispitivanju dvostruka veća u odnosu na onu u prvom ispitivanju. Istim principom kao i prilikom prvog ispitivanja, intenzitet fluorescencije u stanicama praćen je nakon svakog od 4 vremena inkubacije. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Intenzitet fluorescencije izražen u RFU nakon različitih vremena inkubacije suspenzije bukalnih stanica s 10 μM otopinom DHE.

Vrijeme inkubacije	10 min	20 min	30 min	40 min
Intenzitet fluorescencije (RFU)	149,787 \pm 15,334	158,276 \pm 18,840	168,431 \pm 12,633*	183,993 \pm 24,844*

* statistički značajno različito u odnosu na 10-minutnu inkubaciju ($p < 0,05$)

S porastom vremena inkubacije, došlo je i do porasta intenziteta fluorescencije u stanicama. U stanicama inkubiranim s 10 μ M DHE u vremenima od 30 i 40 minuta, intenzitet fluorescencije bio je značajno viši u odnosu na intenzitet fluorescencije stanica koje su bile inkubirane s DHE 10 minuta. Još uvijek se može primijetiti da je citoplazma stanice slabo uočljiva, odnosno da slabo fluorescira (slika 9).



Slika 9. Bukalne stanice inkubirane s 10 μ M otopinom DHE 30 minuta; povećanje 400x.

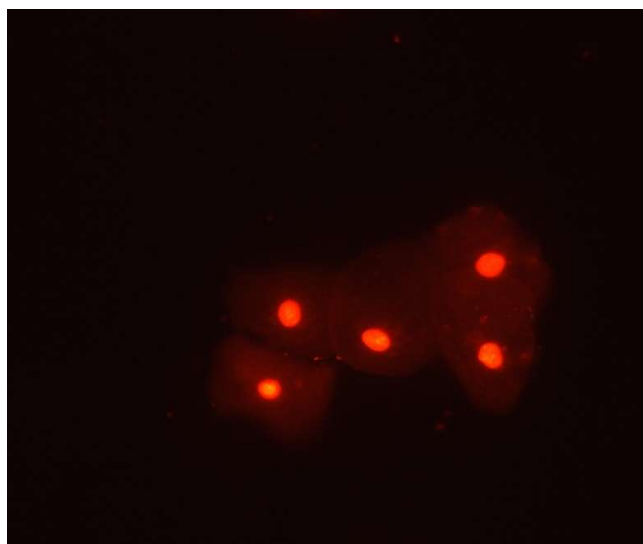
Zatim je ispitana inkubacija stanica s 20 μ M otopinom DHE u vremenima od 5, 10, 15 i 20 minuta. Opet su odabrana nova vremena inkubacije suspenzije stanica i DHE radi prilagodbe koncentraciji otopine DHE. Rezultati su prikazani tablicom 5.

Tablica 5. Intenzitet fluorescencije izražen u RFU nakon različitih vremena inkubacije suspenzije bukalnih stanica s 20 μ M otopinom DHE.

Vrijeme inkubacije	5 min	10 min	15 min	20 min
Intenzitet fluorescencije (RFU)	266,698 \pm 39,329	368,184 \pm 42,605*	402,364 \pm 33,692*	442,002 \pm 34,991*

* statistički značajno različito u odnosu na 5-minutnu inkubaciju ($p < 0,05$)

Vrijednosti intenziteta fluorescencije ovih stanica više su u odnosu na prethodna ispitivanja, što je i za očekivati, jer je otopina DHE u trećem ispitivanju četverostruko, odnosno dvostruko koncentriranija od otopina DHE u prva dva ispitivanja. S vremenom inkubacije rastao je i intenzitet fluorescencije stanica te je nakon 10, 15 i 20-minutne inkubacije intenzitet fluorescencije stanica bio značajno viši u odnosu na 5-minutnu inkubaciju.



Slika 10. Bukalne stanice inkubirane s 20 μM otopinom DHE 10 minuta; povećanje 400x.

Kako je vidljivo na slici 10, 20 μM otopina DHE izazvala je najintenzivnije obojenje citoplazme. S obzirom da je svrha korištenja DHE-a, kao fluorescentne probe, mjerenje citosolnog O_2^- u stanici, koncentracija od 20 μM odabrana je kao optimalna koncentracija otopine DHE za mjerenje O_2^- zbog najoptimalnijeg obojenja citoplazme. Nadalje, kao optimalno vrijeme inkubiranja uzorka odabrano je 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, jer je već nakon 15 minuta inkubacije zamijećena granulacija citoplazmatskog sadržaja, što ukazuje na moguće degenerativne procese i oštećenje stanice.

4.2. Primjena metode

U sljedećem su dijelu istraživanja, u svrhu primjene optimizirane metode za praćenje $O_2^{\cdot-}$ u bukalnim stanicama, stanice tretirane s H_2O_2 s ciljem izazivanja OS-a. Izlaganje stanica H_2O_2 široko je upotrebljavan postupak vanjskog induciranja OS-a u stanicama. Ransy i sur., (2020) utvrdili su da stanice izložene H_2O_2 konvertiraju H_2O_2 u O_2 unutar nekoliko minuta. Nakon kraćeg vremena od izlaganja H_2O_2 , u stanicama je kao indirektna posljedica primijećen porast $O_2^{\cdot-}$. Zbog velikog porasta unutarstanične koncentracije molekularnog kisika, koji zajedno s H_2O nastaje djelovanjem katalaze na H_2O_2 , znatno je povećana vjerojatnost njegove redukcije s e^- ispuštenim tijekom procesa staničnog metabolizma, a uslijed toga je povećan i porast produkcije $O_2^{\cdot-}$ (Ransy i sur., 2020).

Za ovo ispitivanje priređene su 3 otopine H_2O_2 različitih koncentracija: 10, 20 i 30 mM. Suspenzija epitelnih stanica usne šupljine alikvotirana je u volumenu od 100 μ L te je svaki od alikvota tretiran različitom koncentracijom H_2O_2 . Jedan pripremljeni alikvot suspenzije stanica nije tretiran s H_2O_2 te je služio kao kontrolni uzorak. Fluorescentni mikroskop podešen je jednako kao pri optimiziranju metode. Cilj je utvrditi je li se nakon tretmana uzoraka s H_2O_2 povećao intenzitet fluorescencije u citoplazmi stanice. Intenzitet fluorescencije 2-hidroksietidija mjerio se isključivo u citoplazmi, a izostanak mjerenja intenziteta fluorescencije u jezgri stanice objašnjava niže vrijednosti intenziteta fluorescencije koje su zabilježene tijekom primjene metode.

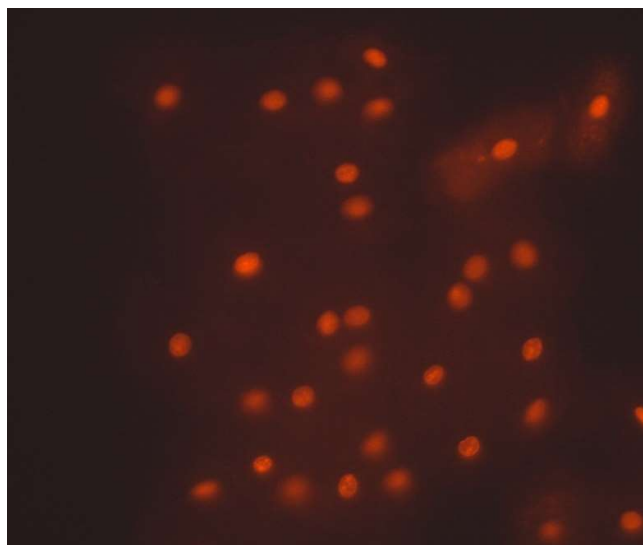
U kontrolni uzorak suspenzije stanica dodano je 20 μ L 20 μ M otopine DHE te je uzorak inkubiran 10 minuta i nakon toga je izmjerena vrijednost intenziteta fluorescencije 2-hidroksietidija u citoplazmama 10 nasumičnih stanica. Tretman suspenzije stanica s H_2O_2 proveden je tako da je jedan alikvot suspenzije stanica tretiran s 10 mM H_2O_2 (20 μ L) te je inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije s H_2O_2 dodano je 20 μ L 20 μ M DHE te je provedena dodatna 10-minutna inkubacija. Potom je izmjeren intenzitet fluorescencije stanica. Jednaki postupak vrijedi i za drugi i treći alikvot suspenzije stanica, samo je drugi uzorak tretiran s 30 mM, a treći sa 60 mM otopinom H_2O_2 . Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Intenzitet fluorescencije 2-hidroksietidija u citoplazmi stanice izražen u RFU nakon 10 minuta inkubacije s H₂O₂ različitih koncentracija i inkubacije s 20 μM otopinom DHE.

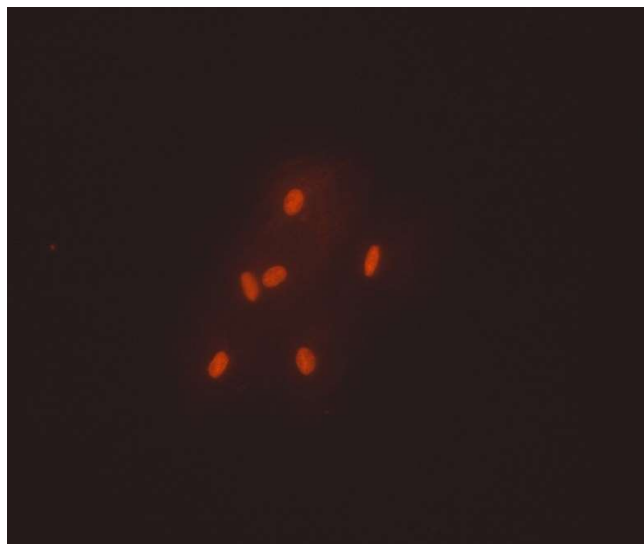
Koncentracija H ₂ O ₂	0 mM (kontrola)	10 mM	30 mM	60 mM
Intenzitet fluorescencije (RFU)	76,686 ± 8,319	84,150 ± 12,061	90,152 ± 6,415*	110,803 ± 13,920*

* statistički značajno različito u odnosu na 10-minutnu inkubaciju kontrole (p < 0,05)

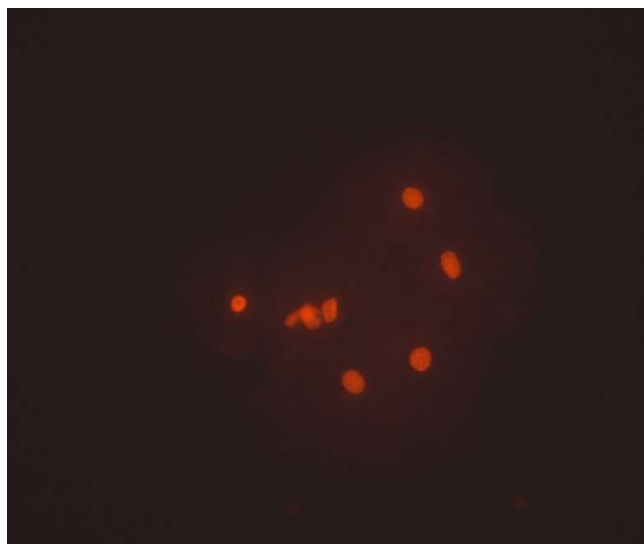
Intenzitet fluorescencije u stanicama tretiranim s otopinama H₂O₂ u koncentracijama 10, 30 i 60 mM bio je veći od kontrolnog uzorka te je s porastom koncentracije H₂O₂ rastao i intenzitet fluorescencije. Između vrijednosti intenziteta fluorescencije kontrolnih stanica i stanica tretiranih najnižom koncentracijom H₂O₂ nije bilo značajnije razlike. Intenzitet fluorescencije bio je značajno viši u stanica tretiranih višim koncentracijama H₂O₂ (30 i 60 mM) u odnosu na kontrolne stanice. Na slikama 11, 12 i 13 prikazane su stanice tretirane s H₂O₂ u koncentracijama 10, 30 i 60 mM.



Slika 11. Bukalne stanice tretirane s 10 mM otopinom H₂O₂ te potom s 20 μM otopinom DHE-a; ukupna inkubacija 20 minuta; povećanje 400x.



Slika 12. Bukalne stanice tretirane s 30 mM otopinom H₂O₂ te potom s 20 μM otopinom DHE-a; ukupna inkubacija 20 minuta; povećanje 400x.



Slika 13. Bukalne stanice tretirane s 60 mM otopinom H₂O₂ te potom s 20 μM otopinom DHE-a; ukupna inkubacija 20 minuta; povećanje 400x.

Na slikama 11, 12 i 13 vidljivo je da se u citoplazmi stanica, nakon tretmana s H₂O₂, povećao intenzitet fluorescencije. Od ispitanih otopina H₂O₂ različitih koncentracija, najbolji odabir za ovu metodu mjerenja O₂⁻ u stanicama bila bi 30 mM otopina H₂O₂. U velikoj većini publikacija u bazi podataka PubMed koncentracija H₂O₂ korištena za generiranje OS-a u staničnim modelima bila je niža od koncentracija odabranih u ovome istraživanju (Ransy i sur., 2020). Međutim, u ovom istraživanju relativno visoke koncentracije otopina H₂O₂ odabrane su

uzimajući u obzir razrjeđenje, do kojeg dolazi kad se mali volumen otopine H_2O_2 pomiješa sa suspenzijom stanica u PBS-u, čiji je volumen 5 puta veći.

Uzimajući u obzir literaturne podatke, izvršeno je još i ispitivanje učinka dvostruko duže inkubacije suspenzije stanica s 10 mM otopinom H_2O_2 na intenzitet fluorescencije. U epruvetu sa suspenzijom stanica dodana je 10 mM otopina H_2O_2 (20 μ L) te su stanice inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, dodan je 20 μ M DHE (20 μ L) te su stanice inkubirane dodatnih 10 minuta. Izmjereni intenzitet fluorescencije 2-hidroksietidija u citoplazmi izražen u RFU iznosio je $82,205 \pm 6,480$. Vidljivo je da intenzitet s vremenom polagano pada, a to nije iznenađujuće, jer, prema literaturi, stanice izložene vodikovom peroksidu konvertiraju H_2O_2 u O_2 i H_2O unutar nekoliko minuta, što izlaganje stanica H_2O_2 čini vrlo kratkim i manje intenzivnim od očekivanog (Ransy i sur., 2020), stoga je kraće vrijeme inkubacije bolja varijanta za ovu metodu.

Porast intenziteta fluorescencije nakon dodatka H_2O_2 , kao induktora OS-a, signalizira potencijalni dijagnostički značaj ove metode. S obzirom da je metoda prvenstveno vizualna, poželjno ju je kombinirati i s drugim metodama, koje također služe u otkrivanju OS-a i oksidativnih oštećenja u stanicama, primjerice s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Takvim se kombiniranjem poboljšava specifičnost i osjetljivost te kvantifikacija ROS-ova. Još jedan način mjerenja razine $O_2^{\cdot-}$ je korištenjem MitoSOX Red fluorescentne probe, kationskog derivata DHE-a, koji se koristi za mjerenje produkcije $O_2^{\cdot-}$ u matriksu mitohondrija (Dikalov i Harrison, 2014; Wojtala i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Optimalni uvjeti za mjerenje superoksidnog radikala u stanicama pomoću DHE su otopina DHE u koncentraciji od 20 μM i vrijeme inkubacije stanica od 10 minuta na sobnoj temperaturi uslijed najoptimalnijeg obojenja citoplazme u tim uvjetima.
- Potvrđeno je da je H_2O_2 uspješan induktor oksidacijskog stresa, odnosno da uspješno potencira stvaranje $\text{O}_2^{\cdot-}$ u stanicama. Do indukcije povišene razine $\text{O}_2^{\cdot-}$ u bukalnim stanicama došlo je nakon inkubacije stanica s 30 mM otopinom H_2O_2 u trajanju od 10 minuta.
- Razvijenu metodu moguće je primijeniti za praćenje razine $\text{O}_2^{\cdot-}$, a time i OS-a, u stanicama *in situ*.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

8-OH-G – 8-hidroksigvanin

H₂O₂ – vodikov peroksid

HOO· - hidroperoksidni radikal

DHE – dihidroetidij

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

FM – fluorescentna mikroskopija

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NOX – NADPH oksidaza

¹O₂ – singletni kisik

O₂⁻ - superoksidni radikal

·OH – hidroksilni radikal

OS – oksidacijski stres

PBS – fosfatni pufer

RFU – relativne jedinice fluorescencije

ROO· - peroksilni radikal

ROS - reaktivne kisikove vrste

XO – ksantin oksidaza

7. LITERATURA

Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Juan CA, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies. *Stresses*, 2022, 2, 256-274.

Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Juan CA, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Superoxide Anion Chemistry-Its Role at the Core of the Innate Immunity. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3), 1841.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007, 87(1), 245-313.

Combs CA. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr Protoc Neurosci*, 2010, 1-19.

Danga AK, Rath PC. Human buccal epithelial cells as a model system for molecular analysis of DNA, RNA and protein. *Tissue Cell*, 2024, 88, 102336.

Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci*, 2014, 2, 53.

Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(2), 372-382.

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

Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer – A Review of the Current Clinical Status. *Front Chem*, 2021, 9, 686303.

Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, Pramodh S, Alsulimani A, Alkhanani MF, Harakeh S, Hussain A, Haque S, Reshi MS. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 2022, 11(3), 552.

Hickey SM, Ung B, Bader C, Brooks R, Lazniewska J, Johnson IRD, Sorvina A, Logan J, Martini C, Moore CR, Karageorgos L, Sweetman MJ, Brooks DA. Fluorescence Microscopy - An Outline of Hardware, Biological Handling, and Fluorophore Considerations. *Cells*, 2021, 11(1), 35.

Jelic, MD, Mandic AD, Maricic, SM, Srdjenovic, BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(1), 22-28.

Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*, 2023, 97(10), 2499-2574.

Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9), 4642.

Jug M, Bećirević-Laćan M. Usna šupljina kao mjesto primjene lijekova. *Farm glas*, 2004, 80, 205-216.

Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019, 1279250.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11), 26087-26124.

Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 6501046.

Nishimura S. 8-Hydroxyguanine: From its discovery in 1983 to the present status. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2006, 82(4), 127-141.

Petlevski R, Juretić D, Hadžija M, Slijepčević M, Lukač-Bajalo J. Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. *Biochem Med*, 2006, 16(1), 43-49.

- Petlevski R, Kutnjak V. Oksidacijski stres u šećernoj bolesti. *Farm glas*, 2015, 71, 303-308.
- Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants – An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem*, 2021, 209, 112891.
- Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23), 9149.
- Renz, M. Fluorescence microscopy - A historical and technical perspective. *Cytometry*, 2013, 83, 767-779.
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 1-36.
- Schöneich C. Thiyl radicals and induction of protein degradation. *Free Radic Res*, 2016, 50(2), 143-149.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 1997, 82(2), 291-295.
- Szanto I, Pusztaszeri M, Mavromati M. H₂O₂ Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases. *Antioxidants*, 2019, 8(5), 126.
- Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladâcenco O, Roza E, Costăchescu B, Grumezescu AM, Teleanu RI. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11), 5938.
- Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Suzuki-Karasaki Y. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *Int J Oncol*, 2013, 42(3), 863-872.
- Wang X, Lai Y. Three basic types of fluorescence microscopy and recent improvement. *ICGEC*, 2021, 1-6.

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.

Xin X, Gong T, Hong Y. Hydrogen peroxide initiates oxidative stress and proteomic alterations in meningotheial cells. *Sci Rep*, 2022, 12(1), 14519.

Zenin V, Ivanova J, Pugovkina N, Shatrova A, Aksenov N, Tyuryaeva I, Kirpichnikova K, Kuneev I, Zhuravlev A, Osyayeva E, Lyublinskaya E, Gazizova I, Guriev N, Lyublinskaya O. Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biol*, 2022, 50, 102245.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$) primarni je kisikov radikal, koji u glavnini nastaje tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima i pokreće kaskadu stvaranja drugih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanici. Neravnoteža između stvaranja ROS-ova i mogućnosti biološkog sustava da ih detoksificira i da popravljaja štetu koja je u nastanku, dovodi do oksidacijskog stresa (OS), koji je povezan s razvojem mnogih bolesti. Zbog pretpostavke da je $O_2^{\cdot-}$ potencijalno koristan u procjeni razine OS-a i činjenice da bi mjerenje $O_2^{\cdot-}$ moglo imati dijagnostičku svrhu, cilj ovog rada bio je optimizirati metodu za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama na fluorescentnom mikroskopu. Za detekciju $O_2^{\cdot-}$ korištena je fluorescentna proba dihidroetidij (DHE), a pokus je proveden na bukalnim stanicama.

U prvom je koraku istraživanja optimizirana metoda mjerenja $O_2^{\cdot-}$ u stanicama, u smislu koncentracije DHE i vremena inkubacije stanica s DHE. Rezultati su pokazali da su optimalni uvjeti za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama 10-minutna inkubacija stanica na sobnoj temperaturi ($25^{\circ}C$) s otopinom DHE u koncentraciji od $20 \mu M$ zbog najoptimalnijeg obojenja citoplazme. Nakon toga je optimizirana metoda primijenjena za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama koje su tretirane s H_2O_2 da bi se inducirao OS. Potvrđeno je da je H_2O_2 uspješan induktor OS-a, odnosno da uspješno potencira stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama. Do indukcije povišene razine $O_2^{\cdot-}$ u bukalnim stanicama došlo je nakon 10-minutne inkubacije stanica s $30 mM$ otopinom H_2O_2 . Razvijenu je metodu moguće primijeniti za praćenje razine $O_2^{\cdot-}$, a time i OS-a, u stanicama.

The superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) is the primary oxygen radical, predominantly formed during the process of oxidative phosphorylation in mitochondria, and it initiates a cascade of other reactive oxygen species (ROS) production in the cell. An imbalance between ROS production and the biological system's ability to detoxify them and repair the resulting damage leads to oxidative stress (OS), which is associated with the development of many diseases. Due to the assumption that $O_2^{\cdot-}$ could be potentially useful in assessing OS levels and the fact that measuring $O_2^{\cdot-}$ could have diagnostic purposes, the aim of this study was to optimize a method for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells using a fluorescent microscope. The fluorescent probe dihydroethidium (DHE) was used for detecting $O_2^{\cdot-}$, and as experimental model, buccal cells were used.

In the first step of the research, the method for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells was optimized in terms of DHE concentration and cell incubation time with DHE. Results indicate that the optimal conditions for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells are 10 minutes incubation of cells at room temperature (25°C) with a DHE solution at a concentration of 20 μ M for the most optimal cytoplasmic staining. Subsequently, the optimized method was applied to measure $O_2^{\cdot-}$ in cells treated with H_2O_2 to induce OS. It was confirmed that H_2O_2 is a successful inducer of OS, meaning that it effectively enhances the production of $O_2^{\cdot-}$ in cells. Elevated levels of $O_2^{\cdot-}$ in buccal cells were induced after 10 minutes incubation of the cells with a 30 mM H_2O_2 solution. The developed method can be applied to monitor $O_2^{\cdot-}$ levels and, consequently, OS in cells.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Optimiziranje uvjeta mjerenja superoksidnog radikala fluorescentnom mikroskopijom

Luka Režan

SAŽETAK

Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$) primarni je kisikov radikal, koji u glavnini nastaje tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima i pokreće kaskadu stvaranja drugih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanici. Neravnoteža između stvaranja ROS-ova i mogućnosti biološkog sustava da ih detoksificira i da popravljaju štetu koja je u nastanku, dovodi do oksidacijskog stresa (OS), koji je povezan s razvojem mnogih bolesti. Zbog pretpostavke da je $O_2^{\cdot-}$ potencijalno koristan u procjeni razine OS-a i činjenice da bi mjerenje $O_2^{\cdot-}$ moglo imati dijagnostičku svrhu, cilj ovog rada bio je optimizirati metodu za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama na fluorescentnom mikroskopu. Za detekciju $O_2^{\cdot-}$ korištena je fluorescentna proba dihidroetidij (DHE), a pokus je proveden na bukalnim stanicama. U prvom je koraku istraživanja optimizirana metoda mjerenja $O_2^{\cdot-}$ u stanicama, u smislu koncentracije DHE i vremena inkubacije stanica s DHE. Rezultati su pokazali da su optimalni uvjeti za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama 10-minutna inkubacija stanica na sobnoj temperaturi ($25^{\circ}C$) s otopinom DHE u koncentraciji od $20 \mu M$ zbog najoptimalnijeg obojenja citoplazme. Nakon toga je optimizirana metoda primijenjena za mjerenje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama koje su tretirane s H_2O_2 da bi se inducirao OS. Potvrđeno je da je H_2O_2 uspješan induktor OS-a, odnosno da uspješno potencira stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u stanicama. Do indukcije povišene razine $O_2^{\cdot-}$ u bukalnim stanicama došlo je nakon 10-minutne inkubacije stanica s $30 mM$ otopinom H_2O_2 . Razvijenu je metodu moguće primijeniti za praćenje razine $O_2^{\cdot-}$, a time i OS-a, u stanicama.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 13 grafičkih prikaza, 6 tablica i 34 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Oksidacijski stres, superoksidni radikal, reaktivne kisikove vrste, fluorescentni mikroskop, DHE

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

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

Dr. sc. Petra Turčić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Kristina Radić, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Optimization of Superoxide Radical Measurement by Fluorescence Microscopy

Luka Režan

SUMMARY

The superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) is the primary oxygen radical, predominantly formed during the process of oxidative phosphorylation in mitochondria, and it initiates a cascade of other reactive oxygen species (ROS) production in the cell. An imbalance between ROS production and the biological system's ability to detoxify them and repair the resulting damage leads to oxidative stress (OS), which is associated with the development of many diseases. Due to the assumption that $O_2^{\cdot-}$ could be potentially useful in assessing OS levels and the fact that measuring $O_2^{\cdot-}$ could have diagnostic purposes, the aim of this study was to optimize a method for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells using a fluorescent microscope. The fluorescent probe dihydroethidium (DHE) was used for detecting $O_2^{\cdot-}$, and as experimental model, buccal cells were used. In the first step of the research, the method for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells was optimized in terms of DHE concentration and cell incubation time with DHE. Results indicate that the optimal conditions for measuring $O_2^{\cdot-}$ in cells are 10 minutes incubation of cells at room temperature (25°C) with a DHE solution at a concentration of 20 μ M for the most optimal cytoplasmic staining. Subsequently, the optimized method was applied to measure $O_2^{\cdot-}$ in cells treated with H_2O_2 to induce OS. It was confirmed that H_2O_2 is a successful inducer of OS, meaning that it effectively enhances the production of $O_2^{\cdot-}$ in cells. Elevated levels of $O_2^{\cdot-}$ in buccal cells were induced after 10 minutes incubation of the cells with a 30 mM H_2O_2 solution. The developed method can be applied to monitor $O_2^{\cdot-}$ levels and, consequently, OS in cells.

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

Thesis includes: 35 pages, 13 figures, 6 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Oxidative stress, superoxide radicals, reactive oxygen species, fluorescence microscopy, DHE

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full 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
Petra Turčić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Radić, Ph.D. *Senior Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.