# Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 u prisutnosti toksičnih koncentracija iona bakra

**Ukić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:059817

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Petra Ukić

# Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 u prisutnosti toksičnih koncentracija iona bakra

Diplomski rad

Zagreb, 2015. godine

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Maje Jazvinšćak Jembrek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

**Zahvala**

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Maji Jazvinšćak Jembrek na predloženoj temi te strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Također želim zahvaliti i ostalim djelatnicima Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju te dr. sc. Nadi Oršolić na iskazanoj susretljivosti i pomoći pri pisanju.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

# UČINAK ALKOHOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA NA PREŽIVLJENJE NEURONA P19 U PRISUTNOSTI TOKSIČNIH KONCENTRACIJA IONA BAKRA

Petra Ukić
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Oksidacijski stres je jedan od glavnih uzročnika oštećenja neurona. Suvišak iona bakra putem Fentonove reakcije može uzrokovati nakupljanje toksičnih reaktivnih kisikovih vrsta (RKV), posebice hidroksilnog radikala, te izravno pridonijeti nastanku i progresiji raznih neurodegenerativnih bolesti. Propolis kao smjesa spojeva bogata polifenolima ima veliku sposobnost antioksidacijskog djelovanja. Stoga je cilj istraživanja bio utvrditi učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na staničnu smrt i oksidacijsko oštećenje izazvano toksičnim koncentracijama bakra u kulturi neurona P19. U ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji bakar je smanjio preživljenje neurona P19, dok je toksični učinak alkoholnog ekstrakta propolisa opažen tek pri vrlo visokim koncentracijama. Suprotno očekivanjima, alkoholni ekstrakt propolisa dodatno je smanjio preživljenje neurona P19 istovremeno tretiranih s 1 mM otopinom bakrova sulfata ($CuSO_4$). Neurotoksično djelovanje propolisa uzrokovano je dodatnim stvaranjem RKV-a, kao i pojačanom aktivnošću kaspaza-3/7, te promjenama u ekspresiji gena p53 i c-fos na razini mRNA. Dobiveni rezultati upućuju na prooksidacijsko i proapoptotsko djelovanje alkoholnog ekstrakta propolisa u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog visokim koncentracijama iona bakra. Budući da je dokazana povezanost između suviška bakra i obolijevanja od neurodegenerativnih bolesti, primjena propolisa u ovakvih pacijenata bi mogla imati neželjene posljedice.

(55 stranica, 11 slika, 1 tablica, 112 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
**Ključne riječi:** oksidacijski stres, neurotoksičnost, apoptoza, kaspaze-3/7, p53, c-fos
**Mentor:** dr. sc. Maja Jazvinšćak Jembrek, znan. suradnik
**Komentor:** dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.
**Ocjenjitelji:** dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.
dr. sc. Mirta Tkalec, doc.
dr. sc. Petar Kružić, doc.
Zamjena: dr. sc. Mirjana Kalafatić, red. prof.
**Rad prihvaćen:** 05.02.2015.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

# EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT ON VIABILLITY OF P19 NEURONS IN THE PRESENCE OF TOXIC CONCENTRATIONS OF COPPER IONS

Petra Ukić

Rooseveltov trg 6, Zagreb

Oxidative stress is one of the key factors involved in neuronal injury. Excess of copper ions can lead to the accumulation of toxic reactive oxygen species (ROS), especially hydroxyl radicals, via the Fenton chemistry, directly contributing to the development and progression of various neurodegenerative diseases. Propolis, a complex mixture rich in polyphenols, exerts great antioxidative activity. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of alcoholic extract of propolis on oxidative damage and cell death provoked by toxic levels of copper in the culture of P19 neurons. In a dose-dependent manner, exposure to excess copper for 24 hours reduced survival of P19 neurons, while toxic effects of alcoholic extract of propolis were observed only at very high concentrations. Unexpectedly, alcoholic extract of propolis further decreased survival of P19 neurons exposed to 1 mM copper sulfate ($CuSO_4$). Neurotoxic action of propolis was induced by increased accumulation of ROS and more pronounced caspase-3/7 activity, as well as with changes in the expression of p53 and c-fos mRNA. The obtained results suggest a pro-oxidant and pro-apoptotic potential of alcoholic extract of propolis during neuronal oxidative injury induced by high concentrations of copper ions, and indicate that usage of alcoholic extract of propolis might be contraindicated in patients with copper-related neurodegenerative diseases.

(55 pages, 11 figures, 1 table, 112 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library
**Key words:** oxidative stress, neurotoxicity, apoptosis, caspase-3/7, p53, c-fos
**Mentor:** dr. Maja Jazvinšćak Jembrek, Res. Assoc.
**Co-mentor:** dr. Nada Oršolić, Prof.
**Reviewers:** dr. Nada Oršolić, Prof.
dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.
dr. Petar Kružić, Asst. Prof.
Replacement: dr. Mirjana Kalafatić, Prof.
**Thesis accepted:** 05.02.2015.

## Popis kratica

| | |
|---|---|
| ANOVA | jednostruka analiza varijance |
| AraC | citozin arabino(furan)ozid |
| CAPE | fenetil ester kafeinske kiseline (fenetil kafeat), engl. *caffeic acid phenethyl ester* |
| EDTA | etilendiamintetraoctena kiselina |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | dimetil-sulfoksid |
| FBS | fetalni goveđi serum |
| GSH | glutation; reducirani oblik |
| K | kontrola, kontrolna skupina stanica |
| MTT | 3-(4,5-dimethiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid |
| RJF | relativna jedinica fluorescencije |
| RKV | reaktivne kisikove vrste |
| (RT)-PCR | (reverzna transkripcija)- lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction* |
| SŽS | središnji živčani sustav |

**Sadržaj**

1. UVOD ..... 1

1.1. Tranzicijski metal bakar u biološkom sustavu ..... 1

1.2. Metabolizam bakra ..... 1

1.3. Uloga bakra u oksidacijskom stresu ..... 2

1.4. Uloga bakra u neurodegenerativnim bolestima ..... 3

1.5. Stanična smrt neurona uzrokovana bakrom ..... 4

2. Propolis i njegovo djelovanje na biološki sustav ..... 5

2.1. Kemijski sastav propolisa ..... 6

2.2. Medicinska svojstva propolisa ..... 7

3. Kultura stanica P19 i diferencijacija u neurone ..... 10

3.1. Mehanizam indukcije diferencijacije retinoičnom kiselinom ..... 11

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ..... 12

3. MATERIJALI I METODE ..... 13

3.1. MATERIJAL ..... 13

3.2. METODE ..... 15

3.2.1. Diferencija stanica P19 u neurone ..... 15

3.2.2. Obrada diferenciranih neurona P19 s bakrovim sulfatom i alkoholnim ekstraktom propolisa ..... 16

3.2.3. Određivanje preživljenja neurona P19 primjenom testa MTT ..... 17

3.2.4. Određivanje preživljenja neurona P19 bojanjem tripanskim modrilom ..... 17

3.2.5. Unutarstanično stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta ..... 18

3.2.6. Određivanje aktivnosti kaspaza ..... 18

3.2.7. Izolacija RNA ..... 19

3.2.8. Reverzna transkripcija ..... 19

3.2.9. Semikvantitativna metoda PCR za određivanje ekspresije *p53* i *c-fos* ..... 20

3.2.10. Analiza rezultata ..... 21

4. REZULTATI ..... 22

4.1. Diferencijacija neurona P19 ..... 22

4.2. Učinak bakra i propolisa *per se* na preživljenje neurona P19 ..... 22

4.3. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 tretiranih s 1 mM otopinom bakrova (II) sulfata ..... 24

4.4. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta ..... 26

4.5. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na aktivnost kaspaza-3/7 u prisutnosti iona bakra ..... 27

4.6. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na ekspresiju gena uključenih u unutarstaničnu signalizaciju pri indukciji apoptoze ..... 28

5. RASPRAVA ..... 32

6. ZAKLJUČAK ..... 43

7. POPIS LITERATURE ..... 44

# 1. UVOD

## 1.1. Tranzicijski metal bakar u biološkim sustavima

Danas se sve više istražuje uloga okolišnih čimbenika u nastanku i progresiji neurodegenerativnih bolesti. Brojni znanstveni radovi pokazuju povezanost između porasta spomenutih poremećaja s povećanim koncentracijama bakra koji je danas uvelike prisutan u okolišu te zapravo možemo govoriti o sveprisutnom zagađenju tim prijelaznim metalom. Bakar se upotrebljava u širokoj lepezi različitih industrija, brojnim agrikulturnim tretmanima te se koristi u izradi mnogih medicinskih pomagala kao i kućnih potrepština. Iz svih gore navedenih razloga te povezanosti suviška bakra i obolijevanja od raznih neurodegenerativnih bolesti, zagađenje bakrom smatra se potencijalnom biološkom prijetnjom (Wang i sur., 2013).

Bakar je kao kofaktor sastavni dio unutarstaničnih i izvanstaničnih proteina i enzima koji su uključeni u brojne biokemijske i fiziološke mehanizme kao što su proizvodnja energije, prijenos kisika, hematopoeza, stanični metabolizam te prijenos signala (Squitti i sur., 2013; Stern i sur., 2007). Dakle, esencijalan je za pravilno funkcioniranje živućih stanica. Koncentraciju slobodnog bakra potrebno je održavati u vrlo uskim granicama te je stoga unutarstanični i izvanstanični metabolizam bakra homeostatski strogo kontroliran proces. Naglasimo da je bakar esencijalan element za većinu neuroloških funkcija te je zapravo središnji živčani sustav (SŽS) vrlo često mjesto poremećaja u metabolizmu bakra. Prekomjerno nakupljanje bakra kao i deficit istog su povezani s promijenjenom funkcijom i bolestima živčanog sustava. Zahvaljujući sposobnosti da katalizira redoks reakcije u biološkim sustavima, bakreni ioni mogu generirati štetne reaktivne kisikove vrste odnosno RKV molekule (engl. *reactive oxygen species*). Na taj način dolazi do oštećenja strukture i funkcije brojnih bioloških makromolekula te stanice dovodi u stanje oksidacijskog stresa.

## 1.2. Metabolizam bakra

Većina bakra u ljudskom tijelu prisutna je u reduciranom obliku $Cu^{+}$ i oksidiranom obliku $Cu^{2+}$ pa stoga služi kao intermedijer prilikom prijenosa elektrona u redoks reakcijama. Prosječni dnevni unos bakra je između 0,5 i 1,5 mg; najviše iz sjemenki, žitarica, kamenica, orašastog voća, graha i jetre (Tapiero i sur., 2003). Većim dijelom se apsorbira u proksimalnom dijelu tankog crijeva, manjim dijelom u želucu i distalnom dijelu jejunuma. U epitelnim stanicama tankog crijeva (enterocitima) smješten je prijenosni protein bakra (hCTR1) koji reducira hranom uneseni bakar $Cu^{2+}$ u $Cu^{+}$ (Hordyjewska i sur., 2014). U

hepatocitima bakar se veže za metalotionein (MT), reducirani glutation (GSH) ili na jedan od bakrovih šaperona kao što su šaperon za superoksid dismutazu 1 CCS (engl. *chaperone for superoxide dismutase 1 SOD1*), šaperon za citokrom C oksigenazu COX17 (engl. *chaperone for cytochrome C oxygenase*), te antioksidant 1 ATOX1 (engl. *antioxidant 1: chaperone for the ATPases, ATP7A i ATP7B*) koji reguliraju unutarstanični prijenos bakra. ATOX1 je šaperon bakra koji je većim dijelom eksprimiran u koroidnom spletu, kori velikog mozga, hipokampusu i njušnim lukovicama. On dostavlja citosolni bakar za ATP7A i ATP7B, grupu vrlo važnih transmembranskih prijenosnika bakra (Manto, 2014). Govoreći o skladištenju bakra, možemo reći da je uskladištena količina bakra od 90-100 mg, s najvećom koncentracijom u jetri, mozgu, bubrezima i srcu. U mozgu, raspodjela bakra je heterogena. Više koncentracije bakra prisutne su u hipokampusu, crnoj tvari (lat. *substantia nigra*) i jezgri (lat. *locus coeruleus*). Glija stanice su više obogaćene bakrom od neurona (Manto, 2014). U kontekstu metabolizma bakra u jetri spomenimo njegovu ugradnju u ceruloplazmin, enzim najvećim dijelom sintetiziran u jetri. U krvnom optoku, 65-90% bakra u obliku $Cu^{2+}$ je vezano za ceruloplazmin. Funkcionalni ceruloplazmin je jako bitan u sintezi proteina koji su zaduženi za metabolizam željeza, drugog vrlo važnog iona u pravilnom funkcioniranju živčanog sustava. Može se reći da je veza između metabolizma bakra i željeza upravo ceruloplazmin. Ceruloplazmin igra ulogu kao oksidant željeza, oksidant amina, antioksidant i kao glutation peroksidaza, a također odstranjuje reaktivne kisikove vrste. Zaključno, naglasimo da ceruloplazmin u glija stanicama kontrolira proces oksidacije željeza te samo uklanjanje/čišćenje željeza iz središnjeg živčanog sustava (Manto, 2014).

### 1.3. Uloga bakra u oksidacijskom stresu

Visoke koncentracije bakra putem svog prooksidacijskog djelovanja mogu uzrokovati oksidativnu štetu na lipidima, proteinima te na samoj DNA molekuli, i na taj način pridonijeti razvoju neurodegenerativnih poremećaja. S druge strane, bakar je esencijalan element antioksidacijske obrane organizma, jer sudjeluje u izgradnji brojnih regulatornih enzima te manjak bakra smanjuje mogućnost obrane organizma od oksidacijskog stresa. Brojni nutrijenti mogu interferirati s bakrom i djelovati na njegovu toksičnost. Vitamin E, askorbinska kiselina i cink kao i selen, alfa-lipoična kiselina i polifenoli štite organizam od prooksidativnih učinaka bakra (Gaetke i Chow, 2003).

Nekoliko mehanizama vezano je uz stanični stres izazvan bakrom. Najčešće se naglašava sklonost slobodnih iona bakra da sudjeluju u formiranju RKV molekula. Bakar u

ioniziranoj formi $Cu^{2+}$ i $Cu^{+}$ može sudjelovati u reakcijama oksidacije i redukcije. U prisutnosti superoksidnog aniona ($*O_{2-}$ ) ili redukcijskih komponenti kao što je askorbinska kiselina ili reducirani glutation (GSH), $Cu^{2+}$ može biti reduciran u $Cu^{+}$. $Cu^{+}$ putem Haber-Weissove reakcije katalizira nastanak hidroksilnog radikala ($OH^{\bullet}$) iz vodikovog peroksida ($H_2O_2$) (Bremner, 1998; Kadiiska i sur., 1993).

$$*O_{2-} + Cu^{2+} \rightarrow O_2 + Cu^{+}$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH^{\bullet}$$

Jedan od najučestalijih načina *in vitro* inicijacije oksidacije lipoproteina niske gustoće (LNG) uključuje inkubaciju s ionima $Cu^{2+}$ (Steinberg, 1997). Potrebna su daljnja istraživanja da se potvrdi inicijacija oksidacije LNG-e *in vivo*, ali se po dosadašnjim dokazima smatra da se pri nedostatku specifičnih helatora, bakar iz forme $Cu^{2+}$ reducira u $Cu^{+}$ vežući se za histidinske ostatke na apolipoproteinu B-100 na LNG-e. Naglasimo da nisu samo slobodni ioni bakra odgovorni za oksidaciju LNG-e. Ceruloplazmin, koji sadrži sedam atoma bakra po molekuli, također može poslužiti kao izvor slobodnog bakra te biti uključen u oksidaciju LNG-e.

### 1.4. Uloga bakra u neurodegenerativnim bolestima

Unatoč prisutnosti molekula čija je uloga zaštita moždanih krugova od oksidativne štete kao što su metalotionein i različiti šaperoni, dokazano je da redoks potencijal slobodnog bakra, njegova mogućnost okidača u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta te uska povezanost s regulacijom željeza i cinka imaju bitnu ulogu u nastanku i progresiji neurodegenerativnih bolesti. Suvišak slobodnog bakra je direktno uključen u neurodegeneraciju. Parkinsonova i Alzheimerova bolest su najčešće spominjane neurodegenerativne bolesti povezane s narušenom homeostazom bakra (Manto, 2014). Glavna histopatološka obilježja Alzheimerove bolesti, najučestalijeg oblika demencije širom svijeta, senilni su plakovi i neurofibrilarni snopići. Kod Alzheimerove bolesti dolazi do pojačanog procesiranja amiloidnog prekursor proteina (APP-a) putem β i γ sekretaze. Pretpostavlja se da bi narušena homeostaza bakra mogla potaknuti inicijaciju nastanka ove bolesti, te pogodovati njenoj progresiji. Prilikom početne faze razvitka bolesti protein prekursor amiloida sadrži vezno mjesto za bakar. Vezanje $Cu^{2+}$ za prekursor proteina amiloida *in vitro* rezultira oksidacijom dvije cisteinske molekule u cistin i nastankom dva elektrona. Kako je samo jedan elektron potreban za

redukciju $Cu^{2+}$, preostali elektron se smatra uključenim u produkciju hidroksil radikala (Gaetke i Chow, 2003). Nadalje, narušena homeostaza bakra vodi ka oksidacijskom stresu u mozgu, promovirajući daljni nastanak slobodnih radikala. Dok se $Cu^{2+}$ može vezati na dušikove ili kisikove donore, kao što je glutamat, $Cu^{+}$ preferira vezanje za slobodne tiolne grupe cisteina/metionina. Ovo uzrokuje križno povezivanje proteina (Squitti i sur., 2003).

Koncentracije slobodnog bakra u cerebrospinalnoj tekućini su povišene i u bolesnika s Parkinsonovom bolesti te su predložene kao biokemijski biljeg za ovu bolest. Istraživanja su pokazala da dugoročna izloženost visokim koncentracijama bakra i mangana povećava rizik od Parkinsonove bolesti (Gorell i sur., 1999). Aktivnost feroksidaze (koja je vezana za ceruloplazmin) je smanjena u bolesnika s Parkinsonovom bolešću. Bakrovi ioni pospješuju oksidaciju dopamina, dovode do oštećenja DNA te u crnoj tvari promoviraju apoptozu dopaminergičnih neurona (Yu i sur., 2008).

### 1.5. Stanična smrt neurona uzrokovana bakrom

Poznato je da prilikom progresije neurodegenerativnih bolesti dolazi i do odumiranja neurona u različitim dijelovima mozga što posljedično daje sve izraženije karakteristike prisutnog neurodegenerativnog oboljenja. Do stanične smrti dolazi u kasnijoj fazi bolesti kojoj prethode funkcionalne promjene neurona. Apoptoza je genetički programiran put stanične smrti koji obično uključuje aktivaciju kaspaza i morfološke promjene stanice (Steckley, 2007). Apoptoza se može aktivirati preko vanjskog puta receptorima smrti ili unutarnjeg/mitohondrijskog puta preko otpuštanja citokroma *c* u citosol (Bredesen i sur., 2006), do čega dolazi zbog gubitka elektrokemijskog gradijenta membrane mitohondrija. Mitohondrijski put uključuje članove proteinske porodice *Bcl-2* i uglavnom je aktiviran podražajima neovisnim o „vanjskoj“ aktivaciji putem apoptotskih receptora, npr. oštećenjem DNA (Hengartner, 2000). U kontekstu programirane stanične smrti, naglasimo da stanični i molekularni odgovori započeti ionima bakra, nisu u potpunosti razjašnjeni. Generalno se za metalima induciranu apoptozu smatra da je aktivirana mitohondrijskim putem, zbog povećane produkcije molekula RKV i posljedične aktivacije kaspaza (Chen i sur., 2009). Ovisno o koncentraciji bakra i tipu stanične linije na koju djeluje, dolazi do apoptoze ovisne o aktivnosti kaspaza ili do apoptoze neovisne o kaspazama (Paris i sur., 2009). U kontekstu bakrom induciranog apoptotskog puta neovisnog o kaspazama, Arnal i sur. (2012) su dokazali da bakar izaziva staničnu smrt i aktivacijom kalpaina, kalcij ovisnim cisteinskim proteazama koje mogu i pojačati i blokirati aktivaciju kaspaza. Pretpostavili su da do jačanja ovog procesa

dolazi tijekom stanja oksidacijskog stresa, pošto se zna da su supstrati za kaspaze i za kalpaine jako slični.

Tumor supresorski gen je transkripcijski faktor *p53* sa sposobnošću vezanja metala te je njegova funkcija i konformacija promijenjena prilikom razvoja karcinoma (Hainaut i sur., 1995). Protein p53 veže bakar *in vitro* u formi $Cu^{+}$ (Hainaut i sur., 1995) te su unutarstanične koncentracije i Cu(II)/Cu(I) redoks kapacitet bakra kritični u kontroli konformacije i kapacitetu vezanja DNA za *p53* (Verhaegh i sur., 1997). Zaključno, bakrovi ioni vrlo vjerojatno sudjeluju u fiziološkoj kontroli funkcije gena *p53* (Verhaegh i sur., 1997).
Ostrakovitch i Cherian (2005) su pokazali da je dodatak bakra u koncentracijama od 10 i 25 μM uzrokovao aktivaciju gena *p53* u ljudskim epitelnim stanicama karcinoma dojke (MCF7 liniji stanica), što je rezultiralo aktivacijom *p21*. Predložili su da bakar inducira staničnu smrt mitohondrijskim putem, bez aktivnosti kaspaza, depolarizacijom mitohondrijske membrane i oslobađanjem apoptotskog-inducirajućeg faktora AIF (engl. *apoptosis-inducing factor*) te njegovom translokacijom u jezgru.

U kontekstu bakrovog induciranja oksidacijskog stresa, spomenimo jedan od tri najpoznatija biljega, c-fos. Xu i sur. (2004) su istražujući kroničnu hipoksiju, koja se javlja u opstruktivnoj apneji za vrijeme spavanja, otkrili da staničnoj smrti neurona prethodi stanje pojačanog oksidacijskog stresa koje se očituje u oksidacijskom oštećenju proteina, lipida te nukleinskih kiselina. Imunohistokemijskim metodama su otkrili povećanu ekspresiju biljega oksidacijskog stresa: gena *c-fos*, *c-jun* te *NF-κB*. Jazvinšćak i sur. (2014) su također pratili povećanu ekspresiju gena *c-fos* nakon dodavanja različitih koncentracija iona bakra.

## 2. Propolis i njegovo djelovanje u biološkim sustavima

Propolis je jedan od nekoliko proizvoda iz prirode koji je tijekom dugogodišnje primjene zadržao svoju popularnost. Zbog svojih važnih farmakoloških obilježja koristi se u liječenju i/ili prevenciji brojnih bolesti (Lofty, 2006). Najranije dokaze njegove upotrebe nalazimo već tisuću godina prije Krista, u antičkom Egiptu. Poznato je da su ga u Egiptu svećenici koristili u medicini, kemiji te prilikom procesa mumifikacije. Također znamo da je bio poznat i starim Grcima, na što upućuje njegovo ime – propolis (lat. *pro* – prije, ispred te *polis* – grad) zbog pčelinje upotrebe propolisa za izgradnju i regulaciju ulaza u košnicu (Lofty, 2006).

Propolis je generičko ime za smolastu tvar koju pčele (*Apis mellifera, L.*) sakupljaju s različitih dijelova biljaka, osobito pupoljaka i kore crnogoričnih biljaka te koriste u izgradnji košnice i njenoj zaštiti protiv vanjskih utjecaja. Pčele skupljaju smolu, žvaču i uz pomoć enzima pljuvčanih žlijezda djelomice probavljen materijal se miješa s pčelinjim voskom i koristi u košnici (Greenaway i sur., 1990; Sobočanec, 2006a).

## 2.1. Kemijski sastav propolisa

Kemijski sastav, boja i aroma propolisa variraju ovisno o geografskoj zoni, vremenu kada se sakupljao i biljci s koje je došao. Boja mu varira od tamno zelene do smeđe boje, a okus od slatkastog okusa meda do gorkog okusa (Ghisalberti, 1979). Kemijski sastav mu je vrlo kompleksan i varira, kao što je gore navedeno. Općenito govoreći, propolis sadrži 50% balzama i smola, 30% pčelinjeg voska, 5% polena, 10% eteričnih ulja i 5% ostalih organskih komponenata. Eterična ulja i organske komponente propolisa sadrže fenole male molekularne mase za koje se smatra da imaju biološki aktivna svojstva, a to su flavonoidi, fenolne kiseline i esteri, aromatski aldehidi i terpenoidi (Sobočanec, 2006a). Kapilarna zonska elektroforeza (KZE) se pokazala kao najkorisniji alat u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi polifenolnih sastavnica propolisa. Tako je, upravo KZE-om u jednom istraživanju utvrđeno da propolis sadrži dvanaest različitih flavonoida i to pinocembrin, acacetin, krizin, rutin, katehin, naringenin, galangin, luteolin, kampferol, apigenin, miricetin i kvercetin; dvije fenolske kiseline kafeinsku kiselinu i cimetnu kiselinu te stilbenski derivat resveratrol (Sobočanec, 2006a).

U komercijalnim medicinskim pripravcima se upotrebljavaju različite otopine propolisa, alkoholna/etanolna otopina, vodeno-alkoholna otopina i vodeno-glikolna otopina. Vodeno-etanolna otopina propolisa u velikom postotku sadrži kavenu kiselinu, galangin, kvercetin i krizin, dok je etanolna otopina većim dijelom sastavljena od resveratrola, krizina i kavene kiseline (Volpi, 2004). U sastavu propolisa mogu se naći i brojni minerali kao što je magnezij (Mg), kalcij (Ca), jod (I), kalij (K), natrij (Na), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn) i željezo (Fe) i neki vitamini kao što su B1, B2, B6, C i E te brojne masne kiseline. Također sadrži i neke enzime kao što je sukcinska dehidrogenaza, glukoza-6-fosfataza, adenozin trifosfataza i fosfatna kiselina (Tikhonov i Mamontova, 1987).

## 2.2. Medicinska svojstva propolisa

Zbog flavonoida koji posjeduju jaka antioksidacijska svojstva, propolisu se pripisuje mnogo različitih uloga u obrani i prevenciji organizma od bolesti. Ova smjesa spojeva posjeduje: antibakterijske, antivirusne, antigljivične, antiparazitske, antiprotozoa, antiupalne, antitumorske, antioksidativne, antiproliferativne, antimutagene, antiangiogene, antialergijske, imunomodulatorne, kemopreventivne učinke te učinke protiv čireva probavnog sustava (Oršolić i Bašić, 2007).
Pobliže objašnjeni učinci:

Antibakterijska aktivnost

Akopyan i sur. (1970) pokazali su ulogu propolisa u kontekstu njegovog antibakterijskog djelovanja protiv Gram pozitivnih bakterija, dok mu je aktivnost protiv Gram negativnih bakterija ograničena. Stainberg i sur. (1996) dokazali su antibakterijska svojstva propolisa protiv oralne infekcije bakterijom roda Streptococcus. Propolis je pokazao učinkovitost primijenjen *in vitro* na izoliranim bakterijama iz sline te također i u *in vivo* kliničkom istraživanju na dobrovoljcima. Kedzia (1986) je dokazao da je etanolni ekstrakt propolisa bio učinkovit protiv anaerobnih bakterija rodova Bacterioides i Peptostreptococcusa.

Antivirusna aktivnost

Amoros i sur. (1994) istraživali su antivirusno svojstvo propolisa djelujući na stanice zaražene virusom *Herpes simplex* tipa I. Sastavnica propolisa kojom su radili pokus, 3-metilbut-2-enil kafeat, smanjila je titar virusa i sintezu virusne DNA. Serkedjieva (1997) je pokazala da *in vitro* izopentil (ekstrahiran iz propolisa) značajno inhibira virus gripe tip A1 Honey Kong (H3N2).

Antigljivična aktivnost

Ota i sur. (2001) pokazali su antigljivična svojstva propolisa na 80 uzoraka kvasaca zaraženih različitim sojevima gljivice roda Candida. Antigljivična učinkovitost išla je ovim redoslijedom: *C.albicans> C.tropicalis> C.krusei> C. guilliermondii*.

Antiupalna aktivnost

Park i Kahng (1999) su pokazali protuupalne učinke propolisa koristeći alkoholnu otopinu propolisa kod štakora oboljelih od artritisa. Propolis je imao antiupalno djelovanje i pri akutnim i pri kroničnim upalama. Marquez i sur. (2004) su istraživali antiupalna svojstva CAPE-a, prethodno ekstrahiranog iz propolisa, na razinu aktivacije T-stanica, budući da se zna da je aktivacija T-stanica ključna prilikom razvoja upalnog procesa. Ova polifenolna komponenta propolisa je uspješno zaustavila aktivaciju T-stanica u ranoj i kasnoj fazi upale. Otkrili su da je i uspješno inhibirala transkripciju gena interleukina IL-2 kao i sintezu IL-2 u stimuliranim T-stanicama. Antiupalna svojstva CAPE-a su također potvrdili i na molekularnoj razini, gdje su mjerili kapacitet vezanja DNA i i transkripcijsku aktivnost nuklearnog faktora *(NF)-κB*, nuklearnog faktora aktiviranih stanica (NFAT), i aktivirajućeg proteina-1 (AP-1), transkripcijskog faktora u Jurkatovim stanicama. CAPE je inhibirao transkripcijsku aktivnost ovisnu o *NF-κB* bez učinka na degradaciju citoplazmatskog NF-κB inhibicijskog proteina, IBκB. Korish i Arafa (2011) su također istraživali protuupalni učinak CAPE-a na neuronima oštećenim lipopolisaharidom (LPS) te na posljedično javljanje sindroma sistemskog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome* - SIRS). Primjenom CAPE-a uvidjeli su smanjenje pro-upalnih citokina i povećanje anti-upalnih citokina, pa su zaključili da upravo promjenom u ravnoteži između pro- i anti-upalnih citokina CAPE djeluje na smanjenje sistemskog upalnog odgovora. Ovaj biokemijski dokaz smanjenja SIRS-a i zaštite od oštećenja LPS-om potvrdili su i na histopatološkoj razini uvidjevši očuvanu strukturu živčanih stanica. Ha i sur. (2008) su pokazali antiupalno djelovanje fenetilnog estera kafeinske kiseline u kulturi prekursora osteoklasta. CAPE je uspješno smanjio osteoklastogenezu, blokirao indukciju gena nuklearnog faktora aktiviranih T stanica, citoplazmatskog 1 (NFATc1) i gena *c-fos* (ranog gena pri oksidacijskom stresu i induciranju apoptoze). Lu i sur. (2008) pokazali su zaštitno djelovanje kvercetina, također komponente propolisa, na aktivnost unutarstanične adhezijske molekule-1 (ICAM-1) (važne proupalne molekule, pogotovo u ranom stadiju upalnog procesa). Shimazawa i sur. (2005) pokazali su povoljne učinke brazilskog zelenog propolisa protiv ishemije u mozgu na neuronima PC12.

Antitumorska aktivnost

Kimoto i sur. (1998) su ekstrahirali artepilin C (3,4-diprenil-4-hidroksi-cimetna kiselina) iz brazilskog propolisa. Dokazali su antitumorsko djelovanje *in vitro* i *in vivo* na tumorskim humanim i mišjim stanicama. Prvo su mišu transplatirane ljudske tumorske stanice *in vivo* te

se artepilin ubrizgavao tri puta tjedno. Posljedice su apoptoza, prekinuta mitoza te nekroza tumorskih stanica. Također je utvrđen i porast ukupnog broja pomagačkih T limfocita. Ovo istraživanje je potvrdilo da artepilin C aktivira imunološki sustav i posjeduje direktnu antitumorsku aktivnost. Oršolić i Bašić (2007) su objasnili ulogu propolisa i njegovih polifenolnih/flavonoidnih sastavnica na animalnim modelima. Njihova kemopreventivna uloga je u tom slučaju rezultat njihove mogućnosti da inhibiraju DNA sintezu u tumorskim stanicama, njihovom kapacitetu da induciraju apoptozu u tumorskim stanicama te njihovoj sposobnosti da aktiviraju makrofage u proizvodnji faktora za regulaciju B i T limfocita te NK stanica i na taj način direktno sudjeluju u odumiranju stanica tumora.

Neuroprotektivno djelovanje propolisa

Inokuchi i sur. (2006) pokazali su neuroprotektivno djelovanje brazilskog zelenog propolisa na neuronima retine (RGC-5 linija stanica, ganglijske stanice štakora transformirane virusom E1A), tretiranim vodikovim peroksidom tijekom 24 sata. Propolis je uspješno inhibirao neurotoksičan učinak $H_2O_2$ te zaustavio apoptozu. Noelker i sur. (2005) su pokazali neuroprotektivno djelovanje CAPE-a na neuronima oštećenim 6-hidroksidopaminom (6-OHDA) koji uzrokuje staničnu smrt neurona ili preko cijepanja mitohondrijskog ciklusa oksidativne fosforilacije što rezultira značajnim manjkom energije ili je uključen u proizvodnju hidrogen peroksida, hidroksil i superoksid radikala. Ovisno o koncentraciji, u kulturi granularnih neurona malog mozga CAPE je uspješno blokirao staničnu smrt neurona uzrokovanu 6-OHDA-om, smanjio je kalcijem inducirano oslobađanje citokroma *c* iz mitohondrija, te blokirao aktivnost kaspaza-3. Budući da je oštećenje mitohondrija glavni uzrok degeneracije neurona crne tvari u Parkinsonovoj bolesti, predložili su da derivati propolisa, posebice CAPE imaju neuroprotektivan učinak te mogu postati mogući kandidat u *in vivo* istraživanjima spomenute bolesti. Wei i sur. (2004) su istraživali utjecaj CAPE-a na neonatalne neurone oštećene ishemijom i hipoksijom. Ova aktivna komponenta propolisa djelovala je neuroprotektivno te spriječila neonatalnu štetu neurona korteksa, hipokampusa i talamusa. Dodatno, blokirala je hipoksijom aktiviranu kaspazu-3, ekspresiju dušik oksid sintetaze te izlazak citokroma *c* iz mitohondrija u neuronima. Zaključili su da CAPE djeluje neuroprotektivno na način da smanjuje upalu i/ili direktno blokira hipoksijom uzrokovanu staničnu smrt neurona.

## 3. Kultura stanica P19 i diferencijacija u neurone

Stanice P19 su linija pluripotentnih stanica embrionalnog karcinoma koje imaju sposobnost kontinuirano rasti u mediju s odgovarajućom koncentracijom seruma i dodacima za staničnu kulturu. Diferencijacija ovih stanica može biti potaknuta primjenom određenih induktora u netoksičnoj koncentraciji. Retinoična kiselina uspješno inducira razvitak neurona, astroglije, mikroglije i fibroblasta– stanica koje normalno nastaju iz zametnog listića ektoderma, dok uz dodatak dimetil sulfoksida diferenciraju u endodermalne i mezodermalne derivate uključujući i srčani mišić. Prednost stanica P19 jest to što su lake za uzgoj u kulturi, relativno jednostavno se mogu genetički manipulirati te se njihova diferencijacija može kontrolirano provesti upotrebom različitih induktora diferencijacije kao što su retinoična kiselina i dimetil sulfoksid. P19 stanice imaju euploidni muški kariotip, a njihov kromosomski sastav je iznimno stabilan ako se održavaju u fazi eksponencijalnog rasta (Mcburney i Rogers, 1982).

Kada se za indukciju upotrebljava koncentracija retinoične kiseline viša od $5x10^{-8}$ M, najevidentniji jest nastanak neurona (Jones-Villeneuve i sur., 1982). Kad su uzgajane u suspenziji, embrionalne stanice P19 spontano diferenciraju i formiraju kuglaste stanične nakupine zvane embrionalna tjelešca. Taj stadij je sličan stadiju blastule u ranom razvoju i nužan je za daljnju diferencijaciju, do koje dolazi nakon nasađivanja u adherentne posudice za stanične kulture (Ulrich i Majumder 2006.). Nakon obrade retinoičnom kiselinom od dva dana, agregati P19 stanica počinju gubiti antigen EC (engl. *embrional carcinoma*) te se njihov volumen počinje smanjivati za 25%. Prilikom rasta neurona i formiranja embrionalnih tjelešaca bitan je kontakt između stanica, on ne smije biti sputavan dodatkom drugih reagensa kao što je kalcij ili trešnjom petrijevke te je također bitno da stanice rastu u bakterijskim petrijevkama koje imaju neobrađeno poliestersko dno. Stanice se ne pričvršćuju na takve stanične podloge i spontano se nakupljaju u embrionalna tjelešca (Schmidt i sur., 1992).

Šestog dana nakon indukcije retinoične kiseline 85% neurona eksprimira tipične neuronske biljege kao što je vezno mjesto za toksin tetanusa, prisutnost proteina neurofilamenta od 68 i 160 kD i antigena HNK1 (engl. *human natural killer-1*) te se koordinirano pojavljuje aktivnost acetilkolin-transferaze i acetilkolin-esteraze (Mcburney, 1993). Proporcija neurona nakon šestog dana opada jer neuroni ulaze u postmitotičku fazu te ostale ne-neuronske stanice kao što su astrociti, glija stanice, fibroblasti nastavljaju proliferirati što se sprječava dodatkom antimitotika, poput citozin-arabinozida. U kontekstu neurotransmitera nađenih u neuronima, napomenimo da je detaljnom analizom potvrđeno da

60% neurona iz kulture sadrži neurotransmiter gama-amino maslačna kiselina (GABA), 20% somatostatin, 20% neuropeptid Y, 1% tirozin hidroksilazu, te neke druge neurotransmitere u manjem udjelu (Ulrich i Majumder 2006.).

### 3.1. Mehanizam indukcije diferencijacije retinoičnom kiselinom

Budući da se prvi biljezi diferenciranih neurona pojavljuju tek nakon 3 dana obrade sa retinoičnom kiselinom (RA), možemo zaključiti da RA aktivira kaskadu reakcija koja rezultira staničnom diferencijacijom. Inicijalno mjesto aktivacije retinoičnom kiselinom jest grupa receptora retinoične kiseline (RARs) za koje se zna da su ligand ovisni transkripcijski faktori (Evans, 1988). P19 stanice eksprimiraju i RARα i RARγ gene. Potrebna su detaljnija istraživanja za utvrđivanje RA odgovornih gena koji igraju ulogu u inicijaciji diferencijacije (Yu i sur., 2012).

# 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja istraživanja upućuju da je upravo suvišak koncentracije metala bakra jedan od čimbenika u korelaciji između jačine oksidacijskog stresa u živčanom sustavu i pojave neurodegenerativnih bolesti. Unatoč djelatnosti šaperona i metalotioneina, nastanak slobodnih radikala zbog suviška bakra vodi do velikog oštećenja neuronskih krugova, počevši od oštećenja same molekule DNA, zatim oksidacije proteina, lipidne peroksidacije te posljedično snižavanja mitohondrijske aktivnosti što sve skupa vodi do kompromitiranja zdravlja stanice (u ovom kontekstu neurona) i vijabilnosti iste (Gaetke i Chow, 2003). S druge strane, istraživanja „prirodnih" spojeva u zaštiti i prevenciji od oksidacijskog stresa su također u porastu. Istraživanja propolisa, koji se zbog svojih sastavnica, te naglašeno velikog udjela flavonoida smatra jednim od najjačih prirodnih antioksidansa, su pokazala jako dobre rezultate u čitavom spektru protektivnih učinaka po stanicu (Oršolić i Bašić, 2007).

Budući da je mozak zbog velikih potreba za energijom, a time i velike mitohondrijske aktivnosti te potrošnje kisika jako osjetljiv na oksidativni stres, cilj ovog rada je istražiti učinak propolisa na neurone P19 oštećene visokim koncentracijama iona bakra. Pretraživanjem dostupne literature nismo pronašli niti jedan rad u kojem je analizirano djelovanje propolisa u prisutnosti toksičnih koncentracija iona bakra. Učinak bakra ćemo ispitati u kulturi neurona P19, dobivenoj indukcijom diferencijacije stanica embrionalnog karcinoma miša retinoičnom kiselinom. Neuroni dobiveni tom metodom svim svojim morfološkim i biokemijskim karakteristikama odgovaraju neuronima *in vivo* (Mcburney i sur., 1988). Testom MTT i metodom bojenja tripanskim modrilom testirati ćemo učinak otopine bakrova sulfata pri različitim koncentracijama na preživljanje neurona P19. Potom ćemo utvrditi učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona neurona, te istražiti stupanj oksidacijskog oštećenja na neuronima P19 prethodno oštećenim ionima bakra. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa u prisutnosti iona bakra na apoptozu odredit ćemo mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7 te ćemo semikvantitativnom metodom RT-PCR istražiti utječe li propolis na ekspresiju mRNA proapoptotskog gena p53 i gena c-fos. Pokušati ćemo odgovoriti na pitanje da li alkoholni ekstrakt propolisa, zbog visokog udjela flavonoida, djeluje protektivno na oksidacijsku štetu izazvanu ionima bakra, te ćemo barem djelomično pokušati objasniti mehanizam njegova djelovanja.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. MATERIJAL

Kultura stanica embrionalnog karcinoma miša P19

- dobivene ljubaznošću dr. J. Pachernika (Prag, Češka)

Kemikalije

Sigma (SAD): agaroza, citozin arabinofuranozid (AraC), 2',7'-diklorofluorescin diacetat, etidij-bromid, fetalni goveđi serum (FBS), L-glutamin, medij za uzgoj stanica (DMEM), MTT (3-(4,5-dimethiltiazol-2-il)-2,5difenil tetrazolium bromid), penicilin-streptomicin, retinoična kiselina, tripansko modrilo, tripsin

Fluka (Švicarska): etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)

Kemika (Zagreb): DMSO (dimetil-sulfoksid), $H_2O_2$ (vodikov peroksid)

Gibco (USA): ITS-X dodatak za staničnu kulturu (sadrži etanolamin, inzulin, transferin i natrij-selenit)

Mediji za uzgoj stanica:

- DMEM s 10% fetalnim goveđim serumom i 2 mM L-glutaminom (za održavanje nediferenciranih stanica u kulturi)
- DMEM s 5% fetalnim goveđim serumom i 2 mM L-glutaminom (za indukciju diferencijacije)
- DMEM bez dodatka seruma, obogaćen dodacima (za rast neurona):
  - 10 mg/L inzulin – potiče unos glukoze i aminokiselina, lipogenezu prijenos jednovalentnih kationa i fosfata te sintezu proteina i nukleinskih kiselina
  - 5,5 mg/L transferin – protein potreban za prijenos željeza, a može pomoći u reduciranju toksičnih razina kisikovih radikala
  - 6,7 ng/L natrij-selenit – esencijalni element u tragovima koji je inače prisutan u serumu, kofaktor glutation-peroksidaze i drugih proteina
  - 2 mg/L etanolamin – masna kiselina, prekursor za sintezu fosfolipida

Otopina za ispiranje stanica (PBSA)

-137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM $Na_2HPO_4$, 1,4 mM $KH_2PO_4$; pH 7,4

Pufer za elektroforezu DNA u gelu agaroze (1 x TAE)

-40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Propolis

Alkoholna otopina propolisa pripremljena je otapanjem sirovog propolisa, iz pčelinjaka smještenih u okolici Zagreba, u 80% etanolu tijekom 24 sata pri temperaturi 37 °C. Nakon postupka liofilizacije, napravljena je spektrofotometrijska i HPLC analiza glavnih bioloških sastavnica nazočnih u propolisu (Benković i sur., 2009). Alkoholni ekstrakt hrvatskog propolisa kojeg smo koristili u našem istraživanju sadrži 84,4% polifenola od čega su 40,2% flavonoidi (0,28% kvercetin, 0,63% naringenin i 2,45% krizin) (Benković i sur., 2009).

Komplet za mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7

The Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega):

- Caspaze-Glo® 3/7 pufer za kaspaze
- Caspaze-Glo® 3/7 supstrat za kaspaze, liofiliziran (sadrži tetrapeptidnu jedinicu Z-DEVD-aminoluciferin)

Komplet za izolaciju ukupne stanične RNA

High Pure RNA Isolation Kit (Roche):

- pufer za lizu stanica i vezivanje za kolonu: 4,5 M gvanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton X-100 (w/v), pH 6,6 (pri 25 °C)
- pufer za inkubaciju s DNaza-om: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl2, pH 7,0 (pri 25 °C)
- pufer za ispiranje I: 5 M gvandin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (pri 25 °C)
- pufer za ispiranje II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (pri 25 °C)
- pufer za eluciju: sterilna bidestilirana $H_2O$
- kolone s odvojivim filterima za izolaciju ukupne RNA
- DNaza I

Kemikalije i enzimi za reverznu transkripciju

- reverzna transkriptaza SuperScript II (Invitrogen)
- 5x pufer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 pri sobnoj temperaturi; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$)

- inhibitor Rnaza – RNaseOUT (Invitrogen)
- 10 mM ditiotreitol (DTT)
- $(N)_6$ početnice (Roche)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR)

- 5 X zeleni GoTaq®reakcijski pufer (Promega)
- GoTaq®DNA polimeraza (Promega)
- mješavina PCR nukleotida: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (Roche)
- početnice (Sigma), detaljnije u Tablici 1.

**Tablica 1.** Početnice i uvjeti PCR reakcije

| Gen | Slijed nukleotida početnica P1 i P2 (5' → 3') | Veličina odsječka | Temperatura replikacije | Broj ciklusa |
|---|---|---|---|---|
| ***c-fos*** | 5'-GAATGGTGAAGACCGTGTCAGG -3'<br>5'-CGTTGCTGATGCTCTTGACTGG -3' | 568 pb | 60 °C | 24-25 |
| ***p53*** | 5'-AGAGACCGCCGTACAGAAGA -3'<br>5'-CTGTAGCATGGGCATCCTTT -3' | 470 pb | 62 °C | 31-32 |
| ***β-aktin*** | 5'-ATGGATGACGATATCGCTG -3'<br>5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT -3' | 568 pb | 60 °C | 20-21 |

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Diferencija stanica P19 u neurone

Nediferencirane stanice P19 uzgajali smo u posudicama za staničnu kulturu (Falcon) u 5 mL kompletiranog medija (DMEM s 10% FBS-om, 2 mM L-glutaminom, 100 U/mL penicilina i 0,1 mL/mg streptomicina). Budući da nediferencirane stanice P19 brzo rastu, presađivali smo ih svaki drugi dan na način da smo uklonili medij, isprali posudicu s 2 x 2 ml PBSA, dodali 1 ml 0,05% otopine tripsina radi odvajanja stanica od podloge te naposljetku stavili u inubator (37 °C) na 10 min. U svrhu inaktiviranja tripsina, dodali smo 2 mL kompletiranog medija i u njemu resuspendirali stanice. 1/15 stanične suspenzije smo prenijeli

u novu posudicu, dodali 4,5 mL novog medija za održavanje nediferenciranih stanica te stanice vratili u inkubator.

Stanice P19 smo diferencirali u neurone metodom indukcije s retinoičnom kiselinom (prilagođeno prema Mandel i sur., 2008). Prvo smo nasadili milijun stanica u neprijanjajuće Petrijeve posudice za uzgoj bakterija (promjera 10 cm) u 10 mL DMEM medija s 5% FBS-om te dodali 1 μM retinoične kiseline. Nakon dva dana rasta P19 stanica u suspenziji, primjećujemo nastanak embrionalnih tjelešaca, tj. okruglastih nakupina P19 stanica što je bitan korak prije diferencijacije u neurone. Tada smo promijenili medij te suspenziju embrionalnih tjelešaca stavili u epruvetu na 10 min da se stanične nakupine istalože, potom smo odpipetirali supernatant, dodali 10 mL novog medija s retinoičnom kiselinom i vratili stanice u inkubator. Ponovno smo nakon inkubacije stanica u vremenskom periodu od dva dana, embrionalna tjelešca zajedno s medijem ostavili na 10 min u epruveti da se istalože. Budući da je preduvjet za daljnju diferencijaciju stanica u neurone razdvajanje tih stanica iz nakupina, mi smo dodali 2 mL otopine koja sadrži 0,05% tripsin i 1 mM EDTA, ostavili tripsin da djeluje 10 min u inkubatoru te ga nakon 10 min inaktivirali dodatkom 5 mL medija s 10% seruma. Potom smo resuspendirali stanice, istaložili ih centrifugiranjem 5 min na 1200 rpm (Eppendorf centrifuga, model 5910 R). Maknuli smo supernatant, resuspendirali talog u mediju i izbrojali stanice na hemocitometru. Nasadili smo milijun stanica u 2 mL kompletiranog DMEM medija s 10% seruma u posudice promjera 35 mm ili $35x10^3$ stanica u posudice za uzgoj s 96 bunarića u 100 μL medija ovisno o tipu eksperimenta i ostavili smo ih dva dana u inkubatoru. Nakon dva dana, šesti dan od početka indukcije, stanice smo uzgajali u mediju koji je posebno prilagođen za razvoj neurona: DMEM bez dodatka seruma, obogaćen dodacima (10 mg/L inzulin, 5,5 mg/L transferin, 2 mg/L etanolamin i 6,7 ng/L Na-selenit) i 10 μM citozin arabinofuranozida (AraC) koji sprječava rast stanica ne-neuronskih stanica kao što su glija stanice i fibroblasti. Nakon dva dana u takvom posebnom mediju, dakle osmi dan od početka indukcije, dobili smo potpuno diferencirane zrele neurone.

### 3.2.2. Obrada diferenciranih neurona P19 s bakrovim sulfatom i alkoholnim ekstraktom propolisa

Osmi dan nakon početka indukcije difencijacije P19 stanica u neurone, tretirali smo stanice različitim koncentracijama bakrova (II) sulfata i alkoholnog ekstrakta propolisa. Prvo smo ispitali učinak samog bakrova sulfata i samog propolisa na preživljenje neurona P19, a potom smo ispitivali učinak propolisa u kombinaciji s 1 mM otopinom bakrova sulfata na

preživljenje P19 stanica, ali i na stvaranje reaktivnim kisikovih vrsta te na inicijaciju aktivacije apoptoze i na razini aktivacije kaspaza i na razini stanične mRNA, tj. specifičnih gena uključenih u apoptozu. U svim pojedinačnim ispitivanjima, podijeli smo stanice na kontrolnu skupinu i obrađene skupine, obradu smo provodili tijekom 24 sata te smo naposljetku obavili mjerenja i analizu rezultata.

### 3.2.3. Određivanje preživljenja neurona P19 primjenom testa MTT

Test MTT je jednostavna, brza i ekonomična metoda ispitivanja citotoksičnog učinka određenih tvari i proliferacije stanica u uvjetima *in vitro*. Temelji se na redukciji tetrazolijeve soli MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazilijev bromid] mitohondrijskom sukcinat-dehidrogenazom metabolički aktivnih stanica. Tada iz svijetložutog supstrata, odnosno MTT-a nastaju tamnoljubičasti obojeni kristali formazana koji se nakupljaju u stanicama. Količina nastalog formazana je izravno proporcionalna broju vijabilnih stanica. Intenzitet nastalog obojenja možemo odrediti spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikrotitarskih pločica, na valnoj duljini od 570 nm. Postotak vijabilnih stanica izražava se kao apsorbancija vijabilnih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrole.

Nakon obrade stanica P19 otopinom bakrova (II) sulfata i/ili alkoholnim ekstraktom propolisa, tijekom 24 sata, dodali smo u svaki bunarić po 40 μL medija s 20 μg boje MTT, a zatim ih vratili u inkubator na 3 sata. Nakon isteklog vremena dodali smo u svaku jažicu po 160 μL DMSO-a kako bismo otopili formazan. Očitavali smo apsorbanciju na 570 nm na spektofotometru (Multiscan MS, Labsystems).

### 3.2.4. Određivanje preživljenja neurona P19 bojanjem tripanskim modrilom

Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa u kombinaciji s 1 mM otopinom $CuSO_4$ na vijabilnost stanica smo odredili i metodom bojenja tripanskim modrilom te brojanjem na hemocitometru. Tripansko modrilo ulazi u stanice s oštećenom membranom i boji ih u plavo, tako da u vidnom polju možemo mikroskopom odrediti na kojim je mjestima došlo do reakcije. Žive stanice ostaju neobojene, jer imaju očuvanu membranu te djelovanjem membranskih pumpi aktivno odstranjuju tripansko modrilo.

Nakon završetka obrade, izvadili smo stanice iz inkubatora te smo medij s plutajućim stanicama premjestili u epruvetu. Stanice koje su priljubljene uz podlogu smo odvojili s 300

μL tripsina kroz 5 minuta na 37 °C. Tripsinizirane stanice smo resuspendirali u 2 mL medija i dodali ih u epruvetu s plutajućim stanicama te centrifugirali 5 minuta na 250 g. Potom smo dekantirali medij, a talog resuspendirali u 250 μL novog medija. U svrhu brojanja na hemocitometru, pomiješali smo volumene tripanskog modrila i suspenzije stanica u omjeru 1:1 te ih inkubirali 5 minuta. Suspenziju smo nanijeli na Bürker-Türkovu komoricu i brojali stanice pod svjetlosnim mikroskopom. Preživljenje smo odredili tako da smo izračunali udio mrtvih stanica u odnosu na ukupni broj stanica.

### 3.2.5. Unutarstanično stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta

U kontekstu produkcije reaktivnih kisikovih vrsta, odredili smo učinak samog propolisa u koncentracijama od 2 i 5 μg/mL kao i njegovu kombinaciju s 1 mM otopinom bakrova sulfata ($CuSO_4$) na neurone P19 tijekom 24 sata. Unutrastaničnu produkciju molekula RKV odredili smo pomoću metode koja se koristi za procjenu prooksidacijskog potencijalarazličitih spojeva te kao pouzdan indikator ukupne količine nastalih molekula RKV. Za mjerenje oksidativne aktivnosti u stanicama upotrijebili smo fluorogenu probu 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCF-DA). DCF-DA nakon difundiranja u stanicu postaje hidroliziran unutarstaničnim esterazama u ne-fluorescentni produkt 2',7'-diklorofluorescin. Akumulirani 2',7'- diklorofluorescin reagira s unutarstaničnim reaktivnim kisikovim vrstama i pritom formira visoko fluorescentni spoj diklorofluorescetin (DCF). Neurone P19 smo inkubirali sa 100 μM DCF-DA u PBS-u tijekom 1 sata, za to vrijeme boja je prodrla u stanice. Potom smo neurone P19 isprali i inkubirali u PBS-u dodatnih 1 sat. Oksidaciju DCF-DA u DCF, odnosno razinu fluorescencije smo mjerili na fluorescencijskom spektrofotometru (Fluoroscan Ascent FL, Thermo Scientific) pri valnoj duljini pobuđivanja ($\lambda$ex) od 485 nm i mjerenjem emisije ( $\lambda_{emm}$) od 538 nm.

### 3.2.6. Određivanje aktivnosti kaspaza

Za određivanje aktivnosti kaspaza-3/7 koristili smo komplet na pločici s 96 bunarića (Caspaze-Glo® 3/7 Assay, Promega) prema uputama proizvođača. U kompletu se nalazi pufer koji lizira stanice i supstrat za kaspaze (Z-DEVD-aminoluciferin). Z-DEVD (aminoluciferin) je supstrat za kaspaze -3 i -7, koji otpušta aminoluciferin nakon cijepanja te emitira fluorescentan signal. Količina nastalog fluorescentnog produkta je proporcionalna aktivnosti kaspaza-3/7.

Miješanjem supstrata i pufera u omjeru 1:100 pripremili smo reagens. U mikrotitarske bunariće s nasađenim stanicama dodali smo volumen reagensa jednak volumenu medija (40 μL), promiješali smo na mješalici na 300-500 rpm te inkubirali na sobnoj temperaturi 2 sata. Zatim smo izmjerili fluorescenciju s valnom duljinom pobuđivanja od 485 nm i mjerenjem emisije na 538 nm (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation).

### 3.2.7. Izolacija RNA

Ukupnu staničnu RNA izolirali smo pomoću kompleta *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) kojim se stanice liziraju, a oslobođena RNA se veže na staklena vlakna filtera. Ispiranjem s posebnim puferima inaktiviraju se RNaze te uklanjaju DNA, soli, proteini i drugi stanični ostatci, a na kraju se eluira RNA.

Pomoću hemocitometra smo odredili broj stanica po skupinama te smo za izolaciju uzeli 1,2 x $10^6$ stanica. Stanice smo centrifugirali na 3000 rpm 3 minute (Eppendorf centrifuga, model miniSpin plus), isprali i resuspendirali u 400 μL PBS-a te ponovno centrifugirali pri istim uvjetima. Nakon toga smo resuspendirali stanice u 200 μL PBS-a. Dodali smo 400 μL pufera koji lizira stanice i omogućuje vezanje nukleinskih kiselina za kolonu. Nakon 15 s vorteksiranja cijeli uzorak smo nanijeli na filter i centrifugirali 15 s na 10 000 rpm. Miješanjem 10 μL DNaze I i 90 μL pufera za inkubaciju pripremili smo otopinu DNaze kojom se rezidualna DNA uklanja s filtera, nanijeli smo je na kolonu i inkubirali 15 min na sobnoj temperaturi. Na filter smo zatim dodali 500 μL pufera za ispiranje I, centrifugirali te bacili filtrat. Zatim smo kroz kolonu propustili 500 μL pufera za ispiranje II, centrifugirali te isprali kolonu s još 200 μL istog pufera i centrifugirali dvije minute na maksimalnoj brzini (14 500 rpm) da se ukloni sav pufer, te smo RNA eluirali s kolone dodatkom 50 μL pufera za eluciju. Centrifugirali smo 1 min na 10 000 rpm te sakupljenu RNA u epruvetici čuvali na -80 °C. Količinu RNA odredili smo spektrofotometrom (Biospec-nano, Shimadzu & Biotech).

### 3.2.8. Reverzna transkripcija

Metodu reverzne transkripcije koristili smo kako bismo ukupnu RNA izoliranu iz svih tretiranih skupina stanica P19 preveli u cDNA. Sastojke za reverznu transkripciju podijelili smo u dvije otopine. Prva otopina, ukupnog volumena 12 μL, sadržavala je ukupnu staničnu RNA, $H_2O$, heksanukleotidne početnice i mješavinu dNTP-a. Otopinu smo inkubirali 5 minuta na 65 °C kako bi denaturirali sekundarne strukture i omogućili slobodno vezivanje

početnica. Druga otopina, ukupnog volumena 7 μL, sastojala se od pufera, DTT-a (reducira disulfidne mostove potrebne za aktivnost RNaza) te inhibitora RNaza. Dobivene otopine smo pomiješali i inkubirali 2 minute na 25 °C. Nakon toga smo u otopinu dodali reverznu transkriptazu SuperScript II i promiješali pipetiranjem, te inkubirali 10 minuta na 25 °C. Sama reakcija reverzne transkripcije odvijala se 50 minuta na temperaturi 42°C, nakon čega smo enzim inaktivirali zagrijavanjem na 70 °C, 15 minuta. Dobivenu cDNA smo za izvođenje lančane reakcije polimerazom razrijedili 10 puta. Sastojci za reakciju reverzne transkripcije s konačnim koncentracijama (ukupni volumen je 20 μL):

- ukupna stanična RNA - 1 μg
- (N)6 početnice - 2,5 μM, 100 ng
- dNTP mješavina - 0,5 mM
- DTT - 10 mM
- inhibitor Rnase - 40 U
- reverzna transkriptaza SuperScript II- 100 U

### 3.2.9. Semikvantitativna metoda PCR za određivanje ekspresije *p53* i *c-fos*

Komplementarnu DNA dobivenu iz ukupne RNA svih skupina stanica koristili smo za semikvantitativnu PCR metodu. To je metoda u kojoj se određeni odsječci DNA različitih skupina umnažaju metodom PCR do određenog ciklusa, kada se reakcija zaustavlja. Nakon elektroforeze u agaroznom gelu i bojanja odsječaka etidij bromidom, mjere se intenziteti signala. Usporedbom intenziteta signala među skupinama možemo uspoređivati količinu cDNA, odnosno relativnu količinu mRNA za određeni gen. Pripremali smo po 10 μL otopine za reakciju, prethodno podijeljene u dvije otopine sa sljedećim omjerom sastojaka:

Otopina 1:

- mješavina dNTP-a - 200 μM
- početnice (P1 i P2) - 0,2 μM
- cDNA - 1 μL iz reakcije RT, razrjeđenje 1:10

Otopina 2:

- zeleni pufer - 1x (uključen 1,5 mM $MgCl_2$)
- GoTaq DNA polimeraza – 0,25 U

Za umnažanje odsječaka DNA za gene *p53* i *c-fos* koristili smo sljedeće uvjete metode PCR:

- početna denaturacija: 94 °C, 5 minuta
- ciklusi:
    - denaturacija DNA: 94 °C, 30"
    - vezivanje početnica: 60"
      *p53*: 62 °C; *c-fos*: 60 °C, *β-aktin*: 60 °C
    - elongacija lanca: 72 °C, 60"
- konačna elongacija: 72 °C, 7 minuta

Za svaki od analiziranih gena prvo smo napravili grubu titraciju zaustavljanjem reakcije nakon 15, 20, 25, 30 i 35 ciklusa. Prema rezultatima smo odredili na kojem ciklusu se pojavljuje vidljiv signal i odabrali cikluse za finu titraciju. Za svaku izolaciju i za svaki gen smo radili posebne titracije. Rezultate fine titracije prikazali smo kao krivulju ovisnosti intenziteta signala o broju ciklusa. Na logaritamskom prikazu odabrali smo ciklus u linearnom dijelu krivulje i na tom broju ciklusa smo uspoređivali razlike među skupinama. Zbog mogućih nepodudaranja u količini DNA među skupinama, dobivene rezultate smo normalizirali prema intenzitetu signala za *β-aktin*, tzv. *house-keeping* gen čija bi ekspresija u stanicama trebala biti konstantna.

Umnožene odsječke razdvojili smo elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu i TAE puferu, pri naponu 75 V, 30 min. Odsječke smo bojali uranjanjem gela u otopinu etidij-bromida (konačna koncentracija 0,5 μg/mL) na 20 min. Signal smo vizualizirali pomoću uređaju za detekciju UV signala (UVITEC, Cambridge) korištenjem programa Alliance. Intenzitete signala (denzitometrijsku analizu) različitih skupina obradili smo pomoću programa Image J.

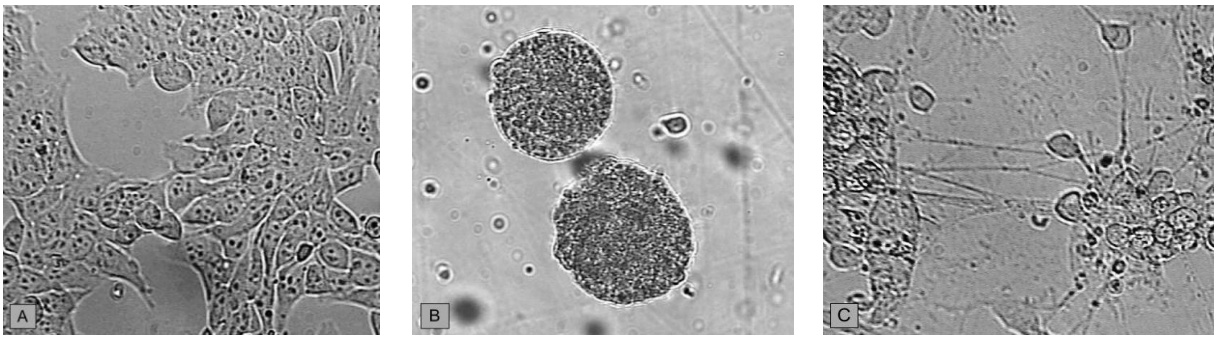
### 3.2.10. Analiza rezultata

Za statističku obradu podataka i pripadajuće grafičke prikaze koristili smo program GraphPad Prism. Rezultati dobiveni iz najmanje tri pokusa izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti. Napravili smo jednostruku analizu varijance (ANOVA) i nakon toga testove *post hoc* višestruke usporedbe: za međusobnu usporedbu svih skupina koristili smo *Tukey's Multiple Comparison Test*, a za usporedbu s kontrolom skupinom *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Razlike srednjih vrijednosti po skupinama smatrane su statistički značajnima kad je vjerojatnost pogreške (P) bila manja od 0,05.

# 4. REZULTATI

## 4.1. Diferencijacija neurona P19

Nediferencirane stanice P19 u posudicama za staničnu kulturu rastu u jednom sloju i brzo se dijele. Nakon presađivanja u Petrijeve posudice i indukcije diferencijacije retinoičnom kiselinom, embrionalne matične stanice su formirale kuglaste stanične nakupine zvane embrionalna tjelešca. Četvrti dan od početka indukcije diferencijacije retinoičnom kiselinom, prethodno tripsinizirane stanice smo izbrojali i presadili u posudice za staničnu kulturu za potpunu diferencijaciju do neuronalnog fenotipa. Osam dana od početka obrade, vidjeli su se potpuno diferencirani neuroni. Neuroni su se sastojali od okruglih tjelešaca, udruženih u agregate te su se iz njih pružali vidljivi dugi neuronski izdanci (Slika 1).

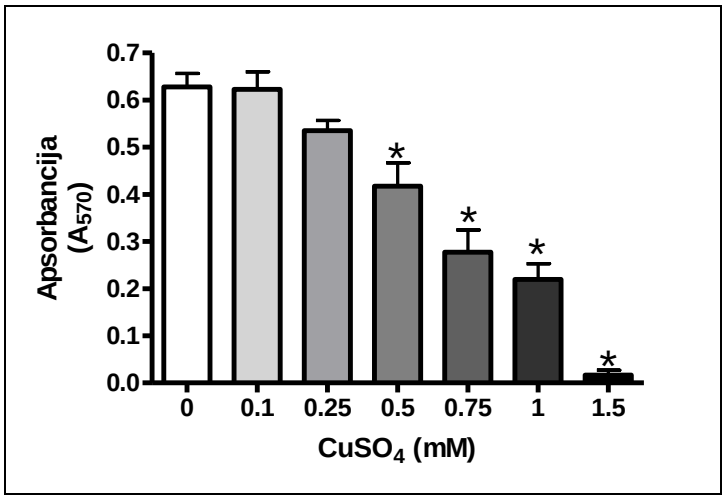



**Slika 1**. Diferencijacija stanica P19 u neurone. Nediferencirane stanice P19 (A), embrionalna tjelešca četiri dana nakon početka indukcije s retinoičnom kiselinom (B) i diferencirani neuroni osmi dan nakon početka obrade s retinoičnom kiselinom (C). Slikano na svjetlosnom mikroskopu (povećanje: 200×).

## 4.2. Učinak bakra i propolisa *per se* na preživljenje neurona P19

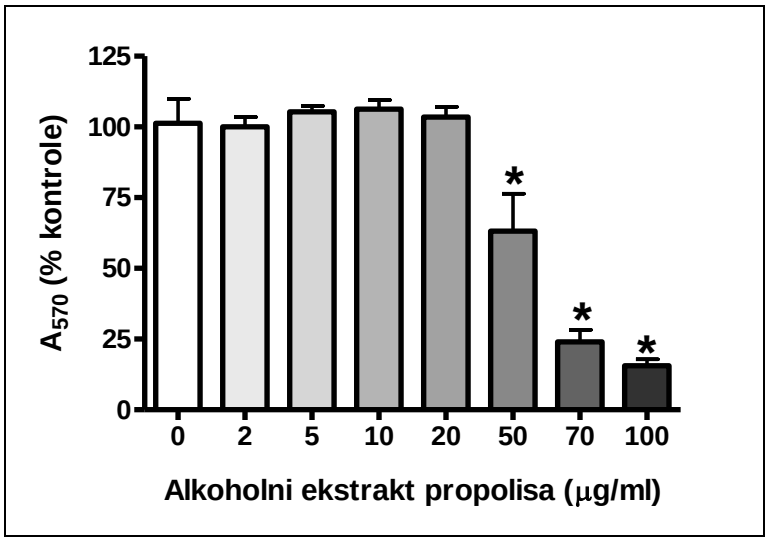
Učinak različitih koncentracija bakrova (II) sulfata pratili smo u kulturi neurona P19 nakon završetka obrade od 24 sata da bismo vidjeli kako dvovalentni bakar djeluje na preživljenje neurona. Odabrane koncentracije bakrovog sulfata bile su u rasponu od 0,1-1,5 mM. Preživljenje neurona P19 odredili smo primjenom MTT testa. Analizom dobivenih rezultata utvrdili smo da koncentracije bakrovog sulfata od 0,5 mM naviše statistički značajno smanjuju preživljenje neurona P19. Naime, u usporedbi s kontrolnom skupinom gdje je

vijabilnost iznosila 0,628 ± 0,028, dodatak bakra u koncentracijama od 0,5, 0,75 i 1 mM smanjio je preživljenje na 0,418 ± 0,050; 0,277 ± 0,048 i 0,220 ± 0,033 što upućuje na toksičan učinak bakra u kulturi neurona P19 (Slika 2).




**Slika 2.** Utjecaj bakrovog (II) sulfata na preživljenje neurona P19. Bakar u koncentracijama od 0,5, 0,75, 1 i 1,5 mM snižava preživljenje u odnosu na kontrolnu skupinu (*P < 0,01 prema Dunettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

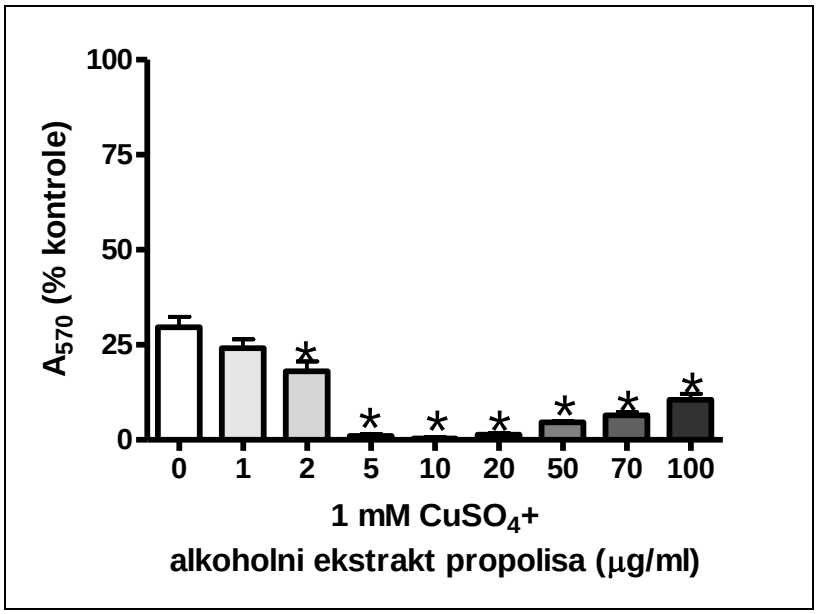
Da bismo ispitali utjecaj samog alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19, obradili smo neurone P19 alkoholnim ekstraktom propolisa u koncentracijama od 2, 5, 10, 20, 50, 70 i 100 μg/mL. Dobiveni rezultati su pokazali da propolis u koncentracijama od 50, 70 i 100 μg/mL smanjuje preživljenje na 63,16 ± 13,22, 23,97 ± 4,36 i 15,56 ± 2,34% vrijednosti kontrolne skupine (Slika 3).




**Slika 3.** Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19. Alkoholni ekstrakt propolisa u koncentracijama od 50, 70 i 100 ug/mL snižava preživljenje neurona u odnosu na kontrolnu skupinu (*P < 0,01 prema Dunettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

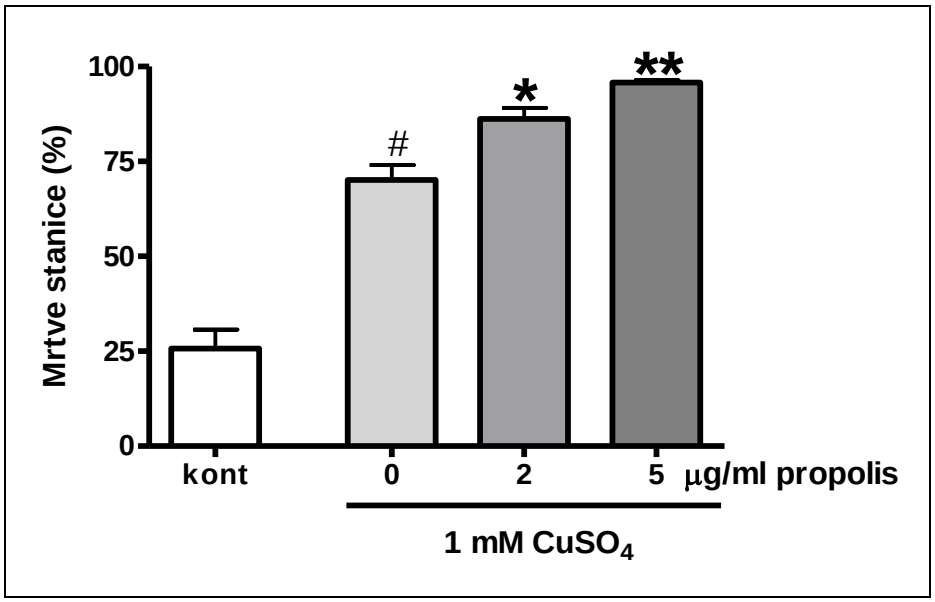
### 4.3. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 tretiranih s 1 mM otopinom bakrova (II) sulfata

U svrhu određivanja potencijalno protektivnog djelovanja alkoholnog ekstrakta propolisa, tretirali smo neurone P19 istovremeno s bakrovim sulfatom u koncentraciji od 1 mM i različitim koncentracijama alkoholnog ekstrakta propolisa (1, 2, 5, 10, 20, 50, 70 i 100 μg/mL) tijekom 24 sata. Preživljenje neurona smo odredili primjenom MTT testa. Statistička obrada rezultata pokazala je da dodatak alkoholnog ekstrakta propolisa, u koncentracijama koje *per se* nisu bile toksične, dodatno smanjuje preživljenje neurona P19 u prisutnosti 1 mM $CuSO_4$. Kao što je prikazano na Slici 4, već u vrlo niskoj koncentraciji od 2 μg/mL alkoholni ekstrakt propolisa dodatno je smanjio preživljenje neurona P19 u odnosu na skupinu obrađenu samo s 1 mM $CuSO_4$, i to na 18,00 ± 2,6%; dok u koncentracijama od 5, 10 i 20 μg/mL gotovo u potpunosti dokida preživljenje neurona P19 u prisutnosti visokih koncentracija iona bakra. Preživljenje neurona koji su u prisutnosti 1 mM $CuSO_4$ bili tretirani s 50, 70 i 100 μg/mL alkoholnog ekstrakta propolisa također je bilo manje nego li u skupinama koje su obrađene samo alkoholnim ekstraktom propolisa (Slika 4).




**Slika 4.** Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 tretiranih s 1 mM $CuSO_4$. Alkoholni ekstrakt propolisa u koncentracijama od 2, 5, 10, 20, 50, 70, 100 ug/mL značajno smanjuje preživljenje (*P < 0,01 prema Dunettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

Učinak dviju odabranih koncentracija propolisa smo odredili i metodom bojanja tripanskim modrilom. Metodom bojanja tripanskim modrilom mrtve stanice se razlikuju od živih po tome što se oboje plavo, a njihov se udio određuje bojanjem na hemocitometru pod mikroskopom. Usporedba kontrolne i tretiranih skupina potvrdila je prethodno dobivene rezultate testom MTT. Koncentracija od 2 μg/mL alkoholnog ekstrakta propolisa statistički je značajno povećavala udio mrtvih stanica na 86,17 ± 2,9%, a koncentracija od 5 μg/mL povećala je smrtnost na 95,80 ± 0,6% (Slika 5).

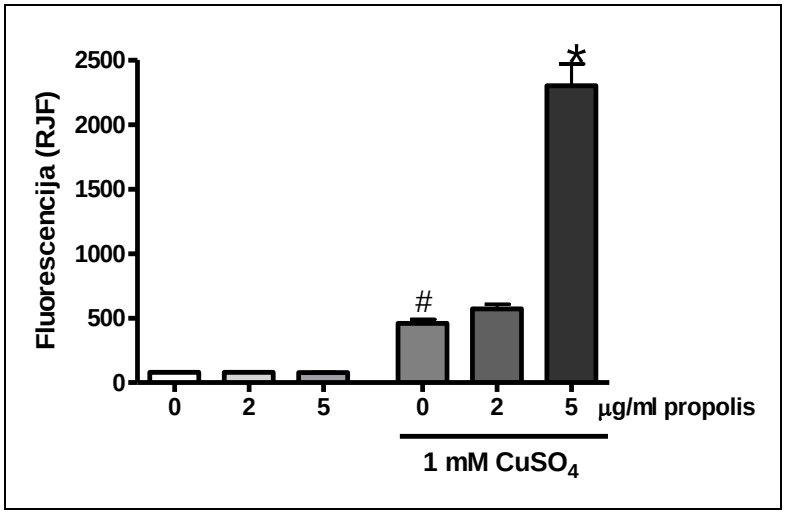



**Slika 5.** Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 tretiranih s 1 mM $CuSO_4$ pomoću metode bojenja tripanskim modrilom. Koncentracije od 2 i 5 μg/mL alkoholnog ekstrakta propolisa značajno su smanjile preživljenje u odnosu na skupinu obrađenu samo s 1 mM $CuSO_4$ (*$P < 0,05$) te sam bakrov sulfat koncentracije od 1 mM smanjuje preživljenje u odnosu na kontrolu ($^{\#}P < 0,001$ prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

### 4.4. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta

Budući da se toksično djelovanje bakra primarno povezuje s njegovim prooksidacijskim djelovanjem, u nastavku istraživanja zanimalo nas je, je li toksično djelovanje bakra i alkoholne otopine propolisa povezano s promjenama u nakupljanju molekula RKV. Unutarstaničnu produkciju RKV-a mjerili smo pomoću fluorogene probe 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCF-DA) te smo razinu fluorescencije, odnosno oksidaciju DCF-DA u DCF (diklorofluorescetin) očitavali fluorescencencijskim sprektrofotometrom. Prvo smo testirali da li će sam propolis u koncentracijama 2 i 5 μg/mL utjecati na nakupljanje RKV-a, a potom smo odredili nakupljanje RKV-a u prisutnosti 1 mM $CuSO_4$ i različitih koncentracija propolisa nakon završetka obrade. Dobiveni rezultati pokazuju da propolis primijenjen samostalno nije utjecao na stvaranje RKV-a, dok sam bakar u 1 mM koncentraciji značajno podiže razinu RKV-a u vrijednosti od 459,4 ± 30,8 relativnih jedinica fluorescencije (RJF). Nadalje, očekivali smo da će zbog svojih flavonoidnih antioksidacijskih sastavnica propolis umanjiti nakupljanje RKV-a izazvano ionima bakra. Obradom dobivenih rezultata utvrdili smo da je prisutnost 5 μg/mL alkoholnog ekstrakta propolisa u kombinaciji s 1 mM

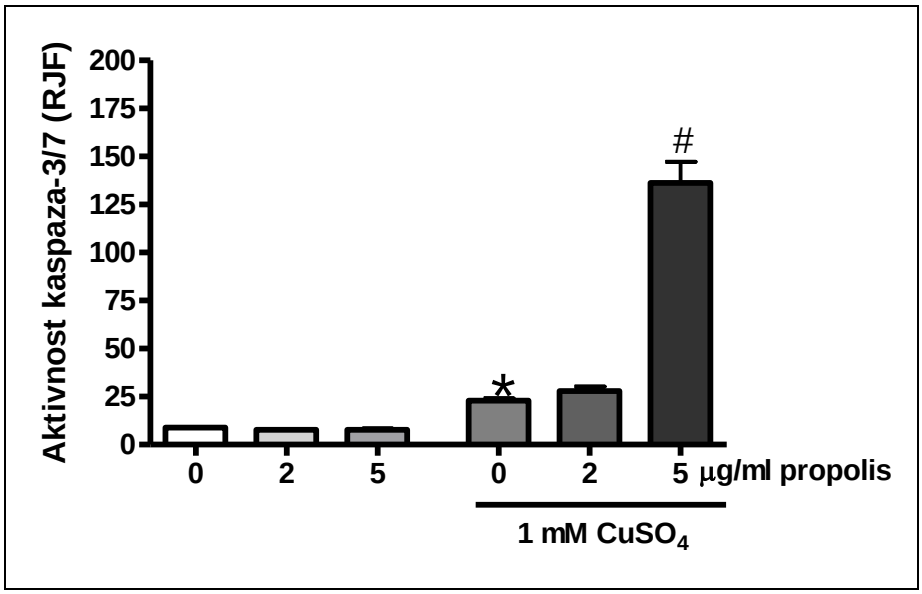
otopinom bakrova (II) sulfata, izazvala neočekivano povećanje produkcije RKV-a u vrijednosti od 2301,0 ± 168,7 RJF-e (Slika 6).




**Slika 6.** Učinak bakrovog (II) sulfata i alkoholnog ekstrakta propolisa na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u kulturi neurona P19. Otopina bakrova sulfata u koncentraciji od 1 mM značajno je povećala produkciju RKV molekula u odnosu na kontrolu ($^{\#}P < 0,01$). Propolis u koncentraciji od 5 µg/mL u kombinaciji s 1 mM otopinom bakrova sulfata izazvao je značajno povećanje produkcije reaktivnih kisikovih vrsta u odnosu na skupinu koja je tretirana samo s 1 mM $CuSO_4$ (*P < 0.001 prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

## 4.5. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na aktivnost kaspaza-3/7 u prisutnosti iona bakra

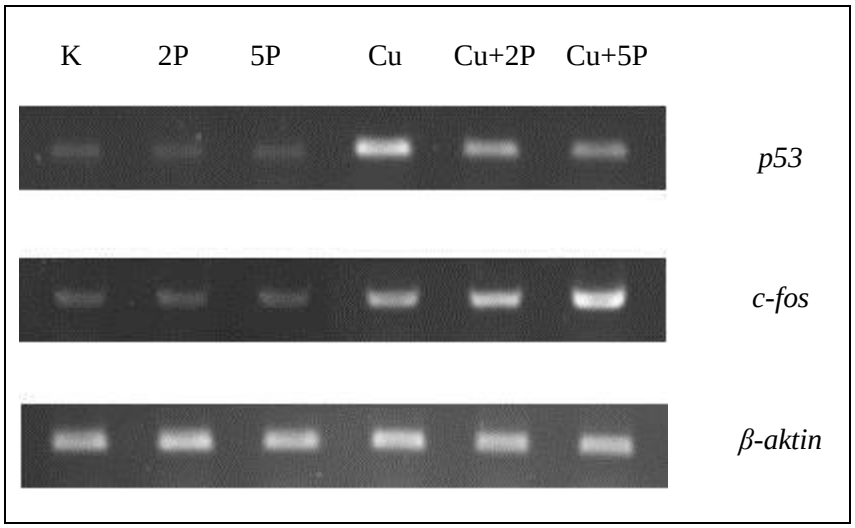
Prisutnost iona bakra obično se povezuje s pokretanjem apoptoze ili programirane stanične smrti. Stoga smo u nastavku našeg istraživanja odredili kako prisutnost iona bakra i alkoholne otopine propolisa utječe na aktivnost kaspaza-3/7 koje su ključne efektorske kaspaze. Kao što je prikazano na Slici 7, utvrdili smo da niske koncentracije alkoholne otopine propolisa primijenjene samostalno ne mijenjaju bazalnu aktivnost kaspaza-3/7 u usporebi s kontrolnom skupinom. Kod neurona tretiranih samo bakrom izmjerili smo očekivano povećanu aktivnost kaspaza-3/7 što upućuje na aktivaciju programirane stanične smrti kod neurona P19 izloženih toksičnim koncentracijama bakra. U kombinaciji s bakrom, alkoholni ekstrakt propolisa u koncentraciji od 2 µg/mL nije utjecao na aktivnost kaspaza, no zato je koncentracija propolisa od 5 µg/mL povećala aktivnost kaspaza-3/7 na vrijednosti od 136,2 ± 11,13 RJF-e. Ovaj rezultat je pokazao proapoptotski učinak alkoholnog ekstrakta propolisa u kombinaciji s ionima metala bakra (Slika 7).




**Slika 7.** Učinak bakrovog (II) sulfata i alkoholnog ekstrakta propolisa na aktivnost kaspaza-3/7 u prisutnosti iona bakra. Alkoholni ekstrakt propolisa primijenjen samostalno nije utjecao na aktivnost kaspaza-3/7. Otopina bakrova (II) sulfata u 1 mM koncentraciji je u usporedbi s kontrolnom skupinom značajno povećala aktivnost kaspaza (*P < 0,01). Alkoholni ekstrakt propolisa koncentracije 5 μg/mL u kombinaciji s 1 mM otopinom bakrova sulfata postigao je značajan proapoptotski učinak ($^{\#}$P < 0,001 u odnosu na skupinu obrađenu samo bakrom prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

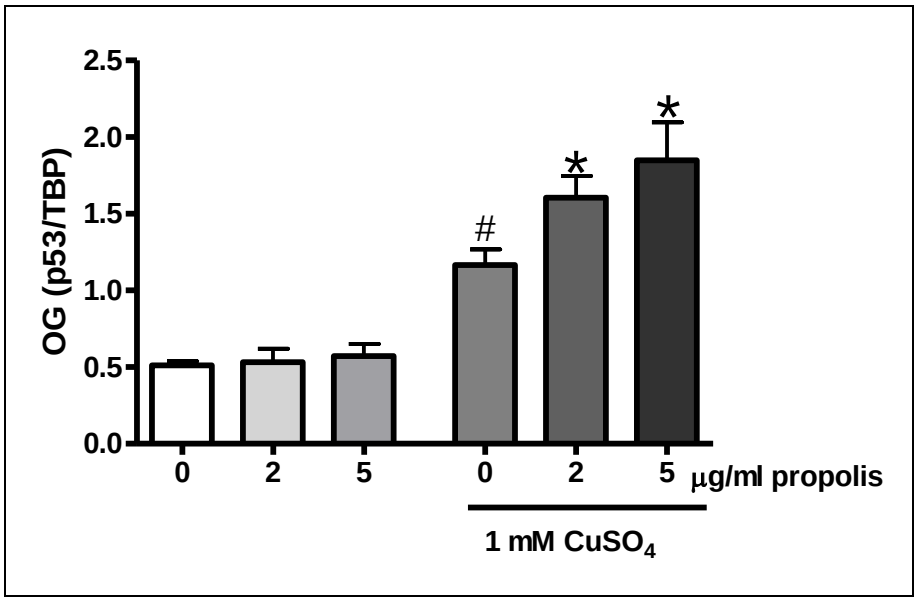
## 4.6. Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na ekspresiju gena uključenih u unutarstaničnu signalizaciju pri indukciji apoptoze

U svrhu daljnjeg razjašnjenja mehanizma toksičnog djelovanja propolisa u prisutnosti iona bakra, analizirali smo ekspresiju gena *p53* i *c-fos* koji sudjeluju u regulaciji apoptoze na razini mRNA. Testirali smo dolazi li do promjena u ekspresiji spomenutih gena u prisutnosti samog alkoholnog ekstrakta propolisa, kao i u njegovoj kombinaciji s otopinom od 1 mM bakrova sulfata. RNA je izolirana iz skupina stanica tretiranih propolisom te propolisom i bakrom, reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNA te umnožena metodom PCR-a. Za svaku izolaciju RNA i svaki gen smo prethodno proveli grubu i finu titraciju kojom smo odredili uvjete i broj ciklusa (tj. linearni dio PCR reakcije) pri kojima možemo usporediti signale dobivene s različitih skupina stanica. Nakon elektroforeze u gelu agaroze i bojenja etidij-bromidom uspoređivali smo intenzitet signala umnoženih odsječaka primjenom programa ImageJ. Rezultate denziometrije smo normalizirali prema intenzitetu signala za *β-aktin*, za čiju ekspresiju pretpostavljamo da se ne mijenja u različitim eksperimentalnim uvjetima (Slika 8).



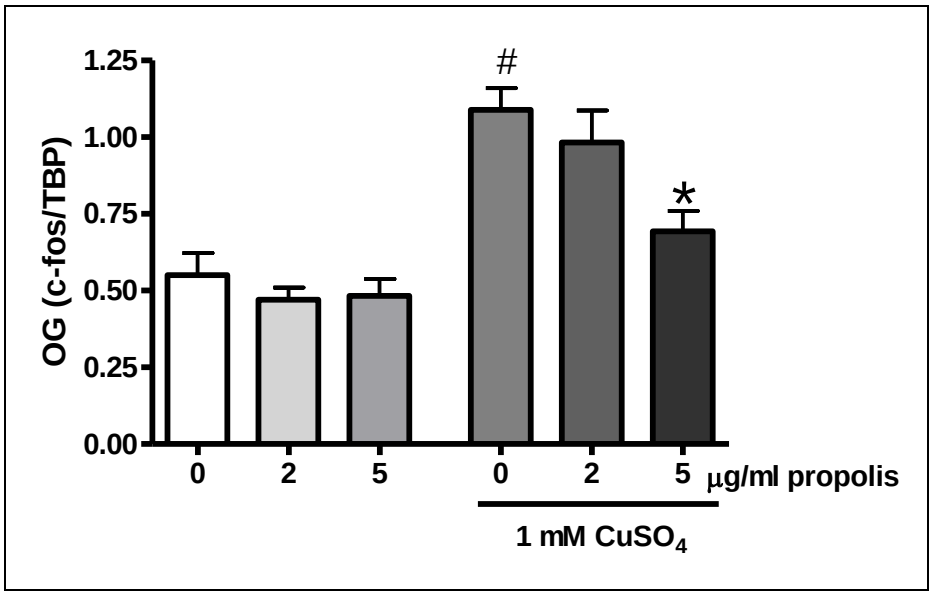

**Slika 8.** Signali dobiveni bojanjem etidij-bromidom nakon elektroforeze u gelu agaroze. Iznad fotografija je označena koncentracija propolisa i bakra kojom su tijekom 24 h obrađene kulture neurona P19 od kojih je dobivena komplementarna DNA. Na svakom gelu nalazi se 6 signala: signal kontrolne skupine stanica (označeno K), signal stanica izloženih samo propolisu koncentracije 2 μg/mL (2P), signal stanica izloženih propolisu koncentracije 5 μg/mL (5P), signal stanica izloženih otopini bakrova sulfata koncentracije 1 mM bez dodanog propolisa (Cu), signal stanica izloženih kombinaciji bakrova sulfata (1 mM) i propolisa (2 μg/mL) (Cu+2P) te signal stanica izloženih kombinaciji bakrova sulfata (1 mM) i propolisa (5 μg/mL) (Cu+5P). Desno je označeno koji su odsječci DNA umnoženi metodom PCR.

Analiza rezultata pokazala je da propolis primijenjen samostalno ne mijenja ekpresiju gena *p53* i *c-fos*, ali je mijenja u prisutnosti iona bakra. Koncentracija alkoholnog ekstrakta propolisa od 2 i 5 μg/mL u kombinaciji s bakrom, statistički je značajno povećala razinu ekspresije mRNA gena *p53* u vrijednostima 1,606 ± 0,140 i 1,849 ± 0,248, odnosno za 37,74 i 58,58% u odnosu na skupinu obrađenu samo ionima bakra (Slika 9).




**Slika 9.** Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa i iona bakra na ekspresiju p53. Otopina bakrova sulfata koncentracije 1 mM statistički povećala je ekspresiju p53 gena u odnosu na kontrolu (#P < 0,05 prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e). Propolis primijenjen samostalno nije utjecao na ekspresiju p53, ali je u kombinaciji s bakrom značajno povećao aktivnost gena p53 (*P < 0,001 u usporedbi sa skupinom treniranom samo bakrom, prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

Nasuprot tome, pri analizi ekspresije mRNA ranog gena *c-fos* utvrdili smo da je alkoholni ekstrakt propolisa koncentracije 5 μg/mL u prisutnosti iona bakra značajno smanjio ekspresiju na vrijednost 0,693 ± 0,067, odnosno da je smanjio ekspresiju 36,4% u odnosu na skupinu obrađenu samo s 1 mM $CuSO_4$ (Slika 10).




**Slika 10.** Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa i iona bakra na ekspresiju gena *c-fos*. Otopina bakrova sulfata koncentracije 1 mM značajno je povećala ekspresiju gena c-fos u odnosu na kontrolu skupinu ($^{\#}P<0,001$), dok je u prisutnosti alkoholnog ekstrakta propolisa (5 μg/mL) bakrom izavani porast ekspresije značajno smanjen (*P<0,01 u odnosu na skupinu obrađenu samo bakrom, prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e).

# 5. RASPRAVA

U novijim istraživanjima koja se bave ljekovitošću prirodnih spojeva, pažnja je usmjerena na biljne proizvode i njihove derivate koji služe za održavanje molekularne ravnoteže u redoks reakcijama u stanici. Većina tih istraživanja upućuje na njihovo jako antioksidacijsko i antitumorsko djelovanje. Kada govorimo o flavonoidima, generalno se može reći da ostvaruju učinke koji su povoljni za ljudsko zdravlje zbog njihove međureakcije s brojnim biokemijskim procesima u stanici. Na staničnoj i molekularnoj razini neuroprotektivno djelovanje flavonoida prvenstveno se povezuje s njihovim antioksidacijskim i antiapoptotskim djelovanjem, inhibicijom signalnih puteva, te sprječavanjem upale u živčanom sustavu (Vauzour i sur. 2008). U kontekstu antikancerogenog djelovanja, predloženo je više modela jer flavonoidi moduliraju ekspresiju različitih gena i enzima te na kompleksan i višeznačan način vode ka proapoptotskom učinku (Chahar i sur., 2011).

Unatoč njihovom neupitnom antioksidacijskom učinku, tijekom posljednjeg desetljeća razvilo se paralelno polje koje se bavi njihovim prooksidacijskim svojstvima te naglašava upravo ovaj učinak kao jedan od najbitnijih za proapoptotsko djelovanje (Ullah i sur., 2011). Hadi i sur. (2007) su pokazali kako se neki biljni antioksidansi, primarno polifenoli, ponašaju kao prooksidansi u prisustvu tranzicijskih metala kao što je bakar, te posljedično putem oksidacijskog oštećenja sudjeluju u oštećenju DNA molekule.

Velik broj istraživanja pokazuje da su oksidacijski stres uzrokovan bakrom i oksidacija proteina (bilo to direktno molekulama RKV ili od njihovih krajnjih produkata lipidne peroksidacije kao što je 4-hidroksinonenal) uključeni u razne neurodegenerativne poremećaje, uključujući Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (Arnal i sur., 2012; Eskici i Axelsen, 2012). Stoga se smatra da bi prevencija stanja oksidacijskog stresa sveukupnim smanjenjem RKV-a mogla smanjiti oksidacijska oštećenja bioloških makromolekula i posljedično spriječiti ili usporiti nastanak i progresiju neurodegenerativnih bolesti.

Propolis je biljna smolasta smjesa tvari, sakupljen od strane pčela (*Apis melifera L.*), a služi kao građevni materijal pri izgradnji košnice. Između ostalih učinaka, poznat je po svom antioksidacijskom i antitumorskom djelovanju zbog visokog udjela polifenola (Lofty, 2006; Ayres i sur., 2007; Oršolić i sur., 2008; Benković i sur., 2009).

Potaknuti brojnim dokazima o antioksidacijskom djelovanju propolisa, mi smo u našem istraživanju testirali učinak alkoholnog ekstrakta propolisa na preživljenje neurona P19 istovremeno obrađenih s otopinom bakrova sulfata koncentracije 1 mM, očekujući neuroprotektivan učinak. Alkoholni ekstrakt hrvatskog propolisa koji smo koristili u našem

istraživanju sadrži 84.4% polifenola od čega su 40.2% flavonoidi (0.28% kvercetin, 0.63% naringenin i 2.45% krizin) (Benković i sur., 2009).

Istraživanja smo proveli u kulturi neurona P19. Stanice P19 (stanice pluripotentnog embrionalnog karcinoma miša) diferencirali smo u kulturu neurona u prisutnosti retionične kiseline, kao što je vidljivo na Slici 1. Potpuno diferencirani neuroni P19 morfološki, biokemijski i fiziološki odgovaraju neuronima *in vivo* (Jones-Villeneuve i sur.,1982) te se koriste kao pouzdan model u neurobiološkim i farmakološkim istraživanjima (Ishikara i sur., 2000; Xilouri i Papazafiri, 2006; Jazvinšćak Jembrek i sur., 2012). Pregledom literature utvrdili smo da ne postoje istraživanja o učincima alkoholnog ekstrakta propolisa na neurone P19, bilo da je primijenjen samostalno, ili u kombinaciji s spojevima koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje i posljedično smrt neurona.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da alkoholni ekstrakt propolisa, kada je primijenjen istovremeno s bakrom, smanjuje preživljenje neurona P19, čak i u vrlo niskim koncentracijama koje *per se* nemaju toksično djelovanje. Propolis u prisutnosti iona bakra povećava aktivnost kaspaza-3/7, ključnih efektorskih molekula u pokretanju programirane stanične smrti. Njegov proapoptotski učinak povezan je s povećanom ekspresijom gena p53, te smanjenjem ekspresije gena c-fos na razini mRNA. Alkoholni ekstrakt propolisa u kombinaciji s bakrovim ionima pokazuje i snažno prooksidativno djelovanje zbog povećane produkcije RKV-a, što također vjerojatno doprinosi njegovom neurotoksičnom djelovanju.

Bakar sudjeluje u redoks reakcijama u organizmu, varirajući između oksidiranog ($Cu^{2+}$) i reduciranog ($Cu^{+}$) stanja. U slobodnom, nevezanom obliku katalizira stvaranje RKV-a preko Fentonove reakcije. Nakon što razine RKV-a nadvladaju endogene antioksidacijske mehanizme obrane, rezultat je pojava stanja oksidacijskog stresa. Brojna istraživanja pokazuju toksične učinke iona bakra na neuronalnim stanicama (Chen i sur., 2009; Jazvinšćak Jembrek i sur., 2014), iako točni mehanizmi bakrom inducirane stanične smrti još nisu u potpunosti razjašnjeni. U svrhu dobivanja boljeg uvida u unutarstanične procese potaknute toksičnim koncentracijama bakra, obradili smo neurone P19 različitim koncentracijama bakrova sulfata kroz 24 sata. Sukladno očekivanjima, utvrdili smo da ovisno o dodanoj koncentraciji bakrov (II) sulfat smanjuje preživljenje neurona P19. White i sur. (2011) su istražujući ulogu amiloid prekursor proteina (APP) u oksidativnom stresu prilikom razvitka Alzheimerove bolesti, također pokazali toksičan učinak bakra odnosno smanjenje preživljenja mišjih kortikalnih, cerebralnih i hipokampalnih neurona.

Imajući na umu da se neurotoksični učinci bakra primarno pripisuju njegovoj sposobnosti stvaranja RKV-a putem Fentonove reakcije kako u citosolu, tako i u

mitohondrijima (Gaetke i Chow, 2003), u nastavku našeg istraživanja, za izazivanje toksičnih učinaka koristili smo bakrov sulfat koncentracije 1 mM. Kao što je vidljivo na Slikama 5 i 6, ova koncentracija značajno povećava stvaranje molekula RKV i aktivaciju kaspaza, odnosno uspješno postiže prooksidacijski i proapoptotski učinak.

Chow (1979) je pokazao da bakar zbog svog promjenjivog oksidacijskog stanja može lako započeti oksidaciju lipida stanične membrane, tj. lipidnu peroksidaciju, u nizu lančanih reakcija koje dovode do gubitka cjelovitosti stanične membrane i posljedično do stanične smrti. Manto (2014) je objasnio kako narušena homeostaza bakra, odnosno povećana koncentracija slobodnog bakra koji katalizira Fentonovu reakciju, u konačnici vodi ka generiranju jako štetnog slobodnog radikala – hidroksil radikala koji oštećuje nukleinske kiseline, proteine i lipide. Korelaciju između pojave neurodegenerativnih bolesti i oksidacijskog stresa u mozgu posredovanog u prvom redu suviškom iona bakra potvrdili su brojni radovi (Simonian i Coyle, 1996; Deibel i sur., 1996; Waggoner i sur., 1999;; Gaetke i Chow, 2003;Barnham i sur., 2004).

Povišen oksidacijski stres jedan je od glavnih uzroka apoptoze neurona. Iako se detalji definicije apoptoze razlikuju među autorima, ono što je općenito prihvaćeno je da je apoptoza proces stanične smrti koji uključuje aktivaciju kaspaza (Mattson, 2000). Mi smo proapoptotsko djelovanje bakra potvrdili Z-DEVD testom, gdje smo mjerili aktivnost kaspaza-3/7 na bakrom oštećenim neuronima P19. Sheline i sur. (2002) također su pokazali da povećanje RKV-a putem bakrovih iona vodi ka klasičnom putu programirane stanične smrti ovisnom o kaspazama, s obilježjima kondenzacije kromatina i povećane aktivnosti kaspaza-3/7, dok su Arnal i sur. (2012) pokazali da suvišak iona bakra može odvesti stanice u programiranu staničnu smrt na dva načina, i aktivacijom kaspaza, ali i aktivacijom kalpaina, odnosno kalcij ovisnih cisteinskih proteaza koje mogu pojačati i smanjiti aktivnost kaspaza. Wolfe i sur. (1994) su pokazali da bakrom (putem Fentonove reakcije) generirani hidroksil radikali uzrokuju staničnu smrt timocita te su u istraživanju sa spojevima koji sadrže tiol grupu, primijetili pojavu apoptoze u različitim staničnim linijama, uz dodatak ili slobodnog bakra ili ceruloplazmina (enzima koji sadrži 7 molekula bakrova iona). Liang i Zhou (2007) su na stanicama kvasca pokazali da bakar uzrokuje staničnu smrt mitohondrijskim putem uz prethodno stvaranje molekula RKV.

Brojni radovi govore o čitavom spektru povoljnih učinaka propolisa, počevši od njegovog snažnog antioksidacijskog učinka, preko antitumorskog, antiupalnog, antigljivičnog, antivirusnog i drugih učinaka (Lofty, 2006; Oršolić i sur., 2008; Ayres i sur., 2007). Također spominje se i neuroprotektivni učinak upravo kroz propolisno antioksidacijsko djelovanje,

pošto je poznato da upravo stanje oksidacijskog stresa, nakupljanje RKV molekula uzrokovano u prvom redu ionima metala, prethodi smrti neurona ( Ilhan i sur., 2004; Chen i sur., 2008).

Propolis primijenjen samostalno je tek u visokim koncentracijama (≥ 50 μg/mL) smanjio preživljenje neurona P19. Kao i svaki ljekoviti biljni derivat, za očekivati je da će u visokim koncentracijama imati toksične učinke na stanicu. Međutim, ono što je bilo posebno zanimljivo, jest to da je alkoholni ekstrakt propolisa primijenjen u kombinaciji s bakrom, već i u vrlo niskim, *per se* netoksičnim koncentracijama od 2 i 5 μg/mL smanjio preživljenje neurona, mjereno testom MTT i metodom bojenja tripanskim modrilom. Nadalje, naša su istraživanja pokazala da propolis u kombinaciji s bakrom djeluje sinergistički, te da povećava njegov prooksidacijski potencijal. Naime, primijenjen u koncentraciji od 5 μg/mL povisio je proizvodnju molekula RKV.

Pretraživanjem literature naišli smo na brojne dokaze o antioksidacijskoj ulozi propolisa, pogotovo vodene otopine ove smjese spojeva, iako postoje radovi koji upućuju na njegov prooksidacijski potencijal (Sobočanec i sur., 2006b; Tsai i sur., 2012). Također, u većini istraživanja koja govore o djelovanju propolisa govori se o učincima izoliranih propolisnih komponenti, rjeđe se govori o propolisu kao smjesi spojeva (Rahman i sur., 1989; Shimazawa i sur., 2005; Nakajima i sur., 2007; Hadi i sur., 2007).

Iako se većina farmakoloških obilježja biljnih polifenola pripisuje njihovom antioksidacijskom potencijalu, odnosno sposobnosti da uklanjaju endogeno generirane slobodne radikale ili one formirane ksenobioticima, zračenjem i slično, neki noviji literaturni podaci sugeriraju da polifenolna obilježja nisu u potpunosti jednoznačna, jer većina biljnih polifenola posjeduje i antioksidacijska i prooksidacijska svojstva. A budući da se većina povoljnih svojstava koja propolis posjeduje pripisuju polifenolima, propolis kao i sami polifenoli, može imati dvojni učinak - antioksidacijski i prooksidacijski. Prooksidacijski i citotoksični učinak propolisa i flavonoida najčešće je istraživan na različitim tumorskim linijama (Izuta i sur., 2008; Lu i sur., 2011, Chahar i sur., 2011).

Shimazawa i sur. (2005) ispitali su neuroprotektivno djelovanje alkoholne i vodene otopine brazilskog zelenog propolisa u staničnoj kulturi neurona PC 12. Alkoholna i vodena otopina brazilskog propolisa inhibirala je citotoksični učinak vodikovog peroksida u koncentracijama 4 i 40 μg/mL, smanjila lipidnu peroksidaciju neutralizacijom slobodnih radikala te je u miševa *in vivo* spriječila cerebralnu ishemiju. Pretpostavljamo da su za različiti učinak propolisa u usporedbi s našim istraživanjem ključne razlike u sastavu propolisa te posebice vrsti oksidacijskog oštećenja. Dok smo mi za indukciju oksidacijskog oštećenja

koristili bakar, Shimazawa i sur. (2005) koristili su vodikov peroksid. Spomenimo također da su, Huang i sur. (2007) pokazali da propolin G, komponenta izolirana iz tajvanskog propolisa, uzrokuje apoptozu tumorskih glija stanica aktivacijom mitohondrijalnog puta ovisnog o kaspazama, dok istovremeno pokazuje neuroprotektivan učinak u kulturi kortikalnih neurona štakora izloženih vodikovom peroksidu zbog svog antioksidacijskog djelovanja i smanjenja RKV molekula. Ovisno o periodu sakupljanja propolisa, udio propolina G je bio veći ako je sakupljen u periodu između svibnja i srpnja, nego u periodu od rujna i listopada. Također su usporedili djelovanje propolina G, tajvanskog propolisa i brazilskog propolisa na oksidacijsko oštećenje kortikalnih neurona štakora te su uvidjeli da propolin G i tajvanski propolis imaju jači neuroprotektivni učinak od brazilskog propolisa. Naglasimo da se iz ovog istraživanja, osim neuroprotektivnog i antitumorskog djelovanja propolisa, vidi i važnost u periodu i mjestu sakupljanja propolisa, zbog promjene njegovog sastava ovisno o godišnjem dobu i geografskoj zoni.

Nakajima i sur. (2007) su na retinalnim ganglijskim stranicama (RGC-5, linija ganglijskih stanica transformirana E1A virusom) u uvjetima oksidacijskog stresa *in vitro* pokazali neuroprotektivni te paralelno antioksidacijski učinak vodene otopine brazilskog zelenog propolisa i njegovih glavnih sastavnica: derivata kafeoil-kvinične kiseline (3,4-di-*O*-kafeoilkvinična kiselina, 3,5-di-*O*-kafeoilkvinična kiselina, klorogenična kiselina) i derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska kiselina, artepilin C, drupanin, baharin). Neurotoksični učinak izazvali su primjenjujući l-butionin-(*S,R*)-sulfoksimin (BSO) koji smanjuje razinu unutarstaničnog glutationa. Koncentracije propolisa i derivata kafeoil-kvinične kiseline (bez derivata cimetne kiseline) koje su snižavale razinu oksidacijskog stresa na retinalnim ganglijskim stanicama, također su bile učinkovite u inhibiciji lipidne peroksidacije na homogenatima mišjih stanica prednjeg mozga. Zaključili su da vodena otopina propolisa i derivati kafeoil-kvinične kiseline uzrokuju neuroprotektivne učinke kroz antioksidacijsku aktivnost. Opet možemo usporedbom našeg rada primijetiti razlike u ekstraktu (vodeni naspram našeg alkoholnog), sastavu (brazilski propolis naspram hrvatskog), induktorima oksidacijskog oštećenja te staničnoj liniji na kojoj su testirali (retinalne ganglijske stanice RGC-5 naspram neurona P19). Naime, brazilski propolis u svom sastavu ima većinom masne i fenolne kiseline te njihove estere, substituirane fenolne estere, flavonoide (flavone, flavonone, flavonole, dihidroflavonole, halkone), terpene, β-steroide, aromatske aldehide i alkohole i derivate seskviterpena, naftalena i stilbena, te je moguće da su upravo razlike u sastavu između brazilskog i našeg propolisa odgovorne za opažene razlike u djelovanju (Aga i

sur., 1994). Također, kao što je već istaknuto, citotoksični učinak flavonoida može varirati ovisno o staničnoj liniji i primijenjenoj koncentraciji (Wätjen i sur., 2005; Durgo i sur.,2009).

Osim antioksidacijskog, opisani su i drugi mehanizmi kojima propolis ostvaruje svoje neuroprotektivno djelovanje. Tako su Chen i sur. (2008) pokazali neuroprotektivno djelovanje vodene otopine kineskog propolisa te ukazali na potencijalnu preventivnu primjenu kod Alzheimerove bolesti i ostalih neurodegenerativnih poremećaja. Istraživanje su provodili *in vivo* te su miševima inducirali poremećaj učenja i pamćenja skopolaminom koji djeluje na povećanu aktivnost acetilkolinesteraze. Acetilkolin je jedan od najbitnijih neurotransmitera koji sudjeluje u pamćenju, a acetilkolinesteraza blokira djelatnost acetilkolina te su u zdravom mozgu ova dva sustava u ravnoteži. Međutim, ako je aktivnost acetilkolinesteraze prevelika, posljedica je amnezija. Nakon obrade s vodenom otopinom propolisa utvrdili su smanjenje poremećaja pamćenja te smanjenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze u kori velikog mozga i hipokampusu. Ovi rezultati pokazuju da kineski propolis može pripomoći u liječenju amnezije kroz inhibiciju aktivnosti acetilkolinesteraze u hipokampusu.

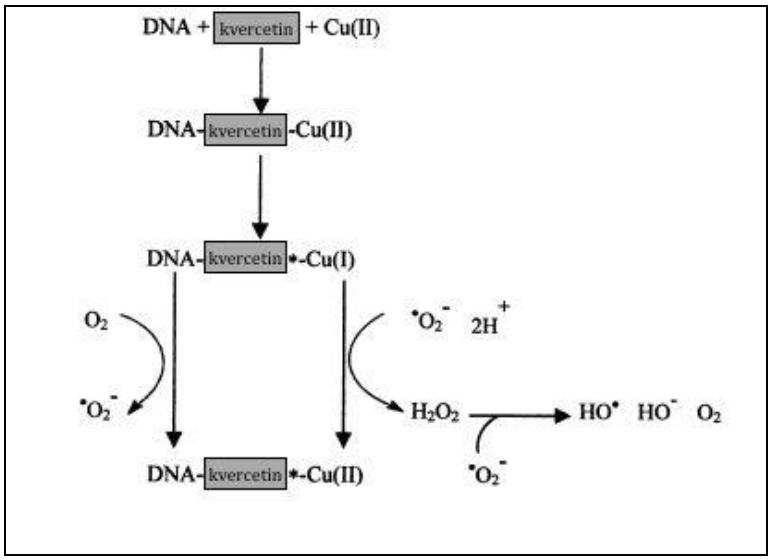
Ilhan i sur. (2004) su pokazali neuroprotektivno djelovanje fenilnog estera kafeinske kiseline, komponente propolisa, na neurone oštećene pentilenetetrazolom (PTZ). PTZ se koristi za testiranje antiepileptičnih lijekova jer uzrokuje višestruko okidanje živčanih impulsa i smanjenje refraktornog perioda. Uz posljedicu epileptičinih napada, zna se i da PTZ povećava produkciju RKV-a te lipidnu peroksidaciju. Fenilni ester kafeinske kiseline u ovom radu opet je pokazao svoje antioksidacijsko svojstvo, jer je utvrđeno smanjenje proizvodnje RKV-a u središnjem živčanom sustavu uzrokovano pentilenetetrazolom.

Tavares i sur. (2006) su istraživali mutagene i antimutagene učinke propolisa na stanicama jajnika kineskog hrčka. Analizirali su učestalost kromosomskih aberacija i mjerili su mitotički indeks. Uočili su da propolis u visokim koncentracijama povećava frekvenciju kromosomskih aberacija, dok s druge strane pri niskim koncentracijama smanjuje štetu na kromosomima uzrokovanu kemoterapeutikom doksorubicinom. Zaključili su da propolis pokazuje svojstva „Janus“ čestice, jer posjeduje genotoksična svojstva pri visokim koncetracijama, dok se pri niskim koncentracijama ponaša kemopreventivno na mutageno oštećenje doksorubicinom. Također su pretpostavili da su za ovakvo ponašanje vrlo vjerojatno odgovorni flavonoidi, koji iskazuju svoja anti- odnosno pro-oksidacijska svojstva ovisno o koncentraciji.

U kontekstu prooksidacijskog djelovanja polifenola, treba istaknuti da većina ovih biljnih derivata inducira staničnu smrt aktivacijom apoptoze, inhibicijom anti-apoptotičkih puteva, te blokiranjem stanične prolirefacije i aktivnosti rada brojnih proteina uključenih u

rast tumorskog tkiva (Chahar i sur., 2011; Raffoul i sur., 2012). Hadi i sur. (2003) su predložili da je upravo prooksidacijska aktivnost bitna pri antitumorskoj aktivnosti i induciranju apoptoze te da uključuje mobilizaciju iona bakra čije su serumske, tkivne i unutarstanične koncentracije povišene u različitim malignim oboljenjima (Linder i sur, 2012). Hadi i sur. (2007) su pokazali da se biljni polifenoli mogu vezati za DNA i $Cu^{2+}$ i formirati tercijarni kompleks. Potom, redoks reakcijom između polifenola i $Cu^{2+}$ u tercijarnom kompleksu dolazi do redukcije $Cu^{2+}$ u $Cu^{+}$, koji onda putem Haber-Weissove reakcije može generirati RKV molekule. Na limfocitima su potvrdili kako je polifenolni-$Cu^{2+}$ kompleks sposoban uzrokovati oštećenje DNA. U njihovom istraživanju su i brojni drugi biljni polifenoli (taninska kiselina i galna kiselina, kurkumin, galokatehini i resveratrol) uzrokovali oksidacijsko oštećenje izolirane plazmidne DNA, bez i u prisutvu prijelaznog metala bakra. Zheng i sur. (2006) pokazali su da se resveratrol i njegovi sintetički analozi 3,3,4'-trihidroksi-*trans*-stilben, 3,4-dihodroksi-*trans*-stilben, i 3,4,5-trihidroksil-*trans*-stilben koji su inače poznati kao antioksidansi, mogu transformirati u prooksidanse u prisustvu $Cu^{2+}$ koji je usko vezan za bazu gvanin, te uzrokovati oksidacijsko oštećenja DNA molekule. Ahmad i sur. (2000) pokazali su da polifenoli, kao što su kvercetin (sastavnica propolisa) i stilben resveratrol, ne samo da vežu kromatinski bakar nego dodatno i kataliziraju njegovu redoks reakciju. Ovo istraživanje možemo povezati s našim, jer smo također dobili prooksidacijski učinak propolisa u prisutnosti iona bakra.

Za flavonoid kvercetin predložen je mehanizam koji uključuje formiranje već spomenutog tercijarnog kompleksa DNA-kvercetin-Cu(II). Redoks reakcijom u tercijarnom kompleksu dolazi do redukcije Cu(II) u Cu(I), koji potom ulazi u Fentonovu reakciju generirajući slobodne kisikove vrste (Rahman i sur., 1989) (Slika 11).




**Slika 11.** Uključenost tercijarnog kompleksa kojeg čine kvercetin, DNA i Cu(II)/Cu(I) u proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta. Model predložili Rahman i sur. (1989).

U kontekstu antioksidacijskog i prooksidacijskog djelovanja, spomenimo još i askorbinsku kiselinu koja se kao esencijalan mikronutrijent smatra jednim od najuspješnijih antioksidansa u živom organizmu. Međutim, također može imati i prooksidacijski učinak blizu mjesta na DNA molekuli gdje je smješten bakar (Wang, 1989). Relativno visoke koncentracije askorbinske kiseline mogu inducirati apoptozu u različitim tumorskim linijama. Zatim, dokazano je da mogu inducirati staničnu smrt, fragmentaciju jezgre te unutarstanično cijepanje DNA molekule u staničnim linijama humane mijeloidne leukemije. Sakagami i sur. (1997) pokazali su da je pro-apoptotska aktivnost askorbinske kiseline povezana s njenom prooksidacijskom funkcijom te je inhibirana katalazom, antioksidansima kao što su *N*-acetilcistein i GSH, manjkom kalcija i željeza, ali stimulirana hidrogen peroksidom, te helatorima bakra i željeza.

Prateći poveznicu između polifenolnog antitumorskog i prooksidacijskog djelovanja, naišli smo na mnoštvo radova koji spominju da je za ovu aktivnost ključno prisutvo metala bakra. Lu i sur. (2011) su ispitujući antitumorsku aktivnost kurkumina (polifenola izoliranog iz biljke *Curcuma longa*) pokazali da u humanim leukemijskim stanicama K562/A02 uzrokuje DNA oštećenja, smanjuje preživljenje i inducira apoptozu, a u prisutnosti bakra povećava se razina oksidacijskog stresa, odnosno produkcija RKV molekula te se pojačava proapoptotski učinak. Izuta i sur. (2008) istraživali su učinke alkoholnog ekstrakta brazilskog crvenog propolisa i CAPE na stanice karcinoma dojke MCF-7 i humane fibroblaste. Pokazali su da brazilski crveni propolis značajno smanjuje preživljenje MCF-7 stanica uzrokujući

poremećaj funkcije mitohondrija, aktivaciju kaspaze-3 te fragmentaciju DNA; dok na fibroblaste nije imao učinka.

U našem istraživanju istražili smo učinak alkoholnog ekstrakta hrvatskog propolisa na aktivnost kaspaza-3/7 te uvidjeli da propolis posjeduje proapoptotski učinak u kombinaciji s bakrom jer je u koncentraciji od 5 μg/mL značajno povećao njihovu aktivnost. Također, alkoholni ekstrakt propolisa u kombinaciji s 1 mM $CuSO_4$ dodatno je povećao ekspresiju *p53* na razini mRNA. Ekspresija transkripcijskog faktora *p53* značajno se povećava kao odgovor na različite oblike staničnog stresa, te dovodi do aktivacije brojnih gena koji promoviraju staničnu smrt. Također, postoje dokazi da *p53* može i izravno, tj. neovisno o transkripcijskoj aktivnosti, inducirati permeabilnost mitohondrija i potaknuti apoptozu (Nair i sur., 2006). Dosadašnja istraživanja upućuju na to da upravo *p53* ima ključnu ulogu u nastanku neurodegenerativnih bolesti. Naime, nakon aktivacije *p53* zbog oštećenja DNA ili oksidacijskog stresa, može doći do aktivacije kaspaze-3 i inicijacije apoptoze (Chatoo i sur., 2011). Također, treba istaknuti da na prooksidacijske uvjete stanice reagiraju inicijacijom transkripcije brojnih antioksidacijskih gena aktivacijom transkripcijskog faktora Nrf2. Međutim, ako je stanje oksidacijskog stresa izazvalo oštećenja DNA molekule, pokreće se drugačiji odgovor preko aktivacije *p53* i posljedično odumiranja apoptozom (Faranio i sur. 2006). U sukladu s navedenim, vrlo je vjerojatno da je u našem istraživanju oštećenje DNA prethodilo porastu ekspresije *p53*, što je imalo značajnu ulogu u pokretanju apoptoze.

Slični rezultati opisani su i na tumorskim linijama. Vidyla i sur. (2010) su pokazali da kvercetin, jedan od sastojaka propolisa, pokazuje citotoksične učinke na tumorskim HeLa stanicama ovisno o dodanoj koncentraciji, zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi i uzrokuje mitohondrijski posredovanu apoptozu *p53* ovisnim mehanizmom. Nadalje, Xuan i sur. (2014) su pokazali citotoksični učinak alkoholnog ekstrakta kineskog propolisa na stanicama humanog karcinoma dojke (MCF-7 i MDA-MB-231 linije), kao i povećanu ekspresiju gena *p53* te povećanje produkcije RKV molekula. Dodatno, potvrdili su i povećanje ekspresije nuklearnog faktora–κB p65 (NF-κB p65), smanjenje ekspresije aneksina A7 (ANXA), te smanjenje mitohondrijskog potencijala. Istovremeno, treba istaknuti da u istom istraživanju alkoholni ekstrakt kineskog propolisa nije prouzrokovao toksične učinke na humane endotelne stanice pupčane vene (HUVEC stanice), što dodatno potvrđuje da se učinak propolisa može razlikovati na različitim staničnim modelima.

Rezultati drugih istraživanja pokazuju da je i antiapoptotsko djelovanje polifenolnih komponenti propolisa povezano s promjenama u ekspresiji p53. Gao i sur. (2008) su pokazali da pinocembrin, najobilniji flavonoid u kineskom propolisu, posjeduje neuroprotektivne

učinke na neurone SH-SY5Y oštećene glutamatom. Glutamat je glavna eksitacijska aminokiselina u mozgu sisavaca, djeluje preko N-metil-D-aspartat receptora (NMDA), povećava unos kalcija u stanicu te je u visokim koncentracijama toksičan za neurone. Obrada pinocembrinom je povećala preživljenje neurona, inhibirala oslobađanje laktat dehidrogenaze i citokroma *c* iz mitohondrija te smanjila ekspresiju gena p53.

Za razliku od indukcije ekspresije p53, alkoholni ekstrakt propolisa je u prisutnosti bakra značajno smanjio ekspresiju c-fos u neuronima P19. Protein c-fos je dio transkripcijskog faktora aktivator proteina-1 (AP-1) koji je uključen u kontrolu brojnih staničnih procesa, pa tako i apoptoze. AP-1 je grupa dimeričkih proteina koja se sastoji od podskupina: Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K i Nrl), i ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2). Protein c-Fos tvori heterodimere s proteinima Jun porodice, a nastali AP-1 kompleks regulira transkripciju vezanjem na AP-1 slijed prisutan u mnogim staničnim genima (Shaulin i Karin, 2002; Zhang i sur. 2002). Porast ekspresije c-fos vrlo je često izazvan porastom RKV molekula i stanjem oksidacijskog stresa, pa je u sukladu s našim istraživanjem, pokazan i na stanicama koje su obrađene visokim koncentracijama bakra (Mattie i sur. 2008). Gillardon i sur. (1996) su pokazali da uz povećanu ekspresiju c-fos gena, i promijenjenu ekspresiju anti-apoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-X te pro-apoptotskog proteina Bax, djeluju na fragmentaciju DNA i indukciju apoptoze u ishemijom oštećenim područjima talamusa i kore mozga štakora. Također, pokazano je da nakupljanje RKV-a smanjuje ekspresiju gena *Bcl-2* i povisuje ekspresiju gena *Bax* (Choi i sur., 2003; Zhou i sur., 2010).

Iako naši rezultati pokazuju učinak na smanjenje ekspresije c-fos samo u uvjetima oksidacijskog stresa, u jednom je istraživanju pokazan inhibitorni učinak propolisa na ekspresiju c-fos u hipokampusu miševa akutno obrađenih alkoholnim ekstraktom propolisa (Lee i sur. 2013). I rezultati drugih istraživanja upućuju na to da c-fos ima važnu ulogu u preživljenju neurona (Zhang i sur. 2002) te da je apoptoza neurona povezana sa smanjenjem ekspresije c-fos (Yuan i sur. 2009).

Zaključno, naši su rezultati pokazali da propolis u prisutnosti visokih koncentracija iona bakra može značajno smanjiti preživljenje neurona P19. Jednim dijelom toksični učinak alkoholnog ekstrakta propolisa može se pripisati njegovom prooksidacijskom potencijalu u prisutnosti bakra, kao i aktivaciji kaspaza tj. inicijaciji apoptoze i modulaciji ekspresije gena koji su povezani s apoptozom i oksidacijskim stresom kao što su p53 i c-fos. Iako dosadašnja istraživanja većinom idu u prilog neuroprotektivnog djelovanja propolisa u uvjetima oksidacijskog stresa zbog njegovih antioksidacijskih svojstava, naši rezultati upućuju i na

mogućnost neželjenog, neurotoksičnog djelovanja propolisa u prisutnosti iona bakra. Budući da se porast koncentracije ovog prijelaznog metala javlja u serumu i mozgu pacijenata oboljelih od različitih neurodgenerativnih poremećaja, primjena propolisa u ovakvih pacijenata mogla bi imati neželjene posljedice. Također, za potvrđivanje ovih rezultata te potpuno razjašnjavanje mehanizama prooksidacijskog i neurotoksičnog djelovanja propolisa potrebno je provesti daljnja istraživanja s vodenom otopinom propolisa, proširiti istraživanja i na animalnim modelima, te pokušati odrediti specifičnu sastavnice propolisa koje imaju ključnu ulogu u opaženim učincima.

# 6. ZAKLJUČAK

Na temelju svih rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Tretman bakrovim (II)-sulfatom u ovisnosti o promijenjenoj koncentraciji smanjuje preživljenje neurona P19.
- Izlaganjem kulture neurona P19 bakrovom sulfatu koncentracije 1 mM dolazi do porasta proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, te povećanja ekspresije gena c-fos što upućuje na stanje oksidacijskog stresa u neuronima obrađenim visokim koncentracijama iona bakra .
- Obrada s alkoholnim ekstraktom propolisa samo u vrlo visokim koncentracija od 50, 70 i 100 μg/mL smanjuje preživljenje neurona P19.
- Istovremenim tretmanom s 1 mM bakar (II) sulfatom (1 mM) i alkoholnim ekstraktom propolisa koncentracije 1, 2, 5, 10, 20, 50, 70, 100 μg/mL kroz 24 sata, primjenom testa MTT i metodom bojanja tripanskim modrilom, utvrdili smo da već i u vrlo niskim, *per se* netoksičnim koncentracijama, alkoholni ekstrakt propolisa dodatno smanjuje preživljenje neurona P19.
- Učinak alkoholnog ekstrakta propolisa u prisutnosti bakra na pokretanje programirane stanične smrti ispitali smo mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7 te na molekularnom nivou mjerenjem ekspresije gena *p53*. Propolis je u kombinaciji s bakrom u koncentraciji od 5 μg/mL povećao aktivnost kaspaza, a u koncentraciji od 2 i 5 μg/mL inducirao ekspresiju gena *p53*, što upućuje na njegovo proapoptotsko djelovanje.
- Alkoholni ekstrakt propolisa koncentracije 5 μg/mL dodatno je povećao stvaranje RKV molekula u prisutnosti 1 mM $CuSO_4$. Propolis primijenjen samostalno u istoj koncentraciji nije povećao RKV-a što ukazuje na njegovo specifično prooksidacijsko djelovanje u prisutnosti iona metala.
- Na molekularnoj razini, alkoholni ekstrakt propolisa koncentracije 5 μg/mL je smanjio bakrom izazvan porast u ekspresiji mRNA c-fos.
- Dobiveni rezultati upućuju na neurotoksično djelovanje alkoholnog ekstrakt propolisa u prisutnosti visokih koncentracija iona bakra. Za dodatno razjašnjavanje mehanizama djelovanja propolisa potrebna su daljnja istraživanja.

# 7. POPIS LITERATURE

**Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M., Nakajima S.H. (1994):** Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechn. Biochem.* **58:** 945–946.

**Ahmad A., Asad S. F., Singh S., Hadi S. M. (2000):** DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett.* **154:** 29-37.

**Akopyan Z. M., Shakaryan G. A., Danielyan S. G. (1970):** Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. *Biol. Zh. Armeniya.* **23:** 70-4.

**Amoros M., Lurton F., Bowtie J., Girre L., Sauvager F., Cormier M. (1994):** Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut- 2 enyl caffeate. *J. Nat. Prod.* **57:** 644-647.

**Arnal N., de Alaniz M. J. D., Marra C. A. (2012):** Cytotoxic effects of copper overload on human-derived lung and liver cells in culture. *Biochem. Biophys. Acta.* **1820:** 931–939.

**Ayeres D. C., Marcucci M. C., Giorgio S. (2007):** Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102:** 215-220.

**Benković V., Horvat Knežević A., Đikić D., Lisičić D., Oršolić N., Bašić I., Kopjar N. (2009):** Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gama-irradiated mice. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **60:** 129-138.

**Bernham K. J., Masters C. L., Bush A. I. (2004):** Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Rev. Drug Discovery.* **3:** 205-214.

**Bredesen D. E., Rao R. V., Mehlen P. (2006):** Cell death in the nervous system. *Nature.* **444:** 796-802.

**Bremner I. (1998):** Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* **67:** 1069-1073.

**Chahar M. K., Sharma N., Dobhal M. P., Joshi Y. C. (2011):** Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* **5:** 1-12.

**Chatoo W., Abdouh M., Bernier G. (2011):** p53 pro-oxidant activity in the central nervous system: implication in aging and neurodegenerative diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **6:** 1729-1737.

**Chen H., Tran J. T., Anderson R. E., Mandal M. N. (2012):** Caffeic acid phenethyl ester protects 661W cells from H2O2-mediated cell death and enhances electroretinography response in dim-reared albino rats. *Mol. Vis.* **18:** 1325-38.

**Chen J., Long Y., Hang M., Wang T., Chen Q., Wang R. (2008):** Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behavior*. **90:** 441-446.

**Chen X., Lan X., Mo S., Qin J., Li W., Liu P. (2009):** p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379:** 944–948.

**Choi Y., Kang Y., Park J. H. Y., LeeY., Choi J., Kang Y. (2003):** Polyphenolic Flavonoids Differ in Their Antiapoptotic Efficacy in Hydrogen Peroxide–Treated Human Vascular Endothelial Cells. *J. Nutr.* **133:** 985–991.

**Chow C. K. (1979):** Nutritional evidence on cellular antioxidant defense system. *Am. J. Clin. Nutr*. **32:** 1066-1081.

**Deibel M. A., Ehmann W. D., Markesbery W. R. (1996):** Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J. Neurosci.* **143:** 137-142.

**Durgo K., Vuković L., Rusak G., Osmak M., Franekić Čolić J. (2009):** Cytotoxic and apoptotic effect of structurally similar flavonoids on parental and drug-resistant cells of a human cervical carcinoma. *Food Technol. Biotechnol.* **47:** 356–363.

**Eskici G., Axelsen P. H. (2012):** Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. **51:** 6289-6311.

**Evans R.M. (1988):** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240:** 889-895.

**Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Pierantoni M.G., Napolitano M., Russo T., Cimino F. (2006):** p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J. Biol. Chem.* **52:** 39776-39784.

**Gaetke L. M., Chow C. K. (2003):** Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189:** 147–163.

**Gao M., Zhang W., Liu Q., Hu J., Liu G., Du G. (2008):** Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of *bax*/*bcl-2* ratio. *Eur. J. Pharmacol.* **591:** 73-79.

**Ghisalberti E. L. (1979):** Propolis: A review. *Bee World.* **60:** 59-84.

**Gillardon F., Lenz C., Waschke K. F., Krajewski S., Reed J. C., Zimmermann M., Kuschinsky W. (1996):** Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Mol. Brain Res.* **40:** 254-260.

**Gorell J. M., Johnson C. C., Rybicki B. A., Peterson E. L., Kortsha G. X., Brown G. G., Richardson R. J. (1999):** Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* **20:** 239–247.

**Greenaway W., Scasbroock T., Whatley F. R. (1990):** The composition and plant origins of propolis: A report of work at Oxford. *Bee World.* **71:** 107-108.

**Ha J.,Choi H. S., Lee Y., Lee Z. H., Kim H. H. (2009):** Caffeic acid phenethyl ester inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF kappaB and downregulating NFATc1 and c-Fos. *Int Immunopharmacol.* **9:** 774-80.

**Hadi S. M., Asad S. F., Singh S., Ahmad A. (2000):** Putative mechanism for anticancer and apoptosis indusing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB life.* **50:** 1-5

**Hadi S. M., Bhat S. H., Azmi A. S., Hanif S., Shamin U., Ullah M. F. (2007):** Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Sem. Cancer Biol.* **17:** 370-6.

**Hainaut P., Rolley N., Davies M., Milner J. (1995):** Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Onkogene.* **10:** 27-32.

**Hengartner M.O. (2000):** The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407:** 770-776.

**Hordyjewska A., Popiołek L., Kocot J. (2014):** The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals.* **4:** 611-621.

**Huang W. J., Huang C. H., Wu C. L., Lin J. K., Chen Y. W., Lin C. L., Chuang S. E., Huang C. Y., Chen C. N. (2007):** Propolin G, a prenylflavanone, isolated from Taiwanese propolis, induces caspase-dependent apoptosis in brain cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **55:** 7366-76.

**Ilhan A., Iraz M., Gurel A., Armutcu F., Akyol O. (2004):** Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylenetetrazol-induced seizures in mice. *Neurochem. Res.* **29:** 2287-92.

**Inokuchi Y., Shimazawa M., Nakajima Y., Suemori S., Mishima S., Hara H. (2006):** Brazilian Green Propolis Protects against Retinal Damage In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complem. and Alt. Med.* **3:** 71-77.

**Ishihara I., Minami Y., Nishizaki T., Matsuoka T., Yamamura H. (2000):** Activation of calpain precedes morphological alterations during hydrogen peroxide-induced apoptosis in neuronally differentiated mouse embryonal carcinoma P19 cell line. *Neurosci. Lett.* **279:** 97-100.

**Ishikara M., Naoi K., Hashita M., Itoh Y., Suzui M. (2009):** Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* **22:** 349-354.

**Jazvinšćak Jembrek M., Vlainić J., Radovanić V., Erhardt J., Oršolić N. (2014):** Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and

crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *Biometals.* **27:** 1303-1322.

**Jazvinšćak Jembrek M., Vuković L., Puhović J., Erhardt J., Oršolić N. (2012):** Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J. Mol. Neurosci.* **47:** 286–299.

**Jones-Villeneuve E. M. V., Rudnicki M. A., Harris J. F., McBurney M. W. (1983):** Retinoic Acid-Induced Neural Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* **3:** 2271-2279.

**Kadiiska, M.B., Hanna, P.M., Jordan, S.J., Mason, R.P., (1993):** Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E- and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.* **44:** 222-227.

**Kakkar V., Kaur I. P. (2011):** Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioural, biochemical and histopathological alterations in mice brain. *Food Chem. Toxicol.* **49:2906-2913.**

**Kamiya T., Nishihara H., Hara H., Adachi T. (2012):** Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *J Agric Food Chem.* **60: 11065-70.**

**Kedzia A. (1986):** Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria. *Herba Polonica.* **32: 53-8.**

**Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallef M. J., Kurimoto M., Mito K. (1998):** Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention.* **22:506-15.**

**Korish A. A., Arafa M. M. (2011):** Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *Branz. J. Infect. Dis.* **15:332-338.**

**Lee M.-S., Kim Y.H., Park W.-S., Ahn W.G., Park O.K., Kwon S.-H., Morita K., Shim I., Her S. (2013):** Novel Antidepressant-Like Activity of Propolis Extract Mediated by

Enhanced Glucocorticoid Receptor Function in the Hippocampus. *Evidence-Based Complem and Alt Med.* Volume **2013,** Article ID 217853

**Liang Q., Zhou B. (2007):** Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol. Biol. Cell.* **18:** 4741-4749

**Linder M. C. (2012):** The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutat Res.* **733:** 83-91

**Lofty M. (2006):** Biological Activity of Bee Propolis in health and Disease. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **7:** 22-31.

**Lu J. J., Cai Y. J., Ding J. (2012):** The short-time treatment with curcumin sufficiently decreases cell viability, induces apoptosis and copper enhances these effects in multidrug-resistant K562/A02 cells. *Mol and Cell Biochem.* **360:** 253-260.

**Manto M. (2014):** Abnormal copper homeostasis: mechanisms and roles in neurodegeneration. *Toxics.* **2:** 327-345.

**Marquez N., Sancho R., Macho A., Calzado M. A., Fiebich B. L., Muñoz E. (2004):** Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-κB transcription factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther. (JPET).* **308:** 993-1001.

**Mattie M.D., McElwee M.K., Freedman J.H. (2008):** Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J. Mol. Biol.* **383:** 1008–1018.

**Mattson M. P. (2000):** Apoptosis in neurodegenerative disorders**.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1:** 120-129.

**McBurney M. W. (1993):** P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* **37:** 135-140**.**

**McBurney M. W., Reuhl K. R., Ally A. I., Nasipuri S., Bell J. C., Craig J. (1988):** Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* **8:** 1063-1073.

**McBurney M. W., Rogers B. J. (1982):** Isolation of male murine embryonal carcinoma cells and their chromosome replication pattems. *Dev. Biol.* **89:** 503-508.

**Nair V.D., McNaught K.S., González-Maeso J., Sealfon S.C., Olanow C.W. (2006):** p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition. *J. Biol. Chem.* **281:** 39550-39560.

**Nakajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. (2009):** Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. *Phytother. Res.* **23:** 1431-8.

**Noelker C., Bacher M., Gocke P., Wei X., Klockgether T., Du Y., Dodel R. (2005):** The flavanoide caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* **383:** 39-43.

**Oršolić N., Bašić I. (2007):** Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. *Rec. Prog. Med. Plant.* **17:** 55–113.

**Oršolić N., Štajcar D., Bašić I. (2008):** Propolis and its flavonoid compounds cause cytotoxicity on human urinary bladder transitional cell carcinoma in primary culture. *Periodicum Biologorum.* **111:** 113-121**.**

**Ostrakovitch E. A., Cherian M. G. (2005):** Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis.* **10:** 111-121**.**

**Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M. T. (2001):** Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses.* **44:** 375-8.

**Paris I., Perez-Pastene C., Couve E., Caviedes P., Ledoux S., Segura- Aguilar J. (2009):** Copper dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **284:** 13306–13315

**Park E. H., Kahng J. H. (1999):** Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm. Res.* **22:** 554-8.

**Rahman A., Shahabuddin A., Hadi S. M., Parish J. H., Ainley K. (1989):** Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxgen free radicals. *Carcinogenesis.* **10:** 1833-9

**Sakagami S., Satoh K. (1997):** Modulating factors of radical intensity and cytotoxic action of ascorbate. *Anticancer Res.* **17:** 3513-20

**Schmidt J. V., Brugge J. S., Nelson W. J. (1992):** pp60src tyrosine kinase modulates P19 embryonal carcinoma cell fate by inhibiting neuronal but not epithelial differentiation**.** *J. Cell BioI.* **116:** 1019-1033.

**Serkedjieva J., Manolova N., Bankova V. (1997):** Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acid). *J. Nat. Prod***.** **55:** 294-302.

**Shaulian E., Karin M. (2002):** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell. Biol.* **4:**131–136

**Sheline C. T., Choi E. H., Kim-Han J. S., Dugan L. L., Choi D. W. (2002):** Cofactors of mitochondrial enzymes attenuate copper-induced death in vitro and in vivo. *Ann Neurol.* **52:**195-204**.**

**Shimazawa M., Chikamatsu S., Morimoto N., Mishima S., Nagai H., Hara H. (2005):** Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. *Evid Based Complement Alt Med.* **2:** 201-207.

**Simonian N. A., Coyle J. T. (1996):** Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36:** 83-106.

**Sobočanec S. (2006a):** Učinak propolisa na oksidacijski/antioksidacijski sustav CBA u miša. *PhD Thesis.* Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

**Sobocanec S., Sverko V., Balog T., Sarić A., Rusak G., Likić S., Kusić B., Katalinić V., Radić S., Marotti T. (2006b):** Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J. Agric. Food. Chem.* **54:** 8018-8026.

**Squitti R., Polimanti R. (2013):** Copper phenotype in Alzheimer's disease: Dissecting the pathway. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2:** 46–56.

**Steckley D., Karajgikar M., Dale L. B., Fuerth B., Swan P., Drummond-Main C., Poulter M. O., Ferguson S. G., Strasser A., Sean P. Cregan S. P. (2007):** Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced bax activation and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **27:** 12989-12999.

**Steinberg D. (1997):** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272:** 20963-20966.

**Steinberg D., Kaine G., Gedalia I. (1996):** Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am. J. Dentistry*. **9:** 236-239.

**Stern B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T. C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T. (2007):** Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health Part B.* **10:** 157–222.

**Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D. (2003):** Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* **57:** 386–398.

**Tavares D. C., Mazzaron Barcelos G. R., Silva L. F., Chacon Tonin C. C., Bastos J. K. (2006):** Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Vitro.* **20:** 1154-1158.

**Tikhonov A. I., Mamontova I. N. S. (1987):** Production and study of a lyophilized phenolic polysaccharide preparation from propolis. *Farmatsevtichnii Zhurnal.* **3:** 67-68.

**Tsai Y.C., Wang Y.H., Liou C.C., Lin Y.C., Huang H., Liu Y.C. (2012):** Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: its mechanism and implication about antioxidant capacity. *Chem. Res. Toxicol.* **25:** 191-196.

**Ullah M. F., Ahmad A., Khan H. Y., Zubair H., Sarkar F. H., Hadi S. M. (2013):** The prooxidant action of dietary antioxidants leading to cellular DNA breakage and anticancer effects: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cell. Biochem. Biophys.* **67:** 431-8.

**Ulrich H. i Majumder P. (2006):** Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell. Prolif.* **39:** 281-300.

**VanLandingham J. W., Fitch C. A., Levenson C. W. (2002):** Zinc inhibits the nuclear translocation of the tumor suppressor protein p53 and protects cultured human neurons from copper-induced neurotoxicity. *Neuromol. Med.* **1:** 171-182.

**Vauzour D., Vafeiadou K., Rodriguez-Mateos A., Rendeiro C., Spencer J. P. E. (2008):** The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes. Nutr.* **3:** 115-126.

**Verhaegh G. W., Richard M. J., Hainaut P. (1997):** Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol. Cell. Biol.* **17:** 5699-706.

**Volpi N. (2004):** Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis.* **25:** 1872-1878

**Waggoner D. J., Bartnikas T. B., Gitlin J. D. (1999):** The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* **6:** 221-230.

**Wang L., Espinoza H. M., Gallagher E. P. (2013):** Brief exposure to copper induces apoptosis and alters mediators of olfactory signal transduction in coho salmon. *Chemosphere.* **93:** 2639-2643

**Wang Y., Ness V. B. (1989):** Site specific cleavage of supercoiled DNA byascorbate/Cu(II). *Nucleic Acids Res.* **17:** 6951-26.

**Wätjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampköter A., Tran-Thi Q., Proksch P., Kahl R. (2005):** Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* **135:** 525-531.

**Wei X., Zhao L., Ma Z., Holtzman D. M., Yan C., Dodel R. C., Hampel H., Oertel W., Farlow M. R., Du Y.(2004):** Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic–ischaemic brain injury. *J. Neurol.* **127:** 2629–2635.

**White A. R., Multhaup G., Maher F., Bellingham S., Camakaris J., Zheng H., Bush A. I., Beyreuther K., Masters C. L., Roberto Cappai R. (1999):** The Alzheimer's Disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J. Neurosci.* **19:** 9170-9179.

**Wolfe J. T., Ross D., Cohen G. M. (1994):** A role of metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett.* **352:** 59-62.

**Xilouri M., Papazafiri P. (2006):** Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons. *Eur. J. Neurosci.* **23:** 43-54.

**Xu W., Chi L., Row B. W., Xu R., Ke Y., Xu B., Luo C., Kheirandish L., Gozal D., Liu R. (2004):** Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience.* **126:** 313-323.

**Xuan H., Li Z., Yan H., Sang Q., Wang K., He Q., Wang Y., Hu F. (2014):** Antitumor activity of chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complem and Alt Med.* **2014** Article ID 280120

**Ying B., Yang T., Song X., Hu X., Fan H., Lu X., Chen L., Cheng D., Wang T., Liu D., Xu D., Wei Y., Wen F. (2009):** Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Mol Biol Rep.* **36:** 1825-1832.

**Yu S., Levi L., Siegel R., Noy N. (2012):** Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPARβ/δ). *J Biol Chem.* **287:** 42195-42205.

**Yu W. R., Jiang H., Wang J., Xie J. X. (2008):** Copper (Cu2+) induces degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system of rats. *Neurosci. Bull.* **24:** 73–78.

**Yuan Z., Gong S., Luo J., Zheng Z., Song B., Ma S., Guo J., Hu C., Thiel G., Vinson C., Hu C.D., Wang Y., Li M. (2009)** Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **9:** 2431-2442.

**Zhang J., Zhang D., McQuade J.S., Behbehani M., Tsien J.Z., Xu M. (2002):** c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat. Genet.* **4:** 416-420.

**Zhang S., Ye J., Dong G. (2010):** Neuroprotective effect of baicalein on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *J. Mol. Neurosci.* **40:** 311-320.

**Zheng L. F., Wei Q. Y., Cai Y. J. (2006):** DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structureactivity relationship. *Free Radic. Biol. Med.* **41:** 1807-1816.

**Zhou L., Zhou X. Z., Zhu X. (2000):** Reactive oxgen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **293:** 982-988.

# Životopis

**Ime i prezime:** Petra Ukić

**Datum i mjesto rođenja:** 21.ožujka 1991. god., Šibenik

**Adresa i telefon:** Put Vodica 8, Tribunj, +385 95 827 69 03

**Obrazovanje:** 2005. – 2009. Gimnazija Antuna Vrančića, Šibenik

2009. – 2011. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, preddiplomski studij eksperimentalne biologije

2011. - 2015. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer: fiziologija i imunologija

**Dosadašnje radno iskustvo:** 2012. – 2013. Praksa na Imunološkom zavodu u Zagrebu

2014. Praksa na Medicinskom fakultetu u Rijeci, Zavod za fiziologiju i imunologiju

2014. - 2015. Rad u manufakturi, tvrtke Lush, u Zagrebu