

# Učinak miricetina, miricitrina i etanolnog ekstrakta propolisa na stanice SH-SY5Y izložene visokim koncentracijama bakra

---

Mick, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:905809>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Katarina Mick

**Učinak miricetina, miricitrina i etanolnog ekstrakta  
propolisa na stanice SH-SY5Y izložene visokim  
koncentracijama bakra**

Diplomski rad

Zagreb, 2020. godine

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Maje Jazvinščak Jembrek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

## **Zahvala**

*Najveće HVALA mojoj dragoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Jazvinščak Jembrek, za predan rad, trud i profesionalnost, za svaku upućenu ohrabrujuću riječ, ogromnu dozu strpljenja i pomoć tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala dr. sc. Juliji Erhardt na suradnji i pomoći prilikom pronalaska mentorstva.*

*Hvala tetama iz referade, gđi Vlatki i gđi Sanjici, za svako ljubazno javljanje na telefon i ekspresno slanje potrebite papirologije.*

*Puno hvala tati i mami na bezuvjetnoj ljubavi i svojoj potpori tijekom školovanja. Hvala za svaki savjet, kritiku, džeparac i plastikicu sa zamrznutom hranom.*

*Hvala Borsi za sve godine smijeha i spoznaju što znači pokraj sebe imati pravog prijatelja.*

*I za kraj, hvala mojoj Bubi zato što me trpi kada sam najluđa, tješi kada sam tužna, svakodnevno puni pozitivnom energijom i iz vlastitog primjera uči kako biti bolja osoba.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINAK MIRICETINA, MIRICITRINA I ETANOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA NA STANICE SH-SY5Y IZLOŽENE VISOKIM KONCENTRACIJAMA BAKRA

Katarina Mick  
Rooseveltove trg 6, Zagreb

Oksidacijski stres (OS) jedan je od glavnih čimbenika u razvoju i progresiji neurodegenerativnih poremećaja. Ioni bakra sudjeluju u procesima proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (RKV-a) i nastanku OS-a sa štetnim djelovanjem na stanice i tkiva. Flavonoidi su prirodni spojevi sa snažnim antioksidacijskim svojstvima, kao i svojstvima keliranja metala te modulacije unutarstaničnih signalnih puteva. Cilj istraživanja bio je utvrditi protektivan učinak odabranih prirodnih spojeva (miricetin, miricitrin, etanolni ekstrakt propolisa i kvercetin) na preživljenje stanica SH-SY5Y i modulaciju signanih puteva kinaza p38 i JNK u uvjetima OS-a izazvanog visokim koncentracijama bakra. Od odabranih prirodnih spojeva samo je flavonoid miricetin pokazao neuroprotektivan učinak u uvjetima jakog oksidacijskog oštećenja izazvanog izlaganjem 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Primijenjen u niskoj koncentraciji (1 µg/ml) miricetin je povećao preživljenje stanica SH-SY5Y, smanjio proizvodnju RKV-a te nastanak apoptotičnih i nekrotičnih promjena. Protektivno djelovanje miricetina je barem djelomično ostvareno aktivacijom kinaza JNK i p38 budući da su selektivni inhibitori ovih kinaza spriječili njegovo neuroprotektivno djelovanje. Miricitrin je pokazao protektivno djelovanje u uvjetima blagog OS-a, ali učinak nije bio posredovan aktivacijom p38 i JNK. Kvercetin nije mijenjao preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti suviška bakra, dok je etanolni ekstrakt propolisa dodatno povećao neurotoksično djelovanje bakra.

(54 stranice, 13 slika, 72 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** oksidacijski stres, flavonoidi, neuroprotekcija, bakar, stanice SH-SY5Y, signalni putevi p38 i JNK

**Voditelj:** dr. sc. Maja Jazvinščak Jembrek, v. znanstv. surad.

**Suvoditelj:** dr. sc. Julija Erhardt, v. predavač

**Ocjenitelji:** dr. sc. Julija Erhardt  
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner  
izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac  
doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević (zamjena)

**Rad prihvaćen: 24. lipnja, 2020.**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECTS OF MYRICETIN, MYRICITRIN AND ETHANOL EXTRACT OF PROPOLIS ON SH-SY5Y CELLS EXPOSED TO HIGH COPPER CONCENTRATIONS**

Katarina Mick  
Rooseveltovo trg 6, Zagreb

Oxidative stress (OS) is one of the major factors in the development and progression of neurodegenerative disorders. Copper ions participate in production processes of reactive oxygen species (ROS) and OS induction with harmful effects on cells and tissues. Flavonoids are natural compounds with strong antioxidative properties, as well as metal chelating properties and ability to modulate intracellular signalling pathways. The aim of this study was to investigate protective effects of selected natural compounds (myricetin, myricitrin, ethanol extract of propolis and quercetin) on the survival of SH-SY5Y cells and modulation of p38 and JNK signalling pathways in OS conditions induced by high copper concentrations. Of all tested natural compounds, only flavonoid myricetin showed neuroprotective effect against severe oxidative injury induced by exposure to 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Applied at low concentration (1 µg/ml), myricetin increased survival of SH-SY5Y cells, reduced ROS generation and prevented appearance of apoptotic and necrotic changes. Protective effect of myricetin was at least partially achieved by activating p38 and JNK signalling pathways as selected inhibitors of these kinases prevented its neuroprotective effect. Myricitrin exhibited protective effect only in mild OS conditions, but the effect was not mediated through p38 and JNK activation. Quercetin did not affect viability of SH-SY5Y cells in the presence of excess copper, whereas ethanol extract of propolis exacerbated neurotoxic effect of copper.

(54 pages, 13 figures, 72 references, original in: Croatian)

**Key words:** oxidative stress, flavonoids, neuroprotection, copper, SH-SY5Y cells, JNK and p38 signalling pathways

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

**Co-supervisor:** dr. Julija Erhardt, Sr. Lect.

**Reviewers:** dr. Julija Erhardt

dr. sc. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof. (replacement)

**Thesis accepted: 24<sup>th</sup> of June, 2020.**

## Popis kratica

<b>DCF</b>	2',7'-diklorofluorescein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	dimetil-sulfoksid
<b>EDTA</b>	etilendiamintetraoctena kiselina
<b>EEP</b>	etanolni ekstrakt propolisa
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>GSH</b>	glutation
<b>GPx</b>	glutation peroksidaza
<b>H<sub>2</sub>DCF-dA</b>	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
<b>MAP kinaze</b>	mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid
<b>OS</b>	oksidacijski stres
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>RJF</b>	relativna jedinica fluorescencije
<b>RKV</b>	reaktivne kisikove vrste
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>SŽS</b>	središnji živčani sustav

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. OKSIDACIJSKI STRES I REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE .....	1
1.2. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAVI .....	2
1.3. ULOGA RKV-A I OKSIDACIJSKOG STRESA U ORGANIZMU .....	3
1.4. OKSIDACIJSKI STRES I NEURODEGENERACIJA .....	4
1.5. BAKAR .....	6
1.6. SIGNALNI PUTOVI MITOGENOM-AKTIVIRANIH PROTEINSKIH (MAP) KINAZA .....	7
1.7. FLAVONOIDI .....	8
1.7.1. Miricetin i miricitrin .....	9
1.7.2. Kvercetin .....	10
1.8. PROPOLIS .....	11
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. MATERIJALI .....	14
3.1.1. Priprema matičnih otopina i pufera .....	15
3.2. METODE .....	16
3.2.1. Pasažiranje i priprema stanica SH-SY5Y za istraživanje .....	16
3.2.2. Tretman stanica SH-SY5Y bakrom i prirodnim spojevima .....	17
3.2.3. Određivanje preživljenja metodom MTT .....	17
3.2.4. Tretiranje stanica bakrom, miricetinom, miricitrinom i etanolnim ekstraktom propolisa uz primjenu inhibitora MAP kinaza .....	18
3.2.5. Bojanje s Hoechst 33342 i propidij jodidom .....	18
3.2.6. Mjerenje razine nakupljanja unutarstaničnih RKV-a .....	19
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	20
4. REZULTATI .....	21
4.1. NEUROTOKSIČNI UČINAK BAKRA NA STANICAMA SH-SY5Y .....	21
4.2. UČINAK MIRICETINA NA NEUROTOKSIČNO DJELOVANJE BAKRA NA STANICAMA SH-SY5Y .....	22
4.3. UČINAK MIRICITRINA NA NEUROTOKSIČNO DJELOVANJE BAKRA NA STANICAMA SH-SY5Y .....	25
4.4. UČINAK KVERCETINA NA NEUROTOKSIČNO DJELOVANJE BAKRA NA STANICAMA SH-SY5Y .....	27
4.5. UČINAK ETANOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA NA NEUROTOKSIČNO DJELOVANJE BAKRA NA STANICAMA SH-SY5Y. .....	29
4.6. UČINAK MIRICETINA, MIRICITRINA I ETANOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA NA AKTIVACIJU SIGNALNIH PUTEVA MAP KINAZA p38 I JNK .....	31
4.7. UČINAK MIRICETINA NA PROIZVODNJU REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U PRISUTNOSTI SUVIŠKA BAKRA .....	34
4.8. UČINAK MIRICETINA NA KONDENZACIJU KROMATINA I BOJANJE PROPIDIJ JODIDOM .....	35
5. RASPRAVA .....	38
6. ZAKLJUČAK .....	47
7. LITERATURA .....	48



## 1. UVOD

### 1.1 Oksidacijski stres i reaktivne kisikove vrste

Oksidacijski stres (OS) je stanje neravnoteže između formiranja i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (RKV-a) koje se javlja uslijed njihove prekomjerne proizvodnje i/ili nemogućnosti neutralizacije (Shukla i sur., 2011; Liguori i sur., 2018). Budući da kisik ima dva slobodna elektrona paralelnih spinova u vanjskoj elektronskoj ljusci, tijekom interakcije s drugim molekulama, naročito u prisustvu metalnih iona, podložan je formiranju radikala. RKV-e su stoga definirane kao grupa molekula nastalih iz kisika koje su kratkoživuće i vrlo reaktivne zbog nesparene valencije elektrona. U RKV-e ubrajamo superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), kao i neke molekule poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) (Kim i sur., 2015; Magnani i Mattevi, 2019).

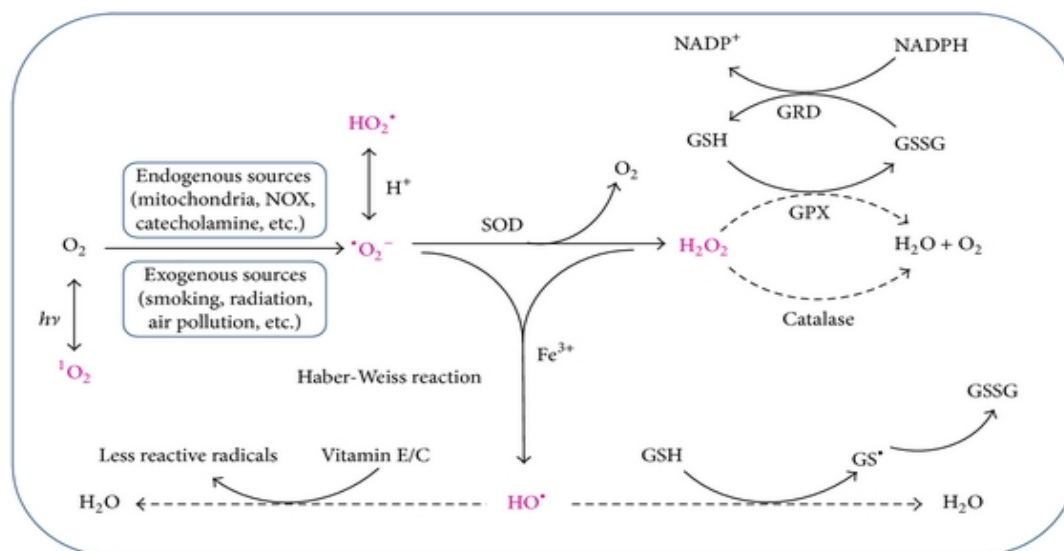
Mitohondrijski respiracijski lanac je glavni izvor RKV-a u fiziološkim uvjetima. Tijekom metabolizma glukoze i stvaranja energije u obliku ATP-a na unutrašnjoj membrani mitohondrija odvija se prijenos elektrona kojeg putem redoks reakcija regulira pet enzimatskih kompleksa (Kim i sur., 2015). U fiziološkim uvjetima 0,2-2% elektrona ne slijedi pravilan transportni lanac već reagira s obližnjim molekulama kisika te kao produkti nastaju RKV-e (Zhao i sur., 2019). Kompleks I transportnog lanca elektrona, tj. NADPH dehidrogenaza, najviše pridonosi endogenoj proizvodnji  $O_2^{\cdot-}$  i to u slučajevima kada postoji visoka koncentracija donora elektrona (NADH) ili kada je protok protona visok, a koncentracija akceptora elektrona niska (Murphy, 2009). Nešto manja proizvodnja RKV-a događa se na kompleksu III gdje se superoksidni radikali otpuštaju u međumembranski prostor nakon čega slijedi njihova enzimska transformacija u stabilniji  $H_2O_2$  koji napušta mitohondrij (Zhao i sur., 2019). Putem Fenton-ove i Haber-Weiss-ove reakcije koje kataliziraju ioni metala, najčešće željeza ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ), iz  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  mogu nastati vrlo reaktivni  $\cdot OH$  radikali, a  $O_2^{\cdot-}$  također može biti protoniran u hidroksiperoksilni radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ) (Slika 1) (Klein i Ackerman, 2003; Kim i sur., 2015). Drugi najvažniji izvor RKV-a u organizmu je enzimatski sustav Nox (NADPH oksidaza) u membrani fagocitnih stanica (neutrofili, eozinofili, monociti, makrofagi) koji tijekom imunološke reakcije katalizira prijenos elektrona sa NADPH na kisik u svrhu proizvodnje velike količine mikrobicidnih  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$ . Ostali endogeni izvori RKV-a su ciklooksigenaze, ksantin oksidaze,

lipooksigenaze, citokrom P450 enzim u endoplazmatskom retikulumu te oksidaze peroksisoma (Kim i sur., 2015).

## 1.2 Antioksidacijski sustavi

Radikali mogu oksidirati brojne biološke molekule kako bi stekli elektron za stabilizaciju. Kao produkti tih reakcija nastaju novi slobodni radikali te se lančana reakcija stabilizacije i stvaranja novih radikala nastavlja. Antioksidacijski obrambeni mehanizmi štite organizam od štetnog djelovanja RKV-a, a uključuju enzimatske i ne-enzimatske putove. Primarni antioksidacijski enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza (GPx) (Shukla i sur., 2011; Liguori i sur., 2018).

SOD katalizira pretvorbu visoko reaktivnog  $O_2^{\cdot-}$  u stabilniji i manje reaktivni  $H_2O_2$  i molekularni kisik, a  $H_2O_2$  se potom djelovanjem katalaze razlaže na vodu i  $O_2$ . Ove enzimatske reakcije odvijaju se u prisutnosti iona prijelaznih metala (Fe, Cu) koji djeluju kao ko-faktori. GPx katalizira oksidaciju tripeptida glutationa (GSH) koji služi kao elektron-donor za redukciju  $H_2O_2$  i  $\cdot OH$  u netoksične forme. GSH se potom regenerira prijenosom elektrona s NADPH na nastali glutation disulfid (Slika 1) (Kim i sur., 2015; Liu i sur., 2015).



**Slika 1.** Superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) je produkt aerobne respiracije u mitohondriju svih sisavaca te polazna točka u formiranju RKV-a. Katalitičkim djelovanjem iona prijelaznih metala  $O_2^{\cdot-}$  se može transformirati u oblike s jačim oksidacijskim djelovanjem ili se djelovanjem antioksidacijskih enzimatskih i ne-enzimatskih puteva neutralizira u stabilnije i manje reaktivne forme ( $H_2O_2$ ,  $O_2$  i  $H_2O$ ). Izvor: Xie Z. Z., Liu Y., Bian J. S. (2016): Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis (Review Article). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016(1): 6043038.

Nadalje, ne-enzimatski antioksidansi su molekule koje vežu i neutraliziraju RKV-e te tako inhibiraju njihovu daljnju proizvodnju. Najpoznatiji takvi antioksidansi su unutarstanični GSH i koenzim Q10, albumin, bilirubin, L-arginin te lipoična i mokraćna kiselina u plazmi. Pored njih, postoji nekoliko egzogenih antioksidansa životinjskog i biljnog porijekla koji se u organizam uglavnom unose putem prehrane ili dodataka prehrani. Takvi antioksidansi su  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, askorbinska kiselina (vitamin C), retinol (vitamin A) te fenolni antioksidansi u koje spadaju i flavonoidi tj. sekundarni proizvodi biljnog metabolizma (Pizzino i sur., 2017; Liguori i sur., 2018).

### **1.3 Uloga RKV-a i oksidacijskog stresa u organizmu**

RKV-e u organizmu imaju dvojako djelovanje. Normalno se proizvode kao ko-produkti oksidacijskog metabolizma te sudjeluju u staničnoj signalizaciji i fiziološkoj regulaciji. Procesi poput stvaranja energije iz organskih molekula, fosforilacije proteina, aktivacije nekih transkripcijskih faktora (npr. NF- $\kappa$ B), proliferacije, diferencijacije i apoptoze su ovisni o pravilnoj produkciji i koncentraciji RKV-a koja u fiziološkim uvjetima mora biti niska (Pizzino i sur., 2017).

Posljednjih godina RKV-e su predmet brojnih istraživanja zbog negativnih posljedica njihove reaktivne prirode. Okolišni čimbenici kao što su polutanti, pesticidi, teški metali (npr. Cu, Fe, Hg, Pb), ksenobiotici, UV i ionizirajuće zračenje te pušenje značajno pridonose njihovoj produkciji u organizmu što narušava ravnotežno djelovanje antioksidacijskog sustava i vodi u stanje OS-a sa štetnim posljedicama na stanice i tkiva. Zbog dugotrajne prisutnosti OS-a i nemogućnosti popravka nastalih oštećenja, u stanici se aktiviraju unutarstanične signalne kaskade programirane stanične smrti tj. apoptoze (Pizzino i sur., 2017; Liguori i sur., 2018).

RKV-e mogu oksidirati esencijalne makromolekule poput DNK, proteina, lipida i ugljikohidrata. Peroksidacijom lipida u staničnoj membrani značajno se smanjuje njena stabilnost, a zbog promjena u naboju i osmotskom tlaku membrane u konačnici dolazi do degradacije stanice (Jan i sur., 2010; Kim i sur., 2015). Oksidacijske promjene proteina, koje se najčešće odvijaju na bočnim lancima cisteina i metionina, mogu dovesti do promjene strukture i križnog vezanja s drugim proteinima. Osim poremećaja u funkciji proteina, na ovaj način formiraju se i derivati koji su otporni na proteolitičku razgradnju (Stadtman,

2006). Kemijsko modificiranje i oštećenje DNK u prisutnosti RKV-a vodi ka zastoju u transkripciji i/ili replikacijskih pogrešaka, te smanjenju preciznosti DNK polimeraza i enzima popravaka čime se narušava stabilnost genoma. Ove promjene koje nastaju u stanici uslijed štetnog djelovanja RKV-a povezuje se s patologijom neurodegeneracije, procesa starenja i mutageneze (Klein i Ackerman, 2003; Liguori i sur., 2018).

#### **1.4 Oksidacijski stres i neurodegeneracija**

Mozak je jedan od metabolički najaktivnijih organa u tijelu i stoga ima iznimno visoke potrebe za kisikom. Iako čini samo 2% ukupne tjelesne mase, troši čak 20% ukupnog kisika. Zbog takvih zahtjeva i visokog sadržaja lipida, posebice polinezasićenih masnih kiselina u membranama, izrazito je osjetljiv na djelovanje RKV-a i OS-a. Osim toga, u mozgu se nalaze niske koncentracije antioksidacijskih enzima i antioksidacijskih molekula poput GSH te visoke koncentracije cinkovih i bakrovih iona koji sudjeluju u redoks reakcijama i kataliziraju formiranje RKV-a (Walton i sur., 2012; Kim i sur., 2015; Liu i sur., 2015).

Neurodegenerativne bolesti su heterogena skupina poremećaja koje karakterizira spor i progresivan gubitak strukture i funkcije neurona u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Karakteristično obilježje ovih bolesti je nakupljanje toksičnih unutar- i izvanstaničnih proteinskih agregata sastavljenih od vlakana nepravilno savijenih proteina otpornih na razgradnju (Miloso i sur., 2008). Najpoznatiji neurodegenerativni poremećaji su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. U 90% slučajeva pojavljuju se sporadično kombinacijom nasljednih i okolišnih faktora te različitih stresora, a tek u 10% slučajeva rezultat su nasljednih genetskih mutacija (Shukla i sur., 2011). Alzheimerova bolest pojavljuje se u kasnijoj životnoj dobi, a glavna patološka obilježja su nakupljanje izvanstaničnih netopljivih senilnih plakova nastalih agregacijom amiloid  $\beta$  peptida te unutarstanična akumulacija neurofilamentnih snopića sastavljenih od hiperfosforiliranog tau proteina. Ovi nepravilni proteini imaju ireverzibilno neurotoksično djelovanje na neurone korteksa i hipokampusa i zato progresijom bolesti dolazi do propadanja kognitivnih funkcija i teške demencije (Loh i sur., 2006; Shukla i sur., 2011). Parkinsonova bolest je neurodegenerativni poremećaj pokreta koju karakterizira rigidnost, bradikineza i tremor. U patologiji bolesti pojavljuje se selektivni gubitak dopaminergičkih neurona u crnoj tvari

(*substantia nigra*) te prisustvo intraneuronalnih filamentoznih inkulzija tj. Lewy-evih tjelešaca sastavljenih od ubikvitina i  $\alpha$ -sinukleina (Desai i Kaler, 2008; Shukla i sur., 2011).

Iako etiologija nastanka i progresije neurodegenerativnih bolesti nije u potpunosti razjašnjena, OS se smatra zajedničkim čimbenikom u razvoju ovih bolesti budući da vodi ka oštećenju svih staničnih makromolekula, poremećajima u sustavu popravka DNK te poremećaju funkcije mitohondrija i proizvodnje energije što u konačnici rezultira odumiranjem neurona (Kim i sur., 2015). Zbog nedostatka *in vivo* dokaza nije u potpunosti jasno je li OS uzrok ili posljedica akumulacije navedenih neurotoksičnih proteina, no sigurno je da se OS, kao i njime uzrokovano oštećenje stanica, povećava sa starenjem zbog smanjene funkcije antioksidacijske obrane i povećane disfunkcije mitohondrija (Klein i Ackerman, 2003).

Apoptoza i nekroza su dva glavna načina odumiranja neurona u neurodegenerativnim bolestima (Chi i sur., 2018). Apoptoza je energetski ovisan proces programirane stanične smrti tijekom kojeg se aktiviraju geni za samouništenje u svrhu povratka organizma u stanje homeostaze. Karakteristične morfološke promjene stanica u procesu apoptoze su smanjenje veličine i povećanje gustoće stanice, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNK, promjena oblika i gustoće mitohondrija, vakuolizacija citoplazme te u konačnici fragmentacija stanice (Loh i sur., 2006; Kalinichenko i Matveeva, 2008). Tijekom neurodegeneracije dolazi do narušavanja kontrolnih mehanizama uključenih u regulaciju apoptoze što vodi pojačanoj smrti neurona i vidljivom oštećenju tkiva. RKV-e aktiviraju intrinzične apoptotične kaskade u mitohondrijskom putu zbog čega se iz mitohondrija u citosol otpuštaju proapoptotski proteini koji aktiviraju proteaze kaspaze. Kaspaze u konačnici dovode do degradacije strukturnih proteina i većine biokemijskih i morfoloških promjena vidljivih u stanici tijekom apoptoze (Radi i sur., 2014). Za razliku od apoptoze, nekrozu karakterizira bujanje stanice zbog prekomjernog ulaska iona, gubitak integriteta stanične membrane i curenje unutarstaničnog sadržaja. U ovaj degradacijski proces također su uključeni lomovi DNK, no izostaje kondenzacija kromatina (Chi i sur., 2018). Smatra se da su promjene u mitohondrijskoj permeabilnosti te posljedična nestabilnost mitohondrijske membrane, kao i smanjenje funkcija mitohondrija, ključni događaji u nekrotičnoj smrti stanica, iako točan mehanizam nije poznat (Nakagawa sur., 2005).

## 1.5 Bakar

Bakar je važan element u tragovima koji sudjeluje u regulaciji bioloških funkcija kod svih organizama s oksidacijskim metabolizmom. Ponaša se kao donor i akceptor elektrona, a njegove najzastupljenije forme u organizmu su  $\text{Cu}^+$  i  $\text{Cu}^{2+}$  ioni. Ovi ioni tvore komplekse s anorganskim i organskim ligandima te su nužne ko-faktorske i strukturne komponente za funkciju strukturnih proteina i esencijalnih enzima u brojnim biološkim procesima (Scheiber i sur., 2014), poput onih koji sudjeluju u redoks reakcijama: energetske metabolizam (citokrom C oksidaza), antioksidacijska obrana (SOD), metabolizam željeza (ceruloplazmin), sinteza neurotransmitera (dopamin  $\beta$ -monooksigenaza) i neuropeptida (peptidilglicin  $\alpha$ -amidacijska monooksigenaza) kod sisavaca (Gaetke i Chow, 2003; Desai i Kaler, 2008).

U mozgu su prijelazni metali, uključujući i bakar, potrebni za pravilan razvoj i metaboličke potrebe. Bakar se iz periferije tj. krvnog optičaja u mozak transportira primarno preko krvno-moždane barijere u obliku slobodnog iona, a zatim se putem prijenosnika unosi u stanice mozga ili ga vežu proteini koji su uključeni u njegovu homeostazu. Unutar stanica, potencijalno toksično djelovanje bakra se onemogućava vezanjem na različite proteine poput metalotioneina, GSH ili specijaliziranih šaperona koji su zaduženi za transport bakra do enzima čija funkcija ovisi o njegovoj prisutnosti (Scheiber i sur., 2014).

Mozak sadrži 8-11% ukupnog bakra u organizmu, no koncentracija i distribucija bakrovih iona se mijenja tijekom razvoja, starenja i uslijed neurodegeneracije. Normalna koncentracija bakra u mozgu iznosi 3.1-5.1  $\mu\text{g/g}$  tkiva. Nejednoliko je raspoređen unutar mozga pa se tako više koncentracije nalaze u sivoj tvari u odnosu na bijelu, te u glija stanicama u odnosu na neurone. Visoke koncentracije bakra su također pronađene u sinaptičkim vezikulima što sugerira da je bakar uključen u prijenos živčanog signala i neuromodulaciju. Istraživanja su pokazala antagonističko djelovanje manjih koncentracija bakra na specifična neuromodulatorna mjesta nekih receptora (kainatni, N-metil-D-aspartata,  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionske kiseline i  $\gamma$ -aminobutirične kiseline), kao i inhibicijsko djelovanje na  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  naponske kanale (Manto, 2014).

Iako je bakar u mozgu potreban za normalnu funkciju i razvoj, visoke koncentracije njegovih iona, kao i njihov nedostatak, mogu ozbiljno oštetiti mozak. Uslijed jake aktivnosti bakra, putem Haber-Weiss-ove i Fenton-ove reakcije, može doći do proizvodnje toksičnih

RKV-a (Jazvinščak Jembrek i sur., 2014). Reducirani GSH ima sposobnost keliranja metala pa tako formira komplekse s bakrovim ionima što smanjuje unutarstaničnu dostupnost bakra i štiti od njegovog toksičnog djelovanja. No s obzirom da je ovaj kompleks redoks aktivan, kontinuirano stupa u reakciju s molekularnim kisikom i posljedično proizvodi superoksidne anione. Osim toga, Cu-GSH kompleks reducira  $Fe^{3+}$  i oslobađa  $Fe^{2+}$  ione koji u prisutnosti  $H_2O_2$  kataliziraju Fenton-ovu reakciju stvaranja  $\cdot OH$  što najznačajnije pridonosi oštećenju mitohondrija i potiče nastanak OS-a u stanicama. Ovo pro-oksidacijsko djelovanje Cu-GSH kompleksa je glavni mehanizam nastanka OS-a uslijed neurotoksičnog nakupljanja bakra u stanici (Gaetke i Chow, 2008; Scheiber i sur., 2014). Nadalje, kada su prisutne visoke koncentracije slobodnog bakra, on se može direktno vezati na nukleinske kiseline i proteine što dovodi do promjene njihove strukture i funkcije, inaktivacije enzima i smrti stanica (Govindaraju i sur., 2013; Giampietro i sur., 2018). Sve je veći broj dokaza da je bakrom uzrokovan OS uključen u razvoj neurodegenerativnih poremećaja te da ioni bakra potiču akumulaciju neurotoksičnih unutar- i izvanstaničnih nakupina proteina kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (Desai i Kaler, 2008; Jazvinščak Jembrek i sur., 2014).

## **1.6 Signalni putovi mitogenom-aktiviranih proteinskih (MAP) kinaza**

Mitogenom-aktivirane proteinske (MAP) kinaze su enzimi unutarstaničnih signalnih puteva koji reguliraju brojne fiziološke procese poput genske ekspresije, metabolizma, stanične diferencijacije i proliferacije, preživljenja, apoptoze te odgovora na stres i upalu (Kim i Choi, 2015; Bohush i sur., 2018). Aktiviraju ih različiti unutar- i izvanstanični signali kao što su faktori rasta peptida, citokini, hormoni te stanični stresori uključujući i RKV-e. Kinaze JNK i p38 pripadaju skupini citoplazmatskih i nuklearnih MAP kinaza, a aktiviraju se tijekom staničnog stresa pa tako i oksidacijskog. Brojna istraživanja su pokazala kako signalni putovi kinaza JNK i p38 tijekom OS-a moduliraju aktivnost pojedinih transkripcijskih faktora što uzrokuje promjene u ekspresiji gena i sintezi proapoptotskih proteina.

Promjene u signalnim putovima i kontinuirana ekspresija ovih kinaza su uključeni u patogenezu neurodegenerativnih bolesti. Kinaze JNK i p38 se kod Alzheimerove bolesti aktiviraju uslijed djelovanja mikroglija i prekomjerne produkcije neurotoksičnih RKV-a ili uslijed OS-a induciranog amiloidom  $\beta$ . Posreduju hiperosforilaciju tau proteina, fosforilaciju

i stabilizaciju amiloid prekursorskog proteina, aktivaciju enzima koji sudjeluju u formiranju plakova amiloid  $\beta$  i posljedičnu smrt neurona. Također, kod Parkinsonove bolesti,  $\alpha$ -sinuklein u stanicama mikroglija aktivira stanične putove kinaza JNK i p38 što rezultira proizvodnjom citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , a u astrocitima dolazi do ekspresije IL-6 i unutarstaničnih adhezijskih molekula što pridonosi kroničnoj upali u mozgu i degeneraciji dopaminergičkih neurona (Kim i Choi, 2015).

Iako se signalizacija putem ovih kinaza uglavnom povezuje s aktivacijom mehanizama uključenih u staničnu smrt, druga istraživanja su pokazala važnost signalizacije putem kinaze JNK tijekom regeneracije neurona nakon ozljede, kao i formiranja i rasta neurita te razvoja mozga (Waetzig i sur., 2006). Osim toga, aktivacija ovog puta je uključena u regulaciju autofagije, mehanizma neophodnog za razgradnju agregiranih i pogrešno savijenih proteina kojim se promovira preživljenje stanica (Schellino i sur., 2019). Kod nekih neuronalnih staničnih linija je pokazana važnost kinaze p38 u preživljenju tijekom izlaganja pro-upalnom citokinu TNF- $\alpha$  (Roulston i sur., 1998), a poznato je i da neki derivati prirodnih spojeva koji se koriste kao terapeutici (artemisinin) putem ove kinaze povećavaju preživljenje neurona u uvjetima OS-a (Linlin i sur., 2017).

## 1.7 Flavonidi

Flavonoidi su grupa prirodnih spojeva male molekulske mase i varijabilne fenolne strukture. Široko su zastupljeni u biljnom svijetu kao sekundarni proizvodi metabolizma tj. pigmenti koji nastaju sintezom iz aminokiselina fenilalanin i tirozin (Panche i sur., 2016). Do danas je identificirano preko 4000 vrsta flavonoida podijeljenih u šest glavnih grupa: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i isoflavoni. U prirodi se pojavljuju u različitim formama, najčešće su glikozidi, ali mogu biti prisutni i aglikonski oblici (Nijveldt i sur., 2001). Osnovnu strukturu svih flavonoida čine heterociklički i aromatski prsten tj. benzopiran (prsteni A i C) na koji je vezan benzenski prsten (prsten B) (Slika 2A), a daljnja podjela ovisi o položaju veze između prstena B i C, stupnju oksidacije i nezasićenosti prstena C, kao i obrascu hidroksilacije i supstituciji na trećem C atomu (Dajas i sur., 2013; Panche i sur., 2016).

Posljednjih nekoliko godina flavonoidi su pridobili pozornost mnogih istraživača zbog raznih potencijalno blagotvornih učinaka. Dobro su poznata njihova jaka



antioksidacijska svojstva koja proizlaze iz strukture bogate dvostrukim vezama i hidroksilnim skupinama što omogućava donaciju vodika za stabilizaciju radikala i keliranje iona prijelaznih metala. Nadalje, protuupalna, protumutagena, protukancerogena svojstva kao i svojstva modulacije nekih staničnih enzima (npr. ksantin oksidaza) čine ove spojeve neizostavnim komponentama u nutritivnoj, farmaceutskoj, medicinskoj i kozmetičkoj primjeni (Panche i sur., 2016). Osim toga, ovi spojevi su potencijalni terapeutici u liječenju neurodegenerativnih bolesti s obzirom da pokazuju neuroprotektivno djelovanje, a zbog regulacije protoka kroz krvno-moždanu barijeru dodatno potiču promjene u neuronalnoj morfologiji putem angiogeneze i neurogeneze (Vauzour i sur., 2008; David i sur., 2016).

### 1.7.1 *Miricetin i miricitrin*

Flavonoli su flavonoidi s ketonskom i hidroksilnom skupinom na poziciji C3 prstena C koja također može biti i glikozilirana. Ova skupina flavonoida je najraznolikija i najzastupljenija u voću i povrću te ima najsnažnije antioksidacijsko djelovanje (Panche i sur., 2016). Jedan od poznatijih flavonola je miricetin (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavin kanabiscetin, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>) (Slika 2B). Miricetin je svijetložuti kristal, najstabilniji je na pH 2, slabo se otapa u vodi, ali kada se deprotonira postaje dobro topljiv u bazičnim vodenim medijima i nekim organskim otapalima (dimetilformamid, tetrahidrofuran, aceton). Ima snažna antioksidacijska svojstva koja ovise o katekolu prstena B i hidroksilnoj grupi na položaju C4. Štiti organizam od lipidne peroksidacije te sprječava apoptozu izazvanu RKV-a preko regulacije signalnih puteva MAP kinaza, a istovremeno potiče aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, katalaze i GPx. Zbog takvih svojstava neka istraživanja pretpostavljaju da ima neuroprotektivno djelovanje kod neurodegeneracije (Semwal i sur., 2016).

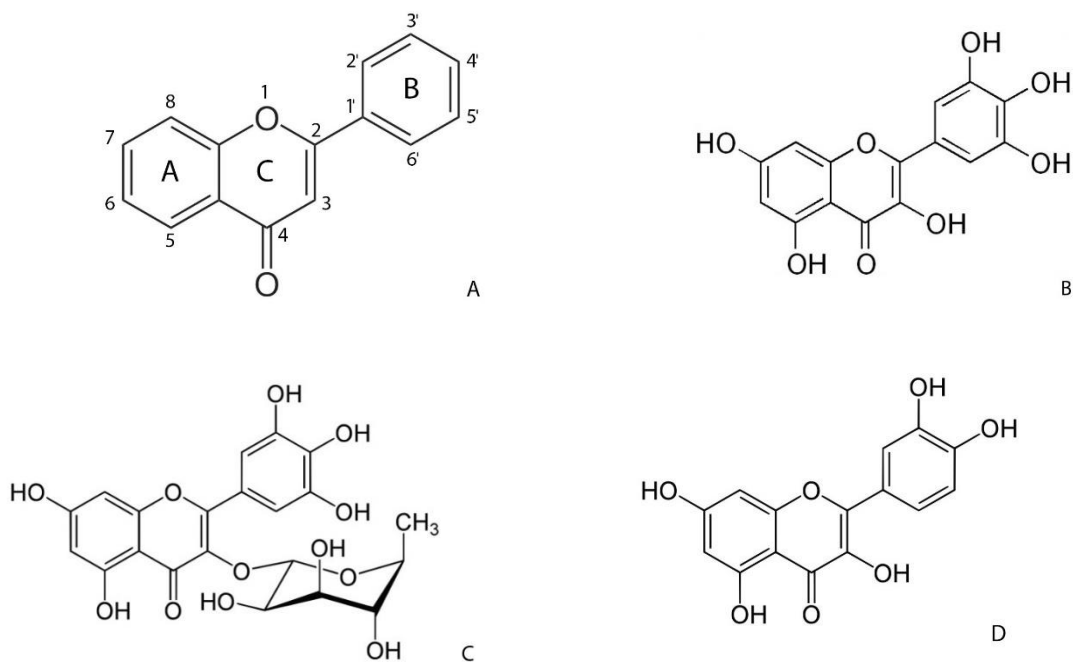
Miricitrin, ili miricetin-3-*O*-ramnozid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), je glikozid miricetina koji nastaje vezanjem šećera ramnoze na poziciji C3 (Slika 2C). Glikozilacija jako utječe na kemijska i fizikalna svojstva flavonoida te mijenja njihova farmakološka svojstva i biodostupnost. Neki glikozidi su pokazali značajnu *in vivo* aktivnost u SŽS-u miševa, posebno kao sedativi i analgetici, a za miricitrin je dokazano da ima antinociceptivan učinak nakon sistemske primjene. Pretpostavlja se da bi glikozidni oblici flavonoida, pa tako i miricitrin, mogli imati jaču antioksidacijsku aktivnost koja proizlazi iz većeg broja hidroksilnih skupina i vodikovih

veza za neutralizaciji radikala i keliranje metala (Fernandez i sur., 2009; Hwang i Chung, 2018), ali zbog nedostatka komparacijskih istraživanja, naročito u živim sustavima, ova teza nije u potpunosti razjašnjena.

### 1.7.2 Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7,-pentahidroksiflavanon,  $C_{15}H_{10}O_7$ ) (Slika 2D) je još jedan flavonoid iz grupe flavonola. Prvi put je izoliran iz hrasta (*Quercus*) odakle i potječe njegov naziv. On je kristal žute boje, igličastog oblika i gorkog okusa, u potpunosti je netopljiv u hladnoj vodi, slabo topljiv u vrućoj vodi, dok se u alkoholu i lipidima vrlo dobro otapa. Jedan je od najzastupljenijih flavonola u hrani biljnog porijekla, te se kao i većina flavonoida najčešće pojavljuje u glikoziliranoj formi. Zajedno sa svojim derivatima (glikozidi, glukuronska i sumporna kiselina) čini 60-70% ukupnog unosa flavonoida u organizam (Li i sur., 2016).

Animalne i *in vitro* studije su pokazale širok spektar biološke aktivnosti kvercetina uključujući antioksidacijsko, neuroprotektivno, protuupalno, imunomodulatorno, protutumorsko i mikrobicidno djelovanje. Dokazano je da modulira djelovanje brojnih enzima uključenih u signalizaciju, rast i biotransformaciju što ga čini spojem od farmakološke i toksikološke važnosti (Jan i sur., 2010). U mozgu povećava koncentracije GSH što vodi pojačanoj neutralizaciji  $H_2O_2$ , a uslijed neuroprotektivnog djelovanja kvercetina dolazi do poboljšanja kognitivnih funkcija, pamćenja i učenja (David i sur., 2016; Li i sur., 2016). Nadalje, *in vitro* istraživanja na neuronalnim modelima su pokazala značajan inhibicijski učinak kvercetina na signalne putove MAP kinaza i apoptozu induciranu izlaganjem oksidacijskom agensu (Yang i sur., 2013; Jiang i sur., 2016). Zbog ovih modulacijskih svojstava kvercetin je potencijalni kandidat za primjenu u terapiji neurodegenerativnih bolesti.



**Slika 2.** Prikaz opće molekulske strukture flavonoida (A), miricetina (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavin kanabiscetin, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>) (B), miricitrina (miricetin-3-O-ramnozid, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) (C) i kvercetina (3,3',4',5,7,-pentahidroksiflavanon, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) (D).

## 1.8 Propolis

Propolis je smolasta tvar koju proizvode pčele miješanjem enzima iz sline s voskom i sekretom prikupljenog s različitih dijelova biljke. Pčele koriste propolis za popunjavanje pukotina na košnici kako bi zaštitile ličinke od invazije predatora i potencijalnih patogena te kako bi se u košnici održala stalna temperatura. Zbog blagotvornog djelovanja na organizam propolis se u narodnoj medicini koristi već stoljećima, a danas su dobro poznata njegova antioksidacijska, protuupalna, antiseptička, antibakterijska, antiviralna i antifungicidna svojstva. S obzirom na geografsko porijeklo, biljni izvor, vrijeme sakupljanja i doba godine, propolis ima varijabilan izgled, boju i konzistenciju (Galeotti i sur., 2018). Uglavnom se sastoji od 50-60% smola i balzama, 30-40% voska i masnih kiselina, 5-10% esencijalnih ulja, 5% polena i 5% ostalih spojeva, uključujući aminokiseline, mikronutrijente, vitamine te druge organske molekule. Ukupno je identificirano preko 300 različitih komponenti u sastavu propolisa, a glavni biološki aktivni spojevi su visoko zastupljeni flavonoidi, fenolne kiseline i njihovi esteri (Kocot i sur., 2018).

Umjesto sirovog propolisa češće se koriste njegovi ekstrakti s obzirom da oni sadrže veće koncentracije bioaktivnih komponenti. Kemijski sastav i biološka svojstva ekstrakta ovise o vrsti otapala kojeg se koristi prilikom procesa ekstrakcije. Npr. polarna otapala se koriste za izolaciju hidrofilnih, a otopine ugljikovodika za izolaciju hidrofobnih komponenti (Kocot i sur., 2018). Iako je voda poželjnije otapalo zbog sigurnije primjene u organizmu, najkorištenije otapalo za ekstrakciju bioaktivnih spojeva propolisa je etanol. Sadržaj ovako pripremljenog ekstrakta se mijenja u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji alkohola, a najznačajniji sadržaj flavonoida se postiže otapanjem u 70%-tnom etanolu. Takav ekstrakt pokazuje najjače antioksidacijsko djelovanje kod uklanjanja unurstaničnih RKV-a, kao i RKV-a u mitohondriju (Kubiliene i sur., 2018). Osim antioksidacijskih svojstava, istraživanja su pokazala da etanolni ekstrakt propolisa (EEP) može modulirati unutarstanične signalne kaskade MAP kinaza i na taj način utjecati na preživljenje ili smrt stanica (Radovanović i sur., 2019).

## 2. Ciljevi istraživanja

Veliki broj istraživanja pokazuje da je OS jedan od glavnih čimbenika u razvoju neurodegenerativnih bolesti te da uslijed njegovog djelovanja nastaju ireverzibilna i progresivna oštećenja SŽS. Zbog toga se noviji terapijski pristupi fokusiraju na smanjenje/zaustavljanje OS-a u stanicama i njime uzrokovane bolesti primjenom antioksidansa. Smatra se da bi prirodni antioksidansi, poput flavonoida koji imaju dodatnu sposobnost keliranja metala i modulacije unutarstaničnih signalnih puteva, mogli pomoći u ublažavanju posljedica OS-a, posebno onog koji je uzrokovan suviškom iona metala.

Cilj našeg istraživanja je utvrditi utječu li flavonoidi miricetin, miricitrin i kvercetin, kao i smjesa flavonoida iz etanolnog ekstrakta propolisa, na vijabilnost stanica SH-SY5Y u uvjetima OS-a koji nastaje uslijed izlaganja visokim koncentracijama bakra ( $\text{CuSO}_4$ ). Također, farmakološkim pristupom, primjenom selektivnih inhibitora, istražiti ćemo nalazi li se u podlozi djelovanja navedenih prirodnih spojeva aktivacija signalnih puteva MAP kinaza JNK i p38. Za spoj s najizraženijim učinkom na preživljenje odredit ćemo antioksidacijski učinak mjerenjem nastajanja RKV-a kao glavnog markera OS-a te ćemo pratiti promjene kondenzacije kromatina kao indikatora programirane stanične smrti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### Kultura neuroblastomskih stanica SH-SY5Y

##### Kemikalije:

- Kemika (Hrvatska): bakar (II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), dimetil-sulfoksid (DMSO), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
- Sigma (SAD): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), penicilin/streptamicin, Na-piruvat, L-glutamin, FBS (Fetal bovine serum), tripsin, tripsinsko modriilo, miricetin, miricitrin, kvercetin, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid), 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat ( $\text{H}_2\text{DCF-dA}$ ), Hoechst 33342 (2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid trihidrat), propidij jodid
- Alfa Aesar (SAD): SB203580 – inhibitor kinaze p38, SP600125 – inhibitor kinaze JNK
- Etanolni ekstrakt propolisa (100 mg/ml u DMSO; dobiveno ljubaznošću prof. Oršolić, N.)

##### Ostali pribor:

Tubice Eppendorf (1.5 ml), plastične tube (15 i 50 ml), posude za staničnu kulturu (Falcon), pločice s 96 ( $0,32 \text{ cm}^2$ ; Sigma, SAD) i 6 bunarića ( $9,4 \text{ cm}^2$ ; TPP, Švicarska), komorica Bürker-Türk, pipete (Eppendorf Research), pipetor Turbo-Fix (TPP, Švicarska), svjetlosni mikroskop (Zeiss), centrifuga (Eppendorf), čitač pločica (Multiskan MS, Labsystems), spektrofotofluorimetar (Varian Cary Eclipse), fluorescencijski mikroskop EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific)

### ***3.1.1. Priprema matičnih otopina i pufera***

- pufer za ispiranje stanica (PBS, phosphate buffered saline):  
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4
- CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O: matična otopina 5 x 10<sup>-2</sup> M u dH<sub>2</sub>O
- tripsin: PBS sa 0.05% tripsina i 1 mM EDTA
- miricetin: 6.37 mg/ml u DMSO
- miricitrin: 4.64 mg/ml u DMSO
- kvercetin: 30 mg/ml u DMSO
- MTT: 5 mg/ml u PBS-u (10x)
- H<sub>2</sub>DCF-dA: 40 mM u DMSO
- Hoechst 33342: 1 mg/ml u dH<sub>2</sub>O
- propidij jodid: 1 mg/ml u dH<sub>2</sub>O

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Pasažiranje i priprema stanica SH-SY5Y za istraživanje

Neuroblastomska stanična linija SH-SY5Y je klon stanične linije SK-N-SH uspostavljene biopsijom iz koštane srži četverogodišnje djevojčice oboljele od neuroblastoma. Ova stanična linija se često koristi kao *in vitro* model za istraživanja fiziologije i patofiziologije neuronalnih stanica, što uključuje i proučavanje odgovora na različite izvore oksidacijskih oštećenja koja se povezuju s razvojem i progresijom neurodegenerativnih bolesti. Za pasažiranje stanica koristili smo pufer za ispiranje stanica (PBS), tripsin i kompletirani medij koji se sastoji od DMEM-a s dodatkom 1% penicilina/streptamicina (sprječava kontaminaciju), 1% Na-piruvata (izvor ugljika u metabolizmu glukoze), 1% L-glutamina (izvor dušika i energije), i 10% FBS-a (izvor faktora rasta). Stanice su uzgajane u posudicama za staničnu kulturu površine 25 cm<sup>2</sup> i čuvane u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> uz relativnu vlažnost 95%. Prilikom pasažiranja smo iz posudice uklonili medij i dva puta isprali stanice sa po 2 ml PBS-a. Potom smo stanice isprali sa 0.5 ml tripsina i ostavili ih na suhom 7-10 min kako bi se odvojile od dna posudice. Nakon toga smo stanice dobro resuspendirali s kompletiranim medijem (2ml) kako bismo zaustavili djelovanje tripsina. U Falcon posudici smo ostavili 0.5 ml stanične suspenzije te smo dodali novih 4.5 ml kompletiranog medija. Posudicu smo vratili u inkubator kako bi se stanična kultura obnovila. Zbog održavanje optimalne gustoće stanične kulture ovaj smo postupak ponavljali svaka četiri dana. Ostatak stanične suspenzije smo koristili za potrebe eksperimenta.

Stanice za istraživanje smo brojali pomoću komorice Bürker-Türk i svjetlosnog mikroskopa. Suspenzija za brojanje se sastojala od 30 µl kompletiranog medija, 20 µl stanične suspenzije i 50 µl tripanskog modrila, te je inkubirana 5 min. Tripansko modrilo se zbog oštećenja vanjske membrane akumulira u mrtvim stanicama, dok žive stanice ostaju neobojene. Na komoricu smo nanosili 10 µl suspenzije. Žive stanice smo brojali u minimalno četiri vidna polja (4x16) kako bismo dobili što pouzdanije rezultate. Broj stanica u mililitru suspenzije izračunali smo prema formuli:

$$\text{Broj stanica/ml} = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj vidnih polja}} \times 5 \text{ (razrjeđenje)} \times 250 \times 10^3$$

Ovisno o cilju eksperimenta, stanice smo nasađivali na pločicu s 96 ili 6 bunarića. Prilikom korištenja pločice od 96 bunarića u svaki smo bunarić dodali 100 µl stanične



suspenzije koja sadrži  $20 \times 10^3$  stanica, a prilikom korištenja pločice od 6 bunarića u svaki bunarić smo dodali 1.5 ml stanične suspenzije koja sadrži  $660 \times 10^3$  stanica. Pločice smo inkubirali 24 sata prije početka tretmana kako bi se stanice dobro pričvrstile za podlogu posudice za uzgoj.

### **3.2.2 Tretman stanica SH-SY5Y bakrom i prirodnim spojevima**

U prvom dijelu istraživanja smo neuroblastomske stanice SH-SY5Y tretirali rastućim koncentracijama  $\text{CuSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$  – 1.5 mM), odnosno rastućim koncentracijama miricetina (1, 2, 5, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ), miricitrina (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ), kvercetina (0.5, 1, 2, 5, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ) i EEP (1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 100 i 200  $\mu\text{g/ml}$ ) kako bi ispitali učinke ovih supstanci na preživljenje stanica SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima. Navedene koncentracije  $\text{CuSO}_4$  i supstanci smo pripremili u kompletiranom mediju. U drugom dijelu istraživanja stanice smo tretirali kombinacijom  $\text{CuSO}_4$  i navedenih koncentracija spojeva. Na pločicu smo nanosili 100  $\mu\text{l}$  uzorka po bunariću, a svaka kombinacija koncentracija je nanešena u kvadripletu. Stanice smo inkubirali na  $37^\circ\text{C}$  pri 5%  $\text{CO}_2$  uz relativnu vlažnost 95%. Nakon perioda od 24 sata mjerili smo njihovo preživljenje testom MTT.

### **3.2.3 Određivanje preživljenja metodom MTT**

Testom MTT smo mjerili vijabilnost stanica. Određivanje preživljenja temelji se na aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza koje pretvaraju topivi žuti supstrat MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) u netopivi formazan ljubičaste boje samo u živim stanicama. Stoga je količina stvorenog formazana izravno proporcionalna broju preživjelih stanica. Nakon tretmana od 24 sata, iz bunarića smo uklonili medij s bakrom i otopljenim spojevima te smo dodali 40  $\mu\text{l}$  medija s 20  $\mu\text{g}$  boje MTT (koncentracija 0.5 mg/ml u DMEM-u). Stanice smo potom vratili u inkubator u trajanju od 3 h. Nakon završetka inkubacije u svaki smo bunarić dodali 160  $\mu\text{l}$  DMSO-a kako bismo otopili formazan. Rezultate smo očitavali spektrofotometrijski pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica (Multiskan MS, Labsystems) mjerenjem apsorbancije na 570 nm.

### **3.2.4 Tretiranje stanica bakrom, miricetinom, miricitrinom i etanolnim ekstraktom propolisa uz primjenu inhibitora MAP kinaza**

Primjenom inhibitora MAP kinaza p38 i JNK istražili smo ulogu ovih signalnih puteva u preživljenju stanica SH-SY5Y nakon tretmana bakrom i odabranim spojevima. U kompletiranom mediju smo zasebno pripremili 10  $\mu$ M koncentraciju inhibitora kinaze p38 SB203580 te 5  $\mu$ M koncentraciju SP600125, inhibitora kinaze JNK. Stanice SH-SY5Y na pločici od 96 bunarića smo podijelili u skupine koje smo tretirali samostalno s  $\text{CuSO}_4$ , odabranim koncentracijama flavonoida, EEP i inhibitorima te u skupine koje smo tretirali kombinacijom  $\text{CuSO}_4$ , inhibitora i flavonoida tj. EEP. Stanicama koje su tretirane s inhibitorima, samostalno ili u kombinaciji, najprije smo dodali 50  $\mu$ l samog inhibitora nakon čega je slijedila inkubacija od 45 min. Zatim smo u iste bunariće dodali još 50  $\mu$ l inhibitora, odnosno inhibitora u kombinaciji s duplom koncentracijom  $\text{CuSO}_4$  i flavonoida/EEP kako bismo u razrjeđenju s prethodno dodanim volumenom postigli željene koncentracije spojeva. U sve ostale bunariće nanosili smo po 100  $\mu$ l uzorka. Svaki uzorak je nanošen u kvadripletu. Stanice su inkubirane na 37°C, a 24 sata nakon inkubacije vijabilnost smo odredili testom MTT.

### **3.2.5 Bojanje s Hoechst 33342 i propidij jodidom**

Hoechst 33342 (2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazini)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid trihidrat) je fluorescentna boja koja se veže za regije DNK bogate adeninom i timinom te boji jezgre svih stanica u uzorku. Nakon ekscitacije ultraljubičastim svjetlom emitira plavu svjetlost valne dužine 460-490 nm. Ova boja se koristi za detekciju kondenziranog kromatina u apoptotskim stanicama koje su u odnosu na normalne stanice obojene žarko plavo. Propidij jodid je crvena fluorescentna boja koja se interkalira u DNK samo mrtvih stanica, ekscitira se valnom duljinom od 488 nm, a emitira na valnoj duljini od 617 nm.

Za provedbu ovog eksperimenta stanice smo tretirali na pločicama sa 6 bunarića. Najprije smo medij iz svakog bunarića (sadrži mrtve stanice) preselili u zasebne sterilne plastične tubice za centrifugiranje, a potom smo u bunariće dodali 350  $\mu$ l tripsina i ostavili 5 min da se stanice u potpunosti odvoje od podloge. Stanice smo zatim resuspendirali sa 1

ml kompletiranog medija i prenijeli u plastične tubice s pripadajućim medijem; postupak smo ponovili još jednom kako bismo bili sigurni da smo pokupili sve stanice iz uzoraka te da je sav tripsin neutraliziran. Uzorke smo centrifugirali 5 min na 1200 rpm. Potom smo iz tubica dekantirali supernatant, dodali 1 ml PBS-a, resuspendirali stanice, prebacili suspenzije u eppendorf tubice (1.5 ml) te ponovno centrifugirali. Postupak sa resuspendiranjem u PBS-u i centrifugiranje smo još jednom ponovili. Uzorak je bio spreman za bojanje nakon dekantiranja supernatanta i resuspendiranja stanica u 27  $\mu$ l PBS-a.

Boju smo pripremili miješanjem 50  $\mu$ M Hoechsta 33342 i 50  $\mu$ M propidij jodida u kvarcnoj vodi ( $qH_2O$ ). Boju smo nanosili na uzorak u omjeru 1:10 te smo je ostavili 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi ušla u stanice. Na predmetno stakalce smo nanosili 15  $\mu$ l obojene suspenzije stanica. Uzorke smo detektirali i fotografirali pomoću EVOS FLoid Cell Imaging Station-a (Thermo Fisher Scientific).

### **3.2.6 Mjerenje razine nakupljanja unutarstaničnih RKV-a**

Nakon završetka tretmana s 1 mM  $CuSO_4$ , 1  $\mu$ g/ml miricetina i 5  $\mu$ M SP600125, inhibitorom kinaze JNK, mjerili smo unutarstanično nakupljanje RKV-a kvantitativnom fluorescentnom metodom pomoću 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata ( $H_2DCF-dA$ ). Nakon difuzije u stanicu, stanične esterase deacetiliraju  $H_2DCF-dA$  u nefluorescirajuću boju koju potom RKV-e prisutne u uzorku oksidiraju u fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF). DCF se detektira na fluorescencijskom spektrofotometru ekscitacijom pri valnoj duljini 485 nm i emisijom na 538 nm.

Pripremili smo 100  $\mu$ M  $H_2DCF-dA$  otapanjem u PBS-u. U sve bunariće, osim kontrole, smo dodali 50  $\mu$ l otopine. Kontrola je sadržavala samo PBS kako bismo odredili autofluorescenciju stanica. Pločicu smo potom stavili 40 min na inkubaciju kako bi boja difundirala u stanice. Nakon inkubacije smo iz bunarića uklonili otopinu, isprali jedan put s 100  $\mu$ l čistog PBS-a, ponovno dodali 100  $\mu$ l PBS-a i vratili stanice u inkubator na sat vremena. Za mjerenje fluorescencije koristili smo Varian Cary Eclipse fluorescencijski spektrofotometar.

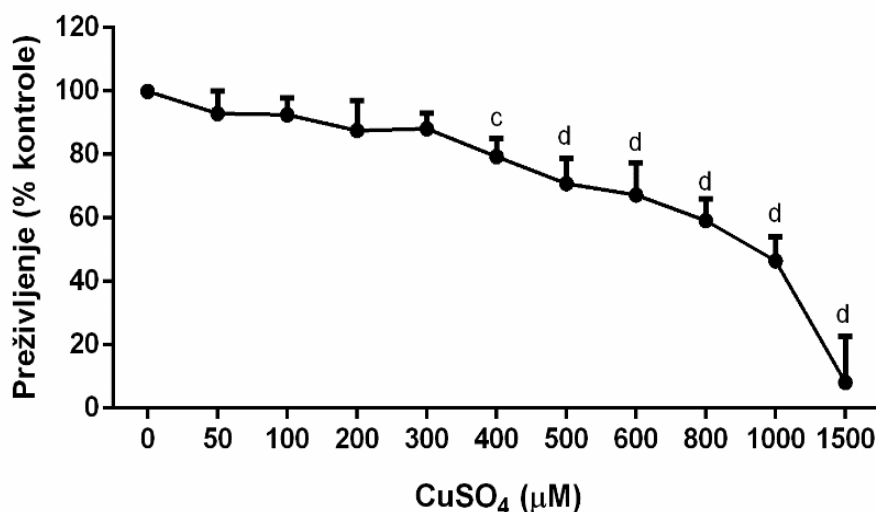
### 3.2.7 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka i pripadajuće grafičke prikaze koristili smo program GraphPad Prism. Svi rezultati su dobiveni iz najmanje tri pokusa te su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednost. Rezultate bojanja s Hoechstom 33342 i propidij jodidom smo dobili manualnim prebrojavanjem stanica iz jednog pokusa u biološkom duplikatu pomoću programa Adobe Photoshop. Za određivanje statističke značajnosti dobivenih rezultat napravili smo jednostruku analizu varijance (ANOVA). Za usporedbu skupina s kontrolom koristili smo *Dunnett's Multiple Comparison Test*, a za usporedbu vrijednosti više skupina *Tukey's Multiple Comparison Test*. Razlike srednjih vrijednosti po skupinama smatrali smo značajnima ako je vrijednost P bila manja od 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Neurotoksični učinak bakra na stanicama SH-SY5Y

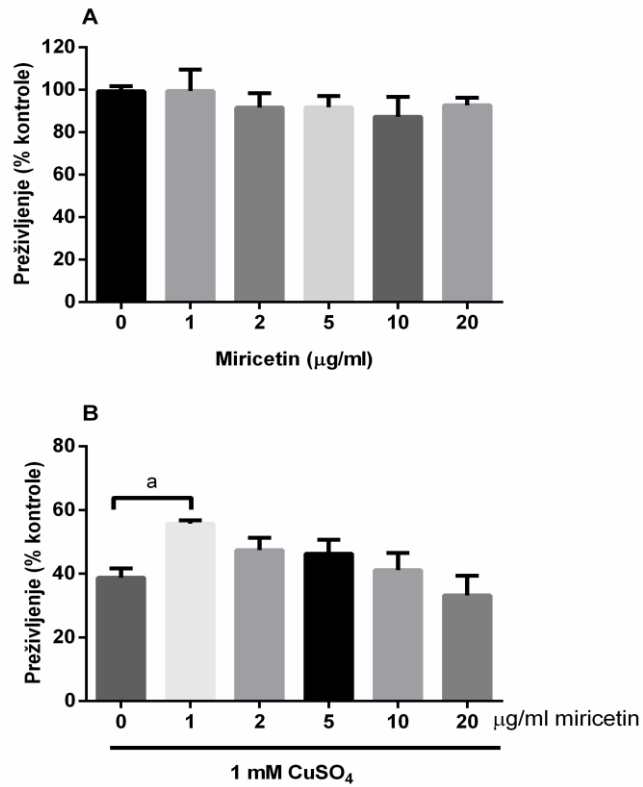
Na stanicama SH-SY5Y prvo smo odredili neurotoksično djelovanje bakra. Stanice su tijekom 24 sata tretirane rastućim koncentracijama  $\text{CuSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$  – 1.5 mM), a nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću kolorimetrijskog testa MTT. Kao što je vidljivo na slici 3, bakar je u ovisnosti o koncentraciji smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y. Po prvi puta značajan učinak na preživljenje dobiven je pri 400  $\mu\text{M}$  koncentraciji  $\text{CuSO}_4$ , a smanjenje preživljenja iznosilo je 20.7% ( $p < 0.001$ , jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test). S porastom koncentracije  $\text{CuSO}_4$  postepeno se smanjivalo preživljenje stanica SH-SY5Y, i u najvišoj korištenoj koncentraciji (1.5 mM  $\text{CuSO}_4$ ) preživjelo je 8.2% stanica. Za nastavak istraživanja odabrali smo dvije koncentracije, 0.5 mM i 1 mM  $\text{CuSO}_4$ , u kojima je preživljenje iznosilo 70.8%, odnosno 46.4%, tj. koncentracije koje uzrokuju relativno blage i nešto teže neurotoksične učinke na stanicama SH-SY5Y.



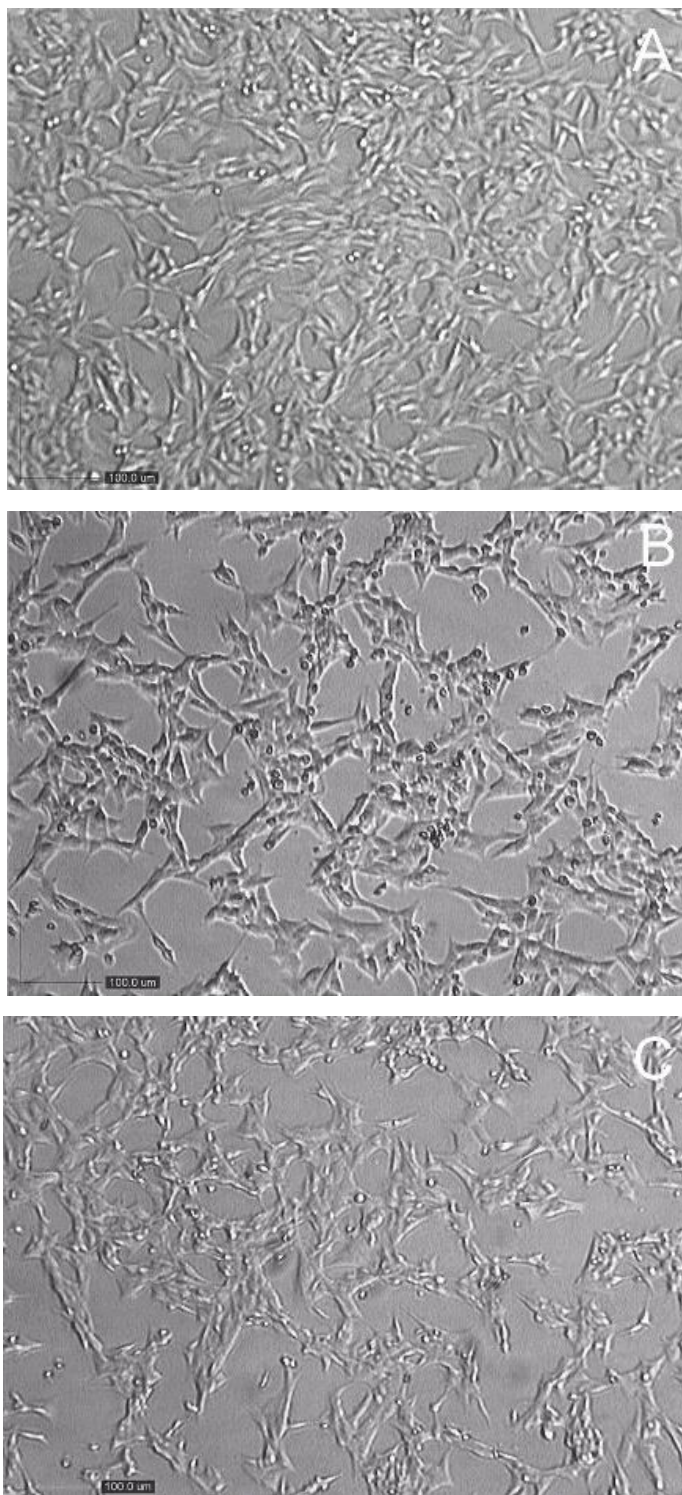
**Slika 3. Neurotoksični učinak bakra na stanicama SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su rastućim koncentracijama bakra (50 – 1500  $\mu\text{M}$ ) tijekom 24 sata nakon čega je njihovo preživljenje određeno pomoću metode MTT. Prikazana krivulja doza-odgovor daje prikaz srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti iz 6 neovisnih pokusa provedenih u kvadripletu (c:  $p < 0.001$ , d:  $p < 0.0001$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test).

## 4.2 Učinak miricetina na neurotoksično djelovanje bakra na stanicama SH-SY5Y

Na početku istraživanja odredili smo učinak miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y. Stanice smo tretirali rastućim koncentracijama ovog flavonoida (1 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom 24 sata. U svim ispitanim koncentracijama miricetin nije imao učinka na preživljenje stanica SH-SY5Y (Slika 4A). Kako bismo utvrdili pokazuje li miricetin neuroprotektivno djelovanje u prisutnosti visokih koncentracija bakra i težih neurotoksičnih učinaka, stanice SH-SY5Y tretirali smo istovremeno miricetinom i 1 mM koncentracijom  $\text{CuSO}_4$  tijekom 24 sata. Utvrdili smo da samo u najmanjoj primijenjenoj koncentraciji od 1  $\mu\text{g/ml}$  miricetin djeluje neuroprotektivno (Slika 4B). Pri toj koncentraciji miricetina vijabilnost je povećana s 38.8% na 55.7% ( $p < 0.05$  u usporedbi sa skupinom tretiranom samo 1 mM  $\text{CuSO}_4$ , jednostruka ANOVA i Dunnett-ov test). Na slici 5 je prikazan izgled stanica SH-SY5Y promatran svjetlosnim mikroskopom u kontrolnoj skupini (A), skupini tretiranoj s 1 mM  $\text{CuSO}_4$  (B) te 1 mM  $\text{CuSO}_4$  i 1  $\mu\text{g/ml}$  miricetina (C). U prisutnost bakra dolazi do određenih morfoloških promjena stanica SH-SY5Y. One nisu toliko izdužene već poprimaju više poligonalni fenotip, te je povećan broj okruglih stanica koje su odlijepljene s podloge i plutaju u mediju. Pod svjetlosnim mikroskopom nakon tretmana miricetinom nisu uočljive značajnije morfološke promjene, osim nešto manjeg udjela stanica poligonalnog oblika u usporedbi sa skupinom tretiranom samo bakrom.



**Slika 4. Učinak miricetina na preživljenje stanica SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su rastućim koncentracijama miricetina (1 – 20 µg/ml) samostalno (A) ili u prisutnosti 1 mM CuSO<sub>4</sub> (B) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću testa MTT. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti iz 4 neovisna pokusa provedena najmanje u kvadripletu (a: p < 0.05 u usporedbi sa skupinom tretiranom 1 mM CuSO<sub>4</sub>, jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test).

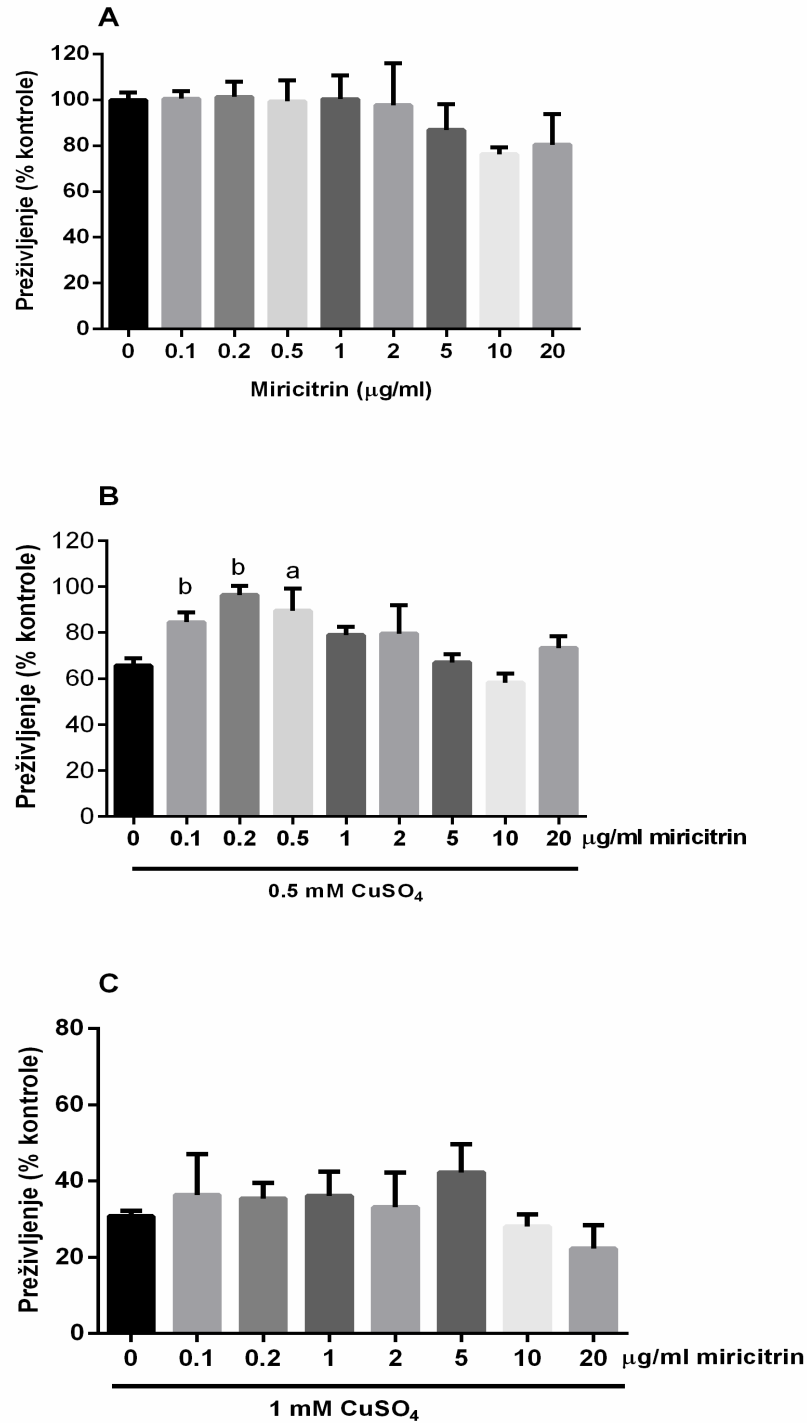


**Slika 5: Prikaz izgleda stanica pod svjetlosnim mikroskopom.** Stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima (A). Stanice nakon tretmana s 1 mM  $\text{CuSO}_4$  (B) te 1 mM  $\text{CuSO}_4$  i miricetinom (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (C) (povećanje 475.7x).



### 4.3 Učinak miricitrina na neurotoksično djelovanje bakra na stanicama SH-SY5Y

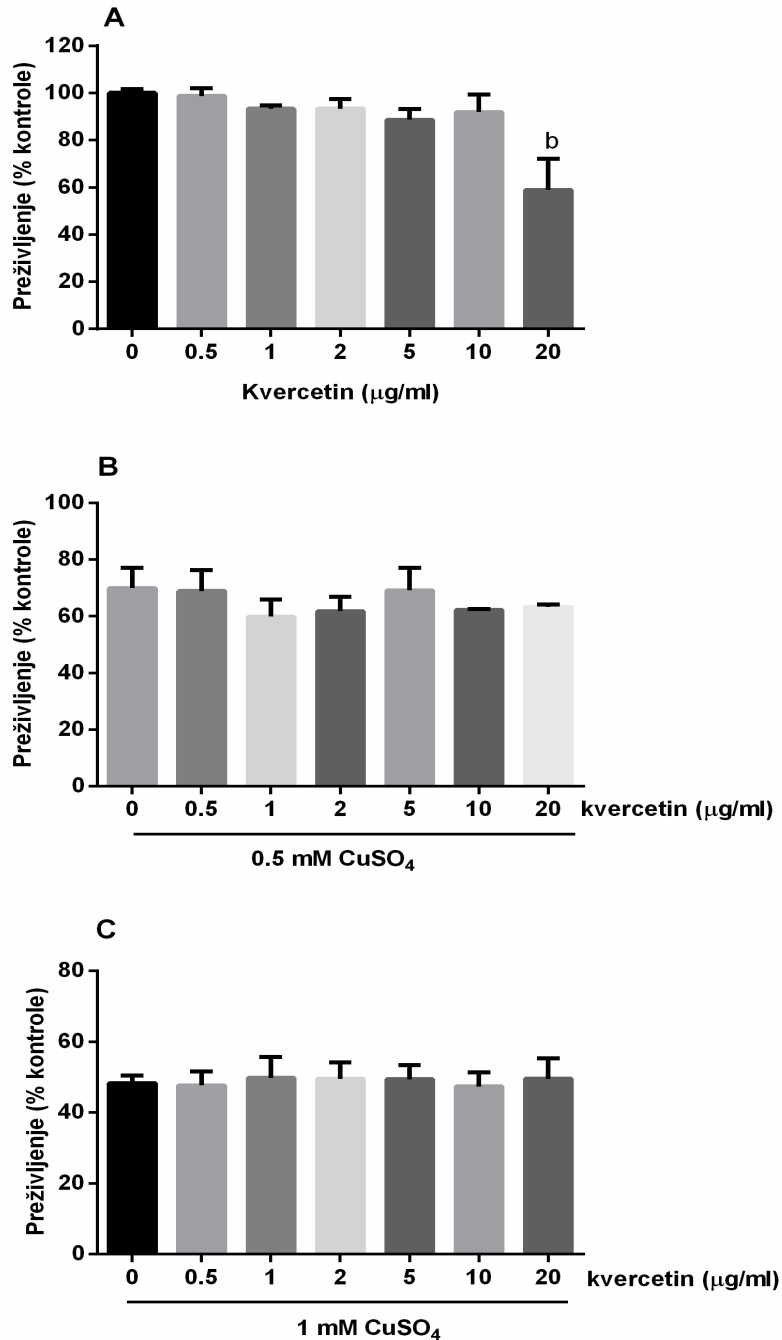
Budući da je miricitrin kemijskom strukturom vrlo sličan miricetinu, istražili smo i učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y izloženih koncentracijama bakra koje izazivaju umjereno i teže smanjenje preživljenja. Miricitrin primijenjen samostalno, u širem rasponu koncentracija (0.1 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) nije imao učinak na preživljenje stanica SH-SY5Y (Slika 6A). Uočena je određena tendencija prema smanjenju preživljenja pri visokim koncentracijama (5, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ), međutim ona nije dosegla razinu statističke značajnosti (jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test). U uvjetima manje izraženog neurotoksičnog djelovanja bakra izazvanog primjenom 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  miricitrin je djelovao neuroprotektivno u 3 najmanje koncentracije (Slika 6B). U prisutnosti 0.1, 0.2 odnosno 0.5  $\mu\text{g/ml}$  miricitrina preživljenje stanica SH-SY5Y iznosilo je 84.5%, 96.34% odnosno 89.59%, dok je kod stanica tretiranih samo 0.5 mM bakrom bilo 65.7% vijabilnih stanica. Kada je miricitrin u istom rasponu koncentracija (0.1 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) primijenjen u uvjetima težeg neurotoksičnog djelovanja bakra izazvanog primjenom 1 mM  $\text{CuSO}_4$ , niti u jednoj primijenjenoj koncentraciji miricitrin nije modulirao neurotoksično djelovanje bakra (Slika 6C).



**Slika 6: Učinak miricitrina na preživljenje stanica SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su rastućim koncentracijama miricitrina (0.1 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) samostalno (A) ili u prisutnosti 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  (B), odnosno 1 mM  $\text{CuSO}_4$  (C) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću testa MTT. U najmanjim primijenjenim koncentracijama miricitrin je djelovao neuroprotektivno u uvjetima umjerene smrti stanica SH-SY5Y (a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$  u usporedbi sa skupinom tretiranom 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$ , jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena najmanje u kvadripletu.

#### **4.4 Učinak kvercetina na neurotoksično djelovanje bakra na stanicama SH-SY5Y**

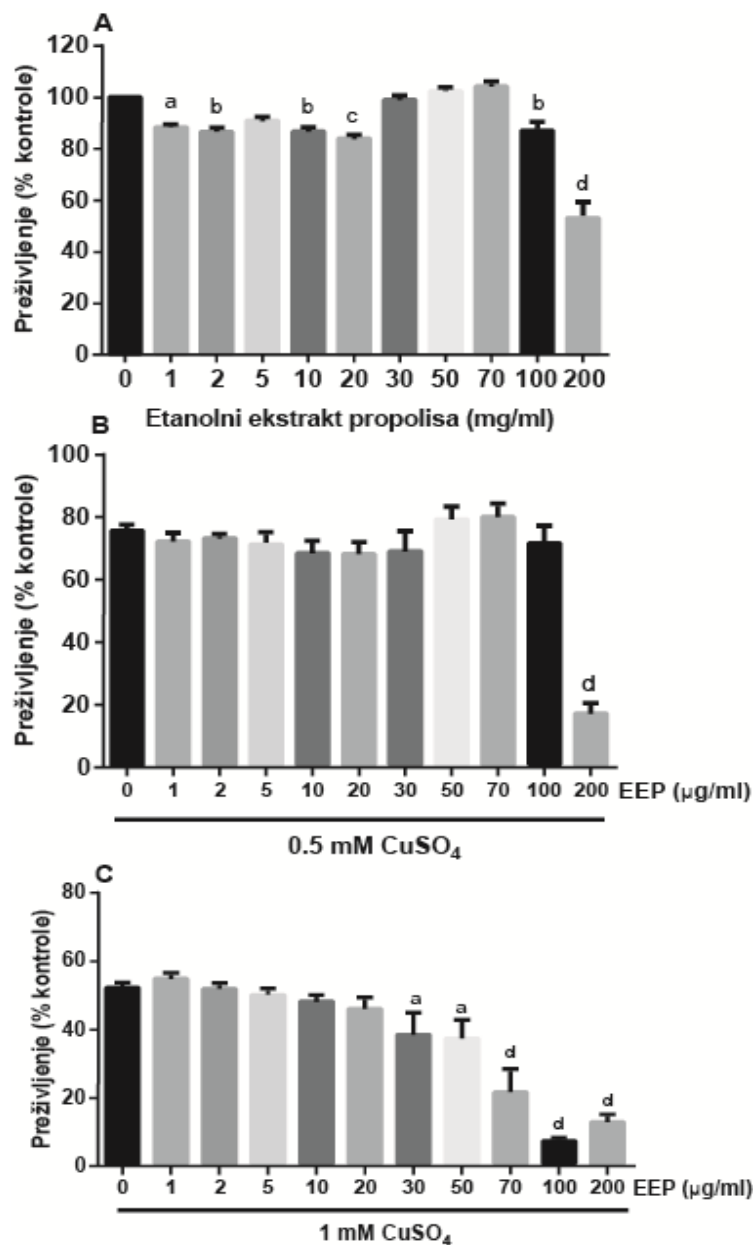
Kvercetin, isto kao i miricetin i miricitrin, pripada flavonoidima iz skupine flavonola te smo ispitali i učinak kvercetina (0.5 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) na neurotoksično djelovanje bakra. Kao što je prikazano na slici 7A, kvercetin je u fiziološkim uvjetima, u najvećoj primijenjenoj dozi od 20  $\mu\text{g/ml}$  smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y na 59% u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0.01$ , jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test). Međutim, u prisutnosti 0.5 i 1 mM  $\text{CuSO}_4$  niti jedna primijenjena koncentracija kvercetina nije imala učinak na vijabilnost stanica (Slika 7B i 7C).



**Slika 7: Učinak kvercetina na preživljenje stanica SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su rastućim koncentracijama kvercetina (0.1 – 20  $\mu\text{g/ml}$ ) samostalno (A) ili u prisutnosti 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> (B), odnosno 1 mM CuSO<sub>4</sub> (C) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću testa MTT. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena najmanje u kvadriletu. Statističkom obradom (jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test) utvrđeno je da kvercetin jedino u fiziološkim uvjetima, i samo u najvećoj koncentraciji, smanjuje preživljenje stanica SH-SY5Y (b:  $p < 0.01$  u usporedbi s kontrolnom skupinom).

#### **4.5 Učinak etanolnog ekstrakta propolisa na neurotoksično djelovanje bakra na stanicama SH-SY5Y**

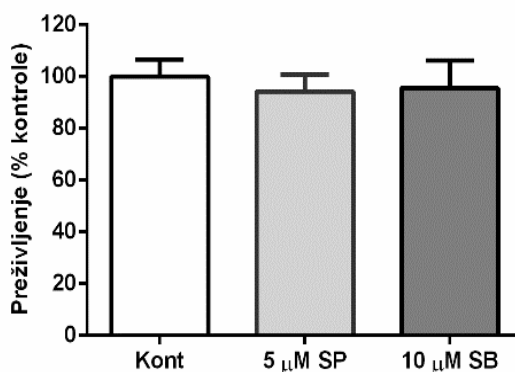
Budući da je propolis smjesa različitih prirodnih spojeva, uključujući i flavonoida, također smo istražili učinak etanolnog ekstrakta propolisa na preživljenje stanica SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima i u prisutnosti bakra (Slika 8). Etanolni ekstrakt propolisa primijenjen samostalno imao je učinak ovisan o dozi. Statistički značajno smanjenje preživljenja opaženo je u najmanjim primijenjenim koncentracijama (1, 2, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ) te pri većim koncentracijama od 100 i 200  $\mu\text{g/ml}$  (Slika 8A). U prisutnosti 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  sve koncentracije u rasponu 1-100  $\mu\text{g/ml}$  bile su bez učinka, dok je etanolni ekstrakt propolisa u koncentraciji 200  $\mu\text{g/ml}$  smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y ( $p < 0.0001$ , jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test). U fiziološkim uvjetima koncentracija 200  $\mu\text{g/ml}$  smanjila je preživljenje za 63.4%, dok je u uvjetima umjerenog neurotoksičnog učinka bakra to smanjenje iznosilo 77.4% (pad vijabilnosti s 75.7 na 17.1%) u usporedbi s kontrolnom skupinom) (Slika 8B). U uvjetima značajnijeg neurotoksičnog djelovanja bakra neurotoksično djelovanje propolisa prisutno je u koncentracijama 30-200  $\mu\text{g/ml}$  etanolnog ekstrakta propolisa (Slika 8C).



**Slika 8: Učinak etanolnog ekstrakta propolisa (EEP) na preživljenje stanica SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su rastućim koncentracijama etanolnog ekstrakta propolisa (1 – 200 μg/ml) samostalno (A) ili u prisutnosti 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> (B), odnosno 1 mM CuSO<sub>4</sub> (C) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određenom pomoću testa MTT. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena najmanje u kvadripletu. Statističkom obradom utvrđeno je da etanolni ekstrakt propolisa primijenjen samostalno može imati neurotoksično djelovanje, ali i da može dodatno pojačati neurotoksično djelovanje bakra (a:  $p < 0.05$ , d:  $p < 0.0001$  u usporedbi sa skupinom tretiranom s CuSO<sub>4</sub>, jednostruka ANOVA, Dunnett-ov test).

#### 4.6 Učinak miricetina, miricitrina i etanolnog ekstrakta propolisa na aktivaciju signalnih puteva MAP kinaza p38 i JNK

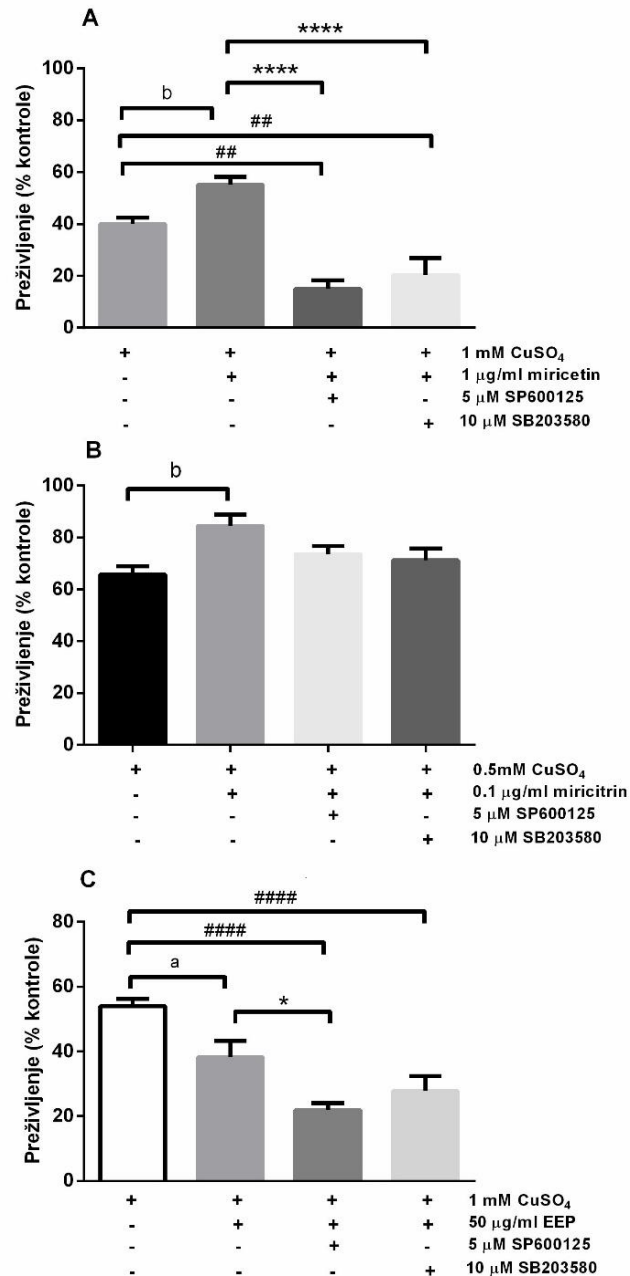
Budući da smrt neuronalnih stanica može biti posredovana aktivacijom signalnih puteva MAP kinaza te da je poznato da prirodni spojevi mogu utjecati na unutarstaničnu signalizaciju (Dajas i sur., 2013), daljnjim eksperimentima htjeli smo utvrditi jesu li učinci miricetina, miricitrina i etanolnog ekstrakta propolisa posredovani aktivacijom signalnih puteva MAP kinaza p38 i JNK. Da bi to utvrdili, stanice smo istovremeno tretirali bakrom ( $\text{CuSO}_4$ ), određenim prirodnim spojem i specifičnim inhibitorima signalnih puteva kinaza p38 i JNK. Za inhibiciju kinaze JNK koristili smo SP600125, dok smo signalni put kinaze p38 inhibirali pomoću spoja SB203580. Oba inhibitora koristili smo u najvećoj koncentraciji koja primijenjena samostalno nije imala učinka na preživljenje stanica SH-SY5Y (Slika 9).



**Slika 9: Učinak inhibitora SP600125 i SB203580 na preživljenje stanica SH-SY5Y.** Stanice SH-SY5Y tretirane su pomoću 5  $\mu\text{M}$  SP600125 i 10  $\mu\text{M}$  SB203580 tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću testa MTT, a statističkom obradom utvrđeno je da navedene koncentracije inhibitora ne utječu na preživljenje stanica SH-SY5Y. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti iz 5 neovisnih pokusa provedenih u kvadripletu.

Nakon što smo utvrdili da u uvjetima izraženog smanjenja preživljenja izazvanog primjenom 1 mM CuSO<sub>4</sub> miricetin primijenjen u koncentraciji 1 µg/ml djeluje neuroprotektivno, u istim smo uvjetima istražili učinak inhibitora kinaza JNK i p38 na preživljenje stanica SH-SY5Y. Kao što je prikazano na slici 10A, u prisutnosti oba inhibitora dokinuto je neuroprotektivno djelovanje miricetina te je preživljenje stanica SH-SY5Y bilo značajno smanjeno u usporedbi sa stanicama tretiranim samo s 1 mM CuSO<sub>4</sub> (pad vijabilnosti sa 55.2% na 15% odnosno 20.29%) (<sup>##</sup>p < 0.01 u usporedbi sa stanicama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, <sup>\*\*\*\*</sup>p < 0.0001 u usporedbi sa stanicama tretiranim s CuSO<sub>4</sub> i miricetinom, Tukey-ev test nakon jednostruke ANOVA-e). Nasuprot tome, u uvjetima blažeg odumiranja neurona, neuroprotektivno djelovanje 0.1 µg/ml miricitrina nije bilo spriječeno u prisutnosti inhibitora SP600125 i SB203580 (Slika 10B). Naposljetku, istražili smo i učinak inhibitora kinaza JNK i p38 na neurotoksično djelovanje 50 µg/ml etanolnog ekstrakta propolisa. SP600125, inhibitor kinaze JNK pokazao je dodatno neurotoksično djelovanje i značajno je smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih samo s 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Sličan trend vidljiv je i za inhibitor kinaze p38 iako on nije dostigao razinu statističke značajnosti (Slika 10C). Slično kao i za miricetin, stanice tretirane etanolnim ekstraktom propolisa i inhibitorima imale su znatno manje preživljenje u usporedbi sa stanicama tretiranim samo s 1 mM CuSO<sub>4</sub> (<sup>####</sup>p < 0.0001 u usporedbi sa stanicama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, Tukey-ev test nakon jednostruke ANOVA-e).

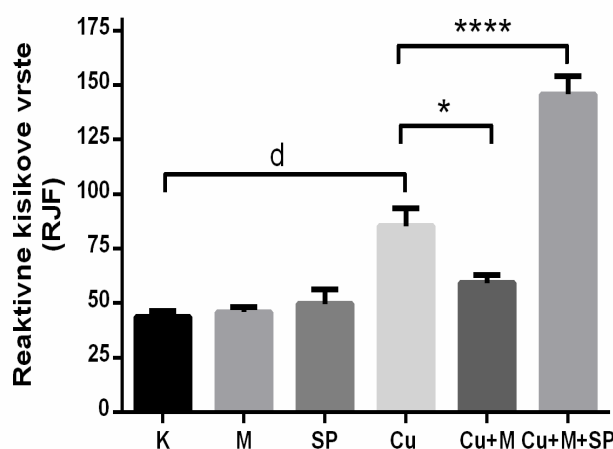




**Slika 10: Učinak inhibitora signalnih puteva kinaza JNK i p38 na učinak miricetina, miricitrina i etanolnog ekstrakta propolisa na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti suviška bakra.** Stanice SH-SY5Y tretirane su s 0.5 ili 1 mM CuSO<sub>4</sub>, određenim prirodnim spojevima i inhibitorima SP600125 (5 μM) i SB203580 (10 μM) tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana preživljenje je određeno pomoću testa MTT. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti iz najmanje 3 neovisna pokusa provedena najmanje u kvadripletu. Oba inhibitora spriječila su neuroprotektivno djelovanje miricetina u prisutnosti 1 mM CuSO<sub>4</sub> (A). Neuroprotektivni učinak miricitrina nije se mogao spriječiti navedenim inhibitorima u prisutnosti 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> (B). Neurotoksično djelovanje etanolnog ekstrakta propolisa izazvano tretmanom s 1 mM CuSO<sub>4</sub> dodatno je povećano u prisutnosti inhibitora kinaze JNK (C) (a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$  u usporedbi sa skupinom tretiranom s CuSO<sub>4</sub>; \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim s CuSO<sub>4</sub> i prirodnim spojem; ## $p < 0.01$ , #### $p < 0.0001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, Tukey-ev test nakon jednostruke ANOVA-e).

#### 4.7 Učinak miricetina na proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta u prisutnosti suviška bakra

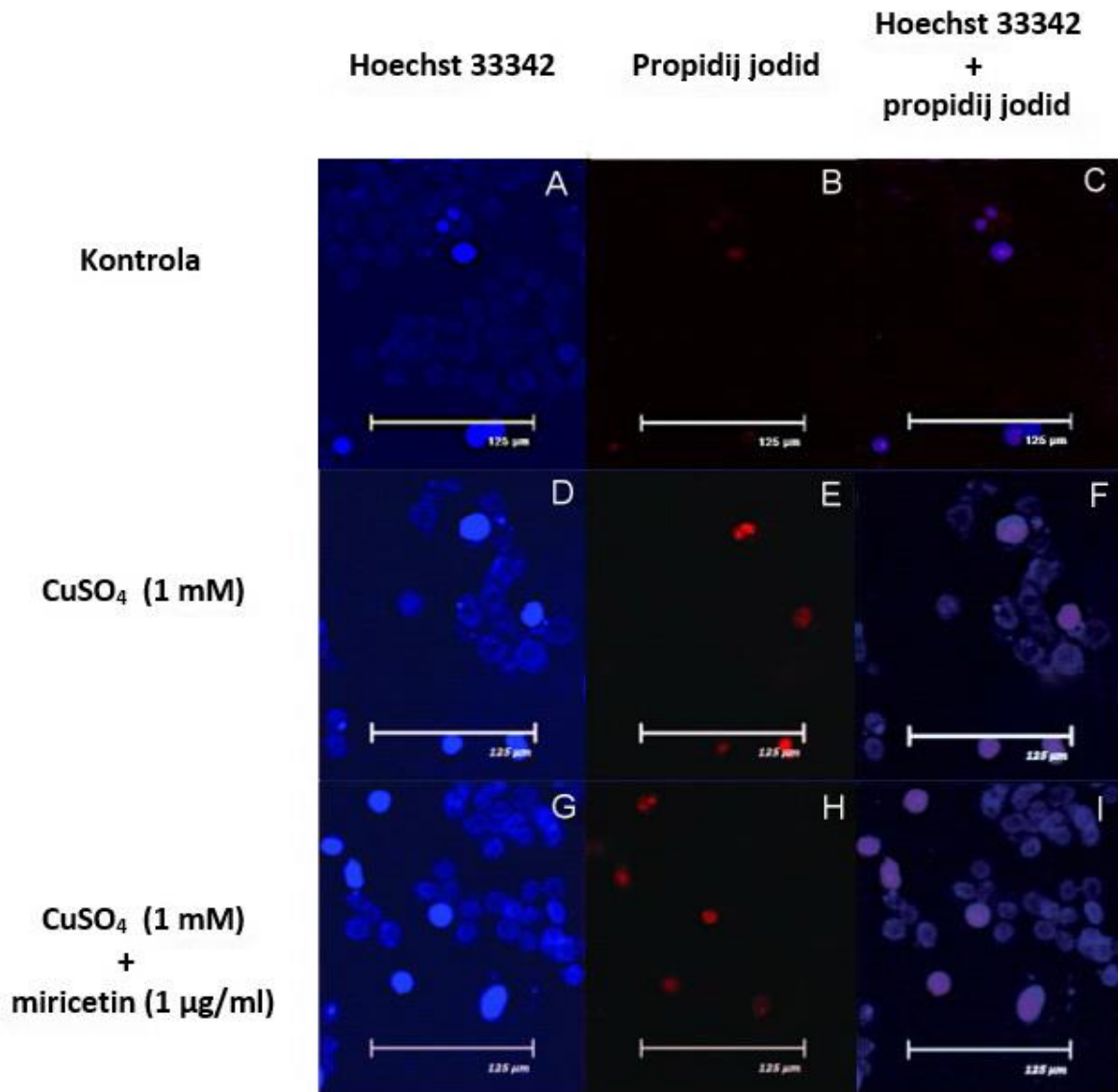
Budući da je neurotoksično djelovanje bakra povezano sa stvaranjem RKV-a i izazivanjem OS-a, istražili smo može li se neuroprotektivno djelovanje miricetina objasniti njegovim antioksidacijskim djelovanjem. Sukladno očekivanju, u prisutnosti 1 mM CuSO<sub>4</sub> došlo je do značajnog povećanja stvaranja RKV-a, s  $43.5 \pm 2.8$  (kontrolna skupina) na  $85.3 \pm 8.3$  relativnih jedinica fluorescencije (RJF) kod stanica izloženih 1 mM CuSO<sub>4</sub>, dok miricetin primijenjen samostalno nije imao učinak na stvaranje RKV-a. Međutim, u uvjetima oksidacijskog stresa, u prisutnosti 1 µg/ml miricetina došlo je do smanjenja nastanka RKV-a za 30.6% ( $59.2 \pm 3.5$  RJF) što upućuje na antioksidacijsko djelovanje miricetina. Prema statističkoj obradi (Tukey test nakon jednostruke ANOVA-e) stvaranje RKV-a nije se razlikovalo između kontrolne skupine i skupine tretirane bakrom i miricetinom. Nadalje, u prisutnosti inhibitora SP600125 (5 µM), stvaranje RKV-a značajno je povećano što upućuje da se djelomično antioksidacijsko djelovanje miricetina postiže posredstvom aktivacije kinaze JNK (Slika 11).



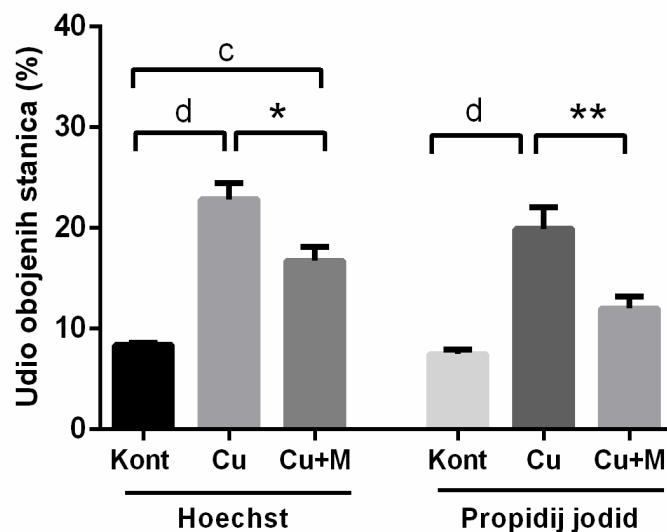
**Slika 11: Učinak miricetina i SP600125, inhibitora kinaze JNK na proizvodnju RKV-a u prisutnosti suviška bakra.** Stanice SH-SY5Y tretirane su s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, 1 µg/ml miricetina i 5 µM SP600125 tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana, stvaranje RKV-a određeno je pomoću 2',7'-diklorofluorescein diacetata. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti iz jednog pokusa s najmanje 8 različitih vrijednosti za svaku skupinu te je utvrđeno antioksidacijsko djelovanje miricetina (d:  $p < 0.0001$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  u usporedbi sa stanicama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, Tukey-ev test nakon jednostruke ANOVA-e).

#### 4.8 Učinak miricetina na kondenzaciju kromatina i bojanje propidij jodidom

Naposljetku, pokušali smo razjasniti mehanizam djelovanja miricetina na razini stanične smrti. Budući da su stanice SH-SY5Y tretirane relativno visokom koncentracijom  $\text{CuSO}_4$  koja je izazvala značajno smanjenje preživljenja, za očekivati je da će do odumiranja neuronalnih stanica doći kroz procese apoptoze i nekroze. Jedno od temeljnih obilježja apoptotičnih stanica je kondenzacija kromatina koju smo pratili bojanjem pomoću boje Hoechst 33342 ( $5 \mu\text{M}$ ). Primjenom ove fluorescentne boje i fluorescencijske mikroskopije apoptotične stanice s kondenziranim kromatinom daju izrazito svjetlo obojenje, dok su jezgre ostalih stanica obojene manje intenzivno i jednolično (Slika 12A). Kao što je prikazano na slici 13, kod kontrolnih stanica, odnosno stanica tretiranih s  $1 \text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$  i  $1 \text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$  u prisutnosti  $1 \mu\text{g/ml}$  miricetina, udio stanica s apoptotskim promjenama iznosio je redom  $8.4 \pm 0.2\%$ ,  $22.9 \pm 1.6\%$  i  $16.7 \pm 1.4\%$  (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti). S druge strane, propidij jodid je fluorescentna boja koja se također veže za dvolančanu DNK dajući crveno obojenje (Slika 12B), ali za razliku od boje Hoechst 33342 ne može proći kroz intaktnu plazmatsku membranu. Stoga propidij jodid boji samo jezgre onih stanica koje imaju oštećenu plazmatsku membranu, tj. mrtve stanice. Stanice u završnoj fazi apoptoze i nekrotične stanice obojene su ljubičasto zbog preklapajućeg efekta plavog Hoechst 33342 i crvenog propidij jodida (Slika 11C). Analizom slika dobivenih pomoću fluorescentnog mikroskopa utvrdili smo da je propidij jodidom ( $5 \mu\text{M}$ ) obojano  $7.5 \pm 0.5\%$ ,  $19.9 \pm 2\%$  i  $12.0 \pm 1.2\%$  jezgara u kontrolnoj skupini, odnosno u skupini tretiranoj samo bakrom i bakrom u prisutnosti miricetina. Statističkom obradom (jednostruka ANOVA, Tukey-test) utvrdili smo da nema značajnih razlika u broju stanica s oštećenjem plazmatske membrane između kontrolne skupine i skupine tretirane istovremeno s  $1 \text{ mM}$   $\text{CuSO}_4$  i  $1 \mu\text{g/ml}$  miricetinom. Budući da je eksperiment proveden samo jednom u biološkom duplikatu, statističku obradu smo proveli obradom najmanje 10 nasumično odabranih vidnih polja iz ta dva uzorka za svaku skupinu.



**Slika 12. Promjene u jezgri vizualizirane fluorescentnim bojanjem s Hoechst 33342 (plava) i propidij jodidom (crvena).** Na slici su prikazane jezgre svih stanica (A, D i G), mrtve i nekrotične stanice (B, E i H) odnosno stanice u završnoj fazi apoptoze (C, F i I) u kontrolnoj skupini te skupinama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub> te 1 mM CuSO<sub>4</sub> i 1 μg/ml miricetina. Stanice su slikane pomoću fluorescencijskog mikroskopa EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific).



**Slika 13: Učinak miricetina na kondenzaciju kromatina i bojanje propidij jodidom.** Stanice SH-SY5Y tretirane su s 1 mM CuSO<sub>4</sub> samostalno ili u prisutnosti 1 µg/ml miricetina tijekom 24 sata. Nakon završetka tretmana, promjene kondenzacije kromatina analizirane su pomoću fluorescentne boje Hoechst 3342, dok je udio stanica s oštećenjem plazmatske membrane određen pomoću propidij jodida. Tretman s 1 mM CuSO<sub>4</sub> značajno je povećao broj stanica sa strukturalnim promjenama kromatina, kao i broj stanica s oštećenjem plazmatske membrane. U prisutnosti 1 µg/ml miricetina ove su promjene bile značajno smanjenje (Hoechst 33342) ili potpuno spriječene (propidij jodid). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti iz jednog neovisnog pokusa u biološkom duplikatu pri čemu je za svaku tretiranu skupinu prebrojano više od 500 stanica u najmanje 10 nasumično odabranih vidnih polja (c:  $p < 0.001$ ; d:  $p < 0.0001$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  u usporedbi sa stanicama tretiranim s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, Tukey-ev test nakon jednostruke ANOVA-e).

## 5. RASPRAVA

OS je stanje koje u stanicama nastaje zbog prekomjernog nakupljanja RKV-a. Poremećaji funkcije mitohondrija, smanjena aktivnost antioksidacijskih mehanizama te djelovanje različitih okolišnih faktora pridonose dugotrajnom stvaranju RKV-a sa štetnim posljedicama na organizam. Uslijed djelovanja slobodnih radikala i OS-a dolazi do oštećenja svih staničnih komponenti, a iste promjene su uočene u patologiji mnogih bolesti poput neurodegenerativnih poremećaja te starenja, procesa upale i mutageneze (Pizzino i sur., 2017).

Bakar je u SŽS-u važan element u trgovima potreban za pravilan razvoj i funkciju, no ukoliko se ravnoteža bakrovih iona naruši može doći do oštećenja brojnih staničnih komponenti i smrti stanice (Giampietro i sur., 2018). Tako je u mozgu i plazmi pacijenata oboljelih od neurodegenerativnih bolesti pronađen suvišak bakrovih iona koji se u najvećoj mjeri akumuliraju u mitohondriju te oštećuju proteine enzimatskih kompleksa uključenih u proizvodnju energije. Smanjena regulacija funkcije mitohondrija vodi ka prekomjernoj proizvodnji RKV-a i nastanku OS-a, a stresom uzrokovana oštećenja se dodatno pojačavaju zbog katalitičkog posredstva bakrovih iona u Fenton-ovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji te posljedičnog stvaranja vrlo reaktivnih hidroksilnih radikala (Arciello i sur., 2005). Osim zaustavljanja metabolizma, visoke koncentracije bakrovih iona potiču akumulaciju nepravilno savijenih neurotoksičnih proteina karakterističnih za progresiju bolesti, a s obzirom da bakar regulira i otpuštanje nekih signalnih molekula, poput IL-1 $\alpha$  i IL-12, pojačana aktivnost njegovih iona promovira upalne procese u mozgu (Manto, 2014).

Uz konvencionalne sintetičke lijekove, pretpostavlja se da bi i prirodni spojevi mogli biti učinkoviti terapeutici pa su posljednjih godina neurobiološka i farmakološka istraživanja usmjerena na ispitivanja protektivnih učinaka ovih supstanci u organizmu. Flavonoidi propolisa, flavonoli kvercetin, miricetin i njegov glikozid miricitrin pokazuju značajna antioksidacijska svojstva zahvaljujući strukturi bogatoj dvostrukim vezama i brojnim hidroksilnim skupinama što omogućava donaciju vodika za stabilizaciju RKV-a. Osim toga, ovi spojevi pokazuju svojstva keliranja i posljedične neutralizacije iona niza prijelaznih metala što bi u kontekstu neurodegenerativnih bolesti, kod kojih oštećenja nastaju uslijed prekomjernog nakupljanja bakra i proizvodnje RKV-a, moglo dati poželjan farmakološki učinak.

SH-SY5Y stanična linija, porijeklom od neuroblastoma, koristi se od 1980-ih u temeljnim istraživanjima različitih aspekata biologije neurona, njihove funkcije, diferencijacije i patologije. Stanice SH-SY5Y su klonovi stanične linije SK-N-SH koja je uspostavljena nakon biopsije iz koštane srži četverogodišnje djevojčice oboljele od metastatskog neuroblastoma (Yusuf i sur., 2013). Po mnogim se karakteristikama razlikuju od zrelih neurona npr. imaju drugačiju morfologiju, mogu se dijeliti, nedostaju im neuron-specifični markeri (NeuN), a neuron-specifični proteini ( $\beta$ -III tubulin, sinaptički vezikulski protein Sv2, glikoproteini u presinaptičkim vezikulima) su često prisutni u znatno manjim koncentracijama (Agholme i sur., 2010). Zbog kancerogenog porijekla imaju brojne kromosomske aberacije kao što su trisomija kromosoma 7, duplikacija q kraka na kromosomu 1 te pojava translokacije između nekoliko kromosoma (Yusuf i sur., 2013; Xicoy i sur., 2017). Unatoč navedenim razlikama, stanična linija SH-SY5Y je uobičajen model za *in vitro* istraživanja molekularnih i staničnih mehanizama u podlozi nastanka različitih neurodegenerativnih bolesti (Agholme i sur., 2010; Xicoy i sur., 2017), pa tako i u istraživanjima antioksidacijske obrane i unutarstanične signalizacije (Ni i sur., 2017). Nadalje, ove stanice su se pokazale kao dobar model za istraživanje neurotoksičnih mehanizama djelovanja metala (Arciello i sur., 2005) kao i molekularnih mehanizama kod neuroprotektivnog djelovanja prirodnih supstanci (Wu i sur., 2018).

U našem istraživanju na stanicama SH-SY5Y neurotoksični učinak bakra je po prvi put uočen primjenom koncentracije od 400  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, što odgovara koncentraciji bakra izmjerenoj u plakovima kod Alzheimerove bolesti (Hordyewska i sur., 2014), kada se preživljenje smanjilo za 20.7%. Najmanje preživljenje, samo 8.2%, imale su stanice tretirane najvišom odabranom koncentracijom od 1.5 mM. Arciello i sur. (2005) su pokazali sličan trend citotoksičnosti tretiranjem iste stanične linije manjim koncentracijama CuSO<sub>4</sub>. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da čak i primjena 300  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> smanjuje preživljenje stanica SH-SY5Y na 30%. Ova razlika u vijabilnosti mogla bi se objasniti djelovanjem bakra na manji broj stanica zbog čega neurotoksični učinak dolazi do jačeg izražaja. Za nastavak našeg istraživanja kao model umjerene i značajnije neurotoksičnosti odabrali smo 0.5 mM i 1 mM koncentraciju CuSO<sub>4</sub>, kod kojih je preživljenje iznosilo 70.8% tj. 46.4%.

Samostalna primjena odabranih rastućih koncentracija flavonoida miricetina (1 do 20  $\mu$ g/mL) nije utjecala na preživljenje neuronalnih stanica SH-SY5Y u odnosu na netretiranu kontrolnu skupinu, što znači da miricetin u testiranim koncentracijama ne pokazuje štetan

učinak na stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima. U stanicama kod kojih smo neurotoksični učinak bakra inducirali tretmanom s 1 mM CuSO<sub>4</sub>, samo najmanja primijenjena koncentracija miricetina, 1 µg/ml, pokazala je značajan neuroprotektivan učinak i porast preživljenja za 30.3% u odnosu na skupinu tretiranu samo s 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Antioksidacijsko djelovanje i svojstvo keliranja prijelaznih metala kod miricetina najviše ovisi o dvostrukim vezama i hidroksilnim grupama u strukturi prstena C i B (Chobot i Hadacek 2011; Jomová i sur., 2019). Pokazalo se da miricetin može vrlo efikasno reducirati željezo (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>), a s obzirom da posjeduje nekoliko mogućih mjesta za keliranje metala može vezati i do tri iona bakra (Cu<sup>2+</sup>) odjednom (Mira i sur., 2002). Ipak, Jomová i sur. (2019) su analizom strukture zaključili da miricetin, iako najjači antioksidans od odabranih flavonoida u njihovom istraživanju, ima slabiji antioksidacijski učinak u prisustvu bakra. Chobot i Hadacek (2011) su pokazali da miricetin u prisutnosti iona željeza prelazi iz antioksidansa u prooksidans budući da kompleks koji nastaje keliranjem metala može poticati proizvodnju RKV-a putem Fenton-ove reakcije. Pretpostavljamo da se analogno rezultatima njihovog istraživanja sličan učinak može javiti tijekom vezanja bakrovih iona. Osim toga, miricetin primijenjen u visokim koncentracijama (100 µM) uzrokuje degradaciju DNK i snažnu lipidnu peroksidaciju, a ovaj štetan učinak se povećava u prisutnosti iona Cu<sup>2+</sup> i uslijed prooksidacijskog djelovanja antioksidacijskog sustava tj. stvaranja <sup>•</sup>OH iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Sahu i Gray, 1993). S obzirom da su stanice SH-SY5Y u našem istraživanju tijekom primjene visokih koncentracija miricetina (20 µg/ml) u kombinaciji s bakrom imala nešto veću smrtnost (nije statistički značajno) od kontrolne skupine tretirane samo CuSO<sub>4</sub>, moguće je da prooksidacijsko djelovanje miricetina u prisutnosti iona bakra raste s porastom koncentracije. Na ovaj način se može objasniti zašto miricetin nije pokazao željeno neuroprotektivno djelovanje i povećanje vijabilnosti stanica tijekom primjene koncentracija viših od 1 µg/ml.

U prirodi se miricetin češće pojavljuje u obliku glikozida miricitrina koji nastaje vezanjem ramnoze na kisik prstena C (miricetin 3-*O*-ramnozid). Prisustvo glikozidne skupine bitno mijenja fizička svojstva, biodostupnost i farmakološki učinak flavonoida (Fernandez i sur., 2009), stoga smo u istraživanju usporedili djelovanje miricetina s miricitrinom. Miricitrin tijekom samostalne primjene u rasponu koncentracija od 0.1 do 20 µg/ml također nije pokazao statistički značajan učinak na vijabilnost neuronalnih stanica SH-SY5Y. Kod blagog neurotoksičnog oštećenja izazvanog bakrom u tretmanu s 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> miricitrin je imao neuroprotektivan učinak samo pri najmanjim koncentracijama koje



su iznosile 0,1, 0,2 i 0,5 µg/ml. Tada se preživljenje stanica povećalo za 22,2%, 31,8%, odnosno 26,7%. Ipak, niti jedna primijenjena koncentracija glikozida nije povećala vijabilnost stanica kod težeg oblika neurotoksičnog oštećenja (1 mM CuSO<sub>4</sub>). Rezultati spektrofotometrijskog testa DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) za procjenu uklanjanja slobodnih radikala su pokazali jače antioksidacijsko djelovanje miricitrina u odnosu na miricetin (Okoth i sur., 2013), ali funkcija glikozidne skupine u procesu antioksidacijske obrane nije detaljno analizirana primjenom *in vitro* i *in vivo* sustava. S obzirom na jače antioksidacijsko djelovanje miricitrina, moglo bi se očekivati da miricitrin ostvaruje neuroprotektivno djelovanje u manjim koncentracijama od miricetina, kao što je i utvrđeno u našem istraživanju. Ipak, suprotno očekivanom, usporedbom rezultata dobivenih testom MTT primijetili smo da neuroprotektivan učinak miricitrina na stanice SH-SY5Y izostaje kod težih oštećenja bakrom, zbog čega pretpostavljamo da flavonoidi s glikozidnom skupinom ipak imaju slabije izražena svojstva neutralizacije RKV-a u prisutnosti iona prijelaznih metala *in vitro*, posebice u uvjetima izraženog OS-a. Budući da neka istraživanja objašnjavaju kako se kompleksi miricitrina i iona bakra interkaliraju u DNK (Atabey Ozdemir i sur., 2017), moguće obrazloženje slabog neuronalnog preživljenja kod tretmana s miricitrinom je postojanje mehanizma kojim ovaj flavonoid promovira neurotoksično djelovanje bakra i smanjuje stabilnost genoma. Kako bismo bolje razumjeli principe po kojima ovi spojevi djeluju u okviru neurodegenerativnih poremećaja potrebno je provesti dodatna istraživanja na drugim staničnim modelima (npr. stanice PC-12 i P19). Također, daljnja istraživanja neuroprotektivnog djelovanja miricetina i miricitrina u neuroblastomskoj liniji SH-SY5Y mogla bi biti usmjerena na druge izvore oksidacijskog stresa poput glutamata i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

U patogenezi neurodegenerativnih poremećaja također sudjeluju komponente unutarstaničnih signalnih puteva MAP kinaza. Tijekom OS-a i upale, te uslijed prisutnosti proteina s promijenjenom funkcijom, aktiviraju se kinaze JNK i p38 koje vode neurone u stanje programirane stanične smrti tj. apoptoze (Kim i Choi, 2015). S obzirom da se s propadanjem neurona smanjuju funkcije mozga i ubrzava progresija bolesti, noviji terapijski pristupi se, između ostalog, fokusiraju na modulaciju ovih signalnih puteva. Kako bismo utvrdili djeluju li miricetin i miricitrin putem aktivacije unutarstaničnih MAP kinaza, pratili smo promjene u preživljenju stanica nakon primjene selektivnih inhibitora kinaza JNK i p38 u kombinaciji s koncentracijama spojeva koje su pokazale najznačajnije djelovanje tijekom izlaganja neurotoksičnim koncentracijama bakra.

Odabrane koncentracije inhibitora kinaza JNK (SP600125, 5  $\mu$ M) i p38 (SB203580, 10  $\mu$ M) tijekom samostalne primjene na stanice SH-SY5Y u fiziološkim uvjetima nemaju utjecaja na vijabilnost. U uvjetima izražene neurotoksičnosti, nastale izlaganjem 1 mM CuSO<sub>4</sub>, oba su inhibitora u kombinaciji s miricetinom (1  $\mu$ g/ml) značajno smanjila preživljenje stanica (s 55.2% kod 1 mM CuSO<sub>4</sub> i 1  $\mu$ g/ml miricetina na 15% kod inhibicije kinaze JNK, odnosno 20.29% kod inhibicije kinaze p38). Do sada se pokazalo da djelovanje miricetina na ove signalne puteve može biti dvojako. U staničnoj liniji mikroglije BV2 miricetin je inhibirao signalizaciju kinaza JNK i p38 aktiviranih djelovanjem lipopolisaharida te je povećao preživljenje stanica (Jang i sur., 2020), dok je u procesu diferencijacije kod osteogeneze miricetin pojačano fosforilirao tj. aktivirao ove kinaze (Kim i sur., 2018). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je u uvjetima neurotoksičnog djelovanja bakra signalizacija putem MAP kinaza JNK i p38 uključena u djelovanje miricetina, te da se blokiranjem ovih kinaza dokidaju njegovi neuroprotektivni učinci u stanicama SH-SY5Y. Suprotno ovome, u uvjetima blage neurotoksičnosti bakra (0.5 mM CuSO<sub>4</sub>) kod koje je prethodno pokazan neuroprotektivan učinak miricetrina (0.1  $\mu$ g/ml) blokiranje signalnih puteva kinaza JNK i p38 ne mijenja značajno preživljenje stanica. Pretpostavljamo da je djelovanje ovog flavonoida posredovano aktivacijom drugih mjesta u putu MAP kinaza ili drugih unutarstaničnih signalnih kaskada uključenih u preživljenje i apoptozu.

Kvercetin je jedan od najistraživanijih flavonoida. Do sada su blagotvorna djelovanja kvercetina pokazana kod kardiovaskularnih bolesti, terapije karcinoma i upale u mozgu (David i sur., 2016), a pretpostavlja se da bi mogao imati i neuroprotektivnu ulogu kod OS-a u procesu neurodegeneracije. Budući da isto kao i miricetin i miricitrin pripada skupini flavonola, dodatno smo istražili njegovo djelovanje u uvjetima umjerene i značajnije neurotoksičnosti bakra. Suprotno očekivanom, kvercetin u širokom rasponu koncentracija (0.5 – 20  $\mu$ g/ml) nije imao učinka na preživljenje stanica SH-SY5Y u prisutnosti bakra, dok smo značajni pad preživljenja uočili u fiziološkim uvjetima nakon primjene najviše odabrane koncentracije (20  $\mu$ g/ml). Ipak, druga istraživanja u istoj staničnoj liniji su pokazala značajan protektivan učinak ovog flavonoida u uvjetima OS-a induciranog s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prema Aulani i sur. (2017), predtretman kvercetinom koncentracije 10  $\mu$ g/ml povećava preživljenje stanica, a prema Xi i sur., (2012) povećanje vijabilnosti može se postići i predtretmanom s 15  $\mu$ M (12h) i 10  $\mu$ M (10h) kvercetina. Nadalje, istraživanja u PC-12 stanicama su također pokazala neuroprotektivan učinak kvercetina. Kod OS-a induciranog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> predtretman kvercetinom

povećao je preživljenje stanica, smanjio proizvodnju RKV-a te pojačao aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD, katalaze, GPx) (Bao i sur., 2017). Prema Li i sur., (2017) kvercetin također smanjuje neurotoksično djelovanje amiloida  $\beta$  kod PC-12, dok oralna primjena kvercetina otopljenog u vodi poboljšava pamćenje kod miševa. Štetno djelovanje amiloida  $\beta$  može se inhibirati i u kulturi primarnih neurona primjenom kvercetina (5-10  $\mu$ M) (Ansari i sur., 2009). S obzirom da je u ovim istraživanjima tretman kvercetinom prethodio izlaganju oksidacijskom agensu, pretpostavljamo da je za postizanje protektivnog učinka ključna akumulacija kvercetina u stanici. Budući da su Jazvinščak Jembrek i sur., (2014) pokazali protektivno djelovanje kvercetina u uvjetima blage neurotoksičnosti bakra kod neurona P19, a isti učinak je izostao kod stanične linije SH-SY5Y u našem istraživanju, također je moguće da se stupanj akumulacije kvercetina mijenja u ovisnosti o tipu stanica. Mogući mehanizmi citotoksičnog djelovanja kvercetina, pogotovo u neuronalnim modelima, nedovoljno su istraženi. Neka istraživanja naglašavaju da kvercetin može podleći autooksidaciji uslijed keliranja iona metala pri čemu nastaju kinonski radikali s prooksidacijskim djelovanjem. Osim toga, citotoksičan učinak kvercetina može se pojaviti tijekom redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$  budući da tom reakcijom nastaju RKV-e i produkti s jakim oksidacijskim svojstvima (Hajji i sur., 2006). Sahu i Washington (1991) su promatrajući hepatocite štakora zaključili da kvercetin primijenjen samostalno u visokim koncentracijama (100  $\mu$ M) podliježe autooksidaciji zbog čega oštećuje DNK i uzrokuje lipidnu peroksidaciju. Moguće je da se sličan proces odvija u fiziološkim uvjetima kod stanica SH-SY5Y što bi objasnilo zašto se vijabilnost smanjila nakon primjene 20  $\mu$ g/ml (100  $\mu$ M) kvercetina.

Propolis je prirodna smjesa sa mnogim dobrotvornim djelovanjima na organizam. Za većinu tih svojstava odgovoran je veliki broj flavonoida koji čine i do 25% ove smolaste smjese (Kosalec i sur., 2017). Ekstrakcijom propolisa u etanolu dobiva se otopina s vrlo visokim sadržajem flavonoida (Kubiliene i sur., 2018) pa nas je zanimalo kakav će učinak takav ekstrakt imati u normalnim fiziološkim uvjetima i uvjetima neurotoksičnosti izazvane visokim koncentracijama bakra kod stanica SH-SY5Y. Utvrdili smo da vrlo visoke koncentracije EEP (200  $\mu$ g/ml) značajno smanjuju preživljenje stanica SH-SY5Y u normalnim fiziološkim uvjetima (pad vijabilnost za 46.73%), kao i u uvjetima umjerene neurotoksičnosti 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  (vijabilnost 17.1%). Štetan utjecaj propolisa dodatno se pojačao kod jake neurotoksičnosti bakra (1 mM  $\text{CuSO}_4$ ). Tada primjena i znatno nižih koncentracija (30 – 70  $\mu$ g/ml) jako smanjuje preživljenje, a izrazitu promjenu u smrtnosti uočili smo kod tretmana s 100  $\mu$ g/ml kada je preživjelo manje od 10% stanica. Radovanović

i sur. (2019) su promatrali djelovanje EEP na neurone P19 u fiziološkim uvjetima, kao i u uvjetima neurotoksičnog djelovanja bakra. Niti u jednom slučaju ekstrakt nije pokazao neuroprotektivan učinak, već se s porastom njegove koncentracije povećavala i neurotoksičnost. Ipak, najznačajnije smanjenje preživljenja P19 stanica uočili su nakon primjene 10 µg/ml EEP u kombinaciji s 0.75 mM CuSO<sub>4</sub> što sugerira da su stanice SH-SY5Y manje osjetljive na neurotoksične učinke EEP-a. Suprotno ovim rezultatima, istraživanja brazilskog zelenog propolisa u staničnoj kulturi PC-12 su pokazala neuroprotektivno djelovanje EEP (4 – 40 µg/ml) kod lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa uzrokovanog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Shimazawa i sur., 2005). Ove razlike u dobivenim djelovanjima ekstrakata mogle bi se objasniti varijabilnim sastavom propolisa koji proizlazi iz geografskog porijekla (Galeotti i sur., 2018) kao i različitim agensom za izazivanje oksidacijskog stresa. Odabir staničnog modela također može imati ključnu ulogu pri interpretaciji bioaktivnih svojstava propolisa. Svakako je važno uočiti kako se učinci propolisa mijenjaju u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji i uvjetima toksičnosti.

Kod neurotoksičnog djelovanja EEP-a (50 µg/ml) dodatno smo istražili signalizaciju putem kinaza JNK i p38 u uvjetima 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Tijekom primjene SP600125, inhibitora kinaze JNK, opazili smo statistički značajno smanjenje vijabilnosti što znači da se neurotoksičan učinak EEP na stanice SH-SY5Y povećao. Iako se i primjenom SB203580, inhibitora kinaze p38, neurotoksično djelovanje ekstrakta povećalo, razlika u preživljenju nije dostigla statističku značajnost. Radovanović i sur. (2019) su pokazali sličan utjecaj EEP (2 µg/ml) tijekom inhibicije signalnog puta kinaze JNK na smrt neurona P19 u prisutnosti iona bakra, no suprotno našim rezultatima, inhibicija p38 spriječila je u potpunosti neurotoksičan učinak ekstrakta. To znači da su obje kinaze donekle uključene u preživljenje stanica tijekom izlaganja neurotoksičnom EEP, no efekt djelovanja varira u različitim staničnim modelima.

Bakar u mozgu ima neurotoksično djelovanje zbog OS-a koji nastaje uslijed oštećenja enzima mitohondrija i prekomjernog stvaranja RKV-a putem Fenton-ove i Haber-Weiss-ove reakcije (Manto, 2014). U skladu s tim, primjenom kvantitativne fluorescentne metode koja mjeri nakupljanje unutarstaničnog DCF-a, na neuroblastomskoj staničnoj liniji SH-SY5Y pokazali smo gotovo udvostručenu proizvodnju RKV-a u nazočnosti 1 mM CuSO<sub>4</sub>. S obzirom da je miricetin (1 µg/ml) u istim uvjetima pokazao neuroprotektivan učinak, pretpostavili smo da ovaj flavonoid ima dostatna antioksidacijska svojstva da barem djelomično smanji produkciju RKV-a izazvanu suviškom bakra. Sukladno našim

predviđanjima, prisustvo miricetina smanjuje produkciju RKV-a za 30.6% u stanicama izloženim CuSO<sub>4</sub>. Istraživanje je također pokazalo da je signalizacija putem kinaze JNK uključena u antioksidacijsko djelovanje miricetina. Kada smo blokirali put ove kinaze, proizvodnja RKV-a bila je značajno veća, čak i u odnosu na skupinu tretiranu samo bakrom. Slično protektivno djelovanje kinaze JNK pokazali su Hu i sur. (2016) u istraživanjima antioksidacijskog djelovanja prirodnog spoja koptizina na stanicama HepG2 i embrijima zebrice. Koptizin smanjuje proizvodnju RKV-a, sprječava lipidnu peroksidaciju i povećava preživljenje stanica, a njegovo protektivno djelovanje je posredovano signalizacijom putem kinaze JNK.

Promjene i broj apoptotičnih stanica u netretiranim kontrolnim uzorcima, uzorcima tretiranih CuSO<sub>4</sub> (1 mM) te uzorcima tretiranih bakrom u prisutnosti miricetina (1 µg/ml) pratili smo bojanjem fluorescentima bojama Hoechst 33342 (plava) i propidij jodid (crvena). Sukladno prethodno dobivenim rezultatima, skupina tretirana samo bakrom je imala najveći broj stanica sa strukturnim promjenama kromatina tj. apoptotičnih stanica, kao i stanica s oštećenjem plazmatske membrane tj. nekrotičnih stanica. Skupina kod koje je neurotoksičan učinak bakra djelomično suprimiran primjenom miricetina imala je smanjen udio apoptotičnih i nekrotičnih stanica. Jači učinak miricetina ipak smo uočili kod dokidanja nekrotičih promjena te se broj nekrotičnih stanica u ovoj skupini nije značajno razlikovao od kontrole. Budući da se nekrotična smrt pojavljuje tijekom jakog OS-a, a apoptoza tijekom blažeg, pretpostavljamo da je flavonoid miricetin neutralizacijom RKV-a smanjio stanje izraženog OS-a i time spriječio nekrozu stanica.

Zaključno, niske koncentracije flavonoida miricetina imaju neuroprotektivan učinak kod neurotoksičnosti izazvane suviškom iona bakra u stanicama SH-SY5Y. Povećanje preživljenja stanica kod primjene miricetina je povezano s neutralizacijom RKV-a tj. antioksidacijskim svojstvima, kao i svojstvom modulacije signalnih puteva MAP kinaza te inhibicije apoptotičnih i nekrotičnih staničnih promjena. Flavonoidi u prisutnosti iona metala mogu podleći autooksidaciji i posljedično proizvoditi RKV-e, stoga je potrebno dodatno istražiti djelovanje miricetina na neurotoksične učinke bakra u drugim neuronalnim staničnim linijama kao i modelima *in vivo*. S obzirom da su flavonoidi prirodni spojevi koji se u organizam primarno unose putem konzumacije biljne hrane, važno je istražiti efikasnost prolaska miricetina preko krvno-moždane barijere i akumulacije u neuronima. Za razliku od miricetina, njegov glikozid miricitrin ima neuroprotektivan učinak samo u uvjetima blagog neurotoksičnog učinka bakra. Ovaj flavonoid je još uvijek nedovoljno istražen, stoga je

potrebno daljnja istraživanja usmjeriti prema analizi funkcije vezanog šećera u antioksidacijskoj obrani i modulaciji signalnih puteva.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti:

- Tretman stanica SH-SY5Y flavonoidima miricetinom i miricitrinom nije utjecao na preživljenje stanica u fiziološkim uvjetima, dok je kvercetin i etanolni ekstrakt propolisa primijenjen u visokim koncentracijama (20  $\mu\text{g/ml}$  odnosno 200  $\mu\text{g/ml}$ ) pokazao toksično djelovanje.
- Tretman  $\text{CuSO}_4$  (izvor iona  $\text{Cu}^{2+}$ ) smanjuje preživljenje stanica SH-SY5Y u ovisnosti o koncentraciji. Istovremeni tretman miricetina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) s 1 mM  $\text{CuSO}_4$  te miricitrina (0.1, 0.2 i 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) s 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  povećava preživljenje neuronalnih stanica SH-SY5Y. Flavonoid kvercetin je bio bez učinka, dok je etanolni ekstrakt propolisa dodatno smanjio preživljenje stanica SH-SY5Y.
- Unutarstanične kinaze JNK i p38 MAP signalnog puta su uključene u neuroprotektivno djelovanje miricitrina. Signalizacija putem kinaze JNK također je uključena u neurotoksično djelovanje etanolnog ekstrakta propolisa, a niti jedna od ove dvije kinaze nije uključena u signalizaciju kod djelovanja miricitrina.
- Tijekom tretmana s  $\text{CuSO}_4$  povećava se unutarstanična proizvodnja RKV-a. Neuroprotektivno djelovanje miricitrina uključuje neutralizaciju RKV-a, a antioksidacijski učinak je posredovan signalizacijom putem kinaze JNK.
- Miricetin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) sprječava apoptotične i nekrotične procese inducirane tretmanom s 1 mM  $\text{CuSO}_4$  na stanicama SH-SY5Y.

## 7. LITERATURA

- Agholme L., Lindström T., Kågedal K., Marcusson J., Hallbeck M. (2010): An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*. 20(4): 1069-1082.
- Ansari M. A., Abdul H. M., Joshi G., Opii W. O., Butterfield A. (2009): Protective Effect of Quercetin in Primary Neurons Against A $\beta$  (1-42): Relevance to Alzheimer's Disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 20(4): 269-275.
- Arciello M., Rotilio G., Rossi L. (2005): Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 327(2): 454-459.
- Atabey Ozdemir B., Demirkiran O., Yildiz U., Tekin I. O., Coban B. (2017): Cytotoxicity and DNK binding of copper (II) and zinc (II) complexes of flavonoids: quercetin, myricetin, rutin. *Bulgarian Chemical Communications*. 49(4): 901-907.
- Aulani D., Tzankova V., Yordanov Y., Kodeva-Burdina M., Yoncheva K. (2017): *In vitro* protective effects of encapsulated quercetin in neuronal models of oxidative stress injury. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31(5): 1055-1063.
- Bao D., Wang J., Pang X., Liu H. (2017): Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules*. 22(7): 1122.
- Bohush A., Niewiadomska G., Filipek A. (2018): Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(10): 2973.
- Chi H., Chang H. Y., Sang T. K. (2018): Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(10): 3082.
- Chobot V. i Hadacek F. (2011): Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Report*. 16(6): 242-247.



- Dajas F., Abin-Carriquiry J. A., Arredondo F., Echeverry C., Rivera-Megret F. (2013): Neuroprotective Action of Flavones and Flavonols: Mechanisms and Relationship to Flavonoid Structural Features. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 13(1): 30-35.
- David A. V. A., Arulmoli R., Parasuraman S. (2016): Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*. 10(20): 84-89.
- Desai V. i Kaler S. G. (2008): Role of Copper in Human Neurological Disorders. *American Journal of Clinical Nutrition*. 88(3): 855-858.
- Fernandez S. P., Nguyen M., Yow T. T., Chu C., Johnston G. A. R., Hanrahan J. R., Chebib M. (2009): The Flavonoid Glycosides, Myricitrin, Goossypin and Naringin Exert Anxiolytic Action in Mice. *Neurochemical Research*. 34(10): 1867-1875.
- Gaetke L. M. i Chow C. K. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189(1-2): 147-163.
- Galeotti F., Maccari A., Fachini A., Volpi N. (2018): Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. *Foods*. 7(3): 41.
- Giampietro R., Spinelli F., Contino M., Colabufo N. A. (2018): The Pivotal Role of Copper in Neurodegeneration: A New Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders. *Molecular Pharmaceutics*. 15(3): 808-820.
- Govindaraju M., Shekar H. S., Sateesh S. B., Vasudeva Raju P., Sambasiva Rao K. R., Rao K. S. J., Rajamma A. J. (2013): Copper interaction with DNK of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 3(5): 354-359.
- Hajji H. E., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. (2006): Interaction of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research*. 40(3): 303-320.
- Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J. (2014): The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals*. 27(4): 611–621.
- Hu Y. R., Ma H., Zou Z. Y., He K., Xiao Y. B., Wang Y., Feng M., Ye X. L., Li X. G. (2016): Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective

- effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 85(1): 313-322.
- Hwang I. W. i Chung S. K. (2018): Isolation and Identification of Myricitrin, an Antioxidant Flavonoid, from Daebong Persimmon Peel. *Preventive Nutrition and Food Science*. 23(4): 341-346.
- Jan A. T., Kamli M. R., Murtaza I., Singh J. B., Ali A., Haq Q. M. R. (2010): Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits – An Overview. *Food Reviews International*. 26(3): 302-317.
- Jazvinščak Jembrek M., Vlainić J., Radovanović V., Erhardt J., Oršolić N. (2014): Effect of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *BioMetals*. 27(6): 1303-1322.
- Jang J. H., Lee S. H., Jung K., Yoo H., Park G. (2020): Inhibitory Effects of Myricetin on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Brain Sciences*. 10(1): 32.
- Jiang W., Luo T., Li S., Zhao Y., Shen X. Y., He F., Xu J., Wang H. Q. (2016): Quercetin Protects against Okadaic Acid-Induce Injury via MAPK and PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  Signaling Pathways in HT22 Hippocampal Neurons. *PLoS ONE*. 11(4): e0152371.
- Jomová K., Hudecova L., Lauro P., Simunkova M., Alwasel S. H., Alhazza I. M., Valko M. (2019): A Switch between Antioxidant and Prooxidant Properties of the Phenolic Compounds Myricetin, Morin, 3',4'-Dihydroxyflavone, Taxifolin and-Hydroxy-Coumarin in the Presence of Copper(II) Ions: A Spectroscopic, Absorbation Titrtion and DNA Damage Study. *Molecules*. 24(23): 4335.
- Kalinichenko S. G. i Matveeva N. Y. (2008): Morphological Characteristics of Apoptosis and Its Significance in Neurogenesis. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 38(4): 333-344.
- Kim E. K. i Choi E. J. (2015): Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*. 89(6): 867-882.
- Kim G. H., Kim J. E., Rhie S. J., Yoon S. (2015): The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*. 24(4): 325-340.

- Kim H. Y., Park S. Y., Choung S. Y. (2018): Enhancing effects of myricetin on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via BMP-2/Smad and ERK/JNK/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*. 834: 84-91.
- Klein J. A. i Ackerman S. L. (2003): Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*. 111(6): 785-793.
- Kocot J., Kielczykowska M., Luchowska-Kocot D., Kurzepa D., Musik I. (2018): Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 7074209.
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S., Vladimir-Knežević S. (2017): Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*. 54(1): 65-72.
- Kubiliene L., Jekabsone A., Zilius M., Trumbeckaite S., Simanaviciute D., Gerbutaviciene R., Majiene D. (2018): Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: Antioxidant and mitochondria modulating properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1): 165.
- Li Y., Yao J., Han C., Yang J., Tabassum Chaudhry M., Wang S., Liu H., Yin Y. (2016): Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 8(3): 167.
- Li Y. L., Guo H., Zhao Y. Q., Li A. F., Ren Y. Q., Zhang J. W. (2017): Quercetin protects neuronal cells from oxidative stress and cognitive degradation induced by amyloid  $\beta$ -peptide treatment. *Molecular Medicine Reports*. 16(2): 1573-1577.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. (2018): Oxidative stress, aging and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 13: 757-772.
- Linlin L., Zeng Z., Gaur U., Yan F., Zheng W. (2017): The p38-MAPK Pathway Is Involved in Neuroprotection of Artemisinin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Apoptosis in PC12 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(7): 416-423.
- Liu T., Zhong S., Liao X., Chen J., He T., Lai S., Jia Y. (2015): A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS ONE*. 10(10): e0138904.

- Loh K. P., Huang S. H., De Silva R., Tan B. K. H., Zhu Y. Z. (2006): Oxidative Stress: Apoptosis in Neuronal Injury. *Current Alzheimer Research*. 3(4): 327-337.
- Magnani F. i Mattevi A. (2019): Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*. 59(1): 91-97.
- Manto M. (2014): Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration. *Toxics*. 2(2): 327-345.
- Miloso M., Scuteri A., Foudah D., Tredici G. (2008): MAPKs as Mediators of Cell Fate Determination: an Approach to Neurodegenerative Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 15(6): 538-548.
- Mira L., Fernandez M. T., Santos M., Rocha R., Florencio M. H., Jennings K. R. (2002): Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research*. 36(11): 1199-1208.
- Murphy M. P. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417(1): 1-13.
- Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y. (2005): Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 434(7033): 652-658.
- Ni J., Wu Z., Meng J., Zhu A., Zhong X., Wu S., Nakanishi H. (2017): The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017: 7984327.
- Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. 74(4): 418-425.
- Okoth D. A., Chenia H. Y., Koorbanally N. A. (2013): Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae). *Phytochemistry Letters*. 6(3): 476-481.
- Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016): Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. 5: e47.

- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017(1): 8416763.
- Radi E., Formichi P., Battisti C., Federico A. (2014): Apoptosis and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 42(3): 125-152.
- Radovanović V., Vlainić J., Hanžić N., Ukić P., Oršolić N., Baranović G., Jazvinščak Jembrek M. (2019): Neurotoxic Effect of Ethanolic Extract of Propolis in the Presence of Copper Ions is Mediated through Enhanced Production of ROS and Stimulation of Caspase-3/7 Activity. *Toxins*. 11(5): 273.
- Roulston A., Reinhard C., Amiri P., Williams L. T. (1998): Early Activation of c-Jun N-terminal Kinase and p38 Kinase Regulate Cell Survival in Response to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*. 273(17): 10232-10239.
- Sahu S. C. i Washington M. C. (1991): Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Letters*. 58(1-2): 75-79.
- Sahu S. C., Gray G. C. (1993): Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Letters*. 70(1-2): 73-79.
- Schellino R., Boido M., Vercelli A. (2019): JNK Signaling Pathway Involvement in Spinal Cord Neuron Development and Death. *Cells*. 8(12): 1576.
- Scheiber I. F., Mercer J. F., Dringen R. (2014): Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology*. 116: 33-57.
- Semwal D. K., Semwal R. B., Combrinck S., Viljoen A. (2016): Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*. 8(2): 90.
- 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. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2(2): 201-207.
- Shukla V., Mishra S. K., Pant H. C. (2011): Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2011(1): 572634.
- Stadtman E. R. (2006): Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 928(1): 22-38.

- Vauzour D., Vafeiadou K., Rodriguez-Mateos A., Rendeiro C., Spencer J. P. E. (2008): The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes and Nutrition*. 3(3): 115-125.
- Waetzig V., Zhao Y., Herdegen T. (2006): The bright side of JNKs – Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Progress in Neurobiology*. 80(2): 84-97.
- Walton N. M., Shin R., Tajinda K., Heusner C. L., Kogan J. H., Miyake S., Chen Q., Tamura K., Matsumoto M. (2012): Adult Neurogenesis Transiently Generates Oxidative Stress. *PLoS ONE*. 7(4): e35264.
- Wu H. C., Hu Q. L., Zhang S. J., Wang Y. M., Jin Z. K., Lv L. F., Zhang S., Liu Z. L., Wu H. L., Cheng O. M. (2018): Neuroprotective effects of genistein on SH-SY5Y cells overexpressing A53T mutant  $\alpha$ -synuclein. *Neural Regeneration Research*. 13(8): 1375-1383.
- Xi J., Zhang B., Luo F., Liu J., Yang T. (2012): Quercetin protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress by inhibiting expression of Krüppel-like factor 4. *Neuroscience Letters*. 527(2): 115-120.
- Xicoy H., Wieringa B., Martens G. J. M. (2017): The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*. 12(1): 10.
- Xie Z. Z., Liu Y., Bian J. S. (2016): Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis (Review Article). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016(1): 6043038.
- Yang E. J., Kim G. S., Kim J. A., Song K. S. (2013): Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacognosy Magazine*. 9(36): 302-308.
- Yusuf M., Leung K., Morris K. J., Volpi E. V. (2013): Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*. 14(1): 63-70.
- Zhao R. Z., Jiang S., Zhang L., Yu Z. B. (2019): Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 44(1): 3-15.



## **ŽIVOTOPIS**

### **Osobne informacije**

Ime i prezime: Katarina Mick

Datum rođenja: 29.12.1995.

Strani jezici: engleski (C1), španjolski (A2)

### **Obrazovanje**

- 2017. – 2020.** Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek  
Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije  
Modul: Fiziologija i imunobiologija
- 2014. – 2017.** Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel za studije mora  
Modul: Biologija i ekologija mora
- 2010. – 2014.** Srednja škola Lovre Montija, Knin  
Opća gimnazija
- 2004. – 2010.** Osnovna glazbena škola Krsto Odak, Knin  
Instrument: klavir

### **Laboratorijska stručna praksa**

**Siječanj – ožujak, 2020.**

*Španjolski nacionalni institut za istraživanje tumora, Madrid, Španjolska*

- Erasmus+ stručna praksa
- Rad u laboratoriju za klinička ispitivanja karcinom dojke (pod vodstvom dr. Miguel A. Quintela)
- Izolacija DNA, RNA, proteina i limfocita iz tumorskog tkiva, slezene i limfnih čvorova miševa, PCR, qPCR i western-blot analize, sortiranje stanica pomoću magnetskih mikrogranula, imunodetekcija, protočna citometrija, održavanje staničnih kultura, održavanje sterilnih uvjeta u sobi za staničnu kulturu, pohađanje seminara



**Lipanj – srpanj, 2018.**

*Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska*

- Laboratorij za kontrolu kvalitete, Analitika (pod vodstvom dipl. ing. bioteh. Danice Šego)
- Ispomoć u laboratoriju

**Radno iskustvo**

**Listopad, 2018 – listopad, 2019**

*Look cafe, Zagreb*

- Konobarski poslovi (studentski posao)

**Svibanj – listopad, 2017.; srpanj – listopad, 2016.**

*Chang, Split*

- Konobarski poslovi (studentski posao)