

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

SANDRA SOBOČANEC

UČINAK PROPOLISA NA
OKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U CBA
MIŠA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Ova disertacija predana je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja znanstvenog stupnja doktora prirodnih znanosti iz područja biologije.

«A great leader inspires people to have confidence in themselves.»

Ovom prilikom želim iskreno zahvaliti mojoj dragoj mentorici dr. Tanji Marotti što me inspirirala da sanjam više, učim više, nastojim više i postanem više.

Veliko hvala mom Labosu: Dragi Tihomir, Vesna, Višnja, Borka i Ana, hvala vam što ste podijelili svoje vrijeme sa mnom, hvala vam na svakodnevnim diskusijama, kritikama i podršci; bez vas to ne bi bilo to.

Zahvaljujem Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju: dipl. ing. Marini Korolija, dr.sc Marijani Popović-Dadžija i dr. sc. Mirku Hadžiji na utrošenom vremenu, strpljenju i trudu tijekom svladavanja metode izolacije RNA i RT-PCR-a.

dr. sc. Anamariji Brozović zahvalna sam na velikoj pomoći i savjetima tijekom svladavanja tehnike Western blottinga.

Velika hvala mr.sc. Jeleni Knežević na profesionalnoj pomoći i suradnji

Zahvaljujem Zavodu za molekularnu medicinu što su mi omogućili korištenje svih potrebnih instrumenata tijekom izrade ove disertacije

Velika hvala doc.dr.sc. Nadi Oršolić na profesionalnim savjetima i nesebičnoj pomoći.

Iskreno zahvaljujem Alojziju i Mirjani Sobočanec na velikoj i nesebičnoj pomoći i podršci.

“Truly great friends are hard to find, difficult to leave, and impossible to forget.”

Dragi moji prijatelji, hvala vam što ste dopustili da vas nađem, što mi niste dozvolili da odem i što ste me prihvatili baš onakvu kakva jesam.

Hvala mojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, toleranciji, razumijevanju i povjerenju koje imaju u mene. Bez njih ne bih postigla sve ovo što jesam. Ovaj Doktorat je za Vas.

“The aim of life is self-development. To realize one's nature perfectly - that is what each of us is here for.”

Oscar Wilde

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

**UČINAK PROPOLISA NA OKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U
CBA MIŠA**

Sandra Sobočanec

Laboratorij za modifikatore biološkog odgovora
Zavod za molekularnu medicinu
Institut "Ruđer Bošković"
Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Biološki učinci propolisa vezani su uz njegova antibiotska, protuupalna i antioksidacijska svojstva. Jedan od sastojaka propolisa su flavonoidi, čija je karakteristika visoki antioksidacijski potencijal zbog kojeg im se pripisuje sposobnost prevencije različitih bolesti. Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti *in vivo* oksidacijsko/antioksidacijski potencijal nativnog propolisa iz kontinentalnih krajeva Hrvatske. *In vitro* smo odredili antioksidacijski kapacitet propolisa pomoću reducirajućeg željeza i pokazali da propolis ima relativno slab antioksidacijski kapacitet u tim uvjetima. Zatim smo istražili djelovanje dviju doza na procese lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidacijskih enzima (superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze) u mozgu, jetri i plućima miševa. Oksidacijski status nakon obradaa nativnim propolisom nije pokazao tkivnu, ali je pokazao doznu ovisnost; antioksidacijski status je pokazao tkivnu i doznu ovisnost. Promjene na transkripcijskom nivou nakon obradaa propolisom su također bile tkivno i dozno ovisne, dok je količina proteina ostala u svim tkivima nepromijenjena, bez obzira na dozu. DNA čipovi pokazali su zaštitni učinak propolisa u manjoj dozi u jetri i plućima, dok je u jetri veća doza izazvala prooksidacijski učinak; u mozgu nije bilo nikakva učinka, bez obzira na dozu. Oksidacijski/antioksidacijski status na navedenim organima su ispitani u uvjetima oksidacijskog stresa, pri čemu su miševi hranjeni propolisom bili izloženi 1 ATM čistog kisika kroz 18 sati. Propolis je smanjio oksidacijski stres u sva tri ispitivana tkiva u dozi od 100 mg kg⁻¹; u plućima je taj učinak propolis ostvario povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima.

Ova doktorska disertacija ima 124 stranice, 44 slike, 6 tablica i 113 literaturnih navoda.
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je pohranjen u:

Ključne riječi: propolis, flavonoidi, miševi, oksidacijski/antioksidacijski status,
hiperoksija, normobarički uvjeti

Voditelj: dr. sc. Tatjana Marotti, znanstveni savjetnik, Institut "R. Bošković", Zagreb

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

**PROPOLIS EFFECT ON OXIDATIVE/ANTIOXIDATIVE STATUS IN CBA
MICE**

Sandra Sobočanec

Laboratory for Biological Response Modifiers
Division of Molecular Medicine
Ruđer Bošković Institute
Bijenička 54, Zagreb, Croatia

Biological effect of propolis is considered to have antibiotic, antiinflammatory and antioxidative properties. Native propolis is composed of flavonoids, which have high antioxidative capacity and are, therefore, able to prevent various pathological states. The aim of this Doctoral Thesis is to examine the oxidative/antioxidative capacity of native propolis collected from continental parts of Croatia *in vivo*. The antioxidative capacity of native propolis *in vitro* has been determined in the conditions of reduced iron and it appeared to be relatively low. The effect of two doses of propolis (100 mg kg⁻¹ and 300 mg kg⁻¹, respectively) on oxidative status (LPO) and antioxidative status (superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase) has been investigated in liver, lungs and brain of mice. Oxidative status appeared to be dose- but not tissue-related upon treatment with native propolis. On the other hand, antioxidative status was both dose- and tissue-dependent. Transcriptional changes after propolis treatment were dose- and tissue-dependent, while protein level remained unchanged in all tissues examined, irrespective of the dose. DNA chips showed protective effect of propolis in lower dose in liver and lungs, while the higher dose had prooxidative effect in liver; there was no effect in the brain with neither lower nor higher dose of propolis. Oxidative/antioxidative status in all three organs was determined in conditions of oxidative stress, where mice were fed with propolis and subjected to 1 ATM of 100% oxygen for 18 hours in a hyperbaric chamber. Propolis decreased oxidative stress in all three tissues examined in a dose of 100 mg kg⁻¹; in lungs this effect was achieved via increment of antioxidative enzyme activities.

This doctoral thesis contains 124 pages, 44 pictures, 6 tables and 113 references.

The original is in: Croatian

Thesis deposited in:

Keywords: Propolis, Flavonoids, Mice, Oxidative/antioxidative status,
Hyperoxia, Normobaric conditions

Supervisor: Tatjana Marotti, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute,
Zagreb

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | PROPOLIS | 1 |
| 1.1.1 | <i>Identifikacija i terminologija</i> | 1 |
| 1.1.2 | <i>Povijesna i današnja upotreba propolisa</i> | 1 |
| 1.1.3 | <i>Kemijska obilježja propolisa</i> | 2 |
| 1.1.4 | <i>Biološka svojstva propolisa</i> | 2 |
| 1.2 | FLAVONOIDI | 3 |
| 1.2.1 | <i>Identifikacija i terminologija</i> | 3 |
| 1.2.2 | <i>Kemijska obilježja flavonoida</i> | 4 |
| 1.2.3 | <i>Apsorpcija i metabolizam flavonoida</i> | 7 |
| 1.2.4 | <i>Genetika flavonoida</i> | 10 |
| 1.2.5 | <i>Flavonoidi kao čistači RKVa (scavengeri)</i> | 10 |
| 1.3 | SLOBODNI RADIKALI | 11 |
| 1.3.1 | <i>Izvori reaktivnih kisikovih vrsta</i> | 14 |
| 1.4 | OKSIDACIJSKI STRES | 16 |
| 1.5 | ZAŠTITA OD REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA | 17 |
| 1.5.1 | <i>Neenzimski antioksidansi</i> | 17 |
| 1.5.2 | <i>Enzimski antioksidansi</i> | 17 |
| 1.6 | POVIJEST HIPERBARIČKE MEDICINE | 23 |
| 1.7 | TERAPIJA HIPERBARIČKIM KISIKOM (THK) | 23 |
| 1.7.1 | <i>Fiziološka osnova i primjena THKa</i> | 25 |
| 1.7.2 | <i>Uloga THKa u dekompresijskoj bolesti</i> | 26 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2 | OBRAZLOŽENJE TEME | 28 |
| 3 | MATERIJALI I METODE | 30 |
| 3.1 | MATERIJALI | 30 |
| 3.2 | METODE | 30 |
| 3.2.1 | <i>Propolis</i> | 30 |
| 3.2.2 | <i>Kemijska analiza nativnog propolisa</i> | 31 |
| 3.2.3 | <i>Priprema etanolnog ekstrakta propolisa</i> | 31 |
| 3.2.4 | <i>HPLC analiza</i> | 32 |
| 3.2.5 | <i>Fenolni standardi</i> | 32 |
| 3.2.6 | <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti propolisa in vitro</i> | 33 |
| 3.2.7 | <i>Priprema tkiva za određivanje lipidne peroksidacije (LPO) i aktivnosti antioksidacijskih enzima - ukupna superoksid dismutaza (tSOD), Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD), mangan superoksid dismutaza (MnSOD), katalaza (KAT) i glutation peroksidaza (Gpx)</i> | 33 |
| 3.2.8 | <i>Određivanje LPO-a u jetri, plućima i mozgu</i> | 34 |
| 3.2.9 | <i>Određivanje tSOD-a, CuZnSOD-a i MnSOD-a u jetri, plućima i mozgu</i> | 36 |
| 3.2.10 | <i>Određivanje KAT-a u jetri, plućima i mozgu</i> | 38 |
| 3.2.11 | <i>Određivanje Gpx-a u jetri, plućima i mozgu</i> | 39 |
| 3.2.12 | <i>Određivanje proteina metodom po Lowryju</i> | 39 |
| 3.2.13 | <i>Priprema tkiva za određivanje ekspresije gena antioksidacijskih enzima (SOD-1, SOD-2, KAT, Gpx-1)</i> | 39 |
| 3.2.14 | <i>Izolacija RNA iz jetre, mozga i pluća</i> | 40 |
| 3.2.15 | <i>Određivanje koncentracije i kvalitete RNA</i> | 41 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.16 | Reverzna transkripcija..... | 42 |
| 3.2.17 | Provjera kvalitete cDNA dobivene reverznom transkripcijom. | 43 |
| 3.2.18 | Analiza ispoljenosti gena SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1 | 44 |
| 3.2.19 | Određivanje genske ekspresije pomoću GEArray Q series Mouse Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array čipa | 46 |
| 3.2.20 | Priprema tkiva za određivanje ekspresije proteina antioksidacijskih enzima (SOD-1, SOD-2, KAT, Gpx) u jetri, mozgu i plućima | 51 |
| 3.2.21 | SDS elektroforeza (SDS-PAGE) | 52 |
| 3.2.22 | Prijenos (transfer) proteina sa gela na membranu..... | 55 |
| 3.2.23 | Kemikalije | 55 |
| 3.2.24 | Detekcija proteina specifičnim antitijelima | 56 |
| 3.2.25 | Antitijela..... | 56 |
| 3.2.26 | Kemikalije | 57 |
| 3.2.27 | Priprema otopina..... | 57 |
| 3.2.28 | Postupak..... | 58 |
| 4 | REZULTATI | 59 |
| 4.1 | KONCENTRACIJA FENOLA U ETANOLNOM EKSTRAKTU PROPOLISA | 60 |
| 4.2 | ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST PROPOLISA IN VITRO | 61 |
| 4.3 | UTJECAJ PROPOLISA NA OKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U JETRI, MOZGU I PLUĆIMA | 62 |
| 4.3.1 | LPO..... | 62 |
| 4.3.2 | CuZnSOD, MnSOD..... | 62 |
| 4.3.3 | KAT, Gpx..... | 65 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3.4 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u jetri</i> | 67 |
| 4.3.5 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u plućima</i> | 67 |
| 4.3.6 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u mozgu.....</i> | 70 |
| 4.3.7 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u jetri</i> | 72 |
| 4.3.8 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u plućima.....</i> | 72 |
| 4.3.9 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u mozgu</i> | 72 |
| 4.3.10 | <i>Utjecaj propolisa na ekspresiju 96 gena koji se aktiviraju u stresu i toksičnosti</i> | 76 |
| 4.4 | UTJECAJ PROPOLISA NA OKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U JETRI, MOZGU I PLUĆIMA U HIPERBARIČKIM UVJETIMA..... | 87 |
| 4.4.1 | <i>LPO.....</i> | 87 |
| 4.4.2 | <i>CuZnSOD, MnSOD.....</i> | 87 |
| 4.4.3 | <i>KAT, Gpx.....</i> | 88 |
| 5 | RASPRAVA | 92 |
| 6 | ZAKLJUČCI..... | 101 |
| 7 | SAŽETAK..... | 103 |

| | | |
|-----------|-------------------------|-----|
| 8 | SUMMARY | 105 |
| 9 | LITERATURA | 107 |
| 10 | ŽIVOTOPIS | 120 |

1 UVOD

1.1 PROPOLIS

1.1.1 Identifikacija i terminologija

Propolis (pčelinje ljepilo – bee glue) je generičko ime za smolastu tvar koju skupljaju pčele s određenih dijelova biljaka, osobito pupoljaka i kore crnogoričnih biljaka. Riječ «propolis» je izvedena od grčke riječi pro- (obrana) i polis- (grad), što označava obranu grada (u ovom slučaju košnice) (Ghisalberti, 1979.). Propolis je adhezivna, smolasta tvar koju pčele skupljaju, prerađuju i koriste u gradnji košnice, i zaštiti od vanjskih neprijatelja. Pčele (*Apis mellifera*, L.) skupljaju smolu, žvaču i uz pomoć enzima pljuvčanih žlijezda djelomice probavljen materijal se miješa s pčelinjim voskom i koristi u košnici. Premda propolis može sadržavati nešto polena, ne smije se miješati s polenom, kao ni sa matičnom mliječi, koja je također pčelinji produkt unutar košnice.

1.1.2 Povijesna i današnja upotreba propolisa

Podaci u literaturi uključuju korištenje propolisa tijekom više od 2000 godina, još od 300 godina prije naše ere. Dokazano je da propolis ima antiseptična, antitumorska, bakteriostatska, antiupalna, anestetska i antioksidacijska svojstva, pa je upravo zbog toga njegova uporaba gotovo neograničena (Burdock, 1998.). Poznata je nadalje, njegova uloga u zacjeljivanju rana, regeneraciji tkiva, liječenju opekлина, neurodermatitisu, psorijazi i drugim kožnim bolestima. Također se upotrebljava u liječenju reumatizma i zubnoj medicini. Pokazano je da ima anestetsko djelovanje čak 5 puta jače od kokaina. Upotrebljava se u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (izrada krema za lice, losiona itd.). Također je upotrebljavan kao konzervans u mesnoj industriji, pa čak i u muzičkoj,

gdje se koristi kao smola za popravak žičanih instrumenata. U posljednje vrijeme se sve više koristi kao dodatak prehrani, obzirom na njegova gore navedena svojstva.

1.1.3 Kemijska obilježja propolisa

Različita boja, miris i kemijski sastav propolisa rezultat je skupljanja istog s različitih biljnih izvora. Općenito, propolis sadrži 50% balzama i smola, 30% pčelinjeg voska, 5% polena, 10% eteričnih ulja i 5% ostalih organskih komponenata. Posljednja dva uključuju fenole male molekularne mase za koje se smatra da imaju biološki aktivna svojstva, a to su flavonoidi, fenolne kiseline i esteri, aromatski aldehidi i terpenoidi (Shimizu i sur. 2004.). Jednostavno frakcioniranje propolisa kako bi se dobile zasebne tvari je teško zbog njegova kompleksnog sastava. Uobičajeni način je ekstrahiranje frakcije topive u alkoholu (propolis balzam), a konačni rezultat je alkoholni ekstrakt propolisa (Pascual i sur.1994.). Osim etanolne ekstrakcije propolisa koja je najčešća, postoji i vodena ekstrakcija propolisa koja je također pokazala pozitivne značajke propolisa (Oršolić i sur. 2004.).

1.1.4 Biološka svojstva propolisa

Kao što je već prije spomenuto, biološki učinci propolisa vezani su uz antibiotska i protuupalna, a u posljednje vrijeme i antioksidacijska svojstva (Isla i sur. 2000) zbog potencijalne uloge «hvatača» slobodnih radikala (eng. scavenger) (Pascual i sur.1994.). Neki istraživači svrstavaju biokemijske efekte aktivnih komponenti propolisa unutar četiri grupe:

- prema afinitetu vezanja bioloških polimera
- prema vezanju iona teških metala
- obzirom na katalizu transporta elektrona

-
- prema sposobnosti vezanja slobodnih radikala

Također postoje podaci o inhibiciji različitih enzima odgovornih za početak upalnih procesa kao što su hidrolaze, alkalne fosfataze, mijeloperoksidaze (Frenkel i sur. 1993.). Gonzales i sur. (1994.) su zamijetili zaštitni učinak propolisa u jetri štakora sa toksičnim oštećenjima jetre tijekom akutne ishemije. Svi ovi biološki učinci se pripisuju flavonoidima, koji predstavljaju biološki najaktivniju komponentu propolisa.

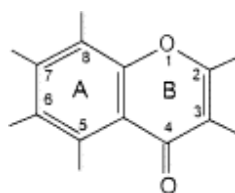
1.2 FLAVONOIDI

1.2.1 Identifikacija i terminologija

Flavonoidi (bioflavonoidi) obuhvaćaju veliku grupu sekundarnih metabolita koji su prisutni u svim biljkama. To su pigmenti odgovorni za obojenost cvjetova i listova. Važni su za normalan rast, razvoj i obranu biljaka. Osim toga, vrlo su važni dio ljudske ishrane jer se nalaze u voću, povrću, orašastim plodovima, vinu i čaju, a često se zbog visoke farmakološke učinkovitosti nazivaju i «bojom zdravlja» (Havsteen, 1983.). Prosječni dnevni unos flavonoida u hrani iznosi 1 do 2 grama. Današnji nutricionisti sve više koriste flavonoide u liječenju mnogih bolesti, zbog dokazane sposobnosti flavonoida da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju hormone i neurotransmitere, te «hvataju» slobodne radikale (Havsteen, 2002.). Međutim, neki flavonoidi posjeduju i prooksidativna svojstva, što ponekad ovisi o vrsti flavonoida, ali i o upotrijebljenoj dozi (Cao i sur. 1997.).

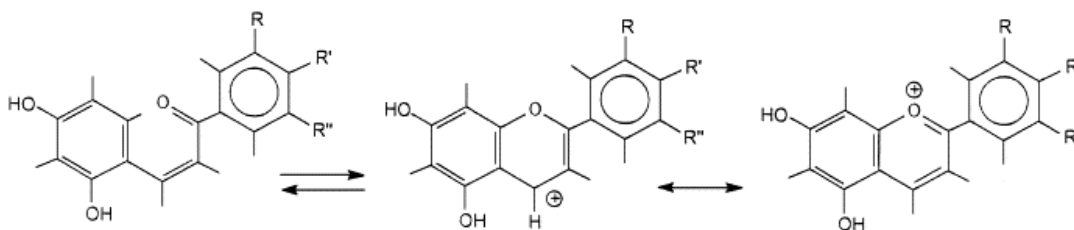
1.2.2 Kemijska obilježja flavonoida

Flavonoidi su derivati benzo- γ -pirona, a mogu biti grupirani prema prisutnosti različitih reaktivnih skupina na prstenu, kao i prema stupnju zasićenosti benzo- γ -pironskog prstena (DiCarlo i sur. 1999.) (*Slika 1*).

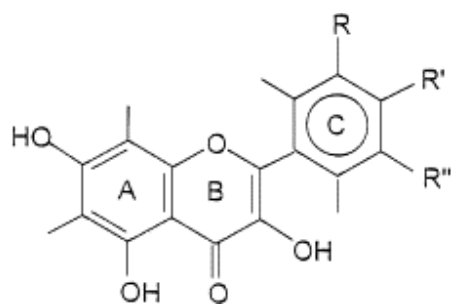


Slika 1. *Struktura benzo- γ pirona. Brojevi na atomima strukture prstena su važni za nomenklaturu derivata flavonoida. Primjer: pelargonidin, $R=H$; $R'=OH$, $R''=OH$; cijanidin, $R=OH$; $R'=OH$, $R''=H$; delphinidin, $R=OH$; $R'=OH$, $R''=OH$; peonidin, $R=OCH_3$; $R'=OH$, $R''=H$; i malvidin, $R=OCH_3$; $R'=OH$, $R''=OCH_3$.*

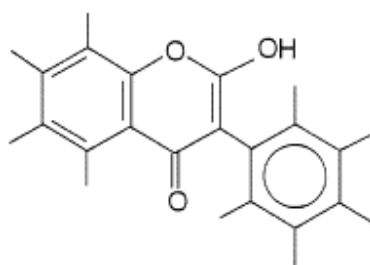
Grupi flavonoida čine antocijanidini (*Slika 2*), flavonoli (*Slika 3*), izoflavonoli (*Slika 4*), flavoni (*Slika 5*), izoflavoni (*Slika 6*), flavanoni (*Slika 7*), auronni (*Slika 8*) i flavanonoli (*Slika 9*). Struktura flavonoida obuhvaća 3 aromatska prstena (A,C,B). Različiti članovi porodice flavonoida prepoznaju se po varijacijama u prstenu C i vrsti supstituenta. Neki od njih prikazani su na sljedećim slikama.



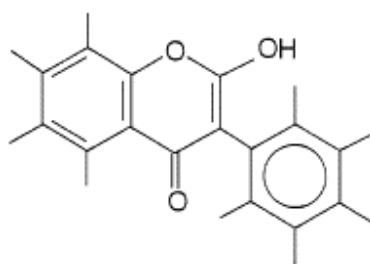
Slika 2. *Struktura, tautomerizam, mezomerizam antocijanidina*



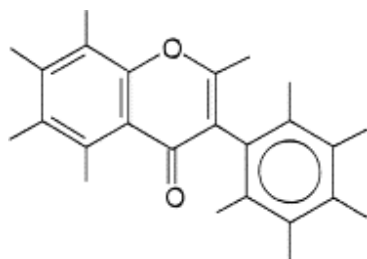
Slika 3. *Struktura flavonola. U tu skupinu pripadaju kamferol, kvercetin, galangin, izoramnetin, miricetin*



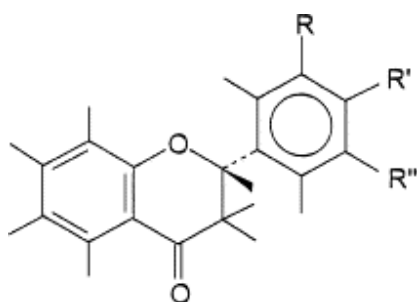
Slika 4. *Struktura izoflavonola.*



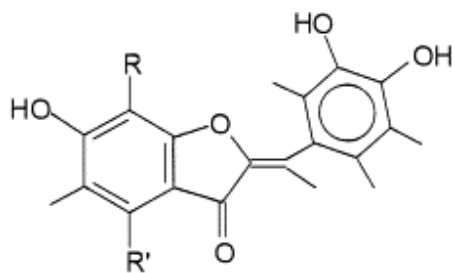
Slika 5. *Struktura flavona. U tu skupinu pripadaju orizin, apigenin, luteolin, krizin*



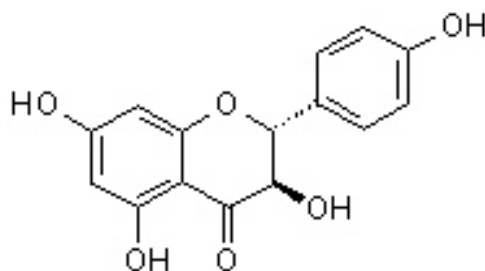
Slika 6. Struktura izoflavona. U tu skupinu pripadaju genistein, daidzein



Slika 7. Struktura flavanona. U tu skupinu pripadaju naringenin, eriodiktiol, likviritin, pinocembrin



Slika 8. Struktura aurona. U tu skupinu pripadaju aurensidin, sulfuretin, marinetin



Slika 9. *Struktura flavanonola. U tu skupinu pripada taksifolin*

Flavonoidi su vrlo reaktivne tvari, koje lako oksidiraju i kao takvi imaju ulogu zaštite različitih tvari u stanicama (npr. zaštićuju polinezasićene masne kiseline od oksidacije u membranama, zaštita askorbinske kiseline od oksidacije). Imaju sposobnost fluorescencije, ali ne postoji dokaz o njihovu sudjelovanju u procesima fotosinteze.

1.2.3 Apsorpcija i metabolizam flavonoida

Antioksidacijski potencijal flavonoida, tj. njihova potencijalna bioaktivnost *in vivo* ovisi o njihovoj apsorpciji, metabolizmu, distribuciji i izlučivanju iz organizma nakon njihovog unosa i redukcijskih svojstava nastalih metabolita. Razumijevanje procesa uključenih u apsorpciju i distribuciju flavonoida je ključno za određivanje njihovih potencijalnih bioaktivnih učinaka *in vivo*, kao i sveukupnog značaja u sprječavanju niza bolesti. Postoji puno podataka u literaturi koji podupiru biotransformaciju flavanola i drugih flavonoida u tankom i debelom crijevu gastrointestinalnog trakta (GI) (Hollman i sur. 1997., Rice-Evans i sur. 2000.) odnosno jetri (Scalbert i sur. 2000.).

1.2.3.1 Promjene flavonoida u gornjem probavnom traktu

1.2.3.1.1 Utjecaj sline

Postoje studije koje ispituju učinak sline i želučanog soka na promjenu strukture flavonoida, pa je tako pokazano da slina gotovo ne djeluje na stabilnost katehina iz zelenog čaja (Tsuchiya i sur. 1997.). Inkubacija procijanidinskih oligomera (dimer-heksamer) u ljudskoj slini tijekom 30 minuta ne rezultira njihovim raspadom u manje oligomerne jedinice, što upućuje da te tvari ostaju intaktne u ustima i ždrijelu prije nego uđu u želudac (Spencer i sur. 2001.)

1.2.3.1.2 Promjene flavonoida u želučanom lumenu

Pokazano je da su flavanolni oligomeri u rasponu od dimera do dekamera izrazito nestabilni u uvjetima niskog pH kakav je prisutan u želucu. Inkubacija procijanidina želučanim sokom u rasponu od 10 minuta do 3 sata je uzrokovala brzu razgradnju oligomera na epikatehinske monomerne i dimerne jedinice, ali i neke druge, tijekom kasnijeg vremenskog perioda (Spencer i sur. 2000.). Premda su neke studije pokazale da ne postoji cijepanje procijanidina u želucu, kemijska razgradnja procijanidina u *in vitro* uvjetima pri niskom pH je dobro određena; prema tome, ako je pH u želucu dovoljno nizak, procijanidini će se brzo razgraditi do manjih flavanolnih jedinica koje će nakon toga ući u tanko crijevo (Porter, 2002.).

1.2.3.2 Promjene flavonoida u tankom crijevu

Postoji mnogo čimbenika koji uvjetuju količinu i brzinu apsorpcije probavljivih komponenata u tankom crijevu, kao što su fizikalno-kemijski čimbenici (molekulska masa, lipofilnost, topivost), te biološki čimbenici (gastričko i intestinalno vrijeme prolaza

tvori, pH lumena, propustivost membrane) (Higuchi i sur. 1981.). Nakon prelaska iz želuca prema jejunumu (prve dvije petine tankog crijeva), pH raste od 2.0 prema pH 7.0. Dobro je poznato da polifenolne tvari s kateholnim strukturama oksidiraju u neutralnim i alkalnim uvjetima. Fenoli se mogu vezati za proteine u kompleksnim hranjivim matriksima, a pH u istima može biti puferiran kroz dugi vremenski period, pa oksidacija flavanola može stoga biti djelomična tijekom putovanja kroz probavni trakt. Nadalje, pokazano je da askorbat značajno povećava stabilnost flavanola u intestinalnoj tekućini (Chen i sur. 1998.). Prema tome, prisutnost askorbata *in vivo* može stabilizirati polifenole u neutralnom ili alkalnom miljeu tankog crijeva. Mnoge studije pokazale su da se transfer probavljenih flavonoida događa na putu od lumena tankog crijeva do krvotoka u mezenteriju i da se upravo tijekom tog transfera flavonoidi konjugiraju (Rice-Evans, 2001.). Neke pak studije potvrđuju da je količina apsorpcije u tankom crijevu dosta niska i čini svega oko 10 do 20% (Spencer i sur. 1999.). Enzimskom razgradnjom flavonoida u debelom crijevu nastaje veliki broj novih metabolita jer bakterijski enzimi mogu katalizirati mnoge reakcije uključujući hidrolizu, dehidroksilaciju, demetilaciju, cijepanje prstena i dekarboksilaciju, te brzu dekonjugaciju (Scheline, 1999.). Crijevna mikroflora katalizira cijepanje flavonoidnog glavnog lanca na jednostavnije molekule kao što su fenolne kiseline. Količina apsorpcije flavonoidnih metabolita u crijevu još uvijek nije do kraja razjašnjena, pa je potrebno odrediti ulogu crijevne mikroflora na sveukupnu rasprostranjenost i moguću bioaktivnost flavonoida u hrani. Nadalje, sve je više radova koji ispituju promjene na crijevnoj mikroflori uzrokovane flavonoidima, a koji mogu imati utjecaj na sveukupno zdravlje organizma (Raventos i sur. 2005.).

1.2.4 Genetika flavonoida

Flavonoidi nastaju pod utjecajem različitih vanjskih podražaja ili pak metaboličkom povratnom spregom reakcija u samoj stanici. Kao rezultat stimulacije flavonoida javljaju se genska aktivacija, mutacije i popravak DNA (Fekermann i sur. 1998.). Flavonoidi induciraju ekspresiju gena za izoenzime oksigenaza specifičnih za pojedini flavonoid, tako da reakcije razgradnje regulirane enzimima citokroma P450, nikotinamid adenin dinukleotida (NADPH), flavin adenin dinukleotida (FADH₂), Cu²⁺ i Fe²⁺ uključuju atome kisika koji, u aktiviranom stanju može biti toksičan u smislu proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (RKV), engl. Reactive oxidative species (ROS).

1.2.5 Flavonoidi kao čistači RKVa (scavengeri)

Jedna od ključnih uloga flavonoida je njihova dobra sposobnost hvatanja RKVa. Duthie i sur. 1999., te Korkina i sur. 1997. su pokazali da njihova antitumorska svojstva jako ovise o njihovim antioksidacijskim i "hvatačkim" svojstvima. Za gore navedena svojstva odgovoran je B-prsten kateholne grupe (dihidroksilirani B-prsten) koji daje vodikov atom (elektron) nestabilnom radikalima koji ga na taj način stabilizira. Ostale antioksidacijske karakteristike flavonoida uključuju prisutnost 2,3 nezasićenih veza u konjugaciji s 4 okso funkcijom C prstena, kao i prisutnost funkcionalnih skupina sposobnih za vezivanje iona prijelaznih metala (Fe²⁺, Cu⁺) (Rice-Evans i sur. 1996.). Metabolički oblici flavonoida koji cirkuliraju organizmom, kao što su glukuronidi i O-metilirani oblici kao i unutarstanični metaboliti, npr. flavonoid-GSH adukti imaju smanjenu sposobnost doniranja vodikovog atoma (Spencer i sur. 2001.), te su stoga manje učinkoviti hvatači RKV-a i dušikovih vrsta u odnosu na njihove izvorne aglikonske forme. Nadalje, koncentracije flavonoida i njihovih metaboličkih oblika

nakupljenih u *in vivo* uvjetima, npr. u plazmi ili mozgu (Abd El Mohsen i sur. 2002.) su niže (visoke nanomolarne, niske mikromolarne) nego one zabilježene za vitamin C i α -*tokoferol* (Halliwell i sur. 2000.). Prema tome, u *in vivo* uvjetima flavonoidi imaju manji značaj kao antioksidansi jer je njihova koncentracija niža od gore navedenih klasičnih antioksidansa. Sve veći broj radova pokazuje da su utjecaji flavonoida na staničnom nivou rezultati njihovog međudjelovanja sa specifičnim proteinima koji imaju središnju ulogu u signalnim putevima u stanici (Schroeter i sur. 2002.). Nedavne studije pokazale su da flavonoidi mogu štiti neurone u oksidacijskom stresu puno učinkovitije nego askorbat, čak i ako se askorbat koristi u 10 puta višim koncentracijama u odnosu na flavonoid (Schroeter i sur. 2000.). To je također bitan aspekt za terapijske aplikacije flavonoida, npr. nakon infekcije, upale, opekline ili radijacijskih ozljeda koje karakterizira povećana proizvodnja RKVa.

1.3 SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost svih radikala. Prema naboju oni mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni, a mogu se formirati i pucanjem kovalentnih veza (homo- ili heterolize). Iako je većina slobodnih radikala organske prirode, moguće je stvaranje i neorganskih radikala. Jednom stvoren slobodni radikal (faza inicijacije) može izazvati niz lančanih reakcija (faza propagacije), reagirajući sa drugim, manje reaktivnim vrstama. Premda su slobodni radikali u organizmu obično prisutni u vrlo niskoj koncentraciji (10^{-5} - 10^{-9} mol), pokazuju, prije svega, toksične efekte. Zbog visoke kemijske reaktivnosti lako stupaju u reakciju međusobno ili sa drugim molekulama, pri čemu nespareni elektroni

stvaraju kemijske veze, oslobađa se energija, a sustav prelazi u niže energetske stanje. U reakciji dva radikala dolazi do kombinacije njihovih nesparenih elektrona (označenih sa \cdot), koji formiraju kovalentnu vezu. Pored formiranja kovalentne veze, slobodni radikali mogu reagirati s drugim biomolekulama i na brojne druge načine. Tipične reakcije slobodnih radikala su: davanje elektrona (sa reducirajućeg radikala), primanje elektrona (na oksidirajući radikal), oduzimanje vodika, reakcija adicije, reakcija poništavanja, reakcija disproporcionalnosti. Djelovanje slobodnih radikala ograničeno je, zbog njihove vrlo velike reaktivnosti, na supstrate (biomolekule) iz najbliže okoline. Njihov srednji radijus difuzije je vrlo mali (manje od 100 nm), a poluživot u biološkim sustavima nekoliko mikrosekundi. Većinu slobodnih radikala u organizmu čine reaktivne vrste kisika. RKVi uključuju niz kemijski reaktivnih molekula nastalih metabolizmom kisika. Djelujući kao oksidansi, RKV mijenjaju svojstva tvari s kojima reagiraju, te stoga interferiraju i s njihovom funkcijom, tj. djeluju toksično. Slobodni radikali kisika prikazani su u **Tablici 1**.

| Tvar | Vrijeme trajanja (poluživot) | Značajke |
|--|-----------------------------------|--|
| $^1\text{O}_2$ (singletni kisik) | 10^{-6} s | Prvi ekscitirani oblik kisika |
| $\text{O}_2^{\bullet -}$ (superoksidni anion) | Spontana i enzimatska dismutacija | Jednoelektronska redukcija O_2 ; stvara se u mnogim antioksidacijskim reakcijama |
| HO_2^{\bullet} (perhidroksi radikal) | - | Protonirani oblik $\text{O}_2^{\bullet -}$; topljiviji u lipidima |
| H_2O_2 (vodikov peroksid) | Stabilna enzimatska redukcija | Dvoelektronsko redukcijsko stanje; stvara se iz $\text{O}_2^{\bullet -}$ (HO_2^{\bullet}) dismutacijom ili direktno iz O_2 |
| HO^{\bullet} (hidroksilni radikal) | 10^{-9} s | Trielektronsko redukcijsko stanje; stvara se u Fentonovoj reakciji, Haber-Weissovoj reakciji uz željezo kao katalizator; visoko je reaktivan |
| RO^{\bullet} (alkoksi radikal) | 10^{-6} s | Organski radikal (lipidni) |

| | | |
|---|-----|---|
| ROO• (peroksi radikal) | 7 s | Stvara se iz organskog hidroperoksida, ROOH, odstranjenjem vodika |
| ROOH (organski hidroperoksid) | - | Lipid-, timin-OOH |

Tablica 1. Reaktivne vrste kisika

1.3.1 Izvori reaktivnih kisikovih vrsta

U aerobnim organizmima reaktivne kisikove vrste se stvaraju na više načina: u toku apsorpcije radijacije (zračenja), u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, tijekom fagocitoze, prilikom transformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatskom retikulumu, u procesu metabolizma etanola, u enzimskim reakcijama koje kataliziraju oksidaze, u reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala s promjenjivom valencijom, te u procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina.

(Tablica 2.)

IZVORI RKV

Unutarnji**Vanjski**

NAD(P)H oksidaza

Toksini iz okoliša

Mitohondriji

Ionizirajuće zračenje

Peroksisomi

Ultraljubičasto svjetlo

Citokrom P450

Električno polje

Ksantin oksidaza

Kemoterapeutici

Ciklooksigenaze

Upalni citokini

Lipooksigenaze

 γ -Glutamil transpeptidaze

Tablica 2. Izvori RKV u organizmu

Enzimi koji su sposobni stvarati RKV su brojni, a uključuju citokrome P450, različite oksidaze, peroksidaze, lipooksigenaze i dehidrogenaze. Podaci iz literature pokazuju da do 4% ukupnog kisika uključenog u proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijima odlazi na stvaranje RKV (Dalton i sur. 1999., Kehrer, 2000.), pa se mitohondrij smatra glavnim izvorom njihova nastajanja. RKV također proizvode sustav ksantin/ksantin oksidaza, lipooksigenaze i ciklooksigenaze. Osim toga, poznato je da RKV nastaju u procesu fagocitoze. Pri kontaktu s patogenom, u fagocitnim stanicama se odvija tzv. respiratorni prasak (eng. respiratory burst), kojeg karakterizira povećana potrošnja kisika i stvaranje RKV, za koje je direktno odgovoran membranski vezani sustav NADPH oksidaze (van Eeden i sur. 1999.).

1.4 OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u prooksidativno-antioksidacijskom sustavu organizma u korist oksidacijskog stanja, što dovodi do potencijalnog oštećenja tkiva i organa (Sies, 1991.). Premda je poznata uloga RKV u regulaciji staničnih puteva, diferencijacije i proliferacije stanice, brojna istraživanja ukazuju na prevagu njihova prooksidativna svojstva (Allen, 1998.). Na molekularnom nivou slobodni radikali mogu modificirati proteine, oštetiti DNA i stanične transkripcijske elemente, te inicirati lančanu reakciju koja uzrokuje lipidnu peroksidaciju. U slučaju oštećenja proteina, nastaju oksidirani oblici proteina koji, iako se u principu brzo uklanjaju kao funkcionalano inaktivni, mogu također postepeno akumulirati i pridonijeti oštećenjima povezanim sa različitim bolestima kao što je dijabetes, ateroskleroza i razne neurodegenerativne bolesti (Kehrer, 2000.). RKV također mogu oksidirati DNA baze. Oksidirani oblik DNA nastao na ovakav način, ima za posljedicu nastanak mutacija i razvoj kancerogeneze. Ovim promjenama naročito je podložna mitohondrijska DNA jer nije zaštićena histonima (što je slučaj sa jezgrinom DNA) a nalazi se u okruženju koje se smatra glavnim izvorom slobodnih kisikovih vrsta (Yu, 1994.). Lipidna peroksidacija (u daljnjem tekstu LPO) nastaje reakcijom RKV sa lipidima membrana, koje su sastavni dio staničnih membrana i kao takve igraju važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu u stanici. Peroksidacija lipida neizbježno mijenja i oštećuje lipidnu molekularnu strukturu. Osim toga, LPO je glavni izvor ostalih citotoksičnih produkata. Produkti LPO (malondialdehid i 4-hidroksinonenal) su biološki aktivni i mogu djelovati na razne stanične komponente, uključujući membrane i enzime.

1.5 ZAŠTITA OD REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA

Održavanje homeostaze oksidativno/antioksidacijskog stanja je preduvjet aerobnog života. Stoga se tijekom evolucije razvilo više mehanizama zaštite, koji obuhvaćaju regulaciju stvaranja RKV, poništavanje njihova djelovanja (antioksidansi) ili pak popravak nastalih oštećenja. Ti mehanizmi uključuju djelovanje enzimskih antioksidansa (superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza), koji predstavljaju primarnu liniju antioksidativne zaštite; te neenzimskih "čistača", poznatih kao antioksidansi, koji ujedno čine sekundarnu liniju obrane organizma. Termin "antioksidansi" ne podrazumjeva jednu određenu grupu značajki sličnih po kemijskoj prirodi: to je opći naziv za sve tvari koje mogu spriječiti ili značajno smanjiti oksidaciju supstrata (Halliwell, 1990.).

1.5.1 Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi obuhvaćaju prirodne endogene produkte stanice, hranjive egzogene tvari i sintetičke produkte. U neenzimske antioksidanse spadaju: vitamin E, vitamin C, β -karoten, glutacion, albumin, metalotionein, transferin, urati, bilirubin, ceruloplazmin, koji, obzirom na različitu strukturu i afinitet, ostvaruju i različite mehanizme djelovanja antioksidativne zaštite.

1.5.2 Enzimski antioksidansi

Enzimska antioksidativna zaštita obuhvaća tri glavna enzima koji obavljaju funkciju uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta iz stanica svih aerobnih organizama. Ova zaštita obuhvaća enzime superoksid dismutazu (SOD), katalazu (KAT), glutacion peroksidazu (Gpx), glutacion reduktazu (GR) i glutacion-S-transferazu (GSZ). U fiziološkim uvjetima ovi enzimi zadržavaju nisku koncentraciju radikala u stanici i

njihova aktivnost regulirana je preciznim mehanizmima na molekularnom nivou. Svi ovi enzimi su bitni za održanje homeostaze između oksidacijskog i antioksidacijskog kapaciteta kao i za preživljavanje svih aerobnih organizama.

1.5.2.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (superoksid:superoksid oksidoreduktaza, EC 1.15.1.1) katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\bullet -}$) u vodik peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula $O_2^{\bullet -}$ oksidira u O_2 , a druga reducira u H_2O_2 (reakcija 1):



Kod eukariota, uključujući i čovjeka, prisutne su tri izoenzimska oblika SOD:

1. Bakar, cink-ovisna SOD (CuZnSOD)
2. Mangan-ovisna SOD (MnSOD)
3. Ekstracelularna SOD (ECSOD)

Sva tri izoenzima imaju istu funkciju, a to je otklanjanje superoksidnog aniona. Međutim, navedeni izoenzimi razlikuju se po strukturi, svojstvima, lokaciji unutar stanice i distribuciji u tkivima, te mehanizmima koji utječu na ekspresiju ovih enzima.

1.5.2.1.1 CuZnSOD (SOD-1)

Gen odgovoran za sintezu CuZnSOD kod čovjeka, nalazi se na 21. kromosomu (Tan i sur. 1973.). CuZnSOD je pretežito citosolni enzim. U malim količinama nalazi se u staničnoj membrani, jezgri i mitohondrijima. Unutar mitohondrija lokaliziran je u intermembranskom prostoru. Pokazano je prisustvo ovog enzima u svim tkivima kao i u plazmi i eritrocitima, a posebno visoku aktivnost pokazuje u jetri, bubrezima, srcu i nadbubrežnoj žlijezdi (Marklund, 1984.). Enzim ima molekularnu masu oko 32 kDa i predstavlja homodimer sastavljen iz dvije podjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan

atom Cu^{2+} i jedan atom Zn^{2+} . Aktivno mjesto enzima čine ioni bakra, i uz bakar je vezana katalitička aktivnost enzima, dok cink stabilizira njegovu prostornu konformaciju. Poliakrilamid gel elektroforezom izolirana su dva izoenzimska oblika humane CuZnSOD. Različiti izoenzimski oblici nastaju u procesu posttranslacijskih modifikacija primarnih transkripata. CuZnSOD je izuzetno stabilan enzim. Otporan je na djelovanje proteaza i denaturirajućih agenasa. CuZnSOD igra važnu ulogu u prvoj liniji antioksidativne obrane. Isto tako, mnoge neurodegenerativne bolesti su povezane uz promjenjene funkcije ovog enzima (Rosen i sur, 1993.), što upućuje na njenu bitnu ulogu u odstranjivanju reaktivnih kisikovih vrsta u stanici.

1.5.2.1.2 MnSOD (SOD-2)

Mangan-ovisna SOD je prvi put opisana 1973. godine. Gen humane MnSOD nalazi se na 6. kromosomu. MnSOD je u eukariotskim organizmima prisutna samo u matriksu mitohondrija. Sintetizira se u citosolu (kodirana je genima u jezgri), a u mitohondrij dolazi translacijom proenzima sa signalnom sekvencom koja upućuje protein u mitohondrij. Kao i CuZnSOD, u velikim je količinama prisutna u jetri, bubregu, nadbubrežnoj žlijezdi i srcu. Ovaj enzim je homotetramer molekularne mase od 80 kDa, sadrži 2 do 4 atoma mangana u aktivnim mjestima enzima i prisutan je u svim aerobnim organizmima. Dokazano je da MnSOD ima kritičnu ulogu u obrani stanica od oksidacijskog stresa kao i u inhibiciji tumorigeničnosti (Oberley i sur, 1979.). Pokazano je da mnoge vrste tumora imaju nisku aktivnost MnSOD. Osim toga, prekomjerna ekspresija MnSOD suprimira tumorigeničnost stanica melanoma i glioma stanica, pa možemo reći da taj enzim ima ulogu tumor-supresora u različitim vrstama raka (Zhong i sur. 1997.).

1.5.2.1.3 ECSOD (SOD-3)

ECSOD je tetramerni, slabo hidrofobni protein sa molekularnom masom od 135 kDa. Sadrži 4 atoma bakra i cinka po molekuli, sa atomima Cu u aktivnom mjestu. Po svojim strukturnim značajkama, ECSOD je sličnija CuZnSOD, nego MnSOD. Pokazuje veliki afinitet za kisele glikozaminoglikane (prije svega heparin) za koji se veže izvanstanično, pa tako u ovisnosti od sposobnosti vezanja na heparin razlikujemo tri frakcije ECSOD: frakcija A (ne posjeduje afinitet za heparin), frakcija B (posjeduje slabi afinitet za heparin) i frakcija C (posjeduje veliki afinitet za heparin). ECSOD sintetiziraju fibroblasti, glija stanice, makrofagi, hondrociti i endotelne stanice. Ovaj enzim također modulira djelovanje dušikovog monoksida (NO^{\bullet}). Dušikov monoksid (također poznat pod nazivom dušikov oksid), je najmanji ubikvitarni stanični signalni medijator. NO^{\bullet} je slobodni radikal male molekulske mase, hidrofobnog karaktera i relativne kemijske nestabilnosti, što ga čini pogodnim za lokalnu komunikaciju unutar i između stanica. U visokim koncentracijama pokazuje direktne toksične efekte u stanicama, i inhibira enzime u različitim dijelovima stanice, uključujući mitohondrije i jezgru. Porast aktivnosti ECSOD uzrokuje intenzivnije otklanjanje $\text{O}_2^{\bullet-}$, čime se pozitivno djelovanje NO^{\bullet} u raznim staničnim procesima produžuje. S druge strane, pri smanjenoj aktivnosti enzima, povećana koncentracija $\text{O}_2^{\bullet-}$ intenzivira vezanje NO^{\bullet} i nastajanje peroksinitrita, koji kao izrazito toksičan jako oštećuje tkiva.

1.5.2.1.4 Katalaza (KAT)

Katalaza (H₂O:H₂O-oksidoireduktaza, EC 1.11.1.6) je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi i nalazi se u svim živim organizmima. Katalaza ima molekularnu masu od 240 kDa i sastavljena je od četiri identične podjedinice od kojih svaka sadrži atom željeza koji predstavlja aktivno mjesto enzima. Gen za katalazu nalazi se na 11. kromosomu. Poznata su tri izoenzimska oblika (A, B, C) koji nastaju posttranslacijskom modifikacijom ishodišnog proteina. Osnovna uloga katalaze je razgradnja vodikovog peroksida putem katalaznog (2) i/ili peroksidaznog (3) oblika reakcije:



gdje je R bilo koji od brojnih H-donirajućih supstrata kao što su etanol, metanol, nitrit, kvinoni). Pri fiziološkim koncentracijama H₂O₂ prevladava peroksidazni tip reakcije. Dok glavnu ulogu u odstranjivanju malih količina vodikovog peroksida ima glutation peroksidaza (GSH-Px), katalazna aktivnost se očituje tek pri većim koncentracijama H₂O₂, što govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Katalaza je prisutna u svim tkivima sisavaca, pri čemu se visokom aktivnošću osobito ističu jetra i eritrociti. Mala aktivnost enzima nađena je u mozgu, srcu, skeletnim mišićima i slezeni. U stanici je lokalizirana ponajviše u peroksisomima, dok ju mitohondriji imaju u vrlo malim količinama ili ju uopće nemaju (Ravindranath i sur, 1990.).

1.5.2.1.5 Glutation peroksidaza (Gpx-1)

Glutation peroksidaza (glutation:vodik peroksid oksidoreduktaza, EC 1.11.1.9) se nalazi u svim eukariotskim stanicama. Katalizira reakciju redukcije H_2O_2 ili organskih hidroperoksida u prisustvu reduciranog glutaciona prema reakciji 4:



Sustav glutation peroksidaze je odgovoran za razgradnju najvećeg dijela H_2O_2 u stanici.

Glutation reduktaza uz pomoć NADPH regulira reducirani GSH:



Molekularna masa enzima je oko 85 kDa. Enzim je tetramer sa četiri identične podjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan atom selena u obliku selenocisteina, a koji tvori aktivno mjesto enzima. U živim organizmima glavna uloga Gpx je otklanjanje vodik peroksida i ostalih organskih hidroperoksida u fiziološkim (malim) koncentracijama u organizmu. Glutation peroksidaza je prisutna u četiri različita oblika: citosolna Gpx (GPX-1), fosfolipidna hidroperoksid Gpx (PHGpx), plazmatska Gpx (pGpx) i gastrointestinalna Gpx (GI-Gpx). Različite izoforme enzima različito su raspoređene po tkivima i pojedinim dijelovima stanice. Tkiva s najvećom količinom Gpx su jetra i bubrezi, u umjerenj količini prisutna je u srcu, plućima i mozgu, a malo je ima u mišićima. Unutar stanice aktivnosti nema u jezgri, dok je visoka aktivnost prisutna u mitohondrijima i citosolu. Dosad nije otkriveno zbog čega postoji toliko vrsta glutacion peroksidaza. No, budući hidroperoksidi imaju, osim toksične i korisnu ulogu kao molekule uključene u signalnu transdukciju, ovi enzimi vjerojatno imaju ulogu u održavanju odgovarajuće koncentracije hidroperoksida, kako bi stanice mogle nesmetano obavljati svoje funkcije.

1.6 POVIJEST HIPERBARIČKE MEDICINE

Henshaw je 1662. godine izgradio prvu hiperbaričku komoru, od kada potječu i prvi podaci o hiperbaričkoj terapiji. Premda je kisik otkriven 1775. godine od kada su poznati i njegovi medicinski učinci, nije se koristio u hiperbaričkoj terapiji zbog toksičnog djelovanja pod tlakom. Hiperbarički kisik je korišten prvi put 1937. godine za liječenje dekompresijske bolesti (Behnke i sur. 1937.). Istraživanja koja je provodila američka vojska nakon 2. svjetskog rata doprinijela su većem saznanju o korištenju kisika u hiperbaričkim uvjetima. Terapija hiperbaričkim kisikom (THK) koristila se kod operacija na otvorenom srcu jer je već tada primijećeno da se oštećenja koja nastaju uslijed ishemije/reperfuzije mogu smanjiti upotrebom hiperbaričkog kisika, pa se tako velika pažnja pridavala osposobljavanju operacijskih hiperbaričkih soba. Međutim, razvoj kardiopulmonarne prenosnice odvratilo je pozornost sa THK (Bernard i sur. 1963.). Tijekom 1950ih godina istraživana je značajnost THK kod učinaka radioterapije u malignim bolestima (Churchill-Davidson i sur. 1955.). Kao rezultat, korištenje THK se povećavalo i do sredine 60ih godina 20. stoljeća je THK korišten za potenciranje efekata radioterapije, liječenje anaerobnih infekcija i trovanja ugljičnim monoksidom (Smith i sur. 1962.).

1.7 TERAPIJA HIPERBARIČKIM KISIKOM (THK)

Terapija hiperbaričkim kisikom se sve više primjenjuje u brojnim područjima medicinske prakse. To je posebna terapija čiji mehanizam djelovanja je još uvijek jednim dijelom nepoznat. THK je definirana od strane «Undersea and Hyperbaric Medical Society» (UHMS) kao obrada u kojem pacijent neprekidno udiše 100%tni kisik u komori

pod tlakom većim od onog na površini morske razine (1 apsolutna atmosfera – 1 ATA). Različite koncentracije kisika kao i različiti vremenski periodi primjene THK daju različite rezultate. Pojavnost toksičnosti kisika je u korelaciji s njegovom koncentracijom, s tlakom pod kojim se udiše, kao i duljinom trajanja udisanja kisika. THK se primjenjuje s bilo kojom koncentracijom kisika i to od 21% (normalan zrak), pa sve do 100% (čisti kisik). Što je veća koncentracija kisika, to je veći rizik od njegove toksičnosti. Nadalje, što je veći tlak pod kojim se udiše kisik, veća je mogućnost toksičnosti kisika. Vrijeme tijekom kojeg se primjenjuje THK ovisi o bolesti ili stanju koja se liječi, koncentraciji kisika koji se pritom koristi, kao i tlaku. Rizik od toksičnosti kisika je i u ovom slučaju proporcionalan vremenu izlaganja. Klinički je dokazano da pacijenti mogu udisati 40%tni pa čak i 60%tni normobarički kisik bez vremenskog ograničenja bez pojavnosti toksičnog učinka kisika. U zdravih ljudi 100%tni kisik pri atmosferskim uvjetima uzrokuje neugodu, bol i kašalj nakon samo par sati. Ako se neprekidno udiše tijekom 24 sati, može dovesti do plućnog edema i smrti, ako se udisanje nastavi. Liječnici stoga nastoje ne koristiti visoke koncentracije kisika osim ako je to zaista neophodno i taj se postupak uvijek provodi u jedinicama za intenzivnu njegu (Martin, 1997.).

Neke indikacije bolesti koje se liječe THK-om prihvaćene od strane UHMSa prikazane su u **Tablici 3.**

| |
|---|
| zračna/plinska embolija |
| trovanje ugljičnim monoksidom |
| plinska gangrena |
| traumatske periferne ishemije |
| dekompresijska bolest |
| ubrzavanje zacjeljivanja kod određenih rana |
| intrakranijalni apces |
| odgođene radijacijske bolesti |
| termičke opekline |
| nekrotizirajuće infekcije mekog tkiva |

Tablica 3. Indikacije bolesti koje se liječe THKom prihvaćene od strane UHMSa

1.7.1 Fiziološka osnova i primjena THKa

Efekti THKa temelje se na plinskim zakonima (Boyleov, Daltonov i Henryjev zakon), te fiziološkim i biokemijskim efektima hiperoksije. Hiperoksija je definirana kao povećanje protoka kisika pod normalnim tlakom (normobarička hiperoksija). Prijašnje studije pokazale su genotoksičnost normobaričke hiperoksije, pa je kao takva predložena kao model za ispitivanje oksidacijskog stresa (Joenje, 1989.; Gille i sur. 1992.). Također je pokazano da izlaganje bilo hiperbaričkoj ili normobaričkoj hiperoksiji uglavnom uzrokuje promjene kao što su delecije i rekombinacije dijelova kromosoma (Vangala i sur. 1998.; Gille i sur. 1993.). Genotoksične učinke uzrokuje i normobarička i hiperbarička hiperoksija, ali se eksperimentalni uvjeti razlikuju. Obradai normobaričke

hiperoksije uključuju stalni obrada kisikom tijekom nekoliko dana, dok se učinci hiperbaričkog kisika vide već nakon nekoliko sati. Negativni učinci THK-a su povećavanje stvaranja RKVa, koji oksidiraju proteine i membranske lipide; oštećenje DNA i inhibicija bakterijskih metaboličkih funkcija. S druge strane, THK je osobito efikasna protiv anaeroba jer olakšava peroksidazni sustav leukocita koji ubijaju bakterije (Knighton i sur. 1984.). Hiperoksija u normalnim tkivima uzrokuje brzu i značajnu vazokonstrikciju, ali se kompenzira povećanim prenošenjem kisika u plazmi, tako da je u konačnici ishemično tkivo obogaćeno kisikom u THK. (Zamboni i sur. 1993.). Drugim riječima, THK ima kompleksne učinke na imunost, transport kisika i hemodinamiku. Pozitivni terapijski učinci rezultat su redukcijских uvjeta tijekom hipoksije i edema, što omogućuje učinkovite odgovore domaćina na infekciju i ishemiju. Smatra se da je THK bolji model za proučavanje akutnih učinaka kisika, kao što je proces mutageneze, apoptoze te procesa adaptacijske zaštite (Rothfuss i sur. 1999.), dok je terapija normobaričkim kisikom bolji model za proučavanje kroničnih učinaka, kao što je proces staničnog starenja (Gille i sur. 1992.).

1.7.2 Uloga THKa u dekompresijskoj bolesti

Dekompresijska bolest pojavljuje se pretežito u ronionca, gdje inertni plin (dušik) stvara mjehuriće u kapilarama i tkivima tijekom izrona (Benson i sur. 2003.). Simptomi uključuju umor, bol u zglobovima, neurološke i kardiorespiratorne simptome, komu i smrt. THK je jedini obrada za liječenje dekompresijske bolesti koji spašava život. Tijekom THK-a u hiperbaričkoj komori, inertni dušik zamijenjuje se brzo metabolizirajućim kisikom pa mjehurići odlaze ili u pluća gdje se izdišu ili u manje kapilare u kojima je tlak veći pa ih eventualno tlači natrag u tekuće stanje. Kao što je već

prije rečeno, THK terapija je korisna metoda za obrada različitih kliničkih stanja (dekompresijska bolest, opekline, trovanje ugljičnim monoksidom, zračna embolija itd.). Međutim, izlaganje čistom kisiku može uzrokovati povećanu proizvodnju RKVa i oštećenja DNA (Rothfuss i sur. 2000.). THK je zapravo pogodan sistem za proučavanje oksidacijskog stresa u ljudi i životinja. Izlaganje hiperbaričkom kisiku uzrokuje porast otopljenog kisika u krvi, što povećava koncentraciju RKVa (Dennog i sur. 1999.). THK je korištena u terapeutske svrhe i značajno oštećuje baze DNA (Rothfuss i sur. 1999.), ali potiče istovremeno i adaptivni odgovor organizma, što ukazuje na aktivnu obranu od oksidacijskog stresa (Eken i sur. 2005.). Obzirom da obrambeni mehanizmi posjeduju ograničeni kapacitet obrane, oksidacijski stres i oštećenja DNA mogu se dodatno smanjiti ili čak spriječiti različitim antioksidansima. Stoga bi antioksidacijsko sredstvo prirodnog porijekla, jednostavne primjene, relativno lako dostupno, a sa gospodarskog stanovišta poticajno, predstavljalo doprinos kako u medicini tako i u nekim područjima ljudskog djelovanja.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Propolis je ispitivan i korišten kao protuvirusno (Kimoto i sur. 2001.), protubakterijsko (Santos i sur. 2002.) i protugljivično (El Hady i sur. 2002.) sredstvo. Biološki učinci propolisa vezani su uz antibiotska i protuupalna i antioksidativna svojstva (Isla i sur. 2001.). Propolis je sastavljen od smole (50-70%), pčelinjeg voska (30%), eteričnih ulja (10%) i peludi (5%), a izuzetno je bogat vitaminima (A, B₁, B₂, B₃, biotin) i flavonoidima. Jedna od glavnih karakteristika flavonoida je visoki antioksidacijski potencijal zbog kojeg im se pripisuje sposobnost prevencije različitih bolesti kao što su različite vrste tumora, osteoporoza, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Galati i sur. 2002.). Pojedina tkiva koriste u svom metabolizmu različite količine kisika, pa tako različiti organi nisu podjednako podložni oštećenjima slobodnim radikalima i lipidnoj peroksidaciji. Usprkos činjenici da korištenje kisika u fiziološkim (metabolički procesi) i nefiziološkim uvjetima (ronioci-100%tni kisik) ima za posljedicu stvaranje slobodnih radikala, kisik se vrlo često koristi u liječenju različitih bolesti. Posljedica takve terapije ili zanimanja (ronioci) može biti oštećenje različitih tkiva i organa slobodnim radikalima. U našim ispitivanjima koristili smo nativni propolis dobiven postupkom koji je prijavljen kao patent P20050071A pri Državnom zavodu za intelektualno vlasništvo, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, Republika Hrvatska. Smatramo da bi najbolje rezultate dao nativni propolis upravo zbog gubitka tvari tijekom ekstrakcije u postupku dobivanja vodenog/alkoholnog ekstrakta. Iz tog razloga smo istražili:

- udio i vrstu flavonoida odgovornih za oksidacijski/antioksidacijski učinak nativnog propolisa

-
- antioksidacijski potencijal nativnog propolisa u *in vitro* uvjetima
 - antioksidacijski učinak nativnog propolisa u jetri, plućima i mozgu ženki CBA miševa starih 4 mjeseca hranjenih nativnim propolisom u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine odnosno 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine
 - mehanizam djelovanja nativnog propolisa na razini ekspresije gena za antioksidacijske enzime (SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1) odnosno na razini ekspresije proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1
 - mehanizam djelovanja nativnog propolisa na skupinu od 96 gena aktiviranih u stresu i toksičnosti
 - djelovanje nativnog propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u jetri, plućima i mozgu miševa izloženih oksidacijskom stresu (100%tni kisik tijekom 18 sati) kako bi se ispitala mogućnost preventivne zaštite od oštećenja izazvanih 100%tnim kisikom koji se koristi u liječenju raznih bolesti ili kod prerano rođene djece (hiperbarička komora) ili kod posebnih vrsta zanimanja (ronioci)

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

Pokuse smo obavili na zdravim miševima što smo ih dobili iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Instituta “Ruđer Bošković” u Zagrebu. Pokusni miševi bile su ženke visokosrodnog soja CBA/Hr, u dobi od 4 mjeseca. Životinje su držane po četiri u kavezu, izložene svjetlu u periodu od 06:00 do 18:00, na temperaturi od 22 °C uz neograničen pristup hrani i vodi. Eksperimentalne grupe sastojale su se od po 8 miševa u svakoj grupi. Miševi su hranjeni tijekom 14 dana prije samog pokusa sa komercijalno dostupnom hranom (kontrolna grupa) ili mješavinom komercijalno dostupne hrane i praška propolisa (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine, odnosno 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine). Jedna grupa životinja hranjena na isti način podvrgnuta je djelovanju normobaričkog kisika (100% O₂ tijekom 18 sati) u hiperbaričkoj komori (Đuro Đaković, Slavonski Brod, Hrvatska). Uvjeti normobaričkog kisika postignuti su tako da se u komoru pustio čisti kisik (25 L/min tijekom 10 minuta) kako bi se zamijenio sobni zrak. Miševi su na ovaj način hranjeni jednom dnevno tijekom dva tjedna. Pokuse smo proveli u skladu s “European Communities Council Directive” of 24 November 1986. (86/609/EEC), a odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Instituta “R. Bošković”.

3.2 METODE

3.2.1 Propolis

U pokusima je korištena smjesa propolisa skupljena iz košnica prirodno očuvanih krajeva kontinentalne Hrvatske. Propolis je sakupljan tijekom cijele godine. Uzorci su pulirani sezonski. Krajem svakog mjeseca, mreže od košnica su uzete i smrznute kako bi se ubrzalo odstranjivanje propolisa. Prirodni propolis korišten u pokusu za određivanje

LPO-a, određivanje ekspresije, količine i aktivnosti antioksidacijskih enzima u jetri, plućima i mozgu je pripremljen kao prah i kemijski neobrađen. Postupak obrade propolisa je prijavljen kao patent P20050071A pri Državnom zavodu za intelektualno vlasništvo, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, Republika Hrvatska.

3.2.2 Kemijska analiza nativnog propolisa

Kemijska analiza nativnog propolisa pokazala je da se isti sastoji od 4.0% vode, 25.6% masti, 1.6% proteina, 0,7% pepela i minerala. Sastav kemijskih elemenata je sljedeći: olovo (Pb) 2.15 mg kg⁻¹, željezo (Fe) 344.5 mg kg⁻¹, bakar (Cu) 1.85 mg kg⁻¹, živa (Hg) 0,0078 mg kg⁻¹, cink (Zn) 131 mg kg⁻¹, mangan (Mn) 7.61 mg kg⁻¹, krom (Cr) 0,707 mg kg⁻¹, kalcij (Ca) 770 mg kg⁻¹, magnezij (Mg) 271 mg kg⁻¹, teški metali 0 mg kg⁻¹.

¹ Analizom sastava vitamina u uzorku dobiveni su sljedeći podaci: vitamin A < 10 µg/100 g propolisa, vitamin C < 1 mg/100 g propolisa, vitamin B₁ = 1.45 mg/100 g propolisa, vitamin B₂ = 0,062 mg/100 g propolisa, vitamin B₆ = 2.25 mg/100 g propolisa. Nativni propolis ovog sastava koristio se u ovom radu za određivanje oksidacijskog/antioksidacijskog statusa u jetri, mozgu i plućima ženki CBA miševa.

3.2.3 Priprema etanolnog ekstrakta propolisa

Propolis (1g) je homogeniziran u hladnom tarioniku i jako izmiješan sa 10,45 ml 80%tnog etanola tijekom 72 sata na sobnoj temperaturi. Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz papir Whatman veličine 1 µm i ostatak je ispran sa 0,5 ml 80%tnog etanola. Ovako pripremljen ekstrakt čuva se na -20°C tijekom 24 sata kako bi se precipitirala smola i vosak, nakon čega se filtrira kroz najlonski filter veličine pora 0,2 µm. Dobiveni ekstrakt podvrgnut je HPLC analizi i analizi FRAP metodom.

3.2.4 HPLC analiza

Kvalitativna i kvantitativna kromatografska analiza fenolnih komponenata određena je visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (eng. high pressure liquid chromatography (HPLC), Agilent 1100 Series opremljenog s kvartarnom pumpom, multivalnim UV/VIS detektorom i automatskim skupljačem frakcija uzoraka. Korištena kolona bila je 5 μ m Zorbax RX-C18 (250 \times 4.6 mm, Agilent Technologies). Ubrizgani volumen bio je 200 μ l pri stalnoj protočnoj brzini od 1.0 ml/min. Ekstrakt propolisa frakcioniran je na 9 frakcija. Frakcije 1 (t_R 9.8-10,6min), 2 (t_R 12.8-13.6 min), 3 (t_R 18.9-20,3 min), 4 (t_R 22.7-23.7 min), 5 (t_R 24.3-25.3 min), 6 (t_R 26.5-27.8 min), 7 (t_R 28-29 min), 8 (t_R 30-31 min), 9 (t_R 32.6-34.1 min) su načinjene korištenjem elucijskog profila koji se sastojao od otapala A (5%tna mravlja kiselina) i otapala B (acetonitril). Linearni gradijent otapala B od 10% do 100% je korišten unutar 45 minuta. Fenolne komponente skupljenih frakcija su određene UV-VIS spektrofotometrom i kromatografijom (HPLC) s autentičnim standardima. Frakcije 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 su analizirane koristeći otapalo A (5%tna mravlja kiselina) i otapalo B (acetonitril) na linearnom gradijentu od 5% do 53% otapala B unutar 30 minuta. Frakcija 9 je analizirana koristeći izokratnu separaciju na 33.5%tnom otapalu B unutar 30 minuta.

3.2.5 Fenolni standardi

Kao standarde pojedinih podgrupa fenola koristili smo: kvercetin, izoramnetin, kamferol, luteolin, miricetin, taksifolin, naringenin, pinocembrin, galangin, krizin i fenilpropanoičnu kavenu kiselinu. Svi standardi su otopljeni u 96%tnom etanolu kako bi dobili otopine koncentracije 0,01 mg/ml.

3.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti propolisa *in vitro*

Ukupni antioksidacijski potencijal uzorka propolisa je određen korištenjem metode FRAP prema metodi Benzie i Strain (1996.). Standardna krivulja je pripremljena koristeći različite koncentracije (100-1000 $\mu\text{mol/l}$) $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Sve otopine su korištene na dan pripreme. U FRAP metodi antioksidacijski učinak antioksidansa koji se ispitivao je izračunat prema referentnoj vrijednosti reakcijskog signala dobivenog u otopini Fe^{2+} poznate koncentracije koja predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona. (+)-katehin, askorbat (vitamin C), Fe^{2+} , troloks (vitamin E) i butilirani hidroksitoluen (BHT) su izmjereni jedan sat nakon pripreme. Sva određivanja napravljena su u triplikatu. Razrjeđenja su pripremljena tako da se uklapaju u linearni raspon standarda.

3.2.7 Priprema tkiva za određivanje lipidne peroksidacije (LPO) i aktivnosti antioksidacijskih enzima - ukupna superoksid dismutaza (tSOD), Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD), mangan superoksid dismutaza (MnSOD), katalaza (KAT) i glutation peroksidaza (Gpx)

3.2.7.1 Kemikalije

Fosfatni pufer (pH=7.8)

1.15% KCl – Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.2.7.2 Priprema otopina

50 mM fosfatni pufer (pH=7.8) sastoji se od otopine (a), koju čini 0,2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i otopine (b) koju čini 0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. 17 ml otopine (a) pomiješa se s 183 ml otopine (b), uskladi pH i dopuni do 800 ml s dH_2O .

3.2.7.3 Postupak

Životinje su uspavane u eteru, te iskrvarene iz jugularne vene. Jetra, mozak i pluća izvađeni su i izvagani na analitičkoj vagi. Homogenizacija tkiva je izvršena na homogenizatoru po Potter-Elvehjemu na 1300 okr/min na +4 °C. Svi postupci su izvođeni na ledu. Za određivanje LPO-a dio jetre se homogenizira u 1.15% KCl-a uz konačnu koncentraciju 1 : 10 (w/v). Dio pluća se homogenizira u 1.15% KCl-a uz konačnu koncentraciju 1 : 10 (w/v). Dio mozga se homogenizira u 1.15% KCl-a uz konačnu koncentraciju 1 : 5 (w/v). Za određivanje aktivnosti SOD-a, KAT-a i Gpx-a, dijelovi jetre i pluća se homogeniziraju u 50 mM fosfatnom puferu (pH=7.8) u omjeru 1 : 10 (w/v), odnosno dijelovi mozga u omjeru 1 : 20 (w/v). Uzorci homogenata jetre, pluća i mozga namijenjenih određivanju aktivnosti antioksidacijskih enzima sonificirani su u tri ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4 °C. Sonificirani homogenati centrifugiraju se na 20 000 g 15 minuta u ultracentrifugi s hlađenjem na +4 °C. Dobiveni supernatanti služe za trenutačno određivanje aktivnosti SOD-a, KAT-a i Gpx-a ili se pohranjuju na –80°C za naknadno određivanje njihovih aktivnosti. Koncentracija TBARS-a i aktivnost svih antioksidacijskih enzima određene su spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru Camspec M330 (Camspec Ltd with corresponding software, Cambridge, UK).

3.2.8 Određivanje LPO-a u jetri, plućima i mozgu

3.2.8.1 Kemikalije

1.15% KCl – Kemika, Zagreb, Hrvatska

8.1% SDS – Merck, Darmstadt, Njemačka

20%tna octena kiselina (pH=3.5) – Kemika, Zagreb, Hrvatska

0,8%tna tiobarbiturna kiselina (TBA) – Sigma, St. Louis, SAD

N-butanol – Kemika, Zagreb, Hrvatska

Piridin – Kemika, Zagreb, Hrvatska

1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP) – Sigma, St. Louis, SAD

HCl – Kemika, Zagreb, Hrvatska

NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska

Etanol (99.9%) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

3.2.8.2 Priprema otopina

1.15 g KCl-a razrijedi se u 100 ml H₂O; 0,81 g natrij dodecil sulfata (SDS) razrijedi se u 10 ml dH₂O; 20 ml 99.5 postotne octene kiseline i 2.31 ml HCl pomiješa se i dopuni do 50 ml sa dH₂O. pH vrijednost se uskladi na 3.5 dodavanjem 17 ml 5M NaOH i dopuni se sa dH₂O do konačnog volumena od 100 ml.

0,8 postotna TBA priprema se otapanjem 0,4 g TBA-e u 40 ml dH₂O uz zagrijavanje. Na taj volumen dodaje se 500 µl 5M NaOH i dopuni do konačnog volumena od 50 ml sa dH₂O. Otopina treba biti svježije pripremljena na dan pokusa.

Na 25 µl TMP-a dodaje se 50 ml etanola te se od tako pripremljene otopine rade razrjeđenja (50 µl TMP + 9.95 ml etanola; 100 µl TMP + 9.90 ml etanola itd.).

3.2.8.3 Postupak

LPO je u homogenatima jetre, pluća i mozga određena mjerenjem tiobarbiturne reaktivne supstancije (TBARS) po metodi Ohkawe i sur. (1979.). Na 0,2 ml 10-postotnog homogenata jetre i pluća (odnosno 5%tnog homogenata mozga) dodano je 0,2 ml 8.1-postotnog SDS-a, 1.5 ml 20-postotne octene kiseline (pH=3.5) i 1.5 ml 0,8-postotne vodene otopine TBA-e i do 4 ml ukupnog volumena destilirane vode. Smjesa se

kuha u vodenoj kupelji 60 minuta na +95 °C, a zatim se hladi na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon toga smjesi se dodaje 1 ml destilirane vode i 5 ml n-butanola i piridina u međusobnom omjeru 15 : 1 (v/v) uz jako miješanje. Uzorci se zatim centrifugiraju 15 minuta na 3000 okr/min, pri čemu se odvajaju dva sloja. U gornjem sloju mjeri se koncentracija TBARS-a na valnoj duljini 532 nm. Kao standard upotrebljava se 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (TMP). Koncentracija TBARS-a u homogenatu jetre, pluća i mozga izražena je u nmol/mg proteina.

3.2.9 Određivanje tSOD-a, CuZnSOD-a i MnSOD-a u jetri, plućima i mozgu

3.2.9.1 Kemikalije

Fosfatni pufer (pH=7.8)

EDTA – Sigma, St. Louis, SAD

NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska

Citokrom C – Sigma, St. Louis, SAD

Ksantin – Sigma, St. Louis, SAD

Ksantin oksidaza (50 jedinica/1,3 ml) – Sigma, St. Louis, SAD

SOD iz govedih eritrocita – Sigma, St. Louis, SAD

KCN - Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.2.9.2 Priprema otopina

Otopina A: 1.5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9.86 ml 1 mM NaOH i tome je dodano 12.96 mg 0,05 mM citokroma C otopljenog u 85 ml 50 mM fosfatnog pufera pH=7.8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e. Otopina B: 1500 µl otopine svježe pripremljene ksantin oksidaze u 50 mM fosfatnom puferu pH=7.8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U/ml. Osnovna otopina SOD-a iz govedih eritrocita u

koncentraciji 1 mg/ml razrjeđuje se do koncentracije 1000 ng/100 μ l; ta se koncentracija namjesti na koncentraciju 500 ng/50 μ l kojom se rade serije razrjeđenja u rasponu od 100 ng/50 μ l do 500 ng/50 μ l.

3.2.9.3 Postupak

Aktivnost tSOD-a određena je u supernatantima homogenata jetre, pluća i mozga inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i sur. (1971). U staklenu kivetu s 2.9 ml otopine A doda se 50 μ l uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7.8 bez EDTA-e) i reakcija se započne dodatkom 50 μ l otopine B. Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak termostatiran je na 25°C. Kako aktivnost ksantin-oksidaze može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Aktivnost MnSOD-a određuje se u istim uvjetima tako da se supernatant inkubira najmanje pola sata sa 3mM KCN-om kako bi se inhibirala aktivnost CuZnSOD-a (Ceballos-Picot i sur. 1992.). CuZnSOD aktivnost se dobila tako da se aktivnost MnSOD-a oduzela od ukupne aktivnosti SOD-a. Aktivnost CuZnSOD-a i MnSOD-a izražena je kao U/mg proteina.

3.2.10 Određivanje KAT-a u jetri, plućima i mozgu

3.2.10.1 Kemikalije

Fosfatni pufer (pH=7.0)

30%tni H₂O₂ – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

3.2.10.2 Priprema otopina

0,34 ml 30-postotnog H₂O₂ razrijedi se fosfatnim puferom pH=7.0 do 100 ml (30 mM H₂O₂). Otopina 30 mM H₂O₂ je stabilna na +4 °C dva tjedna.

3.2.10.3 Postupak

Katalazna aktivnost u supernatantu jetre, pluća i mozga određena je spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984.). U kvarcnu kivetu s 2 ml već razrijeđenog uzorka dodaje se 1 ml supstrata (10 mM H₂O₂), čime počinje enzimska reakcija. Aktivnost enzima mjeri se 30 sekundi na valnoj duljini 240 nm. Svaki uzorak termostatiran je na 25°C. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti, pri čemu je jedinica katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1 μmol H₂O₂ u minuti kod pH=7.0 pri 25 °C gdje koncentracija H₂O₂ pada od 10,3 do 9.2 mM. Aktivnost KAT-a u supernatantu jetre, pluća i mozga izražena je u μmol razgrađenog H₂O₂ po minuti po miligramu proteina (μmol H₂O₂/min mg proteina), što odgovara jedinicama KAT-a po miligramu proteina (U KAT/mg proteina).

3.2.11 Određivanje Gpx-a u jetri, plućima i mozgu

3.2.11.1 Kemikalije

RANSEL kit - Randox Lab., Crumlin, United Kingdom

3.2.11.2 Postupak

Aktivnost Gpx-a određena je u supernatantu jetre, pluća i mozga RANSEL kitom (RANSEL, RANDOX, San Diego, CA, SAD) prema metodi Paglia i Valentine (1967.). U staklenu kivetu volumena 3 ml dodaje se 1 ml reakcijske smjese, 20 μ l supernatanta već razrijeđenog otopinom za razrjeđivanje. Reakcija počinje s dodatkom 40 μ l kumenhidroperoksida ishodišne koncentracije 0,018 mmol/l. Pad apsorbancije mjeri se spektrofotometrijski 3 minute pri valnoj duljini od 340 nm. Jedna jedinica Gpx-a katalizira oksidaciju 1 μ M reduciranoga glutationa (GSH) u oksidirani glutation (GSSG) kod pH=7.0 pri 25 °C, gdje je supstrat kumenhidroperoksid. Aktivnost Gpx-a izražena je u jedinici po miligramu proteina (U Gpx/mg proteina).

3.2.12 Određivanje proteina metodom po Lowryju

Sadržaj proteina u homogenatima jetre, pluća i mozga te supernatantima jetre, pluća i mozga određen je metodom po Lowryju (1951.), a izražen je u miligramima proteina po gramu svježega tkiva. Kao standard upotrijebljen je albumin govedeg seruma (Bovin serum albumin, Armour Pharmaceutical Co. Ltd. Eastborne).

3.2.13 Priprema tkiva za određivanje ekspresije gena antioksidacijskih enzima (SOD-1, SOD-2, KAT, Gpx-1)

3.2.13.1 Postupak

Životinje su uspavane u eteru, te iskrvarene iz jugularne vene. Dijelovi jetre mase oko 20 mg, mozga mase 180 mg i pluća mase 60 mg izvađeni su, stavljeni u sterilne

ependorf epruvete od 2 ml i smrznuti u tekućem dušiku kako bi se spriječila razgradnja RNA od strane ribonukleaza. Dijelovi jetre, mozga i pluća su pulirani unutar svake skupine. Pul uzoraka se sastojao od svakog organa uzetog iz tri životinje iz svake skupine.

3.2.14 Izolacija RNA iz jetre, mozga i pluća

3.2.14.1 Kemikalije

TRIzol[®] Reagent - (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD)

Kloroform - (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Izopropilni alkohol - (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Etanol (75%) - (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Dietilpirokarbonat (DEPC) - Sigma, St. Louis, SAD

3.2.14.2 Priprema otopina

0,5 ml DEPC-a (0,1% v/v) dodaje se u 500 ml destilirane vode. Otopina se dobro promiješa, inkubira preko noći na 37 °C, te autoklavira na 121 °C 20 minuta. DEPC je karcinogen, stoga je potrebno nositi zaštitne rukavice i opremu.

3.2.14.3 Postupak

Uzorci tkiva mase oko 30 mg stavljaju se u homogenizator, te se na njih odmah dodaje 1 ml trizola prema metodi Chomczynski i sur. (1987.). Slijedi homogenizacija uzorka 60 sekundi od manje brzine prema većoj. Nakon toga uzorci se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na uzorke se zatim dodaje 200 µl kloroforma, protresu se na tresilici 15 sekundi i inkubiraju na ledu 5 minuta. Nakon toga centrifugiraju se na 12000g 15 minuta na +4 °C. Dobivena gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA polako se odvoji od prstena i donje faze. Odvojeno je 300 µl vodene faze na koju se zatim

stavlja isti volumen izopropanola. Dobivena otopina se nekoliko puta lagano promiješa i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se centrifugira 10 minuta na 12000g na +4 °C. Supernatant se dekantira i na talog se dodaje 1 ml 75%tnog etanola. Uzorci se promiješaju i centrifugiraju na 7500g 5 minuta na +4 °C. Postupak ispiranja 75%tnim etanolom i centrifugiranja pod istim uvjetima se ponovi još jednom, nakon čega se supernatant dekantira, a talog suši 10 minuta. Nakon toga na talog se dodaje 20 µl vode obrađene DEPC-om.

3.2.15 Određivanje koncentracije i kvalitete RNA

3.2.15.1 Kemikalije

Agaroz - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

Etidij bromid - Sigma, St. Louis, SAD

3.2.15.2 Postupak

Koncentracija RNA mjeri se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije u kvarcnim kivetata na valnoj duljini 260 nm. Formula za računanje koncentracije RNA u µg/ml otopine je:

$$O.D.260 \text{ nm} \times 40 \times \text{čimbenik razrjeđenja}$$

Za RNA se uvijek mjeri i ekstinkcija na 280 nm, koja označuje zagađenje proteinima. Računa se omjer $O.D.260/O.D.280$. Omjer veći od 1,8 upućuje da je izolirana RNA čista. Cjelovitost RNA određuje se horizontalnom elektroforezom na 1%tnom agaroznom gelu. Elektroforezom se RNA razdvaja na dvije vrpce, 28S i 16S ribosomske RNA u omjeru 2:1, koje se nakon bojanja etidij-bromidom vizualiziraju na UV transiluminatoru i dokumentiraju fotografiranjem (Image Master, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.16 Reverzna transkripcija

3.2.16.1 Kemikalije

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

10× DNase I Reaction Buffer - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

25 mM EDTA (pH 8.0) - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

SuperscriptTM II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

RNaseOUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

5× First-Strand Buffer - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

1 mM DTT - Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

0,5 µg/ml oligo d(T)₁₈ - Biolabs, New England, SAD

10 mM dNTP - PeqLab, Isogen, Lifescience, Nizozemska

3.2.16.2 Postupak

Izolirana i prethodno izmjerena RNA jetre, mozga i pluća kontrolnih miševa i miševa hranjenih propolisom u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine pohranjena je na -80°C do korištenja. Zatim je napravljena reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 20 µl prema sljedećem postupku: u svaku eppendorf epruvetu dodano je po 1 µl RNA (koncentracije 1 µg/µl), 1 µl deoksiribonukleaze (DNaze), 1 µl pufera za Dnazu i 7 µl kvarcne vode. Uzorci se inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim se dodaje 25 mM EDTA (pH 8.0) kako bi se inhibirala Dnaza. Nakon toga slijedi inkubacija uzoraka na 65 °C 10 minuta. Uzorci se zatim stave na led i dodaje

se po 1 μ l početnica oligo d(T)₁₈ i 1 μ l dNTPa, te se uzorci inkubiraju 5 minuta na 94 °C. Zatim se dodaje 4 μ l 5 \times First-Strand Buffera, 2 μ l DTTa i 1 μ l ribonukleaznog inhibitora. Slijedi inkubacija 2 minute na 94 °C, nakon čega se u uzorke dodaje po 1 μ l reverzne transkriptaze. Slijedi odvijanje reakcije na 42 °C tijekom 90 minuta nakon čega je cjelokupni produkt reakcije (cDNA) razrijeđen sa kvarcnom vodom do ukupnog volumena od 100 μ l i zamrznut na -20°C. Tako dobivena cDNA korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom.

3.2.17 Provjera kvalitete cDNA dobivene reverznom transkripcijom.

3.2.17.1 Kemikalije

10 \times HotMaster Taq Buffer - Eppendorf, Hamburg, Njemačka

25 mM Mg²⁺ - Eppendorf, Hamburg, Njemačka

0,1 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) - Eppendorf, Hamburg, Njemačka

0,25 μ M početni oligonukleotidi - Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD

0,5 IU HotMaster™ Taq DNA Polymerase - Eppendorf, Hamburg, Njemačka

Agarozna 1,5% - Sigma, St. Louis, SAD

DNA standard GeneRuler™ 50bp DNA Ladder - Fermentas, SAD

3.2.17.2 Postupak

Kvaliteta cDNA dobivene reverznom transkripcijom provjerena je umnažanjem odsječka gena za beta aktin (β -aktin) pomoću para specifičnih početnih oligonukleotida. Produkt ove reakcije je veličine 540 pb. Za reakciju umažanja β -aktina uvjeti su bili sljedeći: svaki od 33 ciklusa reakcije PCR sastojao se od tri faze, denaturacija je trajala 20 sekundi pri 94 °C, faza sparivanja trajala je 20 sekundi pri 55 °C, dok je faza produljivanja lanaca trajala 40 sekundi pri 70°C. Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom

PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 1,5%tnom gelu agaroze. Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu GeneRuler™ 50bp DNA Ladder. Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora.

3.2.18 Analiza ispoljenosti gena SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1

Razina ispoljenosti transkripata mRNA gena SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1 u jetri, mozgu i plućima kontrolnih miševa i miševa hranjenih dvjema dozama propolisa utvrđena je metodom kvantitativnog RT-PCR pomoću specifičnih početnih oligonukleotida prikazanih u **Tablici 4**. Reakcija PCR se odvijala u volumenu od 25 µl kojeg je sačinjavalo 2.5 µl komercijalno dostupnog 10X PCR pufera, 0,5 µl nukleotida (dNTP), po 0,5 µl početnih oligonukleotida, 5 µl cDNA, 0,5 jedinica Taq polimeraze, te qH₂O. Nakon početne inkubacije na 94 °C tijekom 2 minute, reakcije su se odvijale prema tablici xx sa jednakim parametrima za denaturaciju na 94 °C kroz 20 sekundi, određenom temperaturom faze sparivanja (**Tablica 5.**) i produljivanja lanaca na 70°C kroz 40 sekundi. Završni korak reakcije trajao je 7 minuta na 70°C. Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 1.5%tnom gelu agaroze. Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu GeneRuler™ 50bp DNA Ladder. Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora.

| Gen | Početni oligonukleotid | Veličina produkta (bp) |
|----------------|---------------------------------------|------------------------|
| β-AKTIN | | 540 |
| 5' | 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3' | |
| 3' | 5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3' | |
| SOD-1 | | 246 |
| 5' | 5'-AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA-3' | |
| 3' | 5'-CAG GTC TCC AAC ATG CCT CT-3' | |
| SOD-2 | | 241 |
| 5' | 5'-GCA KAT TAA CGC GCA GTC A-3' | |
| 3' | 5'-AGC CTC CAG CAA CTC TCC TT-3' | |
| KAT | | 229 |
| 5' | 5'-GCA GAT ACC TGT GAA CTG TC-3' | |
| 3' | 5'-GTA GAA TGT CCG CAC CTG AG-3' | |
| GPX-1 | | 197 |
| 5' | 5'-CCT CAA GTA CGT CCG ACC TG-3' | |
| 3' | 5'-CAA TGT CGT TGC GGC ACA CC-3' | |

Tablica 4. Oligonukleotidne početnice ciljnih gena korištene u pokusu

| Gen | Jetra | | Mozak | | Pluća | |
|---------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------|-------------|
| | T sparivanja početnica (°C) | Br. ciklusa | T sparivanja početnica (°C) | Broj ciklusa | T sparivanja početnica (°C) | Br. ciklusa |
| SOD-1 | 56 | 24 | 56 | 24 | 56 | 24 |
| SOD-2 | 55 | 37 | 55 | 37 | 55 | 39 |
| KAT | 55 | 27 | 55 | 27 | 55 | 24 |
| GPX-1 | 56 | 19 | 56 | 24 | 56 | 25 |
| β-AKTIN | 55 | 33 | 55 | 30 | 55 | 33 |

Tablica 5. Uvjeti odvijanja PCR reakcije

Analizom na Image Master VDS (Pharmacia Biotech) određena je jačina vrpce u kontrolnom uzorku za svaki gen od interesa (SOD-1, SOD-2, KAT, GPX-1), te utvrđena njegova eksponencijalna faza i zatim su sve daljnje reakcije prekidane u tom ciklusu. Ispoljenost mRNA gena SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1 određena je prema tome ciklusu u svakom pojedinom uzorku.

3.2.19 Određivanje genske ekspresije pomoću GEArray Q series Mouse

Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array čipa

3.2.19.1 Kemikalije

Membrane sa specifičnim probama za 96 gena koji sudjeluju u odgovoru organizma na stres i toksičnost sa pripadajućim kemikalijama (GEArray Q series Mouse Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array kit - SuperArray Bioscience Corporation, SAD

<http://www.superarray.com>). Geni koji se ispituju pripadaju skupini gena aktiviranih u stresu i toksičnosti, a obuhvaćaju sljedeće skupine gena:

- **Proliferacija/karcinogeneza**

Ccnc (ciklin C), Ccnd1 (ciklin D1), Ccng (ciklin G), E2f1, Egr1, Pcna

- **Zaustavljanje rasta/starenje**

Cdkn1a (p21Waf1/p21Cip1), Ddit3 (GADD153/CHOP), Gadd45a, Gadd45b, Igfbp6, Mdm2, Trp53 (p53)

- **Upala**

Csf2 (GM-CSF), Il1a, Il1b, Il6, Il18, Lta (TNF b/lta), Mif, Nfkb1, Nos2 (iNOS), Scya3 (MIP-1a), Scya4 (MIP-1b), Scya21a, Scya21b, Scya21c, Scyb10 (IP 10), Serpin1 (PAI-1)

- **Nekroza/apoptoza**

Oksidacijski/metabolički stres: Crya2 (a-kristalin B), Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp2a5, Cyp2b9, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp3a11, Cyp4a10, Cyp4a14, Cyp7a1, Cyp7b1, Ephx2, Fmo1, Fmo4, Fmo5, Gpx1 (glutation peroksidaza), Gpx2, Gsr (glutation reduktaza), Gstm1 (glutation S-transferaza mu1), Gstm3, Hmox1, Hmox2, Mt1a, Mt2, Por, Ptgs2 (Cox-2), SOD-1, SOD-2

Temperaturni stres: Dnaja1, Hsf1 (tcf5), Hsp25 (Hspb1), Hsp60, Hsp70-1 (hsp70 1), Hsp105, Hspa11 (hsp70 11), Hspa4 (hsp70 4), Hspa5 (grp78), Hspa8, Hspa9a (Hsp74a), Hspe1 (chaperonin 10)

DNA oštećenje & popravak: Atm, Ercc1, Ercc2, Ercc4, Ercc5, Rad23a, Rad50, Rad53, Ugt1a1, Ung, Xrcc1, Xrcc2, Xrcc4, Xrcc5

Signalni putevi u apoptozi: Anxa5 (annexin v), Bax, Bcl2l (bcl-x), Bcl2l2 (bcl-w), Casp1 (Caspase1/ICE), Casp8 (caspase8/FLICE), Nfkbia (ikBa/Mad3), Tnfrsf1a (TNFR1), Tnfsf6 (Fas Ligand), Tnfsf10 (TRAIL), Tradd

3.2.19.2 Postupak

Izolirana RNA iz jetre, mozga i pluća ženki kontrolnih CBA miševa i miševa obrađenih dvjema dozama propolisa pripravljena je za sintezu cDNA probe koristeći AmpoLabeling-LPR Kit (KAT. NO. L-03). Uzorci su pripremljeni tako da su tkiva od po tri jedinke u svakom organu kontrolnih ili obrađenih uzoraka pulirana i iz njih se izolirala RNA, koja je nakon izolacije Trizolom pročištila na koloni RNeasy® Mini Kit 50 (Qiagen, GmbH, Njemačka). Ukupno je tako izolirano 6 RNA po svakom organu (dvije za kontrolu, dvije za prvu dozu i dvije za drugu dozu propolisa), te je svaka RNA stavljena na dvije membrane, kako bi se minimalizirala razlika između dva pula iste skupine. U konačnici je po postupku (kontrola, manja doza propolisa, viša doza propolisa) ispitano 12 membrana (tzv. chipa), od kojih po četiri u svakoj skupini. Postupak detekcije genske ekspresije proveden je prema uputama proizvođača. Ukratko:

Reverzna transkripcija

3 µg RNA prevedeno je u cDNA koristeći MMLV reverznu transkriptazu i odgovarajuću početnicu koja je uključena u Kit.

Reakcija obilježavanja (LPR)

cDNA je obilježena i umnožena tijekom 30 linearnih reakcijskih ciklusa polimerazom, koristeći specifične mišje oligonukleotidne početnice, biotin-16-dUTP i DNA polimerazu.

GEArray™ hibridizacija

Nakon što je provjerena uspješnost obilježavanja probe koristeći protokol za kemiluminiscentnu detekciju, proba je denaturirana na 94°C 5 minuta, te je ohlađena na ledu.

Prehibridizacija

Denaturirana DNA iz lososove sperme (100 µg/ml) je dodana u prethodno zagrijanu GEAPrehyb otopinu (60°C) i membrane sa specifičnim probama su prehibridizirane u hibridizacijskoj pećnici na 60°C tijekom 1 do 2 sata uz neprestano miješanje.

Hibridizacija

GEAPrehyb otopina je odlivena iz hibridizacijskih cijevi i 0,75 ml GEAhbyb otopine zajedno sa cjelokupnim volumenom denaturirane cDNA probe je dodano u svaku hibridizacijsku cijev. Membrane su hibridizirane preko noći u hibridizacijskoj pećnici na 60°C.

Ispiranje

Membrane su isprane dvaput sa otopinom za ispiranje 1 (2X SSC, 1% SDS) i dvaput sa otopinom za ispiranje 2 (0,1 SSC, 0,5% SDS) na 60°C tijekom 15 minuta za svaku otopinu.

3.2.19.3 Detekcija kemiluminiscencijom

Detekcija kemiluminiscencijom je napravljena koristeći Chemiluminicent Detection Kit (KAT. NO. D-01) protokol.

-
- **Blokiranje membrane:** membrane su inkubirane u 2 ml GEAblokirajuće otopine tijekom 40 minuta na sobnoj temperaturi.
 - **Vezivanje streptavidina konjugiranog alkalnom fosfatazom (AP):** membrane su inkubirane u 2 ml of pufera za vezivanje (AP razrijeđen 1:8000) tijekom 10 minuta
 - **Ispiranje:** membrane su isprane 4 puta s 4 ml pufera F (uključenog u kit)
 - **Detekcija:** 1 ml CDP-Star kemiluminiscencijskog supstrata je dodano u hibridizacijsku cijev, te inkubirano 2-5 min. Membrane su zatim stavljene u plastičnu vrećicu, izložene rendgenskom filmu, koji je zatim razvijen prema standardnom protokolu.

3.2.19.4 Analiza podataka dobivenih hibridizacijom

Rendgenski filmovi skenirani su koristeći stolni skener za konverziju slike u format TIFF s rezolucijom od 300 dpi. Dobivena slika pretvorena je u negativ koristeći programski paket Adobe Photoshop. Korištenjem programskog paketa ScanAlyze, točke na negativima fotografija prevedene su u brojčane podatke i pohranjene u formatu Microsoft Excell. Podaci dobiveni iz programskog paketa *ScanAlyze* su prenešeni u program *GEArray Analyzer*, koji uspoređuje neobrađene podatke sa listom gena specifičnog signalnog puta. Neobrađeni podaci korigirani su obzirom na pozadinu kako bi se izbjeglo pojavljivanje negativnih brojeva. Intenziteti signala svih gena normalizirani su prema signalu housekeeping gena. Housekeeping geni služe za normalizaciju isptivanih gena. Na ovom čipu koristilo se 4 housekeeping gena, i to: citoplazmatski β -aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), peptidil izomeraza A (Ppia), ribosomalni protein L13a (Rpl13a)

3.2.20 Priprema tkiva za određivanje ekspresije proteina antioksidacijskih enzima (SOD-1, SOD-2, KAT, Gpx) u jetri, mozgu i plućima

3.2.20.1 Kemikalije

- Fosfatni pufer (pH=7.8)
- Inhibitor proteaza - Roche Diagnostic GmbH, Njemačka
- Pufer za nanošenje uzoraka (sample buffer) 5×:
- Glicerol
- 2-merkaptoetanol
- SDS 10%
- Tris-HCl pH 6.8
- Brom fenol plavilo 10%

3.2.20.2 Priprema otopina

Inhibitor proteaza - jedna tableta inhibitora proteaza otopi se u 1.5 ml ReH₂O i tako pripremljena otopina dovoljna je za inhibiciju proteaza u 10 ml otopine uzorka.

Sample buffer - u odmjernu tikvicu od 10 ml dodaju se 2 ml ReH₂O i 1.2 g SDS-a, zatim se dodaje 2.5 ml pufera Tris-HCl (pH 6.8) i 100 µl 10%tnog brom fenol plavila. Nakon toga dodaje se 3 ml glicerola i 1.2 ml 2-merkaptoetanol, te se nadopuni sa ReH₂O do volumena 10 ml. Sample buffer se pohranjuje na -20°C do upotrebe.

3.2.20.3 Postupak

Jetra, mozak i pluća izvađeni su i izvagani na analitičkoj vagi. Potom je izvršena homogenizacija tkiva na homogenizatoru po Potter-Elvehjemu na 1300 okr/min na +4 °C. Dijelovi jetre i pluća homogeniziraju se u 50 mM fosfatnom puferu (pH=7.8) u omjeru 1 : 10 (w/v), odnosno dijelovi mozga u omjeru 1 : 20 (w/v). Na svaki mililitar

homogenata dodano je 150 μ l inhibitora proteaza. Uzorci homogenata jetre, pluća i mozga zatim su sonificirani u tri ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4 °C. Sonificirani homogenati centrifugiraju se na 20 000 g 15 minuta u ultracentrifugi s hlađenjem na +4 °C. Dio dobivenog supernatanta pohranjuje se na -80°C, dok se dio koristi za određivanje proteina po Lowryu i kasnije za određivanje ekspresije proteina. Na određeni volumen supernatanta dodaje se pufer za nanošenje uzoraka (sample buffer). Tako pripremljeni uzorci koriste se dalje u SDS elektroforezi.

3.2.21 SDS elektroforeza (SDS-PAGE)

3.2.21.1 Kemikalije

- akrilamid/bisakrilamid (omjer 29:1); 40%tna otopina - Sigma, St. Louis, SAD
- APS (amonij persulfat) 10%tni - Sigma, St. Louis, SAD
- SDS (lauril sodium sulfat) 10%tni - Sigma, St. Louis, SAD
- DTT (ditiotreitol) - Sigma, St. Louis, SAD
- TEMED - Sigma, St. Louis, SAD
- izopropanol - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- donji pufer - Tris HCl (pH 8.8) 1.875 M
- gornji pufer - Tris HCl (pH 6.8) 1.25 M
- elektroforetski pufer 10 \times
- BIO-RAD Precision Plus Protein™ Standard - BIO-RAD, Hercules, CA, SAD

3.2.21.2 Priprema otopina

Donji pufer: Tris HCl (pH 8.8) 1.875 M: 11.36 g Tris-a otopiti u ReH₂O, podesiti pH vrijednost na 8.8 sa 6M HCl i nadopuniti do 50 ml sa ReH₂O

Gornji pufer: Tris HCl (pH 6.8) 1.25 M: 7.56g Tris-a otopiti u ReH₂O, podesiti pH vrijednost na 6.8 sa 6M HCl i nadopuniti do 50 ml sa ReH₂O

10× elektroforetski pufer: 16.1 g Tris-a i 72.1 g glicina otopi se u ReH₂O i zatim se doda 5g SDS-a. pH vrijednost se podesi na 8.3

3.2.21.3 Postupak

SDS elektroforeza (SDS-PAGE ili «SDS polyacrylamide gel electrophoresis») je metoda kojom se razdvajaju proteini na osnovu razlike u njihovoj molekularnoj masi (Laemmli, 1970.). Proteini dobivaju ukupni negativni naboj koji je proporcionalan s njegovom duljinom tijekom putovanja kroz gel uz pomoć SDS-a (anionski detergent koji denaturira proteine omotavajući se oko njihovih polipeptidnih veza). Na taj način gustoća naboja proteina postaje jednaka za različite proteine, te oni u električnom polju putuju prema pozitivnom polu brzinom koja ovisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi. Kao sredstvo u kojem dolazi do razdvajanja proteina koristi se poliakrilamidni gel, čija umrežena struktura pruža otpor kretanju proteina, pri čemu proteini veće molekularne mase putuju sporije od proteina manje molekularne mase. Poliakrilamidni gel sastoji se od gela za sabijanje, koji je 5%tni i gela za razdvajanje, koji ovisno o veličini proteina koje želimo razdvojiti ima različiti postotak akrilamidnog dijela. Ukoliko se istovremeno žele izolirati proteini različitih molekularnih masa, priprema se 12.5%tni gel. U našim pokusima pripreman je 12.5%tni gel. Način pripreme gela različitih postotaka prikazan je u **Tablici 6**.

| sastojci gela | gel za razdvajanje (donji gel) | | | | gel za sabijanje (gornji gel) |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------|------------|----------|-------------------------------------|
| | 7.5% (ml) | 10% (ml) | 12.5% (ml) | 15% (ml) | 5% |
| akrilamid 29.1%, bisakrilamid 0,9% | 7.6 | 2.7 | 3.3 | 4 | 0,48 |
| dH ₂ O | 16.1 | 2.5 | 2.5 | 1.9 | 2.2 |
| 4× donji pufer (pH=8.8) | 6 | 2 | 2 | 2 | - |
| 4× gornji pufer (pH=6.8) | - | - | - | - | 0,3 |
| 10% SDS | 0,35 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,03 |
| 10% APS | 0,100 | 0,04 | 0,04 | 0,06 | 0,0105 |
| TEMED | 0,015 | 0,005 | 0,005 | 0,015 | 0,015 |

Tablica 6. poliakrilamidni gel različitih koncentracija

Svi navedeni sastojci pomiješani su prema navedenom redoslijedu, otopina je zatim izlivena između dviju staklenih ploča do $\frac{3}{4}$ razine, te je nadsvođena izopropanolom kako bi se omogućila polimerizacija donjeg gela. Nakon što je gel polimerizirao (oko 30 minuta) izlije se izopropanol, a na donji gel izlije se tekući gornji gel u koji se stavi češalj kako bi se formirale jažice u koje kasnije nanosimo uzorke. Uzorci se neposredno prije nanošenja denaturiraju kuhanjem 2 minute na 95 °C. Uzorci se zatim kratko centrifugiraju, te se nanesu u jažice. Uzorci se miješaju sa 5× puferom za uzorke, te se u svaku jažicu dodaje isti volumen uzorka (20 µl). Također, koncentracija proteina u svakom uzorku koji se nanosi na gel je jednaka (5 µg proteina). U jednu jažicu nanosi se proteinski standard (BIO-RAD Precision Plus Protein™ Standard), koji služi za

pokazivanje položaja proteina određene molekularne mase na gelu za vrijeme elektroforeze i nakon transfera na membrani.

Sistem za vertikalnu elektroforezu na kojem su razdvajani proteini je Mini Protean[®] 3 Cell 67-S (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD). Elektroforeza je rađena na 80 V, a nakon prijelaza proteina iz gornjeg gela u donji, napon je povećan na 100 V. Pod tim uvjetima elektroforeza je rađena sve dok fronta nije došla do dna gela.

3.2.22 Prijenos (transfer) proteina sa gela na membranu

3.2.23 Kemikalije

- elektroforetski pufer 10X
- 100%tni metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- poliviniliden difluorid (PVDF) membrana 0,2 µm - BIO-RAD, Hercules, CA, SAD
- pufer za prijenos

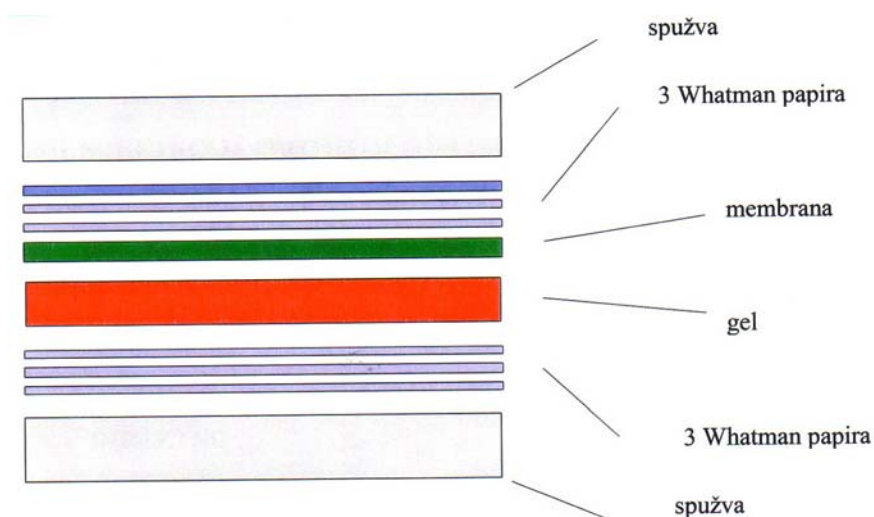
3.2.23.1 Priprema otopina

Pufer za prijenos - 50 ml elektroforetskog pufera 10× (pH=8.3) pomiješamo sa 350 ml dH₂O i 100 ml metanola

3.2.23.2 Postupak

Proteini razdvojeni na 12.5%tnom gelu preneseni su na PVDF membranu pomoću aparata za prijenos proteina Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD). Gel za razdvajanje je prije prijenosa na membranu odvojen od gela za sabijanje i stavljen u pufer za prijenos. PVDF membrana je izrezana na nešto veću dimenziju od gela, stavljena u 100%tni metanol par sekundi kako bi bila upotrebljiva za prijenos proteina, a zatim isprana u dH₂O. Ovaj postupak ponavljan je tri puta, nakon čega je membrana stavljena u pufer za prijenos kako bi se ekvilibrirala. Zatim se gel i membrana zajedno

slažu u kazetu za prijenos. Na donji dio kazete u kadici s puferom za prijenos stavljena je najprije spužvica, Whattman filter papiri, PVDF membrana, gel, Whattman filter papiri i spužvica. Postupak slaganja kazete za prijenos prikazan je na *Slici 10*. Važno je da između membrane i gela ne budu mjehurići zraka jer u tom slučaju ne bi bilo prijenosa proteina s gela na membranu. Kazeta se zatim stavlja u kadicu za prijenos i to tako da gel bude okrenut prema negativnom, a membrana prema pozitivnom polu kako bi negativno nabijeni proteini putovali prema membrani za vrijeme prijenosa. Prijenos je trajao 1 sat pri konstantnoj struji od 350 mA.



Slika 10. Postupak slaganja kazete za transfer. Pozitivni (+) pol je na gornjoj strani, negativni (-) pol na donjoj strani.

3.2.24 Detekcija proteina specifičnim antitijelima

3.2.25 Antitijela

- **anti-SOD-1 (ab16831)** [superoxide dismutase1], 17 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrjeđenje 1:2000, Abcam, Cambridge, UK

-
- **anti-SOD-2 (ab13533)** [superoxide dismutase2], 25 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrjeđenje 1:5000, Abcam, Cambridge, UK
 - **anti-KAT (ab16731)** [KATalase], 60 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrjeđenje 1:2000, Abcam, Cambridge, UK
 - **anti-Gpx1 (ab16798)** [glutathione-peroxidase 1], 22 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrjeđenje 1:2000, Abcam, Cambridge, UK
 - **sekundarno anti-zečje antitijelo iz magarca (NA934)**, razrijeđeno 1:5000, obilježeno peroksidazom hrena, Amersham, Buckinghamshire, UK
 - **anti-ERK2 (C-14)**, 42 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrijeđeno 1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD

3.2.26 Kemikalije

- fosfatni pufer pH=7.8, 50 mM
- TWEEN 0,1% - Sigma, St. Luis, SAD
- mlijeko u prahu (5%) - Fixmilch Instant, Austrija
- BM Chemiluminiscence Blotting Substrate (POD) - Roche Applied Science, Njemačka

3.2.27 Priprema otopina

PBS-Tween - na 500 ml fosfatnog pufera dodaje se 500 µl TWEEN-a

pufer za blokiranje - 2.5 g mlijeka u prahu otopi se u 50 ml PBS Tweena

otopina za detekciju - Otopina supstrata (A) pomiješa se sa startnom otopinom (B) u omjeru 100:1

3.2.28 Postupak

Membrana se nakon prijenosa ispere u fosfatnom puferu 10 minuta na tresilici a zatim se stavlja u pufer za blokiranje preko noći na +4 °C kako bi se blokirala prazna mjesta na membrani i na taj način spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu. Membrana je drugi dan inkubirana primarnim antitijelima (zečja poliklonalna) 3 sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Zatim je isprana tri puta po 5 minuta u PBS-Tweenu nakon čega je inkubirana sekundarnim antitijelom 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrana je ponovo isprana u PBS-Tweenu 3 puta po 5 minuta, nakon čega je na proteinsku stranu stavljena otopina za detekciju. Nakon inkubacije od 2-3 minute, membrana se stavlja u plastičnu foliju i na nju je stavljen autoradiografski film (RF4, 100 NIF, Fotokemika-Kodak), te je stavljeno u kazetu na razvijanje. Nakon određenog vremena ekspozicije koje je prethodno određeno za svako antitijelo, film se razvija stavljanjem u razvijlač, vodu i fiksir. Nakon toga ispere se u vodi i stavlja da se osuši. Membrana se može čuvati u plastičnoj foliji na +4 °C do godinu dana. Isto tako može ju se ponovo inkubirati određenim antitijelom u tom vremenu.

3.2.28.1 Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni u ovom radu su se obradili u statističkom programu za obradu podataka SPSS for Windows (v.10,0,5.). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.E.M. Razlike između sredina kontrolnih i obrađenih uzoraka uspoređene su uz pomoć univarijatne jednočimbenijske analize varijance (one-way ANOVA), sa Dunnetovim testom za testiranje razlika između kontrolne i obrađenih skupina. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5 posto.

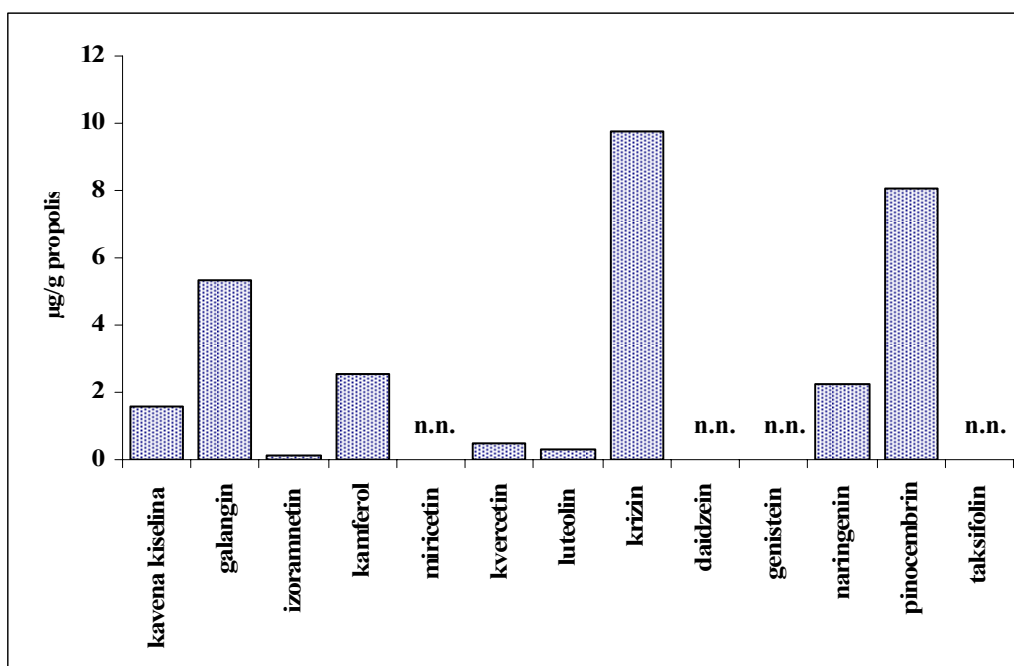
4 REZULTATI

U ovom radu istražili smo:

- ukupnu kvalitativnu i kvantitativnu kromatografsku analizu fenolnih komponenata propolisa
- antioksidacijski potencijal uzorka propolisa *in vitro*
- utjecaj propolisa u dvjema dozama (100 mg kg⁻¹ i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) na oksidacijski (lipidna peroksidacija) i antioksidacijski status (aktivnost enzima CuZnSOD, MnSOD, KAT, Gpx) u jetri, mozgu i plućima ženki CBA miševa starih 4 mjeseca
- utjecaj propolisa u dvjema dozama (100 mg kg⁻¹ i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) na ekspresiju gena SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1 u istim tkivima
- utjecaj propolisa u dvjema dozama (100 mg kg⁻¹ i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) na ekspresiju 96 gena koji sudjeluju u odgovoru organizma na stres i toksičnost
- utjecaj propolisa u dvjema dozama (100 mg kg⁻¹ i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i GPX-1 u istim tkivima
- utjecaj propolisa u dvjema dozama (100 mg kg⁻¹ i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) na oksidacijski (lipidna peroksidacija) i antioksidacijski status (aktivnost enzima CuZnSOD, MnSOD, KAT, Gpx) u jetri, mozgu i plućima ženki CBA miševa starih 4 mjeseca u normobaričkim uvjetima (100% O₂ na 1ATA tijekom 18 sati)

4.1 KONCENTRACIJA FENOLA U ETANOLNOM EKSTRAKTU PROPOLISA

Koncentracija detektiranih fenola u etanolnom ekstraktu propolisa prikazana je na *Slici 11*. Od 13 određenih fenola, 4 nisu bila prisutna (genistein, daidzein, miricetin, taksifolin), krizin je bio prisutan u najvećoj koncentraciji (9.749 $\mu\text{mol/g}$ propolisa), zatim pinocembrin (8.074 $\mu\text{mol/g}$ propolis) i galangin (5.335 $\mu\text{mol/g}$ propolisa), dok je izoramnetin bio prisutan u najmanjoj koncentraciji (0,102 $\mu\text{mol/g}$ propolisa). Neke komponente su ostale neodređene zbog nemogućnosti određivanja specifičnih uzoraka i odgovarajućih standarda.

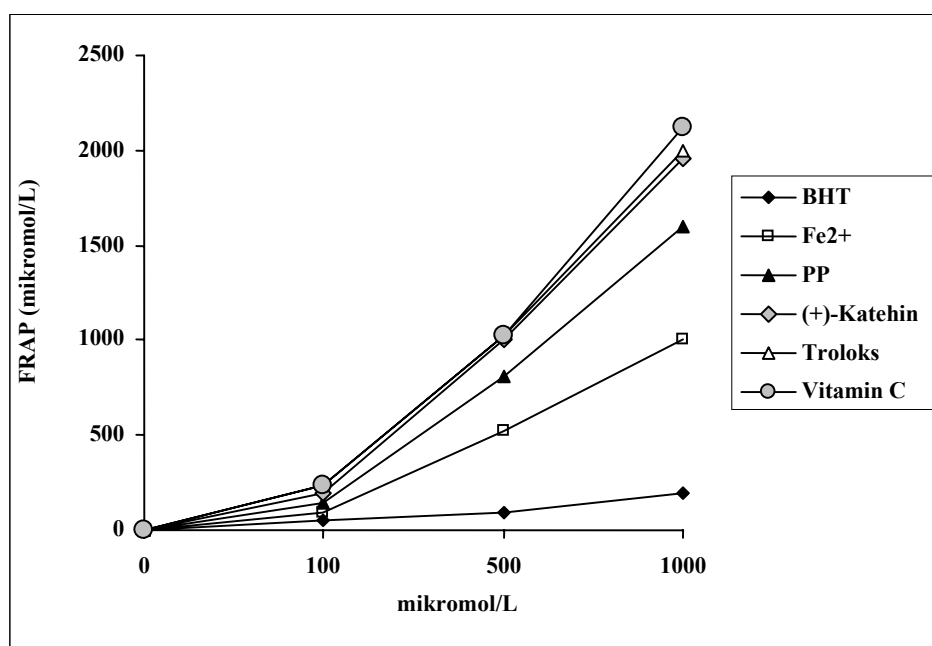


Slika 11. HPLC analiza fenolnih komponenata u etanolnom ekstraktu propolisa.

NN=nije nađeno

4.2 ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST PROPOLISA *IN VITRO*

Kako bi se usporedila antioksidacijska aktivnost propolisa prema poznatim antioksidansima, vitamin C, troloks, (+)-katehin, BHT, Fe^{2+} i propolis su podvrgnuti FRAP testu (FRAP = ferric reduction/antioxidant power assay) (*Slika 12*). Učinkovitost određenog antioksidansa u testu je izračunata u odnosu na reakcijski signal otopine Fe^{2+} poznate koncentracije. Fe^{2+} u toj reakciji predstavlja redoks reakciju izmjene jednog elektrona u FRAP testu. Unutar koncentracijskog opsega 100-1000 μM , najvišu relativnu antioksidacijsku učinkovitost posjeduje vitamin C, troloks i (+)-katehin. Relativna antioksidacijska učinkovitost propolisa jest 1.6 ekvivalenta troloksa.



Slika 12. Koncentracija fenolnih komponenata (vitamin C, troloks, (+)-katehin, Fe^{2+} , BHT i ekstrakta nativnog propolisa (PP), u rasponu od 100 – 1000 μM , u FRAP testu.

4.3 UTJECAJ PROPOLISA NA OKSIDACIJSKI STATUS U JETRI, MOZGU I PLUĆIMA

4.3.1 LPO

U homogenatima jetre, pluća i mozga miševa proces lipidne peroksidacije u kontrolnim i obrađenim uzorcima praćen je određivanjem koncentracije TBARS-a (*Slika 13*). Propolis je u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine značajno smanjio koncentraciju TBARS-a u jetri (p=0,001), plućima (p=0,001) i mozgu (p= 0,042). Propolis u dozi od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine nije imao utjecaja u nijednom testiranom organu u odnosu na kontrolne skupine.

4.3.2 CuZnSOD, MnSOD

U supernatantima homogenata jetre, pluća i mozga miševa određena je aktivnost CuZnSOD-a (*Slika 14*) i MnSOD-a (*Slika 15*). U plućima i mozgu nijedna doza propolisa nije mijenjala aktivnost CuZnSOD-a, dok je u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine propolis značajno povećao aktivnost CuZnSOD u jetri (p=0,001). MnSOD aktivnost ostala je nepromijenjena nakon primjene obje doze propolisa u mozgu i jetri, ali je značajno porasla u plućima nakon obradaa u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine (p=0,002).

slika 13 LPO mozak pluca jetra

slika 14 cuznsod mozak pluca jetra

slika 15 mnsod mozak pluca jetra

slika 16 katalaza mozak pluca jetra

4.3.3 KAT, Gpx

U supernatantima homogenata jetre, pluća i mozga miševa određena je aktivnost KAT-a (*Slika 16*). Propolis je u obje doze povišio KAT aktivnost u plućima (u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine p=0,01; u dozi od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine p<0,001). U jetri propolis utječe na KAT aktivnost, premda porast KAT aktivnosti nije bio statistički značajan. Povećana KAT aktivnost u mozgu ženki obrađenih s dozom od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine bila je na granici statističke značajnosti (p=0,057). Aktivnost Gpx-a ostala je nepromijenjena nakon obradaa s obje doze propolisa u svim testiranim organima (*Slika 17*).

slika 17 gpx mozak pluca jetra

4.3.4 Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u jetri

Utjecaj propolisa na ekspresiju SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 mRNA u jetri prikazan je na *Slici 18a i 18b*. Analizom PCR-skih produkata utvrđeno je da propolis u jetri ne utječe na ekspresiju mRNA za SOD-1 niti u jednoj dozi. Međutim, propolis je značajno povećao ekspresiju mRNA za SOD-2 u obje doze ($p < 0,001$), kao i mRNA za KAT u dozi od 100 mg kg^{-1} ($p < 0,005$) i 300 mg kg^{-1} tjelesne težine ($p < 0,001$). Na sniženje ekspresije mRNA za Gpx-1 propolis utječe samo u dozi od 300 mg kg^{-1} tjelesne težine ($p = 0,041$).

4.3.5 Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u plućima

Utjecaj propolisa na ekspresiju SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 mRNA u plućima prikazan je na *Slici 19a i 19b*. Analizom PCR-skih produkata utvrđeno je da propolis u plućima značajno snižava ekspresiju mRNA za SOD-2 u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine ($p = 0,021$), dok je u obje doze značajno snizio ekspresiju mRNA za KAT (doza od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine $p < 0,004$; doza od 300 mg kg^{-1} tjelesne težine $p < 0,006$). Na ekspresiju mRNA za SOD-1 i Gpx-1 propolis nije imao učinka niti u jednoj dozi.

graf18a RNA jetra

slika 18b RNA jetra

graf 19a RNA pluća

slika 19b RNA pluća

4.3.6 Utjecaj propolisa na ekspresiju CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 mRNA u mozgu

Utjecaj propolisa na ekspresiju SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 mRNA u mozgu prikazan je na *Slici 20a i 20b*. Analizom PCR-skih produkata utvrđeno je da propolis u mozgu ne utječe na ekspresiju mRNA za SOD-1, SOD-2 i KAT niti u jednoj dozi, premda KAT ima tendenciju povećanja količine mRNA. Nasuprot tome, značajno snižava ekspresiju mRNA za Gpx-1 u obje doze (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine p=0,004; 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine p=0,006) u odnosu na kontrolnu skupinu.

graf 20a RNA mozaik

slika 20b RNA mozaik

4.3.7 Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u jetri

Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u jetri prikazan je na *Slici 21a i 21b*. Rezultati Western blot analize pokazali su da propolis u jetri ne utječe značajno na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1. Količine proteina za sva četiri enzima ostale su nepromijenjene nakon primjene obje doze propolisa (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine, odnosno 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine).

4.3.8 Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u plućima

Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u plućima prikazan je na *Slici 22a i 22b*. Rezultati Western blot analize pokazali su da propolis ne utječe značajno na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u plućima, premda oba obradaa blago snižavaju ekspresiju proteina SOD-2, KAT i Gpx-1, a učinak je izraženiji u dozi od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine. Ekspresija proteina SOD-1 ostala je nepromijenjena nakon oba obradaa.

4.3.9 Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina CuZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), KAT i Gpx-1 u mozgu

Utjecaj propolisa na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u mozgu prikazan je na *Slici 23a i 23b*. Rezultati Western blot analize pokazali su da propolis ne utječe značajno na ekspresiju proteina SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u mozgu, premda oba obradaa blago povećavaju ekspresiju proteina SOD-2 i KAT i to je izraženije u dozi od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine. Ekspresija proteina SOD-1 i Gpx-1 ostala je nepromijenjena nakon oba obradaa.

graf 21 a wb jetra

slika m21b wb jetra

graf 22a wb pluća

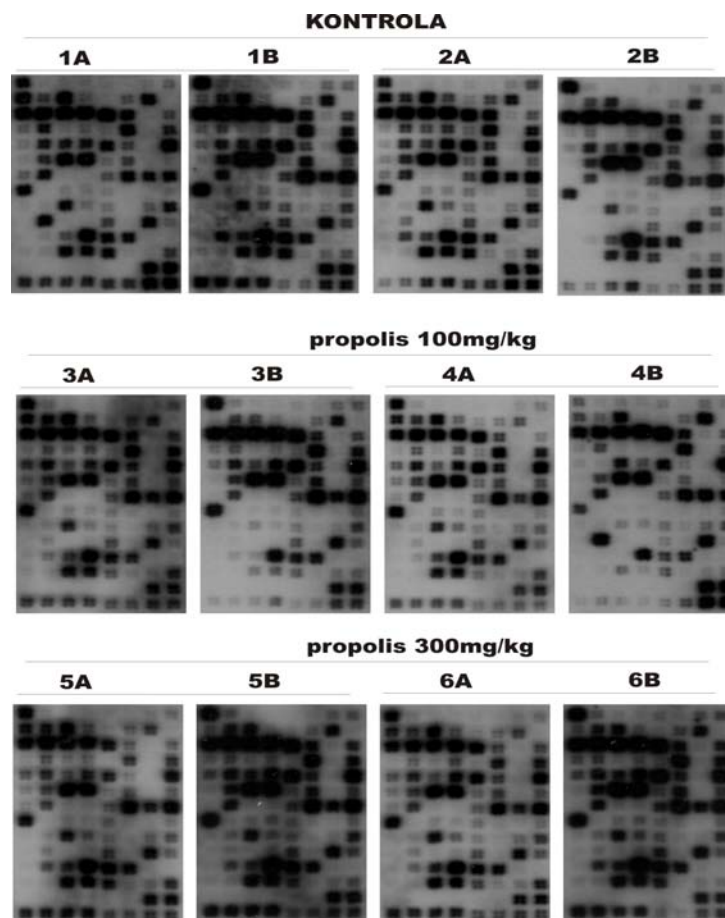
slika 22b wb pluća

graf 23a wb mozak

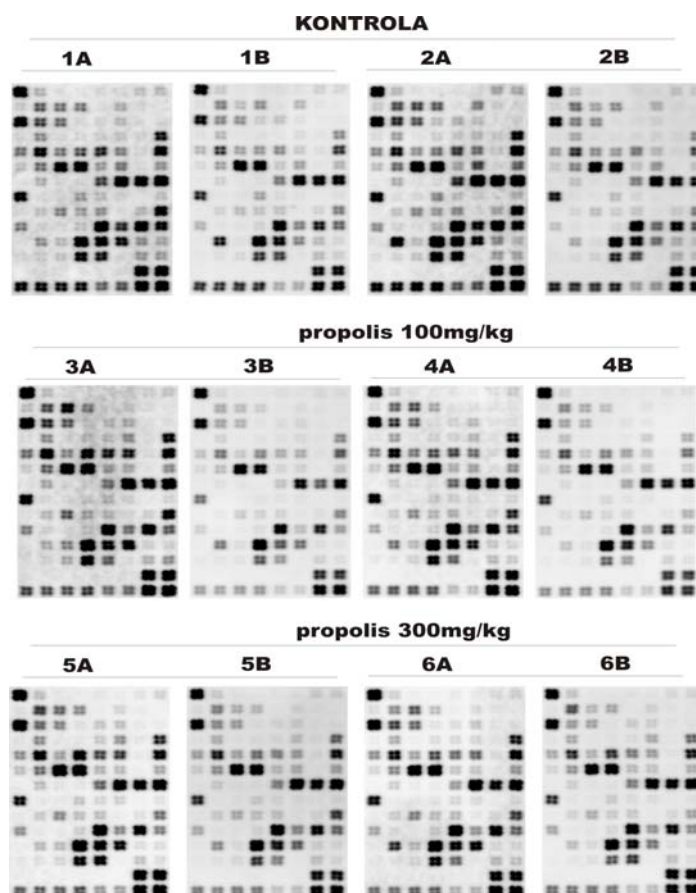
slika 23b wb mozak

4.3.10 Utjecaj propolisa na ekspresiju 96 gena koji se aktiviraju u stresu i toksičnosti

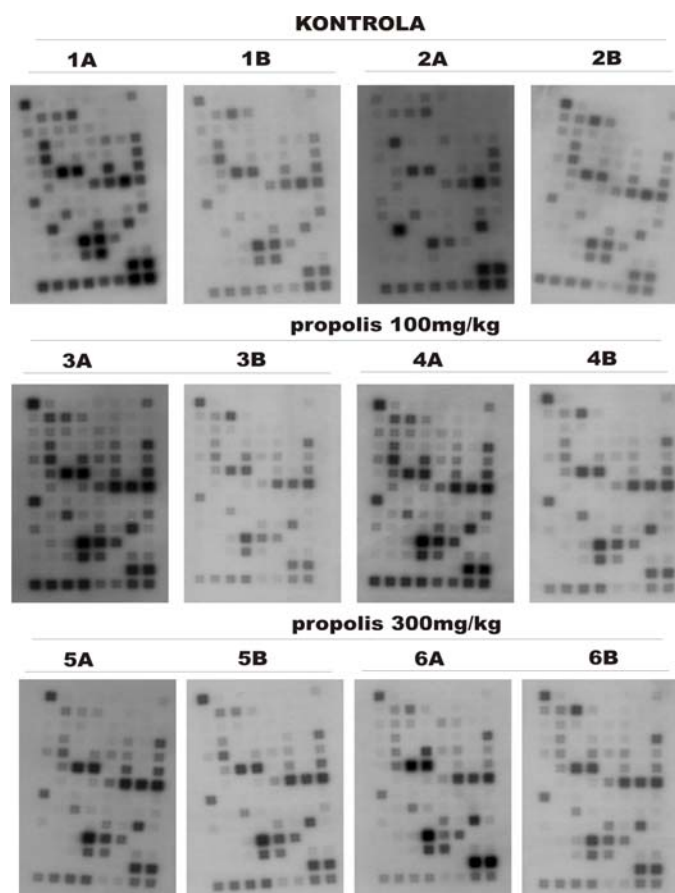
Kako bi odredili utjecaj propolisa u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine na ekspresiju 96 gena koji sudjeluju u stresu i toksičnosti, primijenili smo membrane sa specifičnim probama za 96 gena (tzv. *DNA čipove* - **Slike 24, 25, 26**). Analizom čipova utvrdili smo da u jetri propolis u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine snižava ekspresiju gena koji sudjeluju u oksidacijskom/metaboličkom stresu (SOD-2, p=0,038; **Slika 27**), apoptozi (TNFRSF1A, p=0,018; **Slika 28**) i popravku i oštećenju DNA (XRCC1, p=0,001; **Slika 29**). U dozi od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine, propolis je značajno povećao ekspresiju gena za upalne procese (IL1-β, p=0,014; **Slika 30**), (IL6, p=0,021; **Slika 31**) i (NOS2, p=0,041; **Slika 32**). U plućima je propolis značajno smanjio ekspresiju gena za apoptozu (CASP8, p=0,044, u dozi od 100 mg kg⁻¹; **Slika 33**); TNFSF10, p=0,003, u obje doze; **Slika 34**), HMOX2, p=0,039; u dozi od 300 mg kg⁻¹; (**Slika 35**) i gena koji sudjeluju u oštećenju/popravku DNA (XRCC2, p=0,027; u dozi od 300 mg kg⁻¹; **Slika 36**); zatim gena koji sudjeluju u procesima upale (IL1α, p=0,011, u obje doze (**Slika 37**); u proliferaciji/karcinogenezi (PCNA, p=0,048, u dozi od 100 mg kg⁻¹; (**Slika 38**); oksidacijskom/metaboličkom stresu (CYP1A1, p=0,013 u dozi od 100 mg kg⁻¹; p=0,015 u dozi od 300 mg kg⁻¹; **Slika 39**). U mozgu propolis ne utječe na ekspresiju nijednog od 96 ispitanih gena.



Slika 24. Ekspresija 96 gena u jetri u kontroli (1A, 1B, 2A, 2B), dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine (3A, 3B, 4A, 4B) i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine (5A, 5B, 6A, 6B). RNA je prevedena u cDNA obilježenu biotinom, koja je zatim hibridizirana na membrane GEMatrix Q series Mouse Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array Kit (MM-012-12) na kojoj su pričvršćene odgovarajući komplementarni oligonukleotidni slijedovi za svaki od 96 gena. Radiografski signal je detektiran metodom kemiluminiscencije prema odgovarajućem GEMatrix Q and S Series protokolu. Signal u svakoj točki membrane daje mjeru aktivnosti pojedinog gena.



Slika 25. Ekspresija 96 gena u plućima u kontroli (1A, 1B, 2A, 2B), dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine (3A, 3B, 4A, 4B) i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine (5A, 5B, 6A, 6B). RNA je prevedena u cDNA obilježenu biotinom, koja je zatim hibridizirana na membrane GEMatrix Q series Mouse Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array Kit (MM-012-12) na kojoj su pričvršćene odgovarajući komplementarni oligonukleotidni slijedovi za svaki od 96 gena. Radiografski signal je detektiran metodom kemiluminiscencije prema odgovarajućem GEMatrix Q and S Series protokolu. Signal u svakoj točki membrane daje mjeru aktivnosti pojedinog gena.



Slika 26. Ekspresija 96 gena u mozgu u kontroli (1A, 1B, 2A, 2B), dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine (3A, 3B, 4A, 4B) i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine (5A, 5B, 6A, 6B). RNA je prevedena u cDNA obilježenu biotinom, koja je zatim hibridizirana na membrane GEArray Q series Mouse Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array Kit (MM-012-12) na kojoj su pričvršćene odgovarajući komplementarni oligonukleotidni slijedovi za svaki od 96 gena. Radiografski signal je detektiran metodom kemiluminiscencije prema odgovarajućem GEArray Q and S Series protokolu. Signal u svakoj točki membrane daje mjeru aktivnosti pojedinog gena.

(SOD-2, $p=0,038$; *slika 27*)

(TNFRSF1A, $p=0,018$; *slika 28*)

(XRCC1, $p=0,001$; *slika 29*)

(IL1- β , $p=0,014$; *slika 30*)

(IL6, $p=0,021$; *slika 31*)

(NOS2, $p=0,041$; *slika 32*)

(CASP8, $p=0,044$; **sl. 33**)

TNFSF10, $p=0,003$; **sl. 34**)

(IL1 α , p=0,011; *slika35*)

(PCNA, p=0,048; *slika36*),

(CYP1A1, $p=0,013$, *slika 37*)

(IL1 α , $p=0,013$; *slika 38*),

graf sl.39

4.4 UTJECAJ PROPOLISA NA OKSIDACIJSKI/ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U JETRI, MOZGU I PLUĆIMA U HIPERBARIČKIM UVJETIMA

4.4.1 LPO

U homogenatima jetre, pluća i mozga miševa proces LPO-a praćen je u uvjetima 100%tnog kisika (oksidacijski stres) kod životinja hranjenih samo komercijalnom hranom, te u uvjetima 100%tnog kisika u životinja hranjenih dvjema dozama propolisa (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) (*Slika 40*). Oksidacijski je stres (1 ATA) značajno povećao koncentraciju TBARS-a u jetri (p<0,001) i plućima (p=0,043). U mozgu čisti kisik također povećava koncentraciju TBARS-a, ali taj učinak nije značajan. U životinja hranjenih propolisom i obrađenih 100%tnim kisikom, obje koncentracije propolisa smanjile su povećanu koncentraciju TBARS-a u jetri i plućima na vrijednosti kontrolne skupine. Sličan, iako statistički neznačajan učinak propolis ima i u mozgu.

4.4.2 CuZnSOD, MnSOD

U supernatantima jetre, pluća i mozga ženki miševa određena je aktivnost CuZnSOD i MnSOD-a u uvjetima 100%tnog kisika kod životinja hranjenih samo komercijalnom hranom, te u uvjetima 100%tnog kisika u životinja hranjenih dvjema dozama propolisa (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) (*Slika 41*). Oksidacijski stres nije promijenio CuZnSOD aktivnost, dok propolis u uvjetima oksidacijskog stresa ni u jednoj dozi nije mijenjao CuZnSOD aktivnost. U uvjetima oksidacijskog stresa MnSOD aktivnost se povećala u jetri (p<0,001). Propolis u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine je snizio aktivnost MnSOD-a u odnosu na skupinu obrađenu u

uvjetima oksidacijskog stresa, dok je aktivnost MnSOD-a smanjena u još većoj mjeri u skupini obrađenoj dozom od 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine (p<0,001). Aktivnost MnSOD-a u plućima skupine obrađene sa propolisom u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine u uvjetima oksidacijskog stresa bila je povećana u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0,032), što je rezultat propolisa *per se*. (*Slika 42*).

4.4.3 KAT, Gpx

U supernatantima jetre, pluća i mozga miševa određena je aktivnost KAT-a i Gpx-a u uvjetima 100%tnog kisika kod životinja hranjenih samo komercijalnom hranom, te u uvjetima 100%tnog kisika u životinja hranjenih dvjema dozama propolisa (100 mg kg⁻¹ tjelesne težine i 300 mg kg⁻¹ tjelesne težine) (*Slika 43*). Katalazna aktivnost u jetri nije promijenjena niti u uvjetima oksidacijskog stresa, kao ni uvjetima 100%tnog kisika u životinja hranjenih dvjema dozama propolisa. U mozgu je aktivnost katalaze značajno porasla u uvjetima oksidacijskog stresa (p<0,001), a obje su doze propolisa u uvjetima oksidacijskog stresa smanjile KAT aktivnost na vrijednosti kontrolne skupine. U plućima oksidacijski stres nije imao utjecaja na KAT aktivnost, dok je u kombinaciji s objema dozama propolisa značajno povisio KAT aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (p<0,001). Gpx aktivnost u jetri, plućima i mozgu ostala je nepromijenjena u uvjetima oksidacijskog stresa, kao i uvjetima oksidacijskog stresa u životinja hranjenih dvjema dozama propolisa. (*Slika 44*).

graf lpo 40

graf cuzn i mnsod 41, 42

graf kat gpx

43, 44

5 RASPRAVA

U ovom radu istražili smo oksidacijski/antioksidacijski učinak nativnog propolisa u jetri, mozgu i plućima ženki CBA miševa starih 4 mjeseca, kao i djelovanje nativnog propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u jetri, plućima i mozgu miševa izloženih oksidacijskom stresu (100%tni kisik tijekom 18 sati). Nativni je propolis također podvrgnut kvalitativnoj i kvantitativnoj kromatografskoj analizi, koja je pokazala da je glavni flavonoid detektiran u uzorku nativnog propolisa krizin. Razlike u kemijskom sastavu propolisa korištenog u našim pokusima i propolisa kojeg je proučavao Kosalec i sur. 2003., a koji je skupljan u kontinentalnom dijelu Hrvatske, su uglavnom kvantitativne prirode. U njegovoj studiji pinocembrin je bio najviše prisutan flavonoid, iza kojeg je po zastupljenosti slijedio krizin. Različiti sastavi flavonoida i/ili količine u kojima su pojedini flavonoidi zastupljeni u propolisu su očekivane stoga što osim mjesta na kojem je skupljan propolis, razlike u sastavu mogu nastati i zbog utjecaja lokalne flore, sezonskih razlika ili utjecaja samog okoliša (Bankova i sur. 1998.). Hrvatski propolis, nadalje, ima 3.75 puta veću količinu krizina nego brazilski propolis (Shimizu i sur. 2004.). Ova spoznaja je od velikog značaja stoga što krizin, osim fitoestrogenih, antioksidacijskih (Woo i sur. 2005.), kao i anksiolitičkih aktivnosti (Salgueiro i sur. 1997.) djeluje i kao kompetitivni inhibitor aromataze (Jeong i sur. 1999.). Kao takav krizin može regulirati gonadalne funkcije povećanjem testosterona i smanjenjem estrogena (Seralini i Moslemi, 2001.). Osim toga, lijekovi koji inhibiraju aromatazu koriste se za liječenje žena koje imaju povećanu predispoziciju za rak dojke (Zhang i sur. 2004.). Uzorak nativnog propolisa korištenog u ovoj studiji pokazao je u *in vitro* uvjetima da ima relativno niski antioksidacijski potencijal (1.6 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na troloks koji

ima najviši antioksidacijski potencijal (2.0 $\mu\text{mol/L}$). Za razliku od relativno niskog antioksidacijskog kapaciteta *in vitro*, propolis u našem radu ima jaki antioksidacijski učinak *in vivo*. To može biti od značaja jer su i ostali autori dokazali da postoje suprotna *in vitro* i *in vivo* oksidacijska/antioksidacijska svojstva različitih namirnica bogatih flavonoidima (Lotito i Frei, 2004.). Taj se učinak pokazao ovisan o tkivu i dozi. Pozitivan učinak propolisa pokazan je u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine, gdje je propolis smanjio LPO u svim ispitanim tkivima (jetri, plućima i mozgu), dok u dozi od 300 mg kg^{-1} tjelesne težine nije imao nikakav učinak niti u jednom od ispitivanih organa. Smanjena LPO je vjerojatno posljedica povećane aktivnosti CuZnSOD-a u jetri, kao i povećane aktivnosti MnSOD-a i KAT-a u plućima. Manje je vjerojatno da je smanjenje LPO rezultat Gpx-a jer se aktivnost istog nije promijenila tijekom obradaa u nijednom organu. U literaturi postoji mali broj podataka o dvojnem učinku propolisa na antioksidacijski status *in vivo* u ovisnosti o dozi u smislu zaštitnog/štetnog djelovanja (Ichikawa i sur. 2002.), ali dosad nema nijednog podatka koji je ispitivao djelovanje nativnog propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u istom smislu. Dozna ovisnost pripravaka koji se koriste preventivno kao dodatak prehrani važan je podatak jer se dugo smatralo da antioksidansi, kao npr. vitamin C i E uvijek djeluju protektivno, tj. da nemaju prooksidacijskih svojstava bez obzira na dozu. Međutim, sve je više literaturnih podataka koji ukazuju na štetno (prooksidacijsko) djelovanje antioksidanasa u višim dozama, a što se poglavito odnosi na vitamin C u povećanoj dozi (Kadiiska i sur. 1995.; Porter, 1995.).

Ispitali smo, nadalje, mehanizam djelovanja propolisa u obje doze na ekspresiju gena za SOD-1, SOD-2, KAT i Gpx-1 u jetri, plućima i mozgu, kao i količinu proteina istih gena, te smo usporedili ova dva nivoa regulacije sa aktivnosću istih u sva tri

ispitivana organa. Pokazali smo da u jetri količina mRNA za SOD-1 nije bila promijenjena ni u kojoj dozi, kao ni količina proteina SOD-1. Aktivnost je, međutim značajno porasla u dozi od 100 mg kg⁻¹ obzirom na kontrolnu skupinu životinja. SOD-2 je, s druge strane, značajno porastao na transkripcijskom nivou, i to u ovisnosti o dozi, dok je količina proteina SOD-2 kao i aktivnost ostala nepromijenjena. Ovaj podatak je vrlo bitan jer ukazuje na mogući tumor-supresorski učinak propolisa u jetri, što je u korelaciji sa ostalim podacima iz literature, gdje je pokazano da povećana ekspresija MnSOD-a potiskuje tumorigeničnost stanica melanoma i glioma stanica, sugerirajući tako ulogu enzima kao tumor-supresora u različitim vrstama raka (Ridnour i sur. 2004.; Zhong i sur. 1997.). U plućima propolis nije imao utjecaja na CuZnSOD u nijednoj dozi: promjene nisu nađene niti na nivou RNA, niti u količini proteina, kao ni u aktivnosti enzima. Ovdje zapažamo slične karakteristike enzima kao i u jetri, a to su slaba (ili pak nikakva) promjena enzima obzirom na obradu. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima iz literature, koji su pokazali da je CuZnSOD relativno inertan enzim (Coto-Montes i sur. 1997.), a to je potvrđeno i u našim prijašnjim studijama (Sobočanec i sur. 2003.). Međutim, nađena je razlika između transkripcijske aktivnosti gena za MnSOD u plućima i njegove aktivnosti, koje međusobno nisu u korelaciji. Pokazali smo smanjenu ekspresiju gena za MnSOD u dozi od 100 mg kg⁻¹ dok je aktivnost MnSOD-a porasla. Ista situacija je pokazana u modulaciji KAT-a, gdje je prisutan dozno ovisan pad ekspresije, dok aktivnost bilježi dozno ovisni porast. Promjene u aktivnosti ovih enzima ne odgovaraju promjenama na transkripcijskom nivou, nego su upravo suprotnoga smjera. Ovakva situacija može se objasniti posttranskripcijskim regulacijskim mehanizmima antioksidacijskih enzima pomoću drugih čimbenika (Wilson DO i sur. 2000) tako da

dobivene razlike ne moraju nužno odražavati promjene u razini njihove enzimatske aktivnosti. Transkripcija gena za KAT u jetri pokazala je dozno-ovisnu regulaciju na gore. Na nivou proteina nije zamijećena promjena u količini, dok je aktivnost KAT-a proporcionalno pratila porast transkripcije, premda ne značajno. Ovi rezultati pokazuju antioksidacijski i tumor-supresivni učinak u smislu zaštite organa jer je pokazano da je u nekim tumorima aktivnost katalaze kao i ekspresija smanjena (Chung-man i sur. 2001.). Općenito, obzirom da u literaturi postoje protuslovni podaci o aktivnosti, količini proteina kao i transkripciji antioksidacijskih enzima (Sohal i sur. 2002.; Wilson i sur. 2000.). Ekspresija mRNA za Gpx-1 snižena je ovisno o dozi u jetri i mozgu, dok u plućima postoji tendencija sniženja koja nije statistički značajna. Količina proteina kao i njegova aktivnost ostala je nepromijenjena obzirom na obrada u svim tkivima. Gpx-1 ima glavnu ulogu u antioksidacijskoj obrani organizma u fiziološkim uvjetima jer je pokazano da je njegova ekspresija usporedna s metaboličkom aktivnosti tkiva i samim tim s povećanom proizvodnjom RNV-a (Brigelius-Flohe, 1999.). Obzirom da je na transkripcijskom nivou u jetri i mozgu pokazana značajno snižena količina mRNA za Gpx-1 u obje doze, moglo bi se reći da propolis ima protektivnu, tj. antioksidacijsku ulogu u tim organima, dok je u plućima njegova uloga bila marginalna, tj. enzim se pokazao kao relativno inertan.

Rezultati dobiveni u ovoj studiji pokazuju da je mehanizam regulacije antioksidacijskih enzima u različitim organima u obje doze reguliran na više molekularnih stupnjeva, te ukazuje na kompleksnost antioksidacijskog sustava. U literaturi dosad ne postoje podaci koji obuhvaćaju sva tri antioksidacijska enzima na transkripcijskom, translacijskom nivou, te na razini njihove aktivnosti u jetri, mozgu i

plućima ženki CBA miševa. Postoje neka istraživanja koja obuhvaćaju regulaciju samo jednog enzima na sva tri nivoa regulacije, a ta ista su pokazala da aktivnost MnSOD-a nije popraćena porastom količine njegova proteina, što upućuje na to da osim transkripcijske aktivacije postoji i translacijska/posttranslacijska regulacija ekspresije gena za MnSOD (Ho i sur. 1996.). Neki drugi autori, također, dokazuju da antioksidacijski enzimi nisu regulirani usklađeno i da je ta regulacija vrlo kompleksna, te da se odvija na različitim stupnjevima (Chen i sur. 1993.).

Kako bi odredili utjecaj propolisa u obje doze na ekspresiju 96 gena koji sudjeluju u stresu i toksičnosti, koristili smo membrane sa specifičnim oligonukleotidnim probama na odgovarajućih 96 gena (tzv. *DNA čipove*). Prednosti ove tehnike su u tome što se na ovaj način može odrediti istovremeno transkripcijski obrazac velikog broja gena u istim ili različitim uvjetima. Obzirom na male dimenzije čipa, iz jednog pokusa moguće je dobiti veliku količinu podataka, kao npr. informacije o složenim metaboličkim putevima, detaljan prikaz genotipa, a isto tako je moguće odrediti profil genske ekspresije vezane uz određeni obrada (Bassett i sur. 1999.). Međutim, dosad ne postoje podaci koji bi istražili učinak nativnog propolisa na gensku ekspresiju 96 gena u jetri, mozgu i plućima miševa. Metoda genske ekspresije putem čipova dobivena u našoj studiji pokazala je da je učinak propolisa na ekspresiju gena uključenih u odgovor organizma na oksidacijski stres i toksičnost tkivno i dozno specifičan. Propolis u mozgu nije imao značajan učinak na ekspresiju 96 gena niti u jednoj dozi. U jetri je međutim pokazao doznu ovisnost: 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine imalo je antioksidacijski učinak jer je značajno smanjio ekspresiju gena koji su uključeni u oksidacijski/metabolički stres (SOD-2), popravak/oštećenje DNA (XRCC1), te aktivaciju apoptoze (TNFRSF1A). Smanjena ekspresija SOD-2

ukazuje na zaštitni učinak propolisa u dozi od 100 mg kg⁻¹ tjelesne težine jer je poznato da je povećana ekspresija SOD-2 povezana sa nastankom tumora (Pani i sur. 2000.). Osim toga, ekspresija TNFRSF1A je smanjena u istoj dozi. Regulacija na gore TNFRSF1A (TNF Receptor type 1) potiče signalnu kaskadu koja uzrokuje aktivaciju gena koji sudjeluju u procesima upale, poticanju apoptoze i represiji određenih gena (Nanes S i sur. 2003), pa se tako može zaključiti da propolis smanjenjem ekspresije TNFRSF1A ima antiapoptotski i protuupalni učinak. XRCC-1 (X-ray-repair-cross-complementing-1) je tipičan primjer gena odgovornih u popravku oksidacijskog DNA oštećenja, tj. oštećenja nastalog uslijed djelovanja UV zračenja. Povećanje transkripcijskog produkta zapažen je nakon izlaganja UV zračenju, a biološko značenje tog porasta je u skladu sa trajnim oksidacijskim oštećenjem DNA (Fang-Kircher i sur. 1999.). Poznato je da je mehanizam popravka oštećenja DNA uključen u proces ishemije/reperfuzije u mozgu; u tome XRCC-1 igra ključnu ulogu jer popravlja oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom (Fujimura i sur. 1999.). Neke pak studije pokazuju pad u ekspresiji XRCC-1 mRNA *in vitro*, koji upućuje na DNA oštećenje (Yoo i sur. 1992.), ali detaljna uloga XRCC-1 u patofiziološkim procesima *in vivo* je potpuno nepoznata. Naša je studija pokazala da smanjena ekspresija XRCC-1 u jetri može biti posljedica zaštitnog učinka propolisa u dozi od 100 mg kg⁻¹. S druge strane, doza od 300 mg kg⁻¹ imala je značajni prooksidacijski/proinflamatorni učinak u jetri. To se očituje u selektivnoj upregulaciji gena koji sudjeluju u upalnim procesima: IL-1 β , IL6 i NOS2. Literaturni podaci pokazali su da IL1 može inducirati proizvodnju i oslobađanje medijatora NO \bullet i prostaglandina E2 (PGE2). IL β je također uključen u kataboličke proupalne procese, jer utječe na indukciju gena uključenih u upalu i razgradnju, a to su

geni NOS2 i COX2 (LeGrand i sur. 2001.). Inducibilan oblik NOS-a (NOS2) producira visoke količine NO• i najčešće je povezan s upalom u reumatskim bolestima (Grabowski i sur. 1997.). Nadalje, inducibilni COX (COX2) je izoforma koja je uglavnom odgovorna za povećanu količinu PGE2 u artritisu (Attur i sur. 1999.). Ovi podaci su u skladu sa našim eksperimentima koji pokazuju prooksidacijski učinak propolisa u dozi od 300 mg kg⁻¹ jer reguliraju na gore gene odgovorne za upalne procese, a takav identičan proupalni mehanizam su također potvrdili i drugi (Nair i sur. 2002.; Wei i sur. 2001.). Međutim, očito je da je selektivni učinak propolisa tkivno specifičan, jer je u plućima zabilježena značajno smanjena ekspresija 7 gena, u obje doze. U dozi od 100 mg kg⁻¹ propolis je značajno smanjio ekspresiju gena CASP8 (kaspaza 8), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), TNFSF10, IL1 α i CYP1A1. CASP8 i TNFSF10 su geni čija regulacija na gore uzrokuje ulazak stanice u apoptozu i to tako da se regulacijom na gore TNFSF10 gena aktivira njegov protein Trail, koji potiče aktivaciju CASP8, te apoptotičke kaskade. CASP8 je ključni enzim u receptorski posredovanoj apoptozi, a inhibicija ekspresije gena za CASP8 sprečava apoptozu posredovanu preko ovih receptora. Moglo bi se, stoga, reći da propolis ima i antiapoptotski učinak jer smanjuje indukciju proapoptotičkih gena. Ovaj podatak je u skladu sa Theoharidesom i sur (2001.), koji su također pokazali njegov antiapoptotički učinak. Nadalje, ekspresija gena CYP1A1 je značajno smanjena u obje doze. Murray i sur. (2006.) su pokazali da galangin inhibira AhR (aril hidrokarbon receptor) koji je transkripcijski čimbenik, a sudjeluje u angiogenezi, staničnom odgovoru na hipoksiju, kao i u procesu karcinogeneze. Aktivacija AhR-a se ogleda kroz indukciju CYP1 gena koji kodiraju CYP1A1, 1A2 i 1B1 monooksigenaze, koje pak metaboliziraju policikličke aromatske ugljikovodike (PAH) i dioksine u mutagene intermedijere

(Whitlock, 1990.). Pokazano je da galangin blokira indukciju CYP1A1 u tumorskim stanicama sisavaca (Ciolino i sur. 1999.) i tako zapravo ima potencijal za blokiranje nastanka mutagenih metabolita u tumorskim stanicama.

Oksidacijski stres u obliku hiperoksije je značajno povećao LPO u jetri i plućima, dok je u mozgu zabilježena tendencija ka povećanju LPO, premda nije bila značajna. Razlog povećanoj otpornosti mozga na oksidacijski stres je u tome što je mozak zaštićen od oštećenja zbog velikog porasta u aktivnosti KAT-a (preko 350%tno povećanje aktivnosti). Jetra je zbog relativno niskog porasta u aktivnosti KAT-a, bila neotporna na hiperoksiju, bez obzira što je aktivnost MnSOD-a porasla; ova promjena u aktivnosti SOD-a nije uspjela doprinijeti otpornosti jetre na oksidacijski stres. Obzirom da hiperoksija u plućima nije povezana sa porastom obrambenih čimbenika od oksidacije, pluća su pokazala najveći porast u LPO od svih ispitivanih organa. Porast u koncentraciji TBARS-a u sva tri ispitivana organa induciran hiperoksijom, dokinut je sa obje doze propolisa. U jetri je propolis u dozi od 300 mg kg⁻¹ dokinuo porast MnSOD-a i KAT-a. U mozgu je povećana KAT aktivnost također dokinuta propolisom. U plućima miševa obrađenih propolisom prije hiperoksije, MnSOD i KAT aktivnost su značajno porasle. Ova spoznaja je od ključne važnosti zbog toga što su pluća odraslih životinja, nasuprot plućima novorođenih životinja, osjetljiva na hiperoksiju jer nisu sposobna dovoljno brzo aktivirati zaštitni biokemijski odgovor na oksidacijski stres (Ischiropoulos, 2001.). Rezultati ove studije pokazuju da ova važna sposobnost novorođenih životinja može biti vraćena i u odraslih jedinki administracijom nativnog propolisa tijekom hiperoksije. Iz ovih podataka zaključuje se da nativni propolis iz kontinentalne regije Hrvatske ima zaštitni učinak na mozak, pluća i jetru u fiziološkim uvjetima, ali i uvjetima

oksidacijskog stresa. Ta spoznaja može pomoći u zaštiti od hiperoksije u populaciji novorođenih i starijih osoba kojima je potrebna veća otpornost na oksidacijski stres u uvjetima produženog izlaganja čistom kisiku tijekom obrada u hiperbaričkoj komori. U plućima podvrgnutima hiperoksiji propolis potiče indukciju aktivnosti antioksidacijskih enzima koji su u odraslih jedinici prigušeni. Osim toga, visoka koncentracija krizina u uzorku nativnog propolisa mogla bi se potencijalno koristiti kao sredstvo koje povećava koncentraciju testosterona ili kao dijetetski dodatak u liječenju raka dojke.

6 ZAKLJUČCI

- Prvi je put istražen učinak nativnog propolisa *in vivo* na oksidacijski/antioksidacijski status u miševa
- Premda je antioksidacijski potencijal nativnog propolisa u *in vitro* uvjetima relativno nizak, taj je antioksidacijski učinak jak u *in vivo* uvjetima
- Nativni je propolis pokazao doznu ovisnost i to tako da je u manjoj dozi imao antioksidacijski (zaštitni) učinak, a u većoj dozi prooksidacijski (štetni) učinak
- Oksidacijski status nakon obradaa nativnim propolisom ne pokazuje tkivnu, ali pokazuje doznu ovisnost.
- Antioksidacijski status pokazuje tkivnu, kao i doznu ovisnost
- Promjena aktivnosti antioksidacijskih enzima u jetri nije korelirala s količinom njihove mRNA, dok je u plućima promjena u aktivnosti istih uglavnom imala proporcionalnu promjenu u mRNA.
- Nije zapažena nikakva značajna promjena u ekspresiji proteina za sve ispitivane antioksidacijske enzime, niti obzirom na dozu, niti obzirom na ispitivano tkivo
- Analizom DNA čipova utvrđeno je da propolis u dozi od 100 mg kg⁻¹ u jetri ima zaštitni učinak jer regulira na dolje gene uključene u oksidacijski/metabolički stres, apoptozu i oštećenje DNA; u dozi od 300 mg kg⁻¹ propolis ima prooksidacijski učinak jer regulira na gore gene uključene u proupalne reakcije; u plućima je propolis u obje doze imao zaštitni učinak jer je regulirao na dolje gene odgovorne u apoptozi, oštećenju DNA, oksidacijskom/metaboličkom stresu i procesima upale; u mozgu propolis nije imao učinka u nijednoj dozi

- U hiperbričkim uvjetima propolis je smanjio oksidacijski stres u sva tri ispitivana tkiva u dozi od 100 mg kg⁻¹; u plućima je taj učinak propolis ostvario povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (MnSOD, KAT). Propolis ima značajan učinak u odraslih jedinki u uvjetima 100%tnog kisika regulacijom na gore antioksidacijskih enzima, budući su isti u odraslih jedinki inaktivni, tj. njihova se aktivnost ne može potaknuti

7 SAŽETAK

Propolis je tijekom stoljeća, a u posljednje vrijeme i u suvremenoj medicinskoj praksi ispitivan i korišten kao protuvirusno, protubakterijsko i protugljivično sredstvo. Biološki učinci propolisa vezani su uz antibiotska, protuupalna i antioksidacijska svojstva. Jedan od sastojaka propolisa su flavonoidi, čija je karakteristika visoki antioksidacijski potencijal zbog kojeg im se pripisuje sposobnost prevencije različitih bolesti kao što su različite vrste tumora, osteoporoza, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. U našim ispitivanjima koristili smo nativni propolis u dvije doze (100 mg kg^{-1} , 300 mg kg^{-1}), kojem smo istražili sastav, udio i vrstu flavonoida odgovornih za njegov oksidacijski/antioksidacijski učinak. Krizin je bio prisutan u najvećoj koncentraciji, dok je izoramnetin bio prisutan u najmanjoj. Antioksidacijski potencijal nativnog propolisa u *in vitro* uvjetima je bio relativno nizak. Međutim, propolis značajno povisuje antioksidacijski učinak *in vivo* uvjetima u jetri, plućima i mozgu miševa. Učinak nativnog propolisa pokazao ovisio je o dozi i to tako da je u manjoj dozi djelovao antioksidacijski (zaštitno), a u većoj dozi prooksidacijski (štetno). Oksidacijski status nakon obradaa nativnim propolisom nije pokazao tkivnu, ali je pokazao doznu ovisnost. Antioksidacijski status pokazao je tkivnu i doznu ovisnost; u mozgu nije pokazao promjenu, dok je najveća promjena zabilježena u plućima i u manjoj mjeri u jetri. Promjena aktivnosti antioksidacijskih enzima u jetri nije korelirala s količinom njihove mRNA, dok je u plućima promjena u aktivnosti istih uglavnom bila proporcionalna promjeni u mRNA. Nije zapažena značajna promjena u ekspresiji proteina za sve ispitivane antioksidacijske enzime, niti obzirom na dozu, niti obzirom na ispitivano tkivo. Analizom DNA čipova utvrđeno je da propolis u dozi od 100 mg kg^{-1} u

jetri ima zaštitni učinak, dok je u dozi od 300 mg kg⁻¹ taj učinak prooksidacijski. U plućima je propolis u obje doze imao zaštitni učinak, dok u mozgu nije imao učinka na ispitivane gene. U hiperbaričkim uvjetima propolis je smanjio oksidacijski stres u sva tri ispitivana tkiva u dozi od 100 mg kg⁻¹. U plućima je taj učinak propolis ostvario povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (MnSOD, KAT). Antioksidacijski učinak propolisa porijeklom iz Hrvatske do sada nije istraživani u *in vivo* sistemima. Isto tako po prvi puta se ispituje nativni propolis (tehnologijska inovacija) za razliku od do sada ispitivanih vodenih ili alkoholnih ekstrakata. Rezultati ove studije također pokazuju da sposobnost zaštitnog odgovora u plućima na oksidacijski stres koji postoji u novorođenih, ali se gubi u odraslih jedinki, može biti obnovljena uporabom nativnog propolisa tijekom hiperoksije. Ta spoznaja može pomoći u zaštiti od hiperoksije u populaciji odraslih tijekom terapije kisikom.

8 SUMMARY

Propolis has been used in folk medicine since ancient times. Nowadays, its usage has reached the stage of scientific medicine. Propolis is considered to have antiviral, antibacterial, antifungal and antioxidant properties due to its scavenging capacity of free radicals. Propolis is composed, beside other compounds, of flavonoids which have high antioxidative potential and, therefore, are able to prevent various pathological states (tumors, osteoporosis, cardiovascular and neurodegenerative diseases). In our study we determined flavonoid composition of ethanolic extract of propolis. We used two doses of native propolis ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$ and $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$, respectively). Chrysin was the most abundant flavonoid, while isorhamnetin was the least abundant flavonoid found in our sample of native propolis. Antioxidant potential of native propolis *in vitro* was relatively low. On the contrary, propolis had very high antioxidative capacity *in vivo*. This effect was dose- and tissue-dependent. While lower dose had protective effect, higher dose was prooxidative. Oxidative status after propolis treatment appeared to be dose-, but not tissue dependent. Antioxidative status was both dose- and tissue-dependent: it was unchanged in brain while in liver and lungs it changed significantly. Change in antioxidant enzyme activities due to propolis did not correlate with their mRNA level in liver. In lungs change in activity was paralleled with change in mRNA level. Protein level of antioxidant enzymes, on the other hand, revealed no change upon propolis treatment in any tissue with any dose tested. DNA chip analysis showed protective effect of propolis in lower dose ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$) in liver, while higher dose had prooxidative effect. In lungs both doses of propolis had protective effect. In brain propolis had no effect on none of the genes tested.

In hyperoxia oxidative stress was lowered via increased antioxidant enzyme activity (particularly MnSOD and CAT). Antioxidant effect of native propolis has not been examined *in vivo* so far. This is the first time that native propolis has been investigated since there have been only water/ethanol extracts of propolis investigated. Also, the results of this study show that propolis in lungs subjected to hyperoxia offers the possibility to turn on the antioxidant enzyme activity which is normally shut down in adult animals. This might circumvent oxygen toxicity in the large population of adults who require prolonged high concentration oxygen therapy.

9 LITERATURA

1. Ghisalberti EL (1979) Propolis: a review. *Bee World* 60:59-84.
2. Burdock GA (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chem Toxicol* 36: 347-363.
3. Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y, Kanazawa K (2004) Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. *Arch Biochem Biophys* 424:181-188.
4. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG (1994) Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41:9-13.
5. Oršolić N, Horvat Knežević A, Šver L, Terzić S, Bašić I (2004) Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 94:307-315.
6. Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2001) Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 76:165-170.
7. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang MT, Ferraro T, Conney AH, Grunberger D (1993) Inhibition of tumor promoter mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53:1255-1261.
8. Gonzales R, Corcho I, Ramirez D, Rodriguez S, Gonzales A, Anchetta O, Merino N and Pascual C (1994) Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytotherapy Res* 8:229-232.
9. Havsteen BH (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32:1141-1148.
10. Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 96:67-202.

-
11. Cao G., Sofic E., Prior RL (1997) antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Bio Med* 22:749-760.
 12. DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65(4):337-353.
 13. Hollman PC, Katan MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 51:305-310.
 14. Rice-Evans C, Spencer JPE, Schroeter H, Rechner AR (2000) Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms *in vivo*. *Drug Metabol Drug Interact* 17:291-310.
 15. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073-2085S.
 16. Tsuchiya H, Sato M, Kato H, Okubo T, Juneja LR, Kim M (1997) Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 703:253-258.
 17. Spencer JPE, Schroeter H, Rechner A, Rice-Evans C (2001) Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antiox Redox Signal* 3:1023-1040.
 18. Spencer JPE, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 272:236-241.
 19. Porter LJ (2002) Tannins. In: *Plant Biochemistry*. Vol.1. *Plant Phenolics* (Harborne, JB ed.). Academic Press, London:389-418.

-
20. Higuchi WI, Ho NF, Park JY, Komiya I (1981) Rate-limiting steps and factors in drug absorption. In: Drug Absorption (Prescott, LF & Nimmno, WS eds.);pp35-60. ADIS Press, New York.
 21. Chen ZY, Zhu QY, Wong YF, Zhang ZY, Chung HY (1998) Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea KATechins. *J Agric Food Chem* 46:2512-2516.
 22. Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8:797-807.
 23. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK, Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458:224-230.
 24. Scheline RR (1999) Metabolism of oxygen heterocyclic compounds. In: *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds*, pp243-295.
 25. Raventos RML, Romero-Perez AI, Andres-Lacueva C, Tornero A (2005) Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Sci Tech Int* 11:159-176.
 26. Fekermann S, Schroder G, Schmidt J, Strack D, Edrad RA, Hellariuta Y, Elomaa P, Kotilainan M, Kilpelainen I, Proksch P, Teeri TH, Schroder J (1998) Secondary resistance. New pathways to polyketide in plants. *Nature (Lond)* 396:387-390.
 27. Duthie SJ, Dobson VL (1999) Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 38:28-34.
 28. Korkina LG, Afanasev IB (1997) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 38:151-163.
 29. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20:933-956.

-
30. Spencer JPE, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C (2001) Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epiKATechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 31:1139-1146.
 31. Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA (2002) Uptake and metabolism of epiKATechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Rad Biol Med* 33:1693-1702.
 32. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M (2000) The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radical Res* 33:819-830.
 33. Schroeter H, Boyd S, Spencer JPE, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002) MAPK signalling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23:861-880.
 34. Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans C (2000) Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Rad Biol Med* 29:1222-1233.
 35. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:67-101.
 36. Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50.
 37. Van Eeden SF, Klut ME, Walker BAM, Hogg JC (1999) The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 232:23-43.
 38. Sies H (1991) Oxidative stress: introduction. U: Sies H (ur.), *Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, CA, 15-22.

-
39. Allen RG (1998) Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age* 21:47-76.
 40. Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50.
 41. Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
 42. Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant *Free Rad Res Comm* 9:1-32.
 43. Tan YH, Tischfield J, Ruddle FH (1973) The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21. *J Exp Med* 137:317-330.
 44. Marklund SL (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 222:649-655.
 45. Rosen DR, Brown RH (1993) Mutations in CuZn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
 46. Oberley LW, Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer. A review. *Cancer Res* 39:1141-1149.
 47. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St. Clair DK (1997) Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene* 14:481-490.
 48. Ravindranath V, Reed DJ (1990) Glutathione depletion and formation of glutathione-protein mixed disulfide following exposure of brain mitochondria to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 169:1075-1079.
 49. Henshaw N (1962) *Aero-chalions*. Dublin, Dancer.

-
50. Behnke AR, Shaw LA (1937) Use of hyperbaric oxygen in treatment of sompressed air illness. *Nav Med Bull* 35:1-12.
 51. Bernard WF, Tank ES (1963) The effect of oxygen inhalation at 3.0 to 3.6 atmospheres absolute upon children with cyanotic congenital heart disease. *Surgery* 54:203-211.
 52. Churchill-Davidson I, Sanger C, Thomlinson RH (1955) High-pressure oxygen and radiotherapy. *Lancet* 1:1091-1095.
 53. Smith G, Sharp G (1962) Treatment of coal gas poisoning with oxygen at two atmospheres pressure. *Lancet* 1:816-819.
 54. Martin L (1997) Questions and Answers on Physiology and Medical Aspects of Scuba Diving. U: Best Pub. Co. *Scuba Diving Explained*, 1-11.
 55. Joenje H (1989) Genetic toxicology of oxygen. *Mutat Res* 219:193-208.
 56. Gille JJ, Joenje H (1992) Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res* 275:405-414.
 57. Vangala RR, Kritzler K, Schoch G, Topp H (1998) Induction of single-strand breaks in lymphocyte DNA of rats exposed to hyperoxia. *Arch Toxicol* 72:247-248.
 58. Gille JJ, Van Berkel CGM, Joenje H (1993) Mechanism of hyperoxia-induced chromosomal breakage in Chinese hamster cells. *Environ Mol Mutagen* 22:264-270.
 59. Knighton DR, Halliday B, Hunt TK (1984) Oxygen as antibiotic: the effect of inspired oxygen on infection. *Arch Surg* 119:199-204.
 60. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO (1993) Morphological analysis of the microcirculation during reperfusion of ishaemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic Reconstr Surg* 91:1110-1123.

-
61. Rothfuss A, Stahl W, Radermacher P, Speit G (1999) Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. *Environ Mol Mutagen* 34:291-296.
 62. Benson J, Adkinson C, Collier R (2003) Hyperbaric oxygen therapy of iatrogenic cerebral arterial gas embolism. *Undersea Hyperb Med* 30:117-126.
 63. Rothfuss A, Merk O, Radermacher P, Speit G (2000) Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro: II. Induction of oxidative DNA damage and mutations in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 471:87-94.
 64. Dennog C, Radermacher P, Barnett AY, Speit G (1999) Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 428:83-89.
 65. Eken A, Aydin A, Sayal A, Üstündag A, Duylu Y, Dündar K (2005) The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans. *Clin Biochem* (u štampi).
 66. Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M (2001) Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows Archiv* 438:259-270.
 67. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA, Braga FC (2002) Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 80:1-7.
 68. Abd El Hady FK, Hegazi AG (2002) Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z Naturforsch* 57c:386-394.

-
69. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177:91-104.
 70. Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurements of "antioxidative power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.
 71. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
 72. Flohé L, Ötting F (1971) Superoxide dismutase assays. *Method Enzymol* 105:93-104.
 73. Ceballos-Picot I, Nicol A, Clement M, Bourre JM, Sinet PM (1992) Age related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc dismutase. *Mut Res* 275:281-293.
 74. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol.* 105:121-126.
 75. Rothfuss A, Stahl W, Radermacher P, Speit G (1999) Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. *Environ Mol Mutagen* 34:291-296.
 76. Aebi H (1984) KATalase in vitro. *Method Enzymol.* 105:121-126.
 77. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169.
 78. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:256-275.
 79. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 192:156-159.
 80. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-686.

-
81. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S (2003) Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm* 53(4):275-85.
 82. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin M, Funari SRC (1998) Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 29: 361-367.
 83. Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y, Kanazawa K (2004) Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Arch Biochem Biophys* 424:181-188.
 84. Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK (2005) Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Lett* 579:705-711.
 85. Salgueiro JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MB, Izquierdo I, Medina JH (1997) Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior* 58:887-891.
 86. Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM (1999) Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Arch. Pharm. Res.* 22:309-312.
 87. Séralini GE, Moslemi S (2001) Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178:117-131.
 88. Zhang S, Yang X, Morris ME (2004) Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol Pharmacol* 65:1208-1216.
 89. Lotito SB, Frei B (2004) Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical Bio Med* 36:201-211.
 90. Ichikawa S, Satoh K, Tobe T, Yasuda I, Ushio F, Matsumoto K, Endo K, Ookubo C (2002) Free radical scavenging activity of propolis. *Redox Rep* 7(5):347-50.

-
91. Kadiiska MB, Burkitt MJ, Xiang QH, Mason RP (1995) Iron supplementation generates hydroxyl radical *in vivo*. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest* 96(3):1653-1657.
 92. Porter WL (1995) Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. *Tox Ind Health* 9:93-122.
 93. Ridnour L, Oberley TD, Oberley LW (2004) Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxidants & redox signaling* 6:501-512.
 94. Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Manendez G, Hardeland R, Tolivia D (1997) Physiological oxidative stress model: syrian hamster harderian gland-seks differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Bio Med* 30:785-792.
 95. Sobočanec S, Kušić B, Šverko V, Balog T, Marotti T (2006) Methionine-enkephalin modulated regulation of oxidant/antioxidant status in liver of CBA mice. *Biogerontology* 7:53-62.
 96. Wilson DO, Johnson P (2000) Exercise modulated antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. *J Appl Physiol* 88:1791-1796.
 97. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair AAS, Farver C, Erzurum SC (2001) Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 61:8578-8585.
 98. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002) Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidant stress hypothesis. *Free Radical Bio Med* 33:575-586
 99. Brigelius-Flohé R (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Bio Med* 27:951-965.

-
100. Ho YS, Dey MN, Crapo JD (1996) Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *Am J Physiol* 270:810-818.
 101. Chen Y, Frank L (1993) Differential gene expression of antioxidant enzymes in the perinatal rat lung. *Pediatr Res* 34:27-31.
 102. Bassett DE, Eisen MB, Boguski MS (1999) Gene expression informatics-it's all in your mine. *Nat Genet Suppl* 21:51-55.
 103. Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti L, Borrello S, Galeotti T (2000) Deregulated Manganese Superoxide Dismutase Expression and Resistance to Oxidative Injury in p-53 Deficient Cells. *Cancer Res* 60:4654-4660.
 104. Nanes MS (2003) Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321:1-15.
 105. Fang-Kirscher S, Labudova O, Kitzmueller E, Rink H, Cairns N, Lubec G (1999) Increased steady state mRNA levels of DNA-repair genes XRCC1, ERCC2 and ERCC3 in brain of patients with down syndrome. *Life Sci* 64:1689-1699.
 106. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Sugawara T, Chan PH (1999) Early decrease of XRCC-1, a DNA base excision repair protein, may contribute to DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 30:2456-2463.
 107. Yoo H, Li L, Sacks PG, Thomson LH, Becker FF, Chan HYJ (1992) Alterations in expression and structure of the DNA repair gene XRCC1. *Biochem Biophys Res Comm* 186:900-910.
 108. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F (2001) Interleukin-1, Tumor Necrosis factor α , and Interleukin-17 Synergistically Up-Regulate

-
- Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Explants of Human Osteoarthritic Knee Menisci. *Arthritis Rheum* 44:2078-2083.
109. Grabowski PS, Wright PK, Van't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH (1997) Immunolocalisation of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 36:651-655.
110. Attur MG, Patel PN, Patel PD, Abramson SB, Amin AR (1999) Tetracycline up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E2 production independent of its effect on nitric oxide. *J Immunol* 162:3160-3167.
111. Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha KC, Chawda R, Nair H, Kumar N, Nair RE, Schwartz SA (2002) The flavonoid, quercetin, differently regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL-4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:29-36.
112. Wei BL, Lu CM, Tsao LT, Wang JP, Lin CN (2001) In vitro anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. *Planta Med* 67:745-747.
113. Theoharides TC, Alexandrakis M, Kempuraj D, Lytinas M (2001) Antiinflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int J Immunopathol Pharmacol* 14:119-127.
114. Murray TJ, Yang X, Sherr DH (2006) Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A. *Breast Cancer Res*; *in press*
115. Whitlock JPJ (1990) Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:251-277.

116. Ciolino H, Yeh G (1999) The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP 1A1 activity and an agonist of the AhR. *Br J Cancer* 79:1340-1346.
117. Ischiropoulos H (2001) Reactive species and signal transduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L583-584.

10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. svibnja 1975. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala sam u Zagrebu. Gimnaziju "Lucijan Vranjanin" završila sam 1993./94. godine s odličnim uspjehom. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, inženjerski profil, usmjerenje molekularna biologija, upisala sam 1993./94. godine. Uredno sam odslušala svih osam (8) semestara. Za rad pod naslovom "Učinak metionin-enkefalina na lučenje reaktivnih radikala dušika" dobila sam 1997. godine Rektorovu nagradu. Diplomirala sam 6. svibnja 1999. s radom pod naslovom "Enkefalinazna (CD10/NEP) aktivnost membrane ljudskih neutrofila". Oba rada izrađena su u Laboratoriju za modulare biološkog odgovora pod stručnim vodstvom dr. Tanje Marotti. Temeljem odluke Znanstvenog vijeća Instituta "Ruđer Bošković" od 28. listopada 1999., izabrana sam u istraživačko zvanje mlađi asistent iz područja biomedicine i zdravstva, polje temeljne medicinske znanosti, grana fiziologija. Od 29. listopada 1999. godine zaposlena sam u Institutu "Ruđer Bošković" u Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratorij za modifikatore biološkog odgovora. Magistarski rad obranila sam 17.3.2003. godine pod nazivom «Oksidacijski/antioksidacijski status u CBA miševa različite dobi» pod stručnim vodstvom dr. Tanje Marotti.

Sudjelovala sam na više znanstvenih skupova u zemlji i inozemstvu, a koautor sam na 17 znanstvenih radova, od kojih 16 u CC-u, te 1 u SCI-u.

Mjesto zaposlenja: Laboratorij za modifikatore biološkog odgovora, Zavod za molekularnu medicinu, Institut «Ruđer Bošković» Zagreb.

Mjesto izrade doktorske disertacije: Laboratorij za modifikatore biološkog odgovora, Zavod za molekularnu medicinu, Institut «Ruđer Bošković» Zagreb.

ČLANSTVO U STRUČNIM I ZNANSTVENIM UDRUGAMA:

2000. Hrvatsko imunološko društvo

2001. HNE-Club (član International Society for Free Radicals Research-a)

2004. Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (član FEBS-a)

NAGRADE:

1997. Rektorova nagrada za rad “The link between met-enkephalin-induced down-regulation of APN activity and the release of superoxide anion. *Neuropeptides* 34 (2); 121-128. T Marotti, T Balog, V Munić, **S Sobočanec**, M Abramić (2000).

OBJAVLJENI RADOVI:

1. Marotti T, Balog T, Munić V, **Sobočanec S**, Abramić M (2000) The link between met-enkephalin induced down-regulation of APN activity and the release of superoxide anion". *Neuropeptides* 34 (2), 121-128.
2. Balog T, Marotti T, Abramić M, Beusan-Svoboda I, **Sobočanec S**, Hršak I (2001) Neutrophil neutral endopeptidase variation and its regulation by opioide peptides. *International Immunopharmacology* 1:569-579.
3. Balog T, Marotti T, Musani V, **Sobočanec S**, Šverko V (2001) The effect of methionine-enkephalin on nitric oxide release in mice is age and gender related. *Pharmacological Research* 44:287-291.
4. Šverko V, Balog T, **Sobočanec S**, Gavella M, Marotti T (2002) Age-associated alteration of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in CBA and AKR mice. *Experimental Gerontology* 37:1031-1039.
5. Šverko V, **Sobočanec S**, Balog T, Marotti T (2002) Met-enkephalin modulates lipid peroxidation and total sialic acid level in CBA mice in age- and sex-dependent manners. *Experimental Gerontology* 37; 1413-1421.
6. **Sobočanec S**, Balog T, Šverko V, Marotti T (2003) Sex-dependent Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Ageing Mouse Brain. *Free Radical Research* 37(7); 743-748.
7. Šverko V, **Sobočanec S**, Balog T, Marotti T. (2004) Gender difference in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice. *Biogerontology* 5:235-242
8. Balog T, **Sobočanec S**, Šverko V, Marotti T. (2004) Met-enkephalin modulates resistance to oxidative stress in mouse brain. *Neuropeptides* 38;298-303.
9. Šverko V, **Sobočanec S**, Balog T, Čolić M, Marotti T. (2004) Natural micronized clinoptilolite and clinoptilolite mixtures with 40% *Urtica Dioica* L. extract as possible antioxidant. *Food Technology and Biotechnology* 42 (3) 189-192

-
10. **Sobočanec S**, Balog T, Šverko V, Marotti T. (2005) Met-enkephalin modulation of age-related changes in red cell antioxidant status. *Physiological Research* 54;97-104,
 11. Šverko A, **Sobočanec S**, Balog T, Kušić B, Šverko V, Marotti T (2005) Does long-term exercise modulate oxidant/antioxidant status in humans? comparison between lipid peroxidation and catalase activity in fresh and stored plasma. *Croatica Chimica Acta* 78;3:44-49.
 12. Balog T, **Sobočanec S**, Šverko V, Krolo M, Ročić B, Marotti M, Marotti T (2006) The influence of season on oxidant-antioxidant status in trained and sedentary subjects. *Life Sciences* 78 (13), 1441-1447
 13. **Sobočanec S**, Kušić B, Šverko V, Balog T, Marotti T (2006) “Methionine-enkephalin modulated regulation of oxidant/antioxidant status in liver of CBA mice”. *Biogerontology* 7; 53-62
 14. **Sobočanec S**; Šverko V, Balog T, Šarić A, Rusak G, Likić S, Kušić B, Katalinić Visnja, Radić S, Marotti T (2006) *In vivo* tissue- and dose-related oxidant/antioxidant properties of coratian apiceutic of native propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 21; 8018 -8026
 15. Jasprica, I; Mornar, A; Debeljak, Z; Smolcic-Bubalo, A; Medić-Šarić M; Mayer, Lj; Romić, Z; Bučan K; Balog, T; **Sobočanec, S**; Marotti, T. In vivo study of prolonged propolis supplementation influence on red blood cells and antioxidative status. *Journal of Ethnopharmacology* (prihvaćeno za objavljivanje)
 16. Šarić, A; Balog, T; **Sobočanec, S**; Marotti, T (2007) Endomorphin 1 activates NOS2 activity and downregulates NOS2 mRNA expression. *Neuroscience* (prihvaćeno za objavljivanje)

SCIENTIFIC ARTICLES – SCI

1. Šverko V, Balog T, Gavella M, Lipovac V, Marotti T, **Sobočanec S** (2001) Oxidant/antioxidant status in AKR mice. *Periodicum Biologorum* 103:3-9.

POGLAVLJA U KNJIGAMA:

1. Balog T, **Sobočanec S**, Šverko V, Haberstock-Debic H, Marotti T (2005) “Met-enekphalin in oxidative stress”. *Cytokines: Stress and Immunity, Second Edition*, edited by Nicholas P. Plotnikoff, Robert E. Faith, and Anthony J. Murgu. CRC press UK