

# Učinci ekstrakta crnoplodne aronije na primarne mišje astrocite izložene djelovanju 6-hidroksidopamina

---

Mijatović, Ela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:337165>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ela Mijatović

UČINCI EKSTRAKTA CRNOPLODNE ARONIJE NA PRIMARNE MIŠJE ASTROCITE  
IZLOŽENE DJELOVANJU 6-HIDROKSIDOPAMINA

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ela Mijatović

UČINCI EKSTRAKTA CRNOPLODNE ARONIJE NA PRIMARNE MIŠJE ASTROCITE  
IZLOŽENE DJELOVANJU 6-HIDROKSIDOPAMINA

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.

Završni rad obranjen je dana 15.7.2021. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Dinko Vitezić, dr. med
2. prof. dr. sc. Jasenka Mršić- Pelčić, dr. med
3. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med

Rad sadrži 48 stranica, 15 slika, 2 tablice i 65 literaturnih navoda.

**Zahvala:**

*Iznimno hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Kristini Pilipović, dr. med., na prihvaćanju željenog neuroprotektivnog istraživanja aronije te brojnim znanstvenim savjetima i objašnjenjima koji su doprinijeli izradi ovog rada. Posebno hvala mag. bioteh. u med. Niki Gržeti na strpljenju i prenesenom znanju o metodama molekularne biologije.*

## SAŽETAK

Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*, PD) najčešći je poremećaj kretanja te druga najučestalija progresivna neurodegenerativna bolest u svijetu. Korištenjem neurotoksina 6-hidroksidopamin (engl. *6-hydroxydopamine*, 6-OHDA) u *in vivo* i *in vitro* modelima PD može se doprinijeti rasvjetljavanju patogeneze PD. Terapijske opcije u liječenju PD su limitirane, a sve je veći broj znanstvenih dokaza o neuroprotektivnosti antioksidanasa poput crnoplodne aronije, odgovornih za zaštitu dubokih jezgara mozga poput substantie nigre i bazalnih ganglija. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak tretmana ekstraktom aronije astrocita izloženih djelovanju 6-OHDA.

Pokusi su učinjeni na primarnim mišjim astrocitima koji su bili izloženi tijekom 24 h različitim koncentracijama ekstrakta crnoplodne aronije (10, 50 ili 100 µg/mL). 6-OHDA je dodan u medij za uzgoj stanica tijekom sljedećih 72 h (za test laktatne dehidrogenaze, LDH) ili 24 h (za western blot analize). Razina aktivnosti LDH testirana je radi procjene učinaka tretmana na preživljenje astrocita, a Western blotom detektirana je razina izražaja pojedinih proteina od interesa.

Rezultati su pokazali da tretman različitim koncentracijama ekstrakta aronije ne utječe značajno na aktivnost LDH u uzorcima medija neozlijeđenih astrocita. Uočeno je i da aplikacija 6-OHDA značajno povećava aktivnost LDH, a da su stanice pretretirane ekstraktom aronije u koncentracijama 50 i 100 µg/mL imale značajno nižu razinu aktivnosti ovog enzima. Nadalje, mjerene su razine izražaja proteina toplinskog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70*, HSP70), moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) te inducibilne sintaze dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) u astrocita izloženih djelovanju 6-OHDA, netretiranih ili tretiranih ekstraktom aronije. Pretretman aronijom nije značajno utjecao na razine protektivnih proteina HSP70 i BDNF, ali je povećao razinu izražaja iNOS u ozlijeđenim astrocitima, no ne i statistički značajno.

Ova studija ukazuje na moguće protektivne učinke ekstrakta crnoplodne aronije u *in vitro* modelu PD. Točan mehanizam protektivnog učinka još je uvijek nejasan te bi mogao biti predmetom daljnjih istraživanja.

**Ključne riječi:** aronija, astrociti, 6-hidroksidopamin, laktat dehidrogenaza, moždani neurotrofni čimbenik, protein toplinskog šoka

## SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is the most common movement disorder and the second most frequent progressive neurodegenerative disease in the world. Neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is used in *in vivo* and *in vitro* models of PD and may contribute to elucidating the pathogenesis of this disease. Therapeutic options in the treatment of PD are limited, and there is growing scientific evidence of the neuroprotectiveness of antioxidants such as chokeberry, responsible for protecting deep brain nuclei such as substantia nigra and basal ganglia. The aim of this study was to determine the effect of treatment with chokeberry extract of astrocytes exposed to 6-OHDA.

Experiments were performed on primary mouse astrocytes that were exposed during 24 h to different concentrations of chokeberry extract (10, 50 or 100 µg/mL). 6-OHDA was added to the cell culture medium over the next 72 h (for lactate dehydrogenase test, LDH) or 24 h (for western blot analysis). The level of LDH activity was tested to determine the effects of treatments on astrocyte survival. Western blot analysis detected the level of expression for some proteins of interest.

The results of this study showed that treatment with different concentrations of chokeberry extract did not significantly affect LDH activity in media samples of uninjured astrocytes. Also, it was observed that the application of 6-OHDA significantly increased the activity of LDH, and that the cells treated with chokeberry extract at concentrations of 50 and 100 µg/mL had a significantly lower activity of this enzyme. Furthermore, heat shock protein 70 (HSP70), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression levels were measured in astrocytes exposed to 6-OHDA, untreated or treated with chokeberry extract. Treatment with chokeberry did not significantly affect the levels of protective proteins HSP70 and BDNF but increased the level of iNOS expression in injured astrocytes, albeit not statistically significantly.

This study suggests possible protective effects of chokeberry extract in an *in vitro* model of PD. The exact mechanism of the protective effect is still unclear and could be the subject of further research.

**Keywords:** chokeberry, astrocytes, 6-hydroxydopamine, lactate dehydrogenase, brain neurotrophic factor, heat shock protein

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PARKINSONOVA BOLEST.....	1
1.2. BAZALNI GANGLIJI .....	1
1.1.1. ULOGA BAZALNIH GANGLIJA U MOTORNOJ KONTROLI .....	2
1.1.2. SUBSTANTIA NIGRA .....	3
1.3. ZVJEZDOLIKI GLIOCITI ILI ZVJEZDASTE STANICE – ASTROCITI.....	3
1.3.1. ASTROGLIJA U ČOVJEKA .....	4
1.4. PATOFIZIOLOGIJA PARKINSONOVE BOLESTI.....	4
1.4.1. OKSIDATIVNI STRES.....	4
1.4.1.1. POVEĆANA OKSIDACIJA DOPAMINA I NEUROMELANINA.....	5
1.4.1.2. POVEĆANA KONCENTRACIJA SLOBODNOG ŽELJEZA I SMANJENA KONCENTRACIJA FERITINA.....	5
1.4.1.3. SMANJENA REDUKCIJA I POVEĆANA OKSIDACIJA GLUTATIONA..	6
1.4.2. MITOHONDRIJSKA DISFUNKCIJA U PARKINSONOVOJ BOLESTI.....	6
1.4.3. ULOGA NEUROUPALE U PARKINSONOVOJ BOLESTI .....	7
1.4.4.1. ULOGA NEUROTROFINA U NEUROUPALI .....	9
1.4.4.2. NF- $\kappa$ B SIGNALNI PUT U PARKINSONOVOJ BOLESTI.....	10
1.4.4.3. ULOGA $\alpha$ -SINUKLEINA U PARKINSONOVOJ BOLESTI.....	11
1.5. LIJEČENJE PARKINSONOVE BOLESTI.....	13
1.5.1. BIOSINTEZA I METABOLIZAM DOPAMINA.....	13
1.5.2. LEVODOPA .....	14
1.5.3. AGONISTI DOPAMINERGIČKIH RECEPTORA.....	14
1.5.4. MAO-B INHIBITORI .....	15
1.5.5. ANTIKOLINERGICI .....	15



1.5.6. AMANTADIN .....	16
1.5.7. POTENCIJALNO TERAPIJSKO DJELOVANJE ANTIOKSIDANASA U BORBI PROTIV PARKINSONOVE BOLESTI.....	16
1.5.7.1. NEUROPROTEKTIVNOST CRNOPLODNE ARONIJE .....	17
1.6. PRETKLINIČKI MODELI PARKINSONOVE BOLESTI.....	17
1.6.1. <i>IN VIVO</i> MODELI PARKINSONOVE BOLESTI .....	17
1.6.1.1. 6-HIDROKSIDOPAMIN .....	17
1.6.1.2. 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDIN .....	18
1.6.1.3. PARAKVAT .....	19
1.6.1.4. ROTENON.....	19
1.6.2. <i>IN VITRO</i> MODELI PARKINSONOVE BOLESTI .....	19
1.6.2.1. H4, HEK293, SH-SY5Y, PC12 I LUHMES STANIČNE LINIJE .....	19
1.6.2.2. PRIMARNE KULTURE NEURONA .....	20
1.6.2.3. MATIČNE STANICE.....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJALI I POSTUPCI .....	23
3.1. PRIMARNI MIŠJI ASTROCITI.....	23
2.2. UZORAK ARONIJE .....	23
2.3. KEMIKALIJE .....	24
2.4. INSTRUMENTI.....	25
2.5.1. MJERENJE AKTIVNOSTI LAKTATNE DEHIDROGENAZE .....	28
2.5.2. PRIPREMA UZORAKA ZA WESTERN BLOT ANALIZU.....	29
3.5.2.1. WESTERN BLOT ANALIZE .....	30
2.6. EKSPERIMENTALNE GRUPE .....	31
2.7. PRIKUPLJANJE PODATAKA I STATISTIČKE ANALIZE .....	31

3. REZULTATI.....	32
3.1. ARONIJA U KONCENTRACIJI OD 100 µg/mL SMANJUJE RAZINE AKTIVNOSTI LDH U ASTROCITIMA IZLOŽENIM NEUROTOKSINU 6-OHDA.....	32
3.2. UTJECAJ 6-HIDROKSIDOPAMINA I PRETRETMANA EKSTRAKTOM ARONIJE NA IZRAŽAJ PROTEINA OD INTERESA .....	34
4. RASPRAVA.....	37
5. ZAKLJUČAK .....	40
6. LITERATURA.....	41
7. ŽIVOTOPIS .....	48

## 1. UVOD

### 1.1. PARKINSONOVA BOLEST

Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*, PD) najčešći je poremećaj kretanja, a predstavlja drugu najučestaliju kroničnu, progresivnu neurodegenerativnu bolest u svijetu. Prvi put opisana je u studiji Jamesa Parkinsona 1817. g. u kojoj su zabilježeni motorni znakovi oboljenja, a danas ujedno glavni simptomi: tremor, bradikinezija i rigiditet. Najčešći pacijenti su populacije između 40. i 70. g. života, dok se procijenjena stopa prevalencije i incidencije u Europi kreće između 65 i 12 500/100 000 te između 5 i 346/100 000 ljudi godišnje (1).

Iako je najčešći idiopatski tip, jedan od mogućih uzroka oboljenja je i izloženost metil-fenola-tetrahidropirinidinu (engl. *1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine*, MPTP) ili sintetskom heroinu koji uzrokuje smrt nigrostrijatalnih dopaminergičkih stanica. U ostale rizike ubrajaju se i neuroleptici te toksične razine mangana, trikloretilena i ugljikovog monoksida (2). Dodatno, preboljene traume, infekcije kao i metabolički poremećaji, ateroskleroza te degenerativna oboljenja mozga mogu jednako tako dovesti do razvitka parkinsonizma. Potrebno je spomenuti i genetsku predispoziciju koja se najčešća identificira kod pacijenata juvenilnog i familijarnog tipa bolesti u iznosu od 20% u užoj obitelji (3).

### 1.2. BAZALNI GANGLIJI

Bazalni gangliji su nakupine subkortikalnih jezgri neurona koje su primarno odgovorne za motornu kontrolu, a uz to obavljaju zadaću motoričkog učenja, ponašanja i emocija. Uključuju nekoliko važnih struktura mozga, među kojima su *striatum*, *globus pallidum*, subtalamičke jezgre i *substantia nigra*. Svaka struktura zasniva se na makroskopskoj razlici te se sastoji od jedne ili nekoliko cjelina. *Striatum* uključuje tri osnova dijela zajedničkih histoloških i neurokemijskih karakteristika: *nucleus caudatus*, *putamen* i *nucleus accumbens*. Ipak, dominantni striatalni neurološki elementi su gusti neuroni šiljastih oblika i srednjih veličina koji primaju informacije iz kore velikog mozga i talamusa te koriste inhibitorni neurotransmiter, gama-aminomaslačnu kiselinu (engl. *gamma-amino butyric acid*, GABA). Ostatak striatalnih neuroloških elemenata odnosi se na kolinergičke, parvalbuminergičke i peptidergičke interneurone. Unutar globus pallidusa niža je gustoća relativno velikih GABA-ergičkih neurona, dok subtalamičke jezgre, smještene na spojnici ventralnog diencefalona i mezencefalona, čine gusto zbijeni neuroni koji koriste glutamat kao neurotransmiter. Suprotno tome, *substantia nigra* građena je od dvaju histoloških i neuroloških različitih dijelova, *pars compacta* i *pars reticulata*, čiji su glavni prijenosnici informacija dopamin i GABA (4).

Pojam *bazalni gangliji* odnosi se na jezgre duboko smještene u hemisferama mozga, čija kategorizacija ovisi o vrsti prijenosa informacija. Na temelju navedenoga, razlikujemo tri osnovne podjele: ulazne, izlazne i intrinzične jezgre. Ulazne jezgre striatuma primaju dolazeće kortikalne, talamične i nigralne informacije, dok odlazeće informacije bazalnih ganglija šalju izlazne jezgre globus pallidusa (GP) i substantie nigre pars reticulata (SNpr). Intrinzične jezgre smještene su između ulaznih i izlaznih jezgri, a grade subtalamičke jezgre i substantiu nigru pars compactu (SNpc) (5).

### **1.1.1. ULOGA BAZALNIH GANGLIJA U MOTORNOJ KONTROLI**

U bazalnim ganglijima kodiranje i prijenos informacije znatno je kompleksnije prirode jer većina neurona oslobađa GABA neurotransmitter u trenutku akcijskog potencijala što inhibira aktivnost stanica ciljanog područja. Radi toga, osnovni princip napredovanja informacija bazalnim ganglijima zasniva se na uklanjanju mrežne inhibicije nametnute izlaznim jezgrama na putovima prema talamusu i korteksu, dok konačni ishod najviše ovisi o prostornoj i vremenskoj dinamici prijenosa signala u pojedinačnim i grupiranim neuronima (lokalne mreže) te unutar paralelnih putova (velike mreže).

Važnost bazalnih ganglija u nastanku pokreta temelji se na brzini akcijskih potencijala otpuštenih u neuronima tijekom pripreme i izvođenja pokreta. Primjerice, neuroni striatuma, koji oslobađaju acetilkolin za vrijeme određenih radnji (npr. trčanje), pokazuju dramatične pauze u prijenosu informacije, što uzrokuje ubrzavanja signala u SNpc (substantia nigra pars compacta) dopaminergičkim neuronima. Vrijeme zajedničkog otpuštanja acetilkolina i dopamina uči striatum na koje signale treba obratiti pažnju i omogućuje mu detekciju radnje koja je dovela do njihove pojave. To jača pojedine neurološke putove i osigurava da se poželjne radnje češće javljaju u budućnosti. Ključnu ulogu u takvom procesu ima dopamin koji je ključni u jačanju, ali i u slabljenju sinapsi neželjenih motornih kretnji. Dopaminergički neuroni nazivaju se i čuvarima vrata jer kontroliraju poruke koje se prenose iz striatuma do drugih jezgara bazalnih ganglija tijekom postupka odabira pokreta.

Osim što pojačavaju prijenos informacija o željenom pokretu, lokalne i velike mreže neurona bazalnih ganglija ponekad i reduciraju neželjene signale ne bi li se osigurao i optimizirao precizni akcijski plan. U nedostatku selekcije akcije, potaknuti su svi motorni putovi u mozgu, što uzrokuje aktivaciju velikog broja mišića tijela i neuspjeh u izvršavanju željenih radnji.

Disfunkcija bazalnih ganglija najčešće vodi do poremećaja pokreta i promjena u ponašanju. U pojedinim slučajevima, degeneracija određenih neurona podliježe razvitku i

neuroloških patologija kao npr. Parkinsonove bolesti, gdje dolazi do gubitka 60% dopaminergičkih neurona substantie nigre (6).

### 1.1.2. SUBSTANTIA NIGRA

Substantia nigra je dopaminergička jezgra srednjeg mozga koja ima važnu ulogu u nastanku motornih pokreta. Ispunjena je bazalnim ganglijima, čiji projekcijski neuroni nigrostrijatalno putuju do putamena i sudjeluju u motornim deficitima uočenima kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti.

Na osnovi funkcionalnih i morfoloških razlika, substantia nigra može se podijeliti na dva dijela: *pars compacta* (SNpc) i *pars reticulata* (SNpr). SNpc sadrži gusto zbijene dopaminergičke neurone, a zbog prisutnosti neuromelanina crnog je obojenja. Upravo radi ove karakteristike, sama struktura mozga dobila je naziv koji u prijevodu označava *crnu supstancu*. Preostali SNpr dio predstavlja GABA-ergičku inhibitornu izlaznu jezgru bazalnih ganglija (7).

Iako je oštećenje dopaminergičkih elemenata ozbiljnije u striatumu, aktivnost zaštitnih stanica astrocita veća je unutar substantie nigre pars compacte (8). Spomenuto odstupanje može se objasniti činjenicom kako su SNpc dopaminergičke strukture dominantnije u odnosu na striatum, gdje dopaminske sinapse čine <15% od ukupnih sinapsi (9).

### 1.3. ZVJEZDOLIKI GLIOCITI ILI ZVJEZDASTE STANICE – ASTROCITI

Astroglia ili astrociti razred su živčanih stanica neuroepitelnog podrijetla koje su odgovorne za homeostazu i zaštitu središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS). Zahvaljujući svojoj visokoj heterogenosti u formi i funkciji, astrocite definira prilagodljiva plastičnost koja je odgovorna za održavanje središnjeg živčanog sustava u razvoju i starenju. Riječ je o stanicama koje su čvrsto upletene u neuronske mreže te čije se osnovno djelovanje ostvaruje na svim razinama organizacije, od molekule do organa. Naime, prijenosom iona i protona, uklanjanjem i kataboliziranjem neurotransmitera te oslobađanjem prekursora neurotransmitera, astrociti ostvaruju molekularnu homeostazu, dok poticanjem neurogeneze, sinaptogeneze i definiranjem citoarhitekture, doprinose homeostazi stanica CNS-a. Na razini organa, astroglia vrši kontrolu krvno-moždane barijere (engl. *blood-brain barrier*, BBB) i limfatičkog sustava, a sistemsku ravnotežu ostvaruje djelovanjem poput kemosenzora, stvaranjem neuro-glio-vaskularnih jedinica, regulacijom unosa hrane, lokalnog protoka krvi te glikogenolize (10).

### 1.3.1. ASTROGLIJA U ČOVJEKA

Astroglija u čovjeka može se podijeliti na četiri skupine koje se razlikuju po smještaju i veličini. Prvoj skupini pripadaju protoplazmatski i vlaknasti astrociti bijele i sive tvari, čiji promjer iznosi 142  $\mu\text{m}$ . Osim što su 2,3 puta veći, protoplazmatski astrociti čovjeka integriraju i s 100 puta više sinapsi u odnosu na astrocite glodavaca. Interlaminarni astrociti predstavnici su druge skupine, a nastanjuju supragranularni sloj korteksa. Karakterizira ih kratko sferoidno stanično tijelo promjera od 10  $\mu\text{m}$ , čijim nakupljanjima može doći do formiranja *palisada*. Specifično pokazuju visoku imunoreaktivnost za GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) i S100B (engl. *S100 calcium binding protein B*, S100B) te povezuju udaljene stanice. Treća skupina odnosi se na polarizirane astrocite smještene u dubokim kortikalnim slojevima u blizini bijele tvari, dužine i do 1 mm. Ipak, najduži su tzv. prošireni astrociti koji predstavljaju četvrtu skupinu, a građeni su od nekoliko ogranaka (4-5) dužine iznad 1 mm koji se šire u svim smjerovima korteksa. Zahvaljujući svojoj staničnoj strukturi, mogu se poistovjetiti s protoplazmatskim astrocitima (10).

### 1.4. PATOFIZIOLOGIJA PARKINSONOVE BOLESTI

Neuropatologija Parkinsonove bolesti temelji se na gubitku neurona ili depigmentaciji substantie nigre i pojačanoj akumulaciji intracelularnog proteina  $\alpha$ -sinukleina. Naime, u ranijim stadijima bolesti, gubitak dopaminergičkih neurona može se najviše uočiti u ventrolateralnim dijelovima substantie nigre, a daljnjim napretkom oboljenja, dramatično se širi i u ostalim dijelovima srednjeg mozga. Popratno tome, nenormalna depozicija  $\alpha$ -sinukleina u citoplazmi neurona, uzrokuje agregaciju spomenutog proteina i pojavu Lewyjevih tjelešca. Formirane inkluzije, u asimptomatskim slučajevima, javljaju se u kolinergičkim i monoaminergičkim neuronima donjeg dijela moždanog stabla, dok kod pacijenata s razvijenim motornim simptomima Parkinsonove bolesti, infiltriraju neurone srednjeg i prednjeg mozga. U zadnjim stadijima bolesti, Lewy patologija zahvaća limbičke i neokortikalne moždane regije.

Osim navedenoga, brojne studije istaknule su i oksidativni stres, mitohondrijske disfunkcije te neuroinflamacije u razvitku patogeneze Parkinsonove bolesti (11).

#### 1.4.1. OKSIDATIVNI STRES

Postoji veliki broj dokaza o citotoksičnom djelovanju slobodnih radikala. Slobodni radikali cirkuliraju u normalnim ili patološkim uvjetima, a zbog nevezanih elektrona, smatraju se izrazito nestabilnim molekulama/atomima. Najčešći predstavnici su hidroksilni radikal,

superoksidni radikal i dušikov oksid. Spomenute kemijske vrste slučajno ili ciljano akumuliraju *in vivo* te uzrokuju ozbiljna oštećenja DNA, proteina i lipida.

Oksidativni stres može se definirati kao neravnoteža između biokemijskih procesa proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i stanične antioksidacije, koja dovodi do kritičnih propusta u biološkim funkcijama. Opisano stanje potaknuto slobodnim radikalima, u Parkinsonovoj bolesti, oštećuje membranske lipide neurona, proteine i ostale komponente moždanog tkiva. Najveći gubitci zabilježeni su unutar substantie nigre, regije osjetljive na oksidativni stres s velikim deficitom u obrambenim mehanizmima, a okolnosti koje ih uzrokuju su sljedeće: a) povećana oksidacija dopamina i neuromelanina b) povećana koncentracija slobodnog željeza i smanjena koncentracija feritina c) smanjena redukcija i povećana oksidacija glutaciona.

#### 1.4.1.1. POVEĆANA OKSIDACIJA DOPAMINA I NEUROMELANINA

Katekolamini, a posebice dopamin, važan su izvor slobodnih radikala u mozgu. Stabilnog dopamina može se pronaći u sinaptičkim vezikulama, ali za vrijeme ekscitacije u citosolu, djelovanjem monoamin oksidaze (engl. *monoamine oxidases*, MAO), slijedi njegovo metaboliziranje do vodikovog peroksida (1) ili autoksidacija do kvinona (2,3):



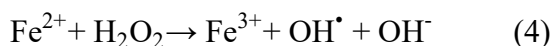
Neuromelanin, crni pigment, najviše se javlja u neuronima substantie nigre pars compacte. Iako se u potpunosti još ne poznaje njegova funkcija, smatra se kako nastaje iz metabolita proizvedenih oksidacijom monoaminskih neurotransmitera: dopamina i noradrenalina. Zahvaljujući tome, spomenuti pigment može vezati slobodne radikale i metale, a paralelno s time promijeniti svoja svojstva; prilikom niskih koncentracija željeza je antioksidans, dok u prisutnosti visokih koncentracija željeza je prooksidans.

#### 1.4.1.2. POVEĆANA KONCENTRACIJA SLOBODNOG ŽELJEZA I SMANJENA KONCENTRACIJA FERITINA

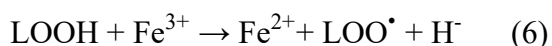
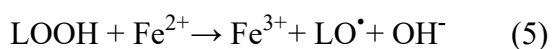
Visoke koncentracije željeza kod PD pacijenata, pronađene su u bazalnim ganglijima substantie nigre, globus pallidusa i putamena. Osim što potiče ROS produkciju, željezo je odgovorno i za aktivnost tirozinhidroksilaze i monoamin oksidaze. Odnosno, navedeni metal prolazi krvno-moždanu barijeru preko specifičnih receptora za transferin, dok unutar stanica veže se na feritin ili formira kelatne spojeve s fosfatnim grupama membranskih komponenti.

Feritin služi za skladištenje  $\text{Fe}^{3+}$  u netoksičnom obliku, što ograničava njegovu mogućnost za stimulaciju oksidativnih procesa.

Željezo uzrokuje oksidativno oštećenje stanica prijenosom jednog elektrona u Fenton reakcijama iz kojih izlazi nestabilni hidroksilni radikal. Nastali produkt može oksidirati nukleinsku kiselinu, proteine, ugljikohidrate i lipide (4):



Ukoliko dolazi do oksidacije lipida, pokreću se lančane reakcije lipidne peroksidacije prilikom kojih mogu nastati lipidni hidroperoksidi (LOOH). Dodatnim djelovanjem željeza, LOOH može se razgraditi do  $\text{LO}^\bullet$  i  $\text{LOO}^\bullet$  (5,6) koji oštećuju membranske proteine, a i do ostalih visoko toksičnih karbonilnih spojeva poput malondialdehida i 4-hidroksi-2-nonenala.



#### 1.4.1.3. SMANJENA REDUKCIJA I POVEĆANA OKSIDACIJA GLUTATIONA

Antioksidativna zaštita mozga osigurana je djelovanjem superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze. Posljednji navedeni enzim, pokazuje najjači stupanj suzbijanja ROS toksičnosti i redukcije  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a može se detektirati u glijalnim stanicama srednjeg mozga.

Tijekom homeostaze, vlada ravnoteža između stvaranja i razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , što smanjuje mogućnost razvitka oksidativnog stresa. No, otklanjanje  $\text{H}_2\text{O}_2$  (7) ovisi o količini reduciranog glutationa (GSH), koji lako prelazi u oksidirani glutation (GS-SG) te čiji nastanak određuje učinkovitost djelovanja glutation reduktaze:



Smanjena razina reduciranog glutationa substantie nigre kod Parkinsonove bolesti, mogla bi se smatrati uzročnikom gubitka neurona. Objašnjenje leži na činjenici kako manja dostupnost GSH dovodi do smanjene neuronske sposobnosti detoksikacije vodikovog peroksida i povećanja rizika od ROS formacije te lipidne peroksidacije (12).

#### 1.4.2. MITOHONDRIJSKA DISFUNKCIJA U PARKINSONOVOJ BOLESTI

Mitohondrijska disfunkcija usko je povezana s povećanim udjelom proizvodnje ROS elemenata u Parkinsonovoj bolesti. Odnosi se na organele koji preko oksidativne fosforilacije osiguravaju energiju za neuronske aktivnosti i ponekad predstavljaju glavni izvor superoksida i vodikovog peroksida koji vode propagaciji slobodnih radikala ili potencijalnih okidača bolesti.



Potrebno je naglasiti važnost kompleksa I u respiratornom lancu mitohondrija neurona, čija inhibicija pojačava nastanak slobodnih radikala u mozgu. U inhibitore kompleksa I ubraja se i MPTP koji prolazi krvno-moždanu barijeru i oksidira u metabolit MPP<sup>+</sup> (engl. *1-methyl-4-phenylpyridinium*, MPP<sup>+</sup>). Akumulacija nastalog produkta remeti rad kompleksa I te lanca prijenosa elektrona u mitohondriju, što rezultira smanjenom ATP proizvodnjom i povećanom ROS generacijom.

Ostali dokazi poremećaja rada mitohondrija povezanih s oksidativnim stresom i oštećenjem dopaminergičkih stanica, mogu se pronaći u mutacijama gena za proteine parkin, DJ-1 i PINK1. Oštećene proteinske strukture pokušavaju se ispravno eliminirati učinkovitom proteolizom i sintezom novih protektivnih proteina u mozgu, dok u ponekim slučajevima dolazi do nepravilnih konfiguracija i degradacija.

Parkin i PINK1 lokalizirani su u mitohondrijima te obavljaju metaboličke funkcije u homeostazi. Prekomjerna ekspresija PINK1 u mišjim modelima, dovodi do smanjenog gubitka dopaminergičkih neurona potaknutog MPTP djelovanjem kroz  $\alpha$ -syn redukciju, dok izostanak gena za PINK1 povećava oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju. Odnosno, PINK1 potreban je za održavanje normalne mitohondrijske morfologije SNpc dopaminergičkih neurona, a svoju neuroprotektivnu funkciju izražava eliminacijom ROS proizvodnje. U slučaju negativnih scenarija i izostanka PINK1 proteina, nastupa parkin koji regulira mitohondrijsku fiziologiju i preživljavanje stanica.

Mutacija DJ-1 proteina jednako se može smatrati okidačem Parkinsonove bolesti. Naime, DJ-1 veže se za podjedinice kompleksa I te time regulira njegovu aktivnost. Prilikom konjugacije s targetnim sekvencama, pokazuje još jače djelovanje protiv stanične smrti uzrokovane oksidativnim stresom (13).

### **1.4.3. ULOGA NEUROPALE U PARKINSONOVOJ BOLESTI**

Urođeni imunološki odgovor povezan s gliozom, nespecifičnom reaktivnom promjenom glijalnih stanica (mikroglije, astrocita) uslijed oštećenja središnjeg živčanog sustava, predstavlja važnu neurološku značajku humanih i animalnih modela Parkinsonove bolesti. S obzirom na mijeloidno podrijetlo, nakon odgovarajuće aktivacije, glija pokazuje antimikrobno djelovanja kao i staničnu toksičnost preko produkcije i oslobađanja citokina.

Upalni citokini važni su medijatori štetne neuroinflamacije u Parkinsonovoj bolesti. Najveću pozornost privlače TNF $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  i interferon  $\gamma$  koji preko dva mehanizma uzrokuju neurotoksičnost: direktno receptorsko vezanje na dopaminergičkim neuronima ili indirektna aktivacija glija stanica i poticanje ekspresije ostalih inflamatornih faktora. Direktni

mehanizam karakterističan je za TNF $\alpha$ , čijim vezanjem na TNF receptor 1 dolazi do povećane ekspresije ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) enzima (14). Opisani put djelovanja spomenutog citokina zainteresirao je brojne znanstvenike koji su nastojali pronaći mogućnosti njegove inhibicije i otkriti njegovu odgovornost u pojavi oštećenja mozga. Ferger i sur. (15) koristeći MPTP mišje modele, otkrili su kako je genetska ablacija TNF $\alpha$  povezana sa smanjenim MPTP-izazvanim striatalnim oštećenjima, bez pojave nigralne degeneracije dopaminergičkih stanica. Suprotno tome, Sriram i sur. (16) iznijeli su studiju knock-out miševa u kojoj se na temelju nedostatka gena za TNF receptora 1 i 2, pojavilo značajno striatalno oštećenje već nakon niske MPTP doze. Ipak, sva tri citokina mogu potaknuti oslobađanje inducibilne sintaze dušikova oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) iz mikroglije i astrocita, putem ekspresije i aktivacije niskoafinitetnog receptora imunoglobulina E ili CD23. Radi se o procesu koji može voditi do proizvodnje toksičnih količina slobodnih radikala dušikovog oksida (NO), što pojačava dodatno oslobađanje TNF $\alpha$  i samu upalnu reakciju.

Glijalno-ovisne inflamatorne reakcije, u većini slučajeva, u mozgu aktiviraju i CD4<sup>+</sup> T stanice u blizini dopaminergičkih neurona. Ove T stanice oslobađaju nekoliko inflamatornih faktora poput TNF $\alpha$ , interferona  $\gamma$  i Fas liganda. Fas ligand, molekula iz obitelji TNF $\alpha$ , nalazi se na površini stanica te aktivira Fas receptore i potiče apoptozu. Fas ekspresija povećana je kod pacijenata s Parkinsonovom bolesti, kao i kod MPTP izloženih miševa, a važnost Fas ligacije na astrocitima u pokretanju neurotoksičnosti, ispitana je kroz nekoliko studija (14). Najzanimljivije je istraživanje koje je dokazalo kako miševi s nedostatkom ekspresije Fas liganda pokazuju veću otpornost na MPTP u odnosu na wt miševe, a ujedno potvrdilo važnost liganda u pokretanju infiltracije CD4<sup>+</sup> T stanicama u dopaminergičkim neuronima miševa izloženih spomenutom toksinu (17). No, odnos Fas liganda i astrocita još uvijek nije u potpunosti razriješen, ali pretpostavlja se kako se zasniva na inflamatornom odgovoru kojeg potiču nekoliko citokina i kemokina, uključujući interleukin 6, interleukin 8 i CCL2/MCP1 (18).

Inflamatorni odgovori u akutnim i kroničnim neurodegenerativnim bolestima, mogu varirati u intenzitetu i signalu citokina, što objašnjava zašto inaktivacija citokina ne može uvijek prevenirati smrt dopaminergičkih stanica. Primjerice, kronična ekspresija interleukina 1 $\beta$  unutar substantie nigre inducira reakciju mikroglije, infiltraciju upalnih stanica i progresivnu dopaminergičku degeneraciju kod štakora (19), dok transgenični miševi s ekspresijom dominantno-negativne mutacije kaspaze 1, konvertirajućeg enzima interleukina 1 $\beta$ , pokazuju smanjenu osjetljivost na MPTP toksičnost (20). Iako kaspaza 1 direktno sudjeluje u kaspaza-ovisnim kaskadnim reakcijama apoptoze, pretpostavlja se kako je češći indirektni

mehanizam obrade i eksporta aktivnog interleukina  $1\beta$  koji posreduje inflamatorno-ovisnim i glija-ovisnim mehanizmima stanične smrti dopaminergičkih neurona. Koprach i sur. (21) potvrdili su prethodno opisane upalne putove, govoreći o interleukin-1 antagonistima koji su kod štakora izloženih 6-hidroksidopaminu (engl. *6-hydroxydopamine*, 6-OHDA), smanjili intenzitet pojave dopaminergičkih lezija inhibicijom ekspresije TNF $\alpha$  i interferona  $\gamma$ . Ovi inflamatorni faktori mogu se povezati s oksidativnim stresom, zbog toga što su potencijalni regulatori respiratorne mašinerije unutar makrofaga i mikroglijalnih stanica te induktori za iNOS i NADPH oksidazu (14).

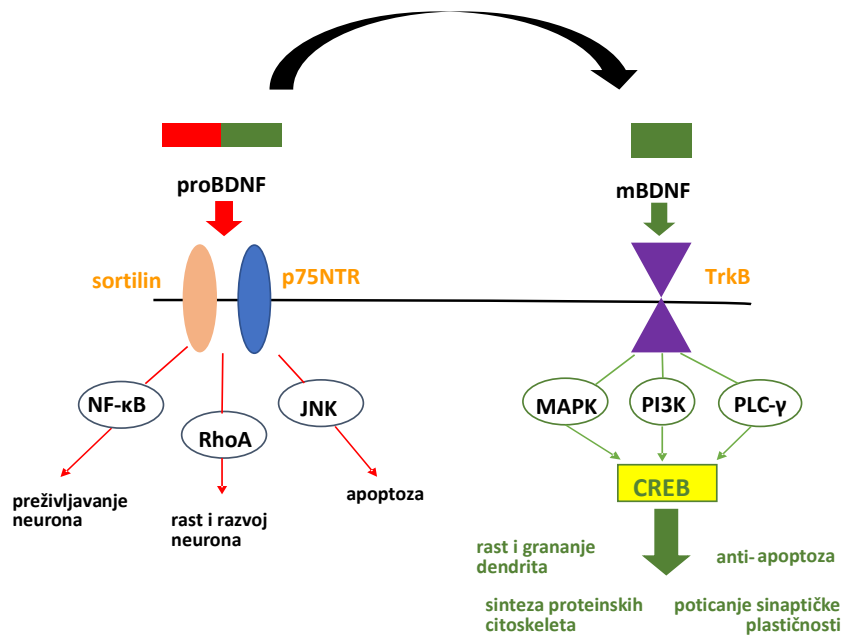
#### 1.4.4.1. ULOGA NEUROTROFINA U NEUROUPALI

Moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) pripada neurotrofinima – obitelji proteina koja promiče funkciju CNS-a. Osim što nastaju u CNS-u, neurotrofini se mogu pronaći i u nemoždanim perifernim stanicama poput T i B limfocita, monocita, vaskularnom endotelu te u stanicama glatkog i koštanog mišićnog tkiva. Izražaj BDNF-a potvrđena je u hipokampusu, frontalnom korteksu, srednjem mozgu, striatumu i *medulli oblongati*. Spomenuti protein igra važnu ulogu u razvoju živčanog sustava jer potiče diferencijaciju stanica, rast i preživljavanje neurona, neurogenezu, sinapsogenezu i sinaptičku plastičnost.

Široki spektar procesa kojeg kontrolira BDNF može se objasniti specifičnošću njegove višestupanjske sinteze; progresija kroz nekoliko intermedijarnih biološko aktivnih izoformi koje se vežu na različite vrste receptora i pokreću važne signalne putove. Općenito, pre-proBDNF prekursor nastaje u endoplazmatskom retikulumu, a razvija se u proBDNF unutar Golgijevog aparata. Izoforma proBDNF prelazi u zreli mBDNF u trans-Golgijevoj mreži, djelovanjem endoproteaza i konvertaza. Ravnoteža u količinama proBDNF i mBDNF proteina ovisi o stadiju razvoja i regiji mozga. Naime, visoke razine proBDNF uočene su u početnoj fazi razvoja mozga, dok mBDNF najviše pokazuje neuroprotektivnu aktivnost u odrasloj dobi.

Kako bi obavili svoje biološke aktivnosti, proBDNF i mBDNF vežu se na dvije vrste receptora na površinama stanica; tirozin kinaze (Trk) i p75 neurotrofinski receptor (p75NTR). mBDNF pokazuje veliki afinitet prema TrkB receptoru, dok se proBDNF u većini slučajeva veže na p75NTR i sortilin. Kompleks proBDNF/p75/sortilin vodi aktivaciji signalnih putova c-Jun-N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun-N-terminal kinase*, JNK), Ras homolognih gena obitelji A (engl. *Ras homolog gene family member A*, RhoA) i nuklearnog čimbenika kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) odgovornih za apoptozu, preživljavanje i razvoj neurona. Uslijed vezanja mBDNF, TrkB receptor prolazi kroz dimerizaciju i autofosforilaciju na ostacima tirozina (Tyr 515 i Tyr 816) njegove unutarstanične domene. Opisano vodi

aktivaciji Ras proteina i mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), PI3K kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) i fosfolipaze C- $\gamma$  (engl. *phospholipase C- $\gamma$* , PLC- $\gamma$ ), a u konačnici i CREB transkripcijskog faktora koji pokreće transkripciju gena odgovornih za regulaciju rasta i razvoja dendrita, sinapsogeneze, sinaptički-ovisnog učenja i pamćenja, apoptoze i opstanka neurona (Slika 1) (22).



**Slika 1.** Grafički prikaz vezanja proBDNF i mBDNF na receptorima p75NTR i TrkB (prilagođeno iz: Palasz i sur. (22)).

#### 1.4.4.2. NF- $\kappa$ B SIGNALNI PUT U PARKINSONOVOJ BOLESTI

Transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B predstavlja ključnog regulatora ekspresije velikog broja komponenti imunološkog sustava. To uključuje proinflamatorne citokine, kemokine, adhezijske molekule, iNOS, COX-2 kao i interleukin 2, interleukin 12 te interferon- $\gamma$  koji kontroliraju proliferaciju i diferencijaciju limfocita (23).

Kod sisavaca, NF- $\kappa$ B/ Rel obitelj čine članovi poput p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel i Rel-B proteina koji formiraju homo- ili heterodimere i zaostaju u obliku inaktivnih kompleksa, jer na njih djeluju inhibitorne molekule zvane I $\kappa$ B proteini.

Aktivacija NF- $\kappa$ B odvija se kanonskim ili nekanonskim putem i ovisi o fosforilacijom-potaknutom ubikvitiranju I $\kappa$ B proteina. Kanonski NF- $\kappa$ B put primarno potiču proinflamatorni signali poput citokina i patogena, dok nekanonski NF- $\kappa$ B put aktiviraju signalni proteini kao

što je porodica receptora faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor family of receptors*, TNFRs) i limfotoksin  $\beta$  receptor.

Najučestaliji oblik NF- $\kappa$ B, aktiviran patološkim podražajima kanonskog puta, je heterodimer p50:p65. Za početak, argininom i lizinom bogati nuklearni lokalizacijski signali ili sljedovi (engl. *nuclear localization signal*, NLS) podjedinica p65 i p50 ulaze u interakciju s importin  $\alpha/\beta$  heterodimerima. Najčešće, importin  $\alpha$  inicira vezanje NLS, dok importin  $\beta$  unosi teret u jezgru kroz jezgrine pore. Dolaskom u jezgru, RAN-GTP proteini vežu i odstranjuju importin  $\beta$  s kompleksa koji sadrži p65. Oslobođeni p65 veže specifičnu nukleotidnu sekvencu ciljanih gena i posreduje strogo kontroliranim transkripcijskim programima koji pokazuju visoki stupanj specifičnosti prema određenim tkivima. Izvoz p65 iz jezgre, odvija se proteinima eksportinima koji vežu nuklearnu izlaznu sekvencu p65 i Ran GTP. Nastali kompleks kroz jezgrine pore dolazi do citoplazme, gdje se podvrgava hidrolizi Ran GTP u Ran GDP i disocijaciji p65 (24).

Ekspresija NF- $\kappa$ B-p65 u mozgu detektirana je u neuronima substantie nigre i ostalim moždanim regijama poput hipokampusa, striatuma i cerebralnog korteksa štakora (25), ali i u hipokampusu pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti (26). Hunot i sur. (27), imunohistokemijski analizirajući tkiva ljudskog mozga PD pacijenata, lokalizirali su nuklearni NF- $\kappa$ B u melaniziranim katekolaminergičkim neuronima substantie nigre pars compacte. Postotak melaniziranih NF- $\kappa$ B pozitivnih neurona podudara se s postotkom neurona koji su ultrastrukturnom analizom ili krajnjim obilježavanjem fragmenata DNA, pokazali karakteristične znakove apoptoze, što može govoriti o povezanosti ovih dvaju otkrića. Ujedno, studija je naglasila kako je aktivacija NF- $\kappa$ B nužna za smrtni ishod, jer posvećenost neurona apoptozi postaje nepovratnom reakcijom, nakon što je došlo do translokacije NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora. Paralelno tome, što je bio duži odmak između translokacije NF- $\kappa$ B i gubitka održivosti stanica, uz klasične morfološke znakove apoptoze, time su više bili aktivirani geni koji sudjeluju u fizikalnoj degeneraciji stanica.

#### 1.4.4.3. ULOGA $\alpha$ -SINUKLEINA U PARKISONOVOJ BOLESTI

Autofagija je evolucijski očuvan katabolički proces koji posreduje degradaciji proteina i disfunkcionalnih ili suvišnih organela u eukariotskoj stanici. Uvjeti koji ju mogu inducirati su ograničeni nutrijenti, niske razine kisika te smanjena glikogenoliza, prilikom kojih dolazi do oslobađanja produkata razgradnje u citoplazmi. Time se pokreću esencijalni putovi biosinteze, a ovisno na koji način se višak ili neželjene komponente dovode do lizosoma, autofagija se dijeli na: a) makroautofagiju, b) mikroautofagiju i c) šaperon-posredovanu autofagiju (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA). CMA uključuje direktnu translokaciju rasklopljenih

polipeptida u lizosomskoj membrani koju pokreću šaperon proteini vezanjem na citosolni supstrat, čiji se ulazak u lizosom odvija preko posebnih receptora/kanala. Mikrofagija opisuje proces direktnog unosa citoplazmatskog materijala u lizosom invaginacijom lizosomske membrane. Nakon što nastali vezikul unese ciljane supstrate, slijedi brza degradacija. Suprotno prvim dvjema podjelama, za vrijeme makroautofagije određeni dijelovi citoplazme zahvaćeni su dvo-membranskim/citosolnim vezikulom ili autofagosomom. Vanjska membrana autofagosoma fuzira s membranom lizosoma i time omogućuje pristup i djelovanje hidrolaza s unutarnjih membrana autofagosoma.

U nativnoj formi,  $\alpha$ -sinuklein se sastoji od 15 aminokiselina, a razgrađuje se šaperonima posredovanom autofagijom. Šaperon protein HSP70 (engl. *heat shock protein 70*, HSP70) prepoznaje sekvencu pentapeptida ili KFERQ CMA i veže  $\alpha$ -sinuklein. Zatim, nastali kompleks (mutirani/nemutirani) putuje do proteina tipa 2A (LAMP-2A) na lizosomskoj membrani koji ga uvodi u lumen lizosoma, gdje degradaciju provode proteaze. Mutirani oblici  $\alpha$ -sinukleina, sprječavaju vlastitu CMA degradaciju, što uzrokuje toksičnu agregaciju u citoplazmi stanica i nemogućnost skladištenja katekolamina uz neuspješno oslobađanje dopamina. Radi se o snažnim inhibitorima LAMP-2A receptora koji sprječavaju vezanje CMA ciljanih molekula i uzrokuju potpuno blokiranje šaperon-posredovane autofagije. Suprotno navedenom, prekomjerna ekspresija wt oblika  $\alpha$ -sinukleina može potaknuti povećanu ekspresiju LAMP-2A receptora, a i dovesti do oligomernih formacija koje se teško degradiraju CMA putem. Iako se mutirani lako detektiraju, forforilirani, ubikvitinirani, nitrirani i oksidirani oblici teško su prepoznatljivi CMA degradaciji u odnosu na nemodificirani  $\alpha$ -sinuklein. Od ostalih modifikacija ističe se i dopamin  $\alpha$ -sinuklein ili DA- $\alpha$ -syn koji sadrži mogućnost inhibicije vlastite degradacije, kao i općenito CMA funkcije. Toksična DA- $\alpha$ -syn forma najviše nastaje unutar dopaminergičke substantie nigre, najoštećenije regije mozga PD pacijenata.

Blokiranje CMA aktivnosti mutirajućim oblicima sinukleinskog proteina, ne rezultira samo direktnom neutroksičnošću, već zaustavlja protektivno djelovanje čimbenika pojačivača miocita 2D (engl. *protein myocyte enhancer factor 2D*, MEF2D). MEF2D transkripcijski faktor, ima važnu ulogu u preživljavanju neurona, čije su povećane razine utvrđene kod PD pacijenata. Općenito, CMA degradacija regulira MEF2A aktivnost, čiji se transport kontinuirano odvija od jezgre do citosola. U citosolu spomenuti protein komunicira s HSP70, gdje se ujedno nakuplja u prekomjernim količinama u slučaju pojave  $\alpha$ -sinukleina (28).

Winslow i sur. (29) dokazali su kako povećana ekspresija  $\alpha$ -sinukleina ometa Rab1a homeostazu i sekreciju, što dovodi do inhibicije sinteze autofagosoma. Osim toga, potvrđeno je kako Rab1a izostavljena ekspresija povećava akumulaciju supstrata autofaga, dok

prekomjerna ekspresija spašava  $\alpha$ -sinukleinom potaknutu redukciju broja autofagosoma. Ujedno, studija govori kako se u normalnim, zdravim stanicama, može pronaći i transmembranski protein Atg9 unutar trans-Golgijske mreže, koji se veže s LC3-pozitivnim vezikulom. Nastala formacija, potaknuta Rab1a djelovanjem za vrijeme autofagije, redistribuirala se u autofosome, dok gubitak Rab1a i porast koncentracije  $\alpha$ -sinukleina, uzrokuju smanjenje lokalizacije Atg9 unutar LC3-pozitivnih vezikula, a time i broja autofagosomalnih prekursora-omegasoma.

## 1.5. LIJEČENJE PARKINSONOVE BOLESTI

### 1.5.1. BIOSINTEZA I METABOLIZAM DOPAMINA

Obzirom da dopamin ne prolazi krvno-moždanu barijeru, ovaj se neurotransmiter mora proizvesti u CNS-u kako bi djelovao u striatumu. Primarno se sintetizira u dopaminergičkim neuronima mozga, a male količine mogu se pronaći i u nadbubrežnoj žlijezdi.

U klasičnoj biosintezi dopamina, direktnog metaboličkog prekursora predstavlja L-dihidroksifenilalanin (engl. *L-dihydroxyphenylalanine*, levodopa; L-DOPA) koji nastaje izravno iz tirozina, neesencijalne aminokiseline, ili neizravno iz fenilalanina, esencijalne aminokiseline. Za početak, L-fenilalanin prelazi u L-tirozin djelovanjem enzima fenilalanin hidroksilaze u jetri uz prisustvo kisika, željeza i tetrahidrobiopterina kao kofaktora. Nastali jetreni tirozin prenosi se aktivnim transportom u dopaminergičke neurone mozga, gdje se pretvara u L-DOPU djelovanjem tirozin hidroksilaze. Potom, L-DOPA dekarboksilacijom prelazi u dopamin pomoću L-3,4-dihidroksifenilalanin dekarboksilaze ili DOPA-dekarboksilaze u presinaptičkom završetku. U posebnim okolnostima, dopamin se može sintetizirati i sporednim putovima, gdje L-tirozin prelazi u p-tiramin uz naknadnu hidroksilaciju enzimom CYP2D6 ili citokromom P450 2D6 koji se može pronaći unutar substantie nigre ljudskog mozga. j

Prilikom zasićenja sinapse dopaminom ili negativne povratne sprege u presinaptičkoj stanici, slijedi njegov metabolizam ili razgradnja. Dopamin podliježe oksidativnoj deaminaciji, kataliziranoj enzimom monoamin oksidazom ili MAO uz prisustvo flavin adeninskog dinukleotida kako bi nastao reaktivni aldehid 3,4-dihidroksifenilacetaldehid (engl. *3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde*, DOPAL). Potom, DOPAL prelazi u inaktivirani 3,4-dihidroksifeniletanol (engl. *3,4-dihydroxyphenylethanol*, DOPET) djelovanjem alkoholne dehidrogenaze ili u 3,4-dihidroksifenilacetatnu kiselinu (engl. *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*, DOPAC) pomoću aldehidne dehidrogenaze. Proizvedeni DOPAC degradira u biološki inaktivni metabolit, homovanilnu kiselinu, zahvaljujući enzinu katekol-O-metil transferazi

(engl. *catechol-O-methyl transferase*, COMT). Alternativnim putem, dopamin se može pomoću COMT enzima metabolizirati i u 3-metoksiacetaldehid kojeg MAO prevodi u 3-metoksi-4-hidroksiacetaldehid. Posljednji navedeni metabolit alkoholnom dehidrogenazom prelazi u homovanilnu kiselinu koja se izlučuje iz organizma mokraćom.

### 1.5.2. LEVODOPA

Glavni oslonci u današnjem liječenju Parkinsonove bolesti su pripravci na bazi levodope, namijenjeni za nadoknađivanje dopamina u osiromašenom striatumu. Ovaj dopaminski prekursor izrazito je visoke polarnosti te lako prolazi BBB. Nakon apsorpcije i prijenosa u mozak, djelovanjem DOPA dekarboksilaze, prelazi u neurotransmiter-dopamin.

Iako se smatra najučinkovitijim lijekom, levodopa ima ograničeno vrijeme djelovanja (3-5 godina) i zato ga treba što kasnije početi koristiti. Većina PD pacijenata započinje s primjenom niskih doza od 150-1000 mg/dnevno, kako bi se izbjegli štetni efekti. Odnosno, što se više povećava doza veća je toksičnost i pojava nuspojava, jer L-DOPA ima jako slabu oralnu biodostupnost. Radi toga se najčešće kombinira s drugim lijekovima poput karbidope koji inhibira perifernu DOPA karboksilazu, ne prelazi krvno-moždanu barijeru i ne ide do CNS-a. Time sprječava rano L-DOPA pretvaranje u krvi, čime 10% veća količina dođe do mozga i 10x manja doza zaostaje u probavnom sustavu i perifernim tkivima. Mogući zaostaci putuju do dopaminergičkih receptora ili prelaze u noradrenalin i adrenalin, što podražuje adrenergičke receptore simpatikusa.

Periferne nuspojave u primjeni levodope, zbog aktivacije dopaminergičkih receptora ili nastanka noradrenalina, rezultiraju u obliku mučnina, povraćanja, hipotenzije/vazodilatacija, hipertenzije/vazokonstrikcije i prolaznih aritmija, dok su glavne centralne posljedice konvulzije te halucinacije. Pri dugotrajnoj L-DOPA primjeni dolazi i do *on-off efekta*; nekontrolirani pokreti lica i udova, povremena hipo/hiperkinezija. U slučaju da su zahvaćeni i ostali dijelovi mozga, osim substantie nigre, postoji opasnost i od razvitka shizofrenije.

### 1.5.3. AGONISTI DOPAMINERGIČKIH RECEPTORA

Agonisti dopaminergičkih receptora počeli su se koristiti u liječenju Parkinsonove bolesti 1978.g. Osim što sadrže ostatke etanolamina, mogu se kategorizirati u dvije skupine: derivati ergota (npr. bromokriptin) i nederivati ergota (npr. apomorfina). Ovi lijekovi stimuliraju aktivnost dopaminergičkog sustava vezanjem za D<sub>2</sub> dopaminergičke receptore i, za razliku od levodope, ne moraju preći u dopamin. Često se prepisuju u inicijalnim terapijama mlađih PD pacijenata, što odgađa primjenu levodope i njezinih nuspojava.



Poluvijek života ovih lijekova varira među oboljelima, ovisno o vrsti prepisanog agonista. Na tržištu su dostupni u obliku tableta, flastera i injekcija, čije se doze kreću između 3-16 mg/dnevno.

Iako je terapija dopaminskim agonistima pokazala redukciju incidencije i težine distonije, motoričkih fluktuacija i diskinezije u odnosu na levodopu, zamijećeni su ozbiljni štetni učinci. Uočene nuspojave uključuju mučninu i povraćanje, suhoću usne šupljine, insomniju, konstipaciju, periferne edeme i halucinacije. Najveću pozornost privlače kompulzivno-impulzivni poremećaji ponašanja (engl. *impulse control disorder*, ICD), čiji su simptomi hiperseksualnost, kockanje, prejedanje i kompulzivna kupovina. Određena ponašanja češća su kod muškog spola, dok se ICD većinom javlja kod bivših ovisnika. Na temelju navedenoga, pretpostavlja se kako je aktivnost agonista dopaminergičkih receptora usmjerena i na mezolimbički put, orbitofrontalni korteks te opijatni i serotoninski sustav.

#### **1.5.4. MAO-B INHIBITORI**

MAO-B inhibitori su lijekovi koji djeluju na bazi inhibicije enzima, uključenih u metabolizam dopamina, što smanjuje endogene razine ovog neurotransmitera. Kao što je objašnjeno u prethodnim poglavljima, MAO-B jedan je od glavnih enzima uključenih u razgradnju dopamina, čije blokiranje rezultira povećanom dopaminergičkom aktivnosti u striatumu.

Česta primjena MAO-B inhibitora uključuje selegilin i rasagilin u dozama od 5-10 mg/dnevno i 0,5-1 mg/dnevno. Navedeni lijekovi pokazuju dobru podnošljivost, uz gastrointestinalne smetnje kao najčešće nuspojave. Ostale zabilježene posljedice su depresija, insomnija, vrtoglavica, konfuzija, halucinacije, simptomi slični gripi i glavobolje.

#### **1.5.5. ANTIKOLINERGICI**

Danas postoji mali broj lijekova u terapiji Parkinsonove bolesti koji ne djeluju preko dopaminergičkog mehanizma. Glavni primjeri su antikolinergici koji reduciraju aktivnost neurotransmitera acetilkolina, djelujući poput antagonista kolinergičkih receptora. Iako je njihova uloga ograničena, pokazali su prednosti u poboljšanju rigiditeta i tremora PD pacijenata, a najčešće se primjenjuje biperidin u kombinaciji s levodopom ili ostalim prethodno spomenutim lijekovima.

Primjena antikolinergika izbjegava se kod starijih pacijenata ili osoba s kognitivnim problema, jer povećavaju rizik od konfuzija. U ostale nuspojave ubrajaju se: suhoća očiju, midrijaza, glaukoma, konstipacija, retencija urina, halucinacije, vrtoglavica.

### 1.5.6. AMANTADIN

Amantadin je antivirusni lijek koji se može koristiti za liječenje blage Parkinsonove bolesti. Može se kombinirati s levodopom, a sličnog je djelovanja kao kokain; oslobađa dopamin iz živaca.

Još uvijek nije u potpunosti otkriven anti-Parkinson učinak amantadina, ali može ga se smatrati slabim glutamat antagonistom N-metil-D-aspartatnog receptora (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR). Kao i ostali lijekovi, primjenjuje se u niskim dozama i to u obliku tableta i tekućeg sirupa. Potencijalne nuspojave su povezane s halucinacijama, konfuzijama, poteškoćama u vidu, mučninom i povraćanjem, znojenjem, gubitkom apetita, oteknućem nogu te glavoboljama (30).

### 1.5.7. POTENCIJALNO TERAPIJSKO DJELOVANJE ANTIOKSIDANASA U BORBI PROTIV PARKINSONOVE BOLESTI

Antioksidansi su kemijske komponente koje inhibiraju oksidaciju, a klasificiraju se u nekoliko skupina poput vitamina, bioflavonoida, karotenoida i hidroksicinamata. Osnovno djelovanje temelji im se na neutralizaciji oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima putem direktnih reakcija ROS čišćenja i indirektnom inhibicijom ROS proizvodnje ili poboljšanjem obrambene funkcije intrinzičnih enzima u borbi protiv ROS elemenata.

Vitamini A, C i E smatraju se direktnim antioksidansima i najuspješnijim čistačima slobodnih radikala u biološkim sustavima. Navode se i kao vitalni antioksidansi koji zaustavljaju oksidaciju LDL kolesterola. Druge vrste direktnih antioksidanasa su karotenoidi (organski pigmenti uključeni u obojenje biljaka i algi) koji reagiraju sa slobodnim radikalima i singletnim kisikom preko polienske okosnice ili C=C veze te hidroksicinamati koji doprinose LDL zaštiti. Primjeri indirektnih antioksidanasa odnose se na polifenole ili derivate polifenola, kao npr. katehini, resveratrol, flavonoidi i izoflavon, koji neposredno reduciraju ROS *in vivo* pomoću aktivacije redoks osjetljivog Keap1-Nrf2-ARE regulatornog puta (31).

Provedene studije dokazale su kako je liječenje prehranbenim antioksidansima rezultiralo poboljšanom mitohondrijskom i neuronskom funkcijom u *in vitro* PD modelima. Primjerice, za baikalein (32), veliki bioaktivni flavon, uočeno je smanjenje tremora mišića i povećani broj tirozin hidroksilaze neurona u rotenonom-induciranom parkinsonu štakora. Učinkovitim antioksidansom smatra se i hesperidin (33), koji je pokazao neuroprotektivni efekt u rotenonom-induciranoj neuroblastomi staničnih PD modela. Osim što je doprinijeo funkciji mitohondrija, ovaj citrusni flavonol poboljšao je neuronske i bihevioralne parametre u 6-OHDA potaknutim PD mišjim modelima. Nekoliko ljudskih kohortnih istraživanja iznijelo je

povezanost primjene antioksidanasa u prehrani s reduciranjem rizika i simptoma Parkinsonove bolesti.

Specifično, kod 85 000 pacijenata dokazan je sinergistički efekt vitamina E i  $\beta$ -karotena u smanjenju rizika od oboljenja (34), dok je kreatin istaknut u odgađanju pojave kognitivnih poremećaja kod PD pacijenata (35). Suprotno tome, meta-analiza nekolicine studija koje su proučavale povezanost antioksidanasa (vitamina A i karotenoida) i PD progresije, nije pokazala statistički značajnu razliku (36,37).

#### 1.5.7.1. NEUROPROTEKTIVNOST CRNOPLODNE ARONIJE

*Aronia melanocarpa* ili crnoplodna aronija, pripada porodici *Rosaceae*, a podrijetlom je iz Sjeverne Amerike. Osim što je poznata po visokoj antioksidativnoj aktivnosti, ističe se po hepatoprotektivnom i protuupalnom djelovanju te snažnim bakteriostatskim i antivirusnim svojstvima. Riječ je biljci, čiji su crni plodovi bogati polifenolima, a pogotovo antocijaninima za koje je dokazana antimutagena i imunomodulacijska aktivnost u staničnim kulturama (limfociti čovjeka) i kod pacijenata oboljelih od karcinoma dojke; supresijska aktivnost u rastu HT-29 tumorskih stanica debelog crijeva; inhibicija formacije N-nitrozamina u štakorima te toksičnosti i akumulacije kadmija u jetri i bubrezima (38).

Antocijanini prolaze krvno-moždanu barijeru i nastanjuju široki pojas moždanih regija, uključujući korteks, cerebelum, hipokampus i striatum (39,40). Glavna im je komponenta cianidin-3-O-glukozid koji je povezan sa smanjenjem rizika od poremećaja rada mozga (41). Neuroprotektivno djelovanja antocijanina temelji se na supresiji neuroinflamacija i oksidativnog stresa te zaštiti neurona od stanične toksičnosti potaknute MPTP i 6-OHDA toksinima (42).

## 1.6. PRETKLINIČKI MODELI PARKINSONOVE BOLESTI

### 1.6.1. *IN VIVO* MODELI PARKINSONOVE BOLESTI

Različiti animalni modeli korištene su u proučavanju Parkinsonove bolesti, a svrstavaju se u četiri kategorije: glodavci, primati, ostali sisavci i ostale grupe. U ostalim sisavcima korištena je patuljasta svinja, pas i mačka, dok su ostale grupe činili organizmi poput oblića *Caenorhabditis elegans*, muhe roda *Drosophila* te tropske slatkovodne ribice *Danio rerio*. Ipak, najčešće korišteni animalni modeli su glodavci koji nemaju zahtjevne uvjete uzgoja, a odlikuju se malim veličinama i anatomijom najbližijoj čovjekovoj (43).

#### 1.6.1.1. 6-HIDROKSIDOPAMIN

Korištenje 6-OHDA kao eksperimentalnog dopaminergičkog neurotoksina je najstariji i najučestaliji PD model. Zahvaljujući ovom modelu, dobiveni su brojni podaci o

bihevioralnim, biokemijskim i fiziološkim efektima iscrpljivanja dopamina i gubitka nigralnih dopaminergičkih stanica u mozgu. Struktura 6-OHDA izrazito je slična dopaminu, čija prisutnost dodatne hidroksilne skupine čini ovu molekulu toksičnom za dopaminergičke neurone. 6-OHDA ima sposobnost ulaska u katekolaminergičke neurone preko dopaminskih receptora, gdje uzrokuje autooksidaciju i leziju stanica putem oksidativnog stresa. Spomenuti toksin ne prolazi BBB te se radi toga unosi u organizam sisavaca unilateralnim injektiranjem u medijalni snop prednjeg mozga (44).

Poznata su tri mehanizma koja objašnjavaju citotoksičnost spomenutog spoja: 1) intra- ili ekstracelularna autoksidacija 6-OHDA koja potiče proizvodnju vodikovog peroksida, superoksidnih i hidroksilnih radikala, 2) stvaranje vodikovog peroksida zbog MAO djelovanja, te 3) direktna inhibicija kompleksa I mitohondrijskog respiratornog lanca. Kako bi se pokrenulo stvaranje ROS, navedeni mehanizmi mogu djelovati pojedinačno ili kombinirano što rezultira oksidativnim stresom i apoptozom stanica.

SNpc dopaminergički neuroni izrazito su osjetljivi na oksidativni stres kojeg uzrokuje 6-OHDA, jer sadrže niske razine glutation peroksidaze ili enzima koji konvertira vodikov peroksid u vodu i smanjuje ROS oštećenja. Paralelno tome, dopamin lako podliježe autoksidaciji i prelazi u neuromelanin koji potiče nastanak hidroksilnih radikala ( $\text{OH}^\cdot$ ). Neuromelanin u većini slučajeva veže željezo čije visoke koncentracije akumuliraju i remete odstranjivanje  $\text{OH}^\cdot$  u dopaminergičkim neuronima. Ipak, nisu svi dopaminergički neuroni osjetljivi na 6-OHDA toksičnost; SNpc sadrži subpopulaciju dopaminergičkih neurona koji vrše ekspresiju dvaju proteina, kalretinina i kalbindina, koji reduciraju akumulaciju intracelularnog kalcija, što smanjuje ekscitotoksičnost glutamata i toksične efekte 6-OHDA. Precizan broj neurona spomenute subpopulacije još uvijek nije u potpunosti poznat, ali pretpostavlja se kako čini 10% dopaminergičkih neurona substantie nigre pars compacte (45).

#### *1.6.1.2. 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDIN*

Veliki broj ljudi tijekom 1953.g., razvilo je tipične znakove Parkinsonove bolesti nakon uzimanja opioida, kontaminiranog MPTP spojem. Ovakvo važno otkriće vodilo je do teorije kako MPTP selektivno oštećuje dopaminergičke SNpc neurone, što je zauzvrat potvrdilo hipotezu kako i okolišni toksini mogu povećati rizik za PD. Na temelju brojnih provedenih studija, utvrđeno je da putem ovog modela, dolazi do pojave Lewy tjelešca u mozgu oboljelih životinja. Za razliku od 6-OHDA, MPTP prolazi krvno-moždanu barijeru i metabolizira u aktivnu formu  $\text{MPP}^+$  koja se pohranjuje u neuronima preko dopaminskih receptora i ometa lanac prijenosa elektrona u mitohondrijima, što uzrokuje gubitak energije.

Motorni deficiti detektirani su bihevioralnim testovima nakon administracija MPTP toksina, ali isključivo kod kroničnog injektiranja.

#### 1.6.1.3. *PARAKVAT*

Parakvat je poljoprivredni herbicid koji strukturalno odgovara MPP<sup>+</sup> metabolitu. Pretpostavlja se kako utječe na redoks ciklus u mitohondrijima i potiče stvaranje oksidativnog stresa, što može uzrokovati ozbiljna oštećenja proteina, lipida, DNA i RNA. Nigrostrijatalno oštećenje nakon parakvat injektiranja, ovisno je o primijenjenoj dozi kod miševa, čiji motorni deficiti nisu još u potpunosti detektirani nakon administracije.

#### 1.6.1.4. *ROTENON*

Rotenon je neurotoksično sredstvo koje se koristi kao herbicid i pesticid, a može se prirodno pronaći u tropskim biljkama. Izrazito je visoke polarnosti, što znači kako može proći BBB. Nakon intravenskog unosa, rotenon potiče dopaminergička neuronska oštećenja, Lewy patologiju i agregaciju  $\alpha$ -sinukleina. Osim što remeti stvaranje dopamina, dokazano je kako ovaj PD model utječe i na serotoninski, noradrenergički i kolinergički sustav (46).

### 1.6.2. *IN VITRO* MODELI PARKINSONOVE BOLESTI

#### 1.6.2.1. *H4, HEK293, SH-SY5Y, PC12 I LUHMES STANIČNE LINIJE*

Nekoliko sustava kultura stanica razvijeno je kako bi se proučavala patogeneza Parkinsonove bolesti ili utvrdila učinkovitost i nuspojave pojedinih lijekova. Tradicionalne *in vitro* stanične kulture najčešće se baziraju na staničnim linijama kao što su ljudske embrionalne bubrežne stanice 293 (HEK293), H4 stanice ljudskog neuroglioma ili PC12 stanice feokromocitoma izvedene iz srži nadbubrežne žlijezde (47). Osim toga, često se koristi i stanična linija neuroblastoma SH-SY5Y jer reproducira dopaminergički fenotip PD patologije (48). Nedavna studija dokazala je prisutnost formacija nalik Lewy tjelešcima u SH-SY5Y staničnim kulturama, izloženim rekombinantnom ljudskom  $\alpha$ -sinukleinu (49). Ipak, važno ograničenje upotrebe SH-SY5Y stanica leži na nedovoljno standardiziranom protokolu uzgoja kulture koji može uzrokovati različitost u rastu stanica i nedosljedne eksperimentalne rezultate (50). Za razliku od SH-SY5Y, ljudske mezencefalne stanice ili LUHMES omogućavaju fiziološki relevantan sustav namijenjen kulturi velikih razmjera. LUHMES stanice izvedene su iz zdravog 8-tjedana starog ljudskog embrionalnog mezencefalnog tkiva, uz umetanje v-myc transgena koji je pod kontrolom promotora za reakciju na tetraciklin. Prednost im se temelji na mogućoj diferencijaciji u zrele dopaminergičke neurone pomoću dodavanja cikličkog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), tetraciklina i neurotrofičnog faktora izvedenog iz gljiva stanica u medij kulture (51).

LUHMES stanične linije često su korištene za izradu 3D model neurotoksičnosti u studijama, gdje su posebnim tehnikama miješanja potaknute na stvaranje astrocita, neurona, oligodendrocita i mikroglije. Prednosti LUHMES stanične kulture su sljedeće: 1) sposobnost LUHMES stanica da osiguraju fenotip koji je biokemijski i morfološki sličan primarnim neuronima, 2) brzo sazrijevanje sustava u astrocite, neurone i oligodendrocite podvrgnute mijelinizaciji i sinapsogenezi u roku od 25 dana, te 3) preživljavanje LUHMES staničnih kultura i do 2 mjeseca, uz neprekinuto sazrijevanje (52).

#### 1.6.2.2. PRIMARNE KULTURE NEURONA

Primarne kulture neurona imaju potencijal nadvladati mnogim poteškoćama svojstvenim za stanične linije, dok su izolacija i uzgoj primarnih dopaminergičkih neurona iz post-mortem mozgov odraslih ili starijih PD pacijenata iznimno zahtjevni. Radi toga, primarni dopaminergički neuroni obično se dobivaju iz embrionalnog moždanog tkiva srednjeg mozga jer stanice tog područja brzo podliježu rastu kulture i formaciji aksona i sinapsi (53). U ovakvom sustavu, primarni neuroni često su kontaminirani glija stanicama, što može biti prednost jer te stanice ponekad oslobađaju faktore u zajedničku okolinu o kojima ovisi funkcija i preživljavanje neurona (54).

#### 1.6.2.3. MATIČNE STANICE

Matične stanice, posebice pluripotentne matične stanice i neurološke matične/progenitorne stanice, predstavljaju važan izvor stanica zbog njihove dostupnosti, neograničene proliferacije, plastičnosti i diferencijacije u druge tipove stanica. Osnovna karakteristika matičnih stanica je sposobnost vlastitog obnavljanja kroz mitotičku diobu stanica i diferencijaciju u specifične stanične vrste. Prva vrsta su totipotentne matične stanice iz kojih može nastati čitavi organizam, uključujući stanice placente, zigotu i stanice u vrlo ranom stadiju oplodnje. Drugu vrstu čine pluripotentne matične stanice koje imaju kapacitet razvoju u specifične stanice triju zametnih listića (ektoderm, mezoderm, endoderm), a njima se smatraju embrionalne matične stanice (engl. *embryonic stem cells*, ESCs), dobivene iz unutarne stanične mase blastocite. ESCs, zbog svojih svojstava, mogu predstavljati optimalan izvor dopaminergičkih neurona za stanične terapije, a da bi ih se moglo iskoristiti, potrebno je upotrijebiti različite metode uzgoja kokultura stromalnih stanica, faktore rasta, sekrecijske i transkripcijske čimbenike te morfogene. Treća vrsta matičnih stanica odnosi se na multipotentne matične stanice iz kojih nastaju samo određene loze stanica poput neuralnih matičnih stanica (engl. *neural stem cells*, NSCs) izvedenih iz neurološkog tkiva. NSCs mogu diferencirati u specifične neuralne prekursorne ili progenitorne stanice iz kojih mogu nastati svi

tipovi stanica (neuroni, astrociti, oligodendrociti) živčanog sustava koje mogu poslužiti kao PD model (55).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavna hipoteza ovoga istraživanja bila je da pretretman astrocita medijem za uzgoj stanica u kojem je otopljen ekstrakt crnoplodne aronije utječe na preživljenje stanica izloženih djelovanju toksina 6-OHDA.

Specifični su ciljevi istraživanja bili:

1. ispitati kako tretman različitim koncentracijama aronije utječe na preživljenje astrocita,
2. odrediti uzrokuje li toksin 6-OHDA ozljedu astrocita,
3. odrediti utječe li predaplikacija ekstrakta aronije na preživljenje astrocita izloženih 6-OHDA, te
4. odrediti učinke 6-OHDA i aplikacije ekstrakta aronije na razine izražaja proteina toplinskog šoka HSP70, neurotrofičnog čimbenika BDNF-a te proteina iNOS.



### 3. MATERIJALI I POSTUPCI

#### 3.1. PRIMARNI MIŠJI ASTROCITI

Kako bi se proveli *in vitro* eksperimenti, obavljene su tri izolacije astrocita iz muških i ženskih mladunaca (0-2 dana) miševa soja C57BL/6. Izolirani mišji korteksi odvojeni su od meninga i bijele tvari, a nakon usitnjavanja, prebačeni su u sterilnu epruvetu volumena od 50 mL s prozirnim medijem za rast stanica (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM). Zatim, korteksi su homogenizirani automatskom pipetom i propušteni kroz sterilne filtere promjera 230 i 140  $\mu\text{m}$ . Pročišćena suspenzija stanica podvrgnuta je centrifugiranju (12 000 rpm) u trajanju od 5 min, a izdvojeni supernatant resuspendiran je s kompletiranim medijem za stanice (DMEM, 10% FBS, 1% antibiotik/antimikotik). Nastala suspenzija propuštena je kroz filter promjera 73  $\mu\text{m}$ , a broj stanica/mL medija određen je pomoću Trypan blue boje i Neubauerove komorice. U 75 cm<sup>2</sup> tikvicama (T75), na temelju izračuna, nasadene su stanice koje su inkubirane u uvjetima 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i relativne vlažnosti od 95%.

#### 2.2. UZORAK ARONIJE

Za analize je korišten 100%-tni aronijin prah proizvođača *Bobica d.o.o.*, Novska, Hrvatska. Voćni prah dobiven je usitnjavanjem kore i sjemenaka aronije, čija je nutritivna deklaracija i vrijednost ukupnih fenolnih spojeva te antioksidativnog kapaciteta prikazana u tablici 1. i 2.

**Tablica 1.** Nutritivna deklaracija korištenog aronijinog praha.

<b>PROSJEČNA HRANJIVA VRIJEDNOST U 100g</b>	
ENERGETSKA VRIJEDNOST	1672 kJ/394 kcal
MASTI	<0,5 g
ZASIĆENE MASNE KISELINE	<0,1 g
UGLJIKOHIDRATI	85 g
ŠEĆERI	5,1 g
PROTEINI	6,9 g
SOL	0,04g

**Tablica 2.** Prikaz vrijednosti ukupnih fenola, neflavonoida, flavonoida, antocijanina i antioksidativnog kapaciteta uzorka P3 (preuzeto iz: Tolić et al. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. 2015).

UZORAK	UF	UN	UFL	UA	UAK
P3	4951±230	1634±67	3317±240	1576±74	105.68±5.58
rezultati prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; UF- ukupni fenoli u mg GAE/L; UN- ukupni neflavonoidi u mg GAE/L; UFL-ukupni flavonoidi u mg GAE/L; UA- ukupni antocijanini u mg CGE/L; UAK- ukupni antioksidativni kapacitet u mmol TE/100g s.t.					

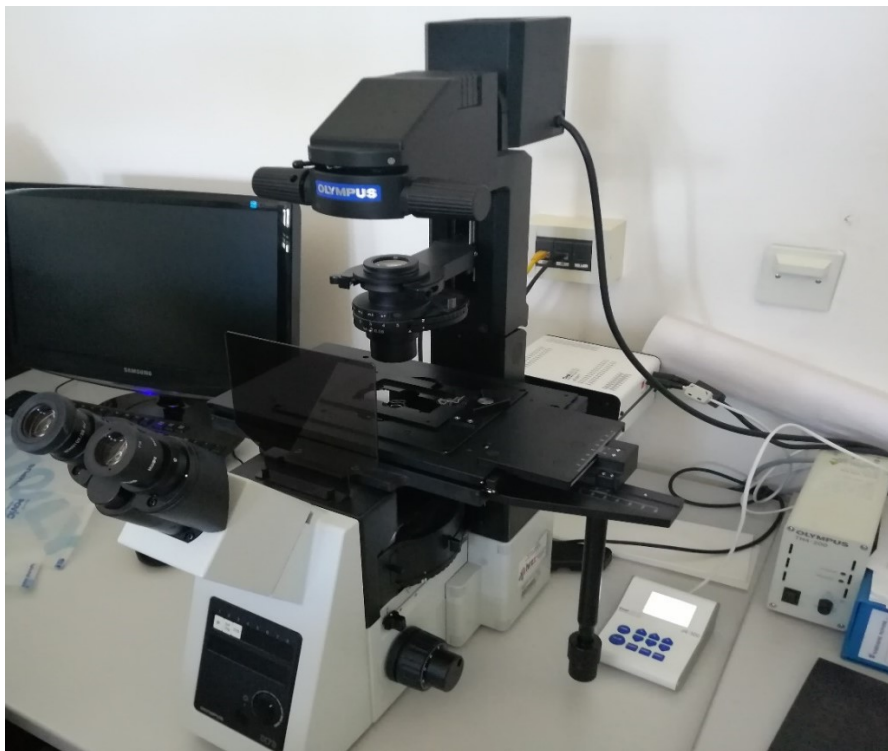
### 2.3. KEMIKALIJE

- 1) 6-hidroksidopamin (6-OHDA), Sigma-Aldrich, Njemačka
- 2) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PAN-Biotech, Njemačka
- 3) serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS), PAN-Biotech, Njemačka
- 4) goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA), PAN-Biotech, Njemačka
- 5) otopina antibiotika i antimikotika, Sigma-Aldrich, SAD
- 6) CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (LDH kit), Promega Corporation, SAD
- 6) SuperSignal™ West Pico PLUS (kemoluminiscentni kit), Thermo Fisher Scientific, SAD

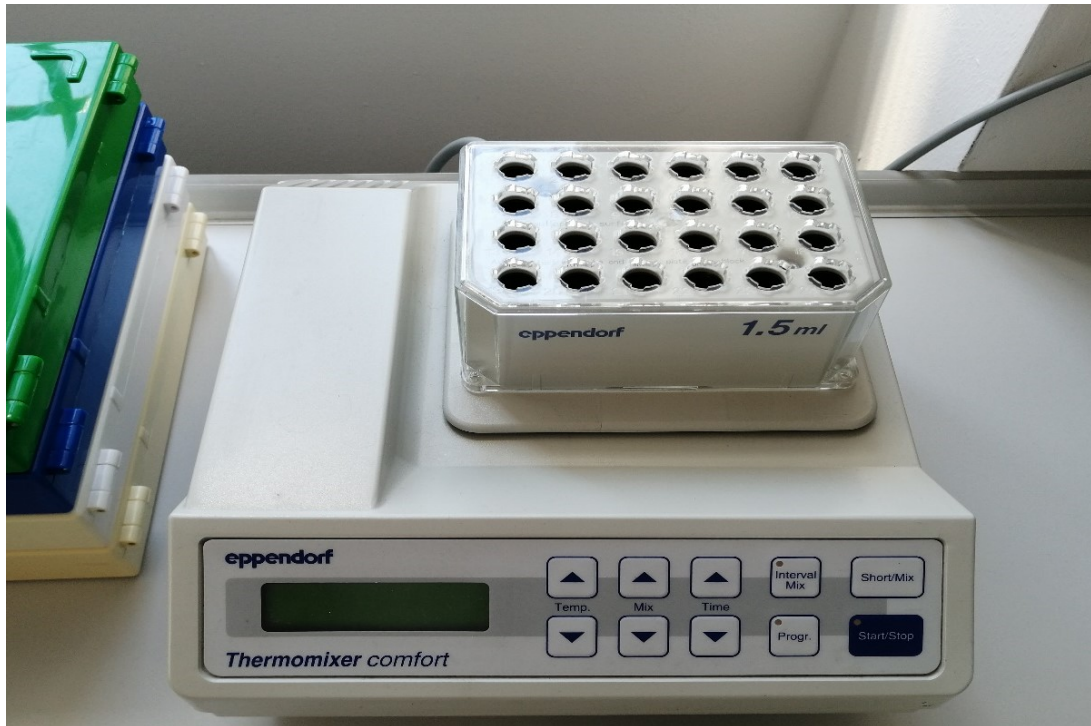
## 2.4. INSTRUMENTI



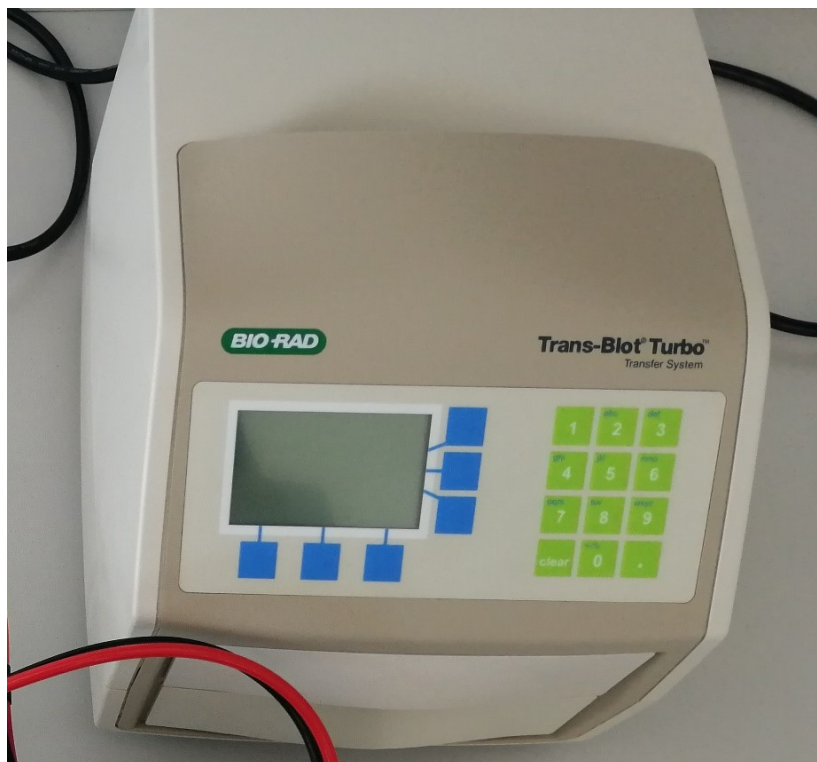
**Slika 1.** METTLER TOLEDO® Analitička vaga AB204, Hrvatska (Fotografija: Ela Mijatović).



**Slika 2.** Olympus® IX73P1F Inverted Microscope, Japan (Fotografija: Ela Mijatović).



**Slika 3.** Eppendorf® Thermomixer Comfort, Njemačka (Fotografija: Ela Mijatović).



**Slika 4.** Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, SAD (Fotografija: Ela Mijatović).

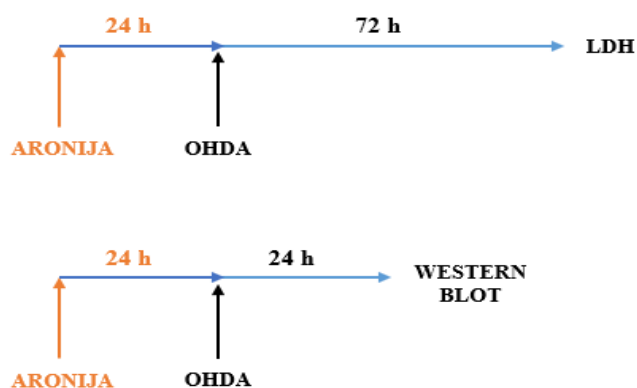


**Slika 5.** Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad Laboratories, SAD (Fotografija: Ela Mijatović).

## 2.5. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Ishodna pripremljena otopina aronijinog praša ( $c_0 = 2 \text{ mg/mL}$ ) razrijeđena je na koncentracije od 100, 50 i 10  $\mu\text{g/mL}$  pomoću DMEM medija (ARO 100, ARO 50 i ARO 10). Uz to, pripremljen je uzorak toksina, OHDA, u koncentraciji od 120  $\mu\text{M}$ .

Učinak pripremljenih uzoraka aronije različitih koncentracija istražen je pretretmanom astrocita otopinama aronijinog praša navedenih koncentracija u trajanju od 24 h, nakon čega su neke od stanica bile izložene utjecaju OHDA tijekom 72 h (za analize aktivnosti LDH) ili 24 h (za analize izražaja proteina od interesa (Slika 6.).

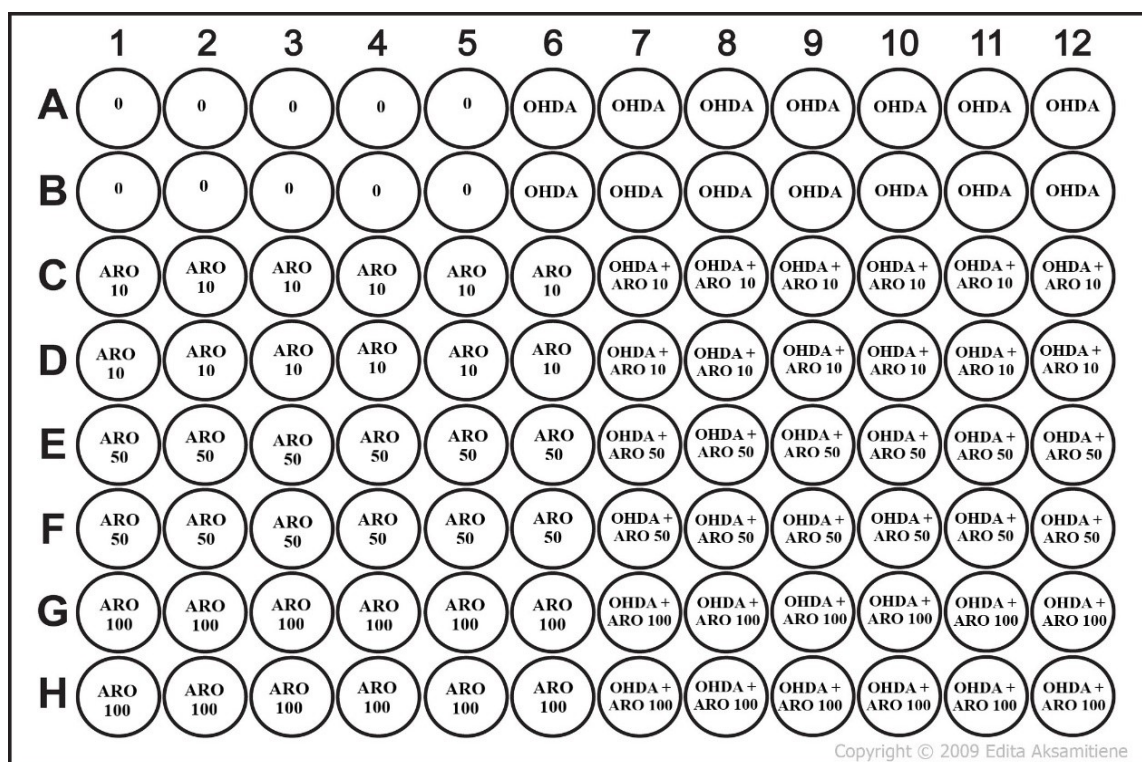


**Slika 6.** Vremenski prikazi pretretmana aronijom i tretmana s 6-hidroksidopaminom.

### 2.5.1. MJERENJE AKTIVNOSTI LAKTATNE DEHIDROGENAZE

Kolorimetrijskim testom je određivana razina aktivnosti laktatne dehidrogenazu (engl. *lactate dehydrogenase*, LDH) koja se oslobodi tijekom lize stanica. Riječ je o stabilnom citosolnom enzimu čije se djelovanjem zasniva na poticanju reakcija oksidacije laktata u piruvat i redukcije  $\text{NAD}^+$  u NADH. Odnosno, oslobođeni LDH uzrokuje konverziju tetrazolijeve soli ljubičaste boje (engl. *iodonitrotetrazolium violet*, INT) u crveni spoj-formazin. Intenzitet nastalog crvenog obojenja, proporcionalan je količini liziranih stanica.

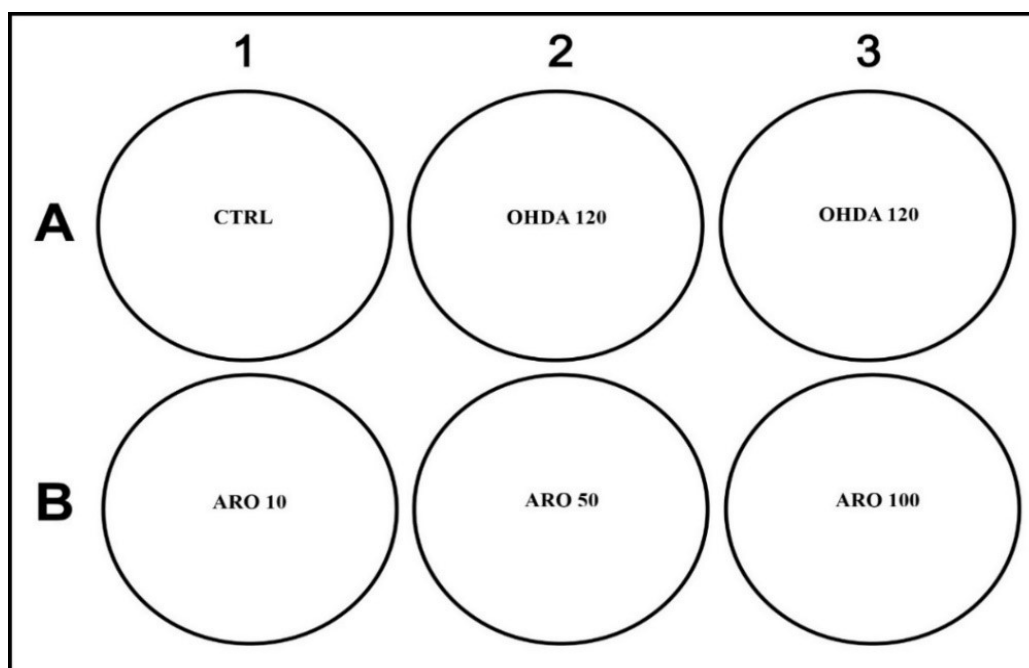
Na temelju prikazane sheme (Slika 7.), u prvih 24 h proveden je tretman stanica nasađenih na ploče s 96 jažica pripremljenim uzorcima ARO 10, ARO 50 i ARO 100. Zatim, uklanjanjem i zamjenom aronijinih smjesa medijem, u za to predviđene jažice, dodano je 100  $\mu\text{L}$  OHDA. Nakon 72 h, izdvojeno je 50  $\mu\text{L}$  medija za uzgoj stanica koji je prebačen na mikrotitarske ploče, a dodatkom supstrata LDH kita spektrofotometrijski detektirana je LDH aktivnost na 490 nm.



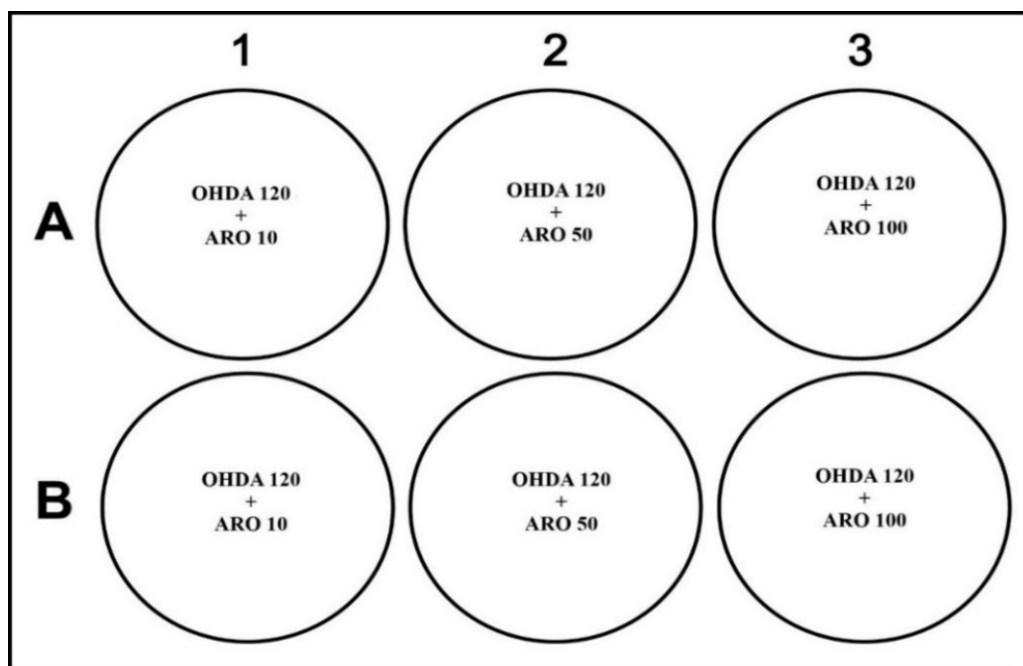
Slika 7. Shematski prikaz pokusa za laktat dehidrogenazu na 96-well ploči.

### 2.5.2. PRIPREMA UZORAKA ZA WESTERN BLOT ANALIZU

Uzorci za Western blot analizu pripremljeni su prema shemama (Slika 8., 9.) u duplikatima na pločama s 6 jažica. Astrociti su pretretirani tijekom 24 h s različitim koncentracijama otopine aronijinog praha, a potom izloženi djelovanju OHDA tijekom 24 h. Po završetku pokusa, odstranjen je medij te na stanice dodano 100  $\mu$ L RIPA pufera (engl. *radioimmunoprecipitation assay*, RIPA), a astrociti su potom sastrugani sa stijenki jažica. Nakon 20 min na ledu uz povremeno miješanje, stanični lizati su prikupljeni te centrifugirani na 14000 rpm na 4°C u trajanju od 10 min. Izdvojeni supernatanti skladišteni su na -80°C, a koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (56).



**Slika 8.** Shematski prikaz pripreme prve vrste uzoraka za western blot analizu na 6-well ploči.



**Slika 9.** Shematski prikaz pripreme druge vrste uzoraka za western blot analizu na 6-well ploči.

### 3.5.2.1. WESTERN BLOT ANALIZE

Proteini u koncentraciji od  $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  dodani su na 10%-tni poliakrilamidni gel. Zatim, pokrenuta je elektroforeza na 200 V tijekom 40 min te obavljen prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu pomoću odgovarajućeg sustava za transfer (Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon blokiranja s 5%-tnim mlijekom u Tris-puferiranom fiziološkom otopinom s 0,1%-tnim Tween 20 (TBST) tijekom 1 h, membrane su inkubirane preko noći na  $4^\circ\text{C}$  s primarnim protutijelima: BDNF (1:500; Abcam, Cambridge, UK), GAPDH (1:2000, Proteintech, Rosemont, Illinois, SAD), HSP70 (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), iNOS (1:1000; Abcam, Cambridge, UK). Potom, membrane su ispirane s TBST u trajanju od 30 min i tretirane sa sekundarnim protutijelima konjugiranim s biotinom: biotinizirano kozje anti-zečje IgG (H+L), (1:2000; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), biotinizirano kozje anti-mišje, (1:3000; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon inkubacije od 1h, membrane su ponovno ispirane s TBST puferom te inkubirane s konjugatom streptavidina i peroksidaze hrena (HRP) tijekom 30 min (1:10000). Vizualizacija proteina učinjena je pomoću kemoluminiscentnog kita i uređaja Kodak Image Station 440 uz korištenje Kodak 1D programa za analizu (v.3.6.5, Kodak Scientific Imaging Systems, SAD).



## 2.6. EKSPERIMENTALNE GRUPE

1. CTRL: kontrolna skupina ili netretirani astrociti,
2. ARO 10: astrociti pretretirani s aronijom u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$ ,
3. ARO 50: astrociti pretretirani s aronijom u koncentraciji od 50  $\mu\text{g/mL}$ ,
4. ARO 100: astrociti pretretirani s aronijom u koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$ ,
5. OHDA: astrociti tretirani s 6-OHDA tijekom 72h ili 24h,
6. OHDA + ARO 10: astrociti pretretirani s ARO 10 te s OHDA tijekom 72h ili 24h,
7. OHDA + ARO 50: astrociti pretretirani s ARO 50 te s OHDA tijekom 72h ili 24h,
8. OHDA + ARO 100: astrociti pretretirani s ARO 100 te s OHDA tijekom 72h ili 24h.

## 2.7. PRIKUPLJANJE PODATAKA I STATISTIČKE ANALIZE

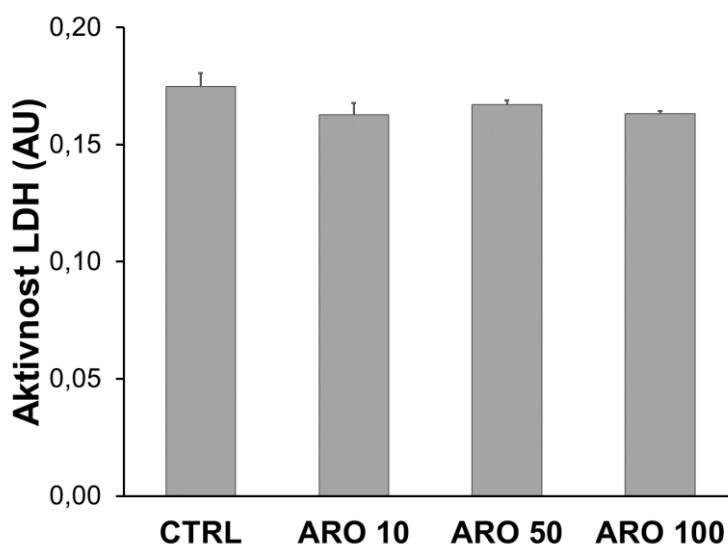
Za pohranu podataka te izradu grafičkih prikaza korišten je program Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Vrijednosti koje su dobivene izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, student T-test analiza ili jednosmjerna (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple Range *post-hoc* testom. Razina od  $P < 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. ARONIJA U KONCENTRACIJI OD 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SMANJUJE RAZINE AKTIVNOSTI LDH U ASTROCITIMA IZLOŽENIM NEUROTOKSINU 6-OHDA

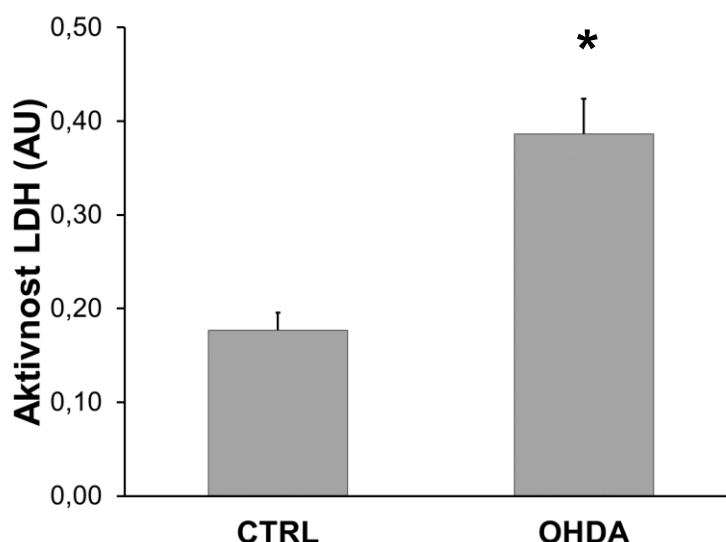
Mjerenjem aktivnosti unutarstaničnog enzima LDH pratila se razina ozljede astrocita. Enzim LDH se otpušta iz citoplazme u izvanstanični prostor kao odgovor na ozljedu stanica. Zbog svoje stabilnosti, mjerenjem količine otpuštenog enzima LDH omogućuje se brza i pouzdana kvantifikacija preživljavanja stanica u kulturi.

Na temelju dobivenih rezultata LDH testa, uočeno je kako pretretman aronijom u različitim koncentracijama otopina, nije utjecao na razine aktivnosti LDH (Slika 10.) [ANOVA:  $F(3;8)=2,065$ ;  $P=0,183$ ].

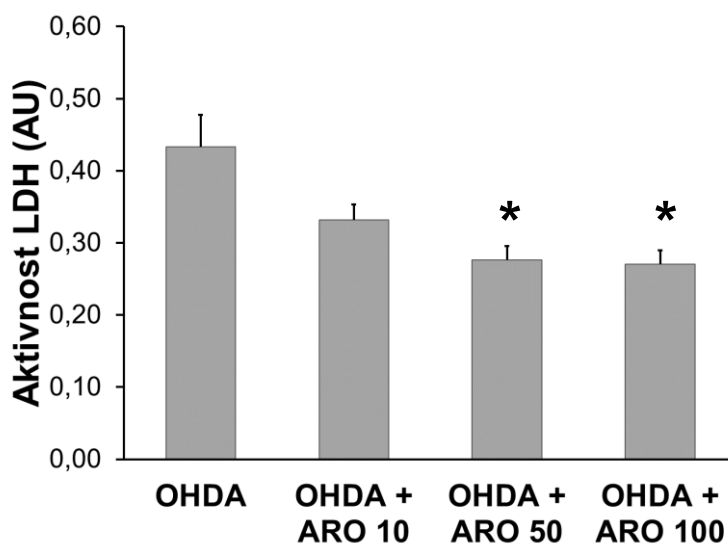


**Slika 10. Ekstrakt aronije ne utječe na razine aktivnosti laktatne dehidrogenaze (LDH) u astrocitima.** Stupčasti grafik prikazuje razine aktivnosti LDH u astrocitima tretiranim tijekom 24 h različitim koncentracijama otopljenog ekstrakta aronije. Razine aktivnosti LDH su mjerene 72 h nakon završetka pretretmana, a učinjene su u triplicatima iz 3 različita biološka replikata. CTRL, kontrolna skupina netretiranih astrocita, ARO 10, pretretman aronijom u koncentraciji od 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ARO 50, pretretman aronijom u koncentraciji od 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ARO 100, pretretman aronijom u koncentraciji od 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Nadalje, određeno je kako tretman astrocita s 6-OHDA u koncentraciji od 120  $\mu\text{M}$  utječe na aktivnosti LDH u odnosu na kontrolne stanice (Slika 11.) [t-test:  $P=0,008$ ].



**Slika 11. Primjena 6-hidroksidopamina (OHDA) povećava razinu aktivnosti laktatne dehidrogenaze (LDH).** Stupčasti grafikon prikazuje razine aktivnosti LDH u astrocitima tretiranim s OHDA tijekom 72 h. Mjerenja su učinjena su u triplikatima iz 3 različita biološka replikata. CTRL, kontrolna skupina netretiranih astrocita, OHDA, tretman s toksinom 6-OHDA. \* $P < 0,05$ ; statistički značajna razlika u odnosu na CTRL skupinu.



**Slika 12. Aronija u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  smanjuje razine aktivnosti laktatne dehidrogenaze (LDH) u astrocitima izloženim neurotoksinu 6-hidroksidopaminu (OHDA).** Stupčasti grafikon prikazuje razine aktivnosti LDH u različitim tretmanima astrocita gdje su: ARO 10, pretretman aronijom u koncentraciji od 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ARO 50, pretretman aronijom u koncentraciji od 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ARO 100, pretretman aronijom u koncentraciji od 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Razine LDH mjerene su u mediju za uzgoj stanica te izvedene u triplikatima iz 4 različita biološka replikata. \* $P < 0,05$ ; statistički značajna razlika u odnosu na OHDA skupinu.

Razine aktivnosti LDH u stanicama izloženim djelovanju OHDA bile su više statistički značajne u odnosu na razine zabilježene u astrocitima kontrolne skupine.

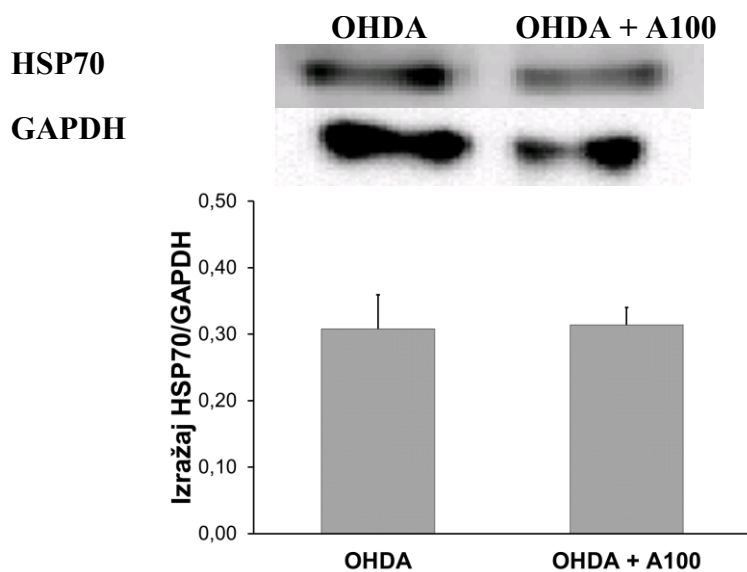
Utjecaj pretretmana astrocita različitim koncentracijama ekstrakta aronije na razine aktivnosti LDH nakon izloženosti stanica 6-OHDA, istražen je 72 h nakon aplikacije toksina u medij za uzgoj stanica (Slika 12.).

U uzorcima medija za uzgoj stanica prikupljenih od astrocita pretretiranih ekstraktom aronije, a potom s OHDA, izmjerene su niže razine aktivnosti LDH u odnosu na razine zabilježene kod stanica tretiranih samo istraživanim toksinom [ $F(3;12)=7,172$ ;  $P=0,005$ ]. Iako su razine aktivnosti LDH bile niže kod sva tri testirana pretretmana, statistički značajno niže razine aktivnosti ovog enzima zabilježene su kod tretmana aronijom u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.2. UTJECAJ 6-HIDROKSIDOPAMINA I PRETRETMANA EKSTRAKTOM ARONIJE NA IZRAŽAJ PROTEINA OD INTERESA

Obzirom da je povoljan učinak pretretmana aronijom na stanicama izloženim djelovanju toksina 6-OHDA uočen prilikom aplikacije koncentracija 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$ , nadalje su za analize korišteni uzorci astrocita tretiranih s najvećom koncentracijom istraživanog antioksidansa.

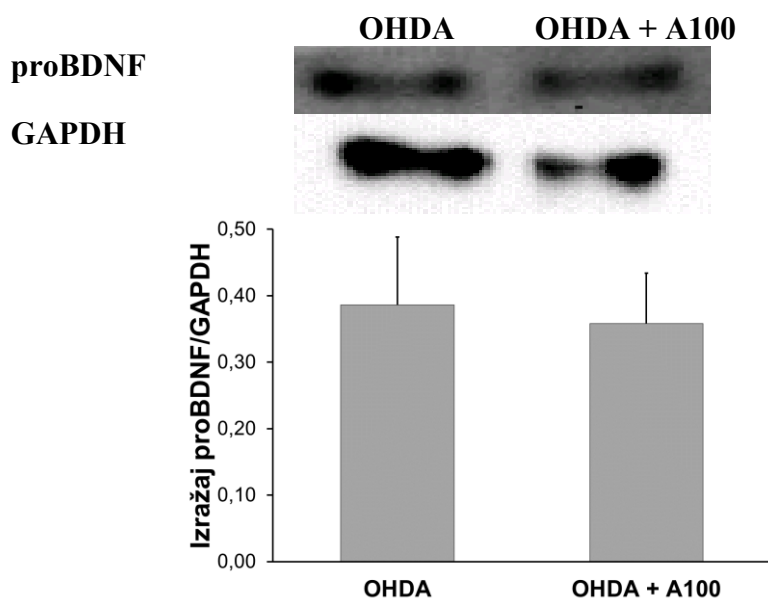
Na Slici 13. prikazani su reprezentativni blotovi i pripadajuća denzitometrijska analiza izražaja proteina HSP70. Razvidno je da pretretman aronijom nije značajno utjecao na izražaj HSP70 u odnosu na razine zabilježene u stanica tretiranih samo s 6-OHDA (t-test,  $P=0,775$ ).



**Slika 13.** Učinak pretretmana ekstraktom aronije u koncentraciji 100  $\mu\text{g/mL}$  (A100) na ekspresiju HSP70 u astrocita izloženih djelovanju 6-hidroksidopamina (OHDA). Prikazani su

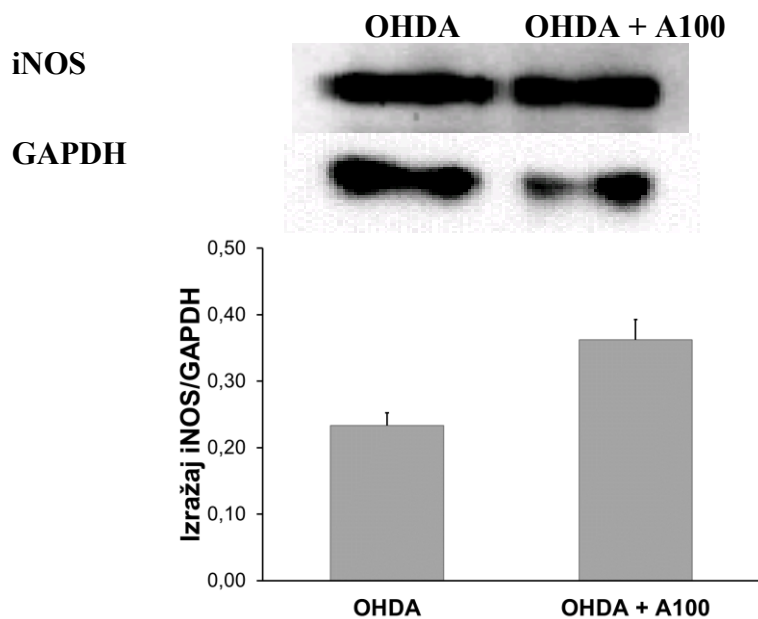
reprezentativni uzorci blotova i pripadajuće denzitometrijske analize, korigirane za vrijednosti GAPDH (N=3).

Nadalje, analiziran je i izražaj prekursora neurotrofnog čimbenika BDNF-a (proBDNF) u istim eksperimentalnim skupinama (Slika 14.) te je također uočeno da se izražaj ovog proteina značajno ne mijenja s pretretmanom stanica ekstraktom aronije (t-test,  $P=0,592$ ).



**Slika 14.** Učinak pretretmana ekstraktom aronije u koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A100) na ekspresiju proBDNF u astrocita izloženih djelovanju 6-hidroksidopamina (OHDA). Prikazani su reprezentativni uzorci blotova i pripadajuće denzitometrijske analize, korigirane za vrijednosti GAPDH (N=3).

Analizirano je i djelovanje pretretmana aronijom na izražaj iNOS nakon izlaganja astrocita toksinu 6-OHDA (Slika 15.). Iako je razvidno da je aplikacija aronije prije 6-OHDA tretmana povećala razinu iNOS u ozlijeđenih astrocita, statistička analiza nije pokazala da se radi o značajnoj promjeni (t-test,  $P=0,072$ ).



**Slika 15.** Učinak pretretmana ekstraktom aronije u koncentraciji 100  $\mu\text{g/mL}$  (A100) na ekspresiju iNOS u astrocita izloženih djelovanju 6-hidroksidopamina (OHDA). Prikazani su reprezentativni uzorci blotova i pripadajuće denzitometrijske analize, korigirane za vrijednosti GAPDH (N=3).

#### 4. RASPRAVA

Komponente prisutne u soku crnoplodne aronije predstavljaju bogate izvore antocijaninskih i polifenolskih supstanci koji reduciraju slobodne radikale. Upravo radi toga, aronija se smatra najjačim antioksidansom koji pozitivno djeluje u gotovo svim organskim sustavima. Nedavnim studijama uočeno je da aronijin učinak može biti primjetan u dubokim jezgrama mozga, substantiji nigri i bazalnim ganglijima, važnim područjima za razvoj patogeneze PD.

Osim toga, korištenjem *in vivo* i *in vitro* modela PD, uspio se otkriti idealan sustav u kojem bi se moglo proučavati djelovanje potencijalnih terapija. Primjerice, Min Ding i sur. (57) istražili su učinke izlaganja kultura postnatalnih stanica ventralnog mezencefalona štakora učinku 6-OHDA, stavljajući fokus na kulture iz područja substantie nigre. Stanice su bile izložene toksinu u koncentracijama od 40, 100 i 500  $\mu\text{M}$  tijekom 15 min, a nakon 48 h obavljeno je imunocitokemijsko bojenje pomoću kojeg je određen gubitak (%) dopaminergičkih i GABAergičkih neurona. Nakon izlaganja koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  6-OHDA, sačuvano je 48% dopaminergičkih neurona, dok se nije uočio značajan gubitak neurona s GABA neurotransmiterom u odnosu na kontrolu (opstalo 95%). U koncentracijama od 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA, GABAergički neuroni reducirani su do 79%, dok su dopaminergički neuroni činili 23% kontrolne skupine. Suprotno tome, koncentracija od 500  $\mu\text{M}$  6-OHDA, uzrokovala je skoro totalni gubitak dopaminergičkih neurona (4% od kontrole), a i specifičnu redukciju GABA stanica (41% od kontrole). Studija je istražila i morfologiju dopaminergičkih neurona izloženih koncentracijama 6-OHDA od 40 i 100  $\mu\text{M}$  tijekom 3h. Dopaminergički neuroni izloženi 40  $\mu\text{M}$  6-OHDA pokazali su fragmentaciju ili gubitak količine živčanog vlakna, kao i redukciju somalne veličine, dok je 38% dopaminergičkih neurona pokazalo morfološke znakove stresa. Kod koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA, uslijedilo je aktiviranje kaspaze-3 i kondenziranje jezgri dopaminergičkih neurona.

Osim dopamina i GABA ovisnih stanica, interes znanstvenika privukao je i glutamat, ekscitacijski neurotransmiter, koji predstavlja važnog pokretača neuroinflamacija i neuronske smrti u poremećajima središnjeg živčanog sustava. Glutatom-potaknuta ekscitotoksičnost može uzrokovati ozljedu neurona u neurodegenerativnim bolestima motornog deficita (58), kao i mitohondrijske poremećaje te crpljenje antioksidativnog sustava obrane koji uključuje enzime poput glutaciona, glutation peroksidaze i glutation reduktaze (59).

Na temelju iznesenih činjenica i poznavanja neuroprotektivnosti *A. melanocarpe*, Yong Lee i suradnici (60) dokazali su kako ekstrakt crnoplodne aronije štiti mišje hipokampalne HT22 neuronske stanice od glutatom-potaknute smrti. Za utvrđivanje preživljavanja stanica,

koristili su MTT test (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*, MTT), a uz dodatak glutamata eksperimentalnim grupama, utvrdili neuroprotektivnost ekstrakta *A. melanocarpe* u koncentraciji od 100 µg/ml u iznosu od 17% i pročišćene frakcije cijanidin-3-O-galaktoze crnoplodne aronije u vrijednosti od 36% u koncentracija od 10 µg/ml.

Kako bi dokazali antitumorsko djelovanje antocijanina aronije, Rugina i sur. (61) tretirali su HeLa tumorske stanice pročišćenom frakcijom antocijanina koja je sadržavala samo cijanidin glikozide. Utjecaj navedenih spojeva na preživljavanje i metabolizam HeLa stanica ispitan je mjerenjem aktivnosti mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze pomoću MTT testa citotoksičnosti. Nakon inkubacije od 48 h, korištena frakcija antocijanina inhibirala je preživljavanje HeLa stanica za 40% u koncentraciji od 200 µg/mL. Otkrivena koncentracija, djelovala je na stanicama raka vrata maternice, dok se u ovom istraživanju pozitivan učinak aronije na stanicama živčanog sustava-astrocitima, detektirao na 2 puta manjim koncentracijama. Opisano bi moglo aludirati kako neuroprotektivnost aronije, za razliku od antitumorskog djelovanja, ne zahtijeva veće koncentracije kako bi ostvarilo svoje efekte u mozgu.

Osim živčanog i imunološkog sustava, aronija je pokazala svoje protektivno djelovanje i u kardiovaskularnom sustavu. Cebova i sur. (62), tretirali su laboratorijske 12 tjedana stare štakore ekstraktom *Aronie melanocarpe* u dozi od 57,90 mg/kg/dan, L-NAME esterom za povećavanje krvnog tlaka (engl. *NG-nitro-L-arginine methyl ester*, L-NAME) u dozi od 40 mg/kg/dan i kombinacijom prethodno spomenutih tretmana tijekom 3 tjedna putem vode. Osnovni cilj studije bio je odrediti učinak ekstrakta crnoplodne aronije na aktivnost NOS u aorti i lijevom ventrikulu. Nakon promatranog vremenskog intervala, uslijedio je porast NOS aktivnosti do 90% od kontrolne skupine samo za lijevi ventrikul i to željene endotelne sintaze dušikova oksida (eNOS). Analizirana je i specifična ekspresija iNOS proteina čije vrijednosti nakon primjene aronije nisu bile statistički značajno promijenjene. Općenito, iNOS ekspresija karakteristična je u astrocitima i mikroglijiji kada dođe do inflamatornog stimulansa (63), a velike količine pronađene su u nigrostrijalnoj regiji i bazalnim ganglijima *post mortem* PD mozgova (64).

U ovom istraživanju, Western blot analizom uočeno je da se primjenom ekstrakta aronije povećava razina izražaja iNOS u astrocitu izloženih 6-OHDA, međutim ova promjena u provedenim eksperimentalnim uvjetima nije bila statistički značajna. Također, nije detektirano da pretretman istraživanim antioksidansom utječe na razine izražaja protektivnih čimbenika HSP70 i proBDNF koji su poznati po svom protektivnom djelovanju unutar CNS-a.



Nagel i sur. (65), spomenuli su Tat-Hsp70 u svojoj studiji u kojoj su uspjeli dokazati djelovanje spomenutog proteina u srednjem mozgu i PD modelima. Odnosno, dokazali su protektivno djelovanje Tat-Hsp70 proteina koji je uzrokovao redukciju gubitka dopaminergičkih neurona u iznosu od 48-54% kod miševa izloženih MPTP toksinu. Općenito, BDNF je neurotrofni čimbenik koji potiče preživljavanje neurona i njihovu diferencijaciju, kao i sinaptogenezu, što je nužno kod neurodegenerativnih bolesti poput PD. U eksperimentalnim uvjetima ovog istraživanja, nisu uočene promjene ekspresije navedenih protektivnih proteina, međutim razlike su istraživane u vremenskoj točki od 24 h nakon početka aplikacije 6-OHDA te je potrebno istražiti izražaj ovih proteina u ranijim, ali i kasnijim vremenskim točkama.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju, ispitan je utjecaj pripremljenog ekstrakta aronijinog praha u različitim koncentracijama na astrocitima *in vitro*, izloženim neurotoksinu 6-OHDA. Dobiveni rezultati doveli su do sljedećih zaključaka:

1. pretretman aronijom različitih koncentracija otopina ne utječe na preživljavanje neozlijeđenih astrocita,
2. toksin 6-OHDA uzrokuje ozljedu astrocita čijim liziranjem dolazi do oslobađanja značajno većih razina LDH,
3. predaplikacija ekstrakta aronije u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$  poboljšava preživljavanje astrocita izloženih toksinu 6-OHDA koji može potaknuti patogenezu Parkinsonove bolesti,
4. primjena ekstrakta aronije tijekom 24 h prije izlaganja astrocita djelovanju 6-OHDA nema značajnog učinka na razine izražaja proteina HSP70, proBDNF te iNOS.

Zaključno, u ovoj su studiji uočeni protektivni učinci aronije na preživljenje astrocita izloženih djelovanju 6-OHDA, no mehanizmi protekcije ovog antioksidansa još su uvijek nerazjašnjeni.

## 6. LITERATURA

1. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 5):S21-23.
2. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2020 Jan;27(1):27–42.
3. Relja M. Parkinsonova bolest - etiologija, dijagnostika i liječenje. *Medix Spec Med Dvomjesečnik*. 2004 Mar 15;10(52):107–8.
4. Groenewegen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast*. 2003;10(1–2):107–20.
5. Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. c. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Dec [cited 2021 May 5];2(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543080/>
6. Basal ganglia | anatomy [Internet]. *Encyclopedia Britannica*. [cited 2021 May 4]. Available from: <https://www.britannica.com/science/basal-ganglion>
7. Sonne J, Reddy V, Beato MR. Neuroanatomy, Substantia Nigra. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 May 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536995/>
8. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988 Aug;38(8):1285–91.
9. Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2017 Jun;40(6):358–70.
10. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):239–389.
11. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Dec 21;3(1):17013.
12. Nikolova G. Oxidative stress and Parkinson disease. *Trakia J Sci*. 2012 Jan 5;

13. Oxidative stress and Parkinson's disease [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495335/>
14. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009 Apr;8(4):382–97.
15. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. Genetic ablation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem*. 2004 May;89(4):822–33.
16. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- $\alpha$ . *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006 Apr;20(6):670–82.
17. Karunakaran S, Saeed U, Mishra M, Valli RK, Datt Joshi S, Meka DP, et al. Selective Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Dopaminergic Neurons of Substantia Nigra Leads to Nuclear Translocation of p53 in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Mice. *J Neurosci*. 2008 Nov 19;28(47):12500–9.
18. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2006 Sep 13;26(37):9365–75.
19. Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 $\beta$  in the substantia nigra. *Neurobiol Dis*. 2006 Oct;24(1):183–93.
20. Klevenyi P, Andreassen O, Ferrante RJ, Schleicher JR, Friedlander RM, Beal MF. Transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1 $\beta$  converting enzyme show resistance to MPTP neurotoxicity. *Neuroreport*. 1999 Feb 25;10(3):635–8.
21. Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1 $\beta$  increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2008 Feb 27;5:8.
22. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet].

2020 Feb 10 [cited 2021 Jun 8];21(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037114/>

23. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005 Oct 15;118(Pt 20):4589–92.
24. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res.* 2018 Oct 30;11:407–19.
25. Pérez-Otano I, McMillian MK, Chen J, Bing G, Hong JS, Pennypacker KR. Induction of NF-κB-like transcription factors in brain areas susceptible to kainate toxicity. *Glia.* 1996 Apr;16(4):306–15.
26. Terai K, Matsuo A, McGeer PL. Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1996 Sep 30;735(1):159–68.
27. Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel M-P, Ruberg M, et al. Nuclear translocation of NF-κB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7531–6.
28. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 May 13];2(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312403/>
29. Winslow AR, Rubinsztein DC. The Parkinson disease protein  $\alpha$ -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy.* 2011 Apr 1;7(4):429–31.
30. Zahoor I, Shafi A, Haq E. Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease. In 2018. p. 129–44.
31. Lee D, Jo MG, Kim SY, Chung CG, Lee SB. Dietary Antioxidants and the Mitochondrial Quality Control: Their Potential Roles in Parkinson's Disease Treatment. *Antioxid Basel Switz.* 2020 Oct 28;9(11).
32. (PDF) Therapeutic effects of baicalein on rotenone-induced Parkinson's disease through protecting mitochondrial function and biogenesis [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/319368044\\_Therapeutic\\_effects\\_of\\_baicalein\\_on\\_rottenone-induced\\_Parkinson's\\_disease\\_through\\_protecting\\_mitochondrial\\_function\\_and\\_biogenesis](https://www.researchgate.net/publication/319368044_Therapeutic_effects_of_baicalein_on_rottenone-induced_Parkinson's_disease_through_protecting_mitochondrial_function_and_biogenesis)

33. Tamilselvam K, Braidy N, Manivasagam T, Essa MM, Prasad NR, Karthikeyan S, et al. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:102741.
34. Yang F, Wolk A, Håkansson N, Pedersen NL, Wirdefeldt K. Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2017 Nov;32(11):1631–6.
35. Li Z, Wang P, Yu Z, Cong Y, Sun H, Zhang J, et al. The effect of creatine and coenzyme q10 combination therapy on mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2015;73(3–4):205–11.
36. Zhang SM, Hernán MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology*. 2002 Oct 22;59(8):1161–9.
37. Vitamin A and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24356061/>
38. Pirvu L, Panteli M, Rasit I, Grigore A, Bubueanu C. The Leaves of *Aronia melanocarpa* L. and *Hippophae rhamnoides* L. as Source of Active Ingredients for Biopharmaceutical Engineering. *Agric Sci Procedia*. 2015 Jan 1;6:593–600.
39. Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci*. 2005 Apr 1;8(2):111–20.
40. Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood–Brain Barrier | Journal of Agricultural and Food Chemistry [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf903529m>
41. Min J, Yu S-W, Baek S-H, Nair KM, Bae O-N, Bhatt A, et al. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2011 Aug 18;500(3):157–61.

42. Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014 Mar 25;1555:60–77.
43. Kin K, Yasuhara T, Kameda M, Date I. Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 30;20(21):5402.
44. Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res.* 2010;184:17–33.
45. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurol Engl Ed.* 2017 Oct 1;32(8):533–9.
46. Salari S, Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol Res.* 2019 Mar 6;68(1):17–24.
47. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 21];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00328/full>
48. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review | *Molecular Neurodegeneration* | Full Text [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-017-0149-0>
49. Taylor-Whiteley TR, Le Maitre CL, Duce JA, Dalton CF, Smith DP. Recapitulating Parkinson's disease pathology in a three-dimensional human neural cell culture model. *Dis Model Mech.* 2019 Apr 9;12(4):dmm038042.
50. Buttiglione M, Vitiello F, Sardella E, Petrone L, Nardulli M, Favia P, et al. Behaviour of SH-SY5Y neuroblastoma cell line grown in different media and on different chemically modified substrates. *Biomaterials.* 2007 Jul 1;28(19):2932–45.
51. Lotharius J, Falsig J, van Beek J, Payne S, Dringen R, Brundin P, et al. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005 Jul 6;25(27):6329–42.

52. van Vliet E, Morath S, Eskes C, Linge J, Rappsilber J, Honegger P, et al. A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology*. 2008 Jan;29(1):1–12.
53. Gaven F, Marin P, Claeysen S. Primary culture of mouse dopaminergic neurons. *J Vis Exp JoVE*. 2014 Sep 8;(91):e51751.
54. Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1 polarization | *Cell Death & Disease* [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0468-2>
55. Martinez-Morales P, Liste I. Stem Cells as In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Int*. 2012 Apr 30;2012:980941.
56. (PDF) The Bradford Method For Protein Quantitation [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/227039216\\_The\\_Bradford\\_Method\\_For\\_Protein\\_Quantitation](https://www.researchgate.net/publication/227039216_The_Bradford_Method_For_Protein_Quantitation)
57. Ding YM, Jaumotte JD, Signore AP, Zigmond MJ. Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*. 2004;89(3):776–87.
58. Schubert D, Piasecki D. Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2001 Nov 1;21:7455–62.
59. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*. 1985 Aug 5;58(3):293–7.
60. Lee HY, Weon JB, Ryu G, Yang WS, Kim NY, Kim MK, et al. Neuroprotective effect of *Aronia melanocarpa* extract against glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Apr 11;17(1):207.
61. Rugină D, Diaconeasa Z, Leopold L, Pintea A, Bunea A, Socaciu C. Antioxidant Activities of Chokeberry Extracts and the Cytotoxic Action of Their Anthocyanin Fraction on HeLa Human Cervical Tumor Cells. *J Med Food*. 2012 Aug 1;15:700–6.
62. Cebova M, Klimentova J, Janega P, Pechanova O. Effect of Bioactive Compound of *Aronia melanocarpa* on Cardiovascular System in Experimental Hypertension. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8156594.



63. Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Jun;8(5–6):929–47.
64. Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 1996 May;72(2):355–63.
65. Nagel F, Falkenburger B, Tönges L, Kowsky S, Pöppelmeyer C, Schulz J, et al. Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2008 Jun 1;105:853–64.

## 7. ŽIVOTOPIS

Ela Mijatović rođena je 26.10.1997.g. u Stuttgartu, Saveznoj Republici Njemačkoj. Nakon završene osnovne škole „Mate Balote” u Bujama, u razdoblju od 2012.-2016.g., pohađala je opću gimnaziju „Vladimir Gortan” u istoimenom gradu. Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo započela je 2016.g., a završila 2019.g. titulom sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) sanitarnog inženjerstva. Svoje obrazovanje nastavila je upisom diplomskog sveučilišnog studija Sanitarno inženjerstvo 2019.g. Tijekom akademskih godina 2017./2018. te 2018./2019., dodijeljene su joj dvije dekanove nagrade za najbolju studenticu 2. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija Sanitarno inženjerstvo i najbolju sveučilišnu prvostupnicu sanitarnog inženjerstva. Zahvaljujući aktivnom sudjelovanju na 3. Studentskom kongresu zaštite zdravlja-Sanitas 2020 s međunarodnim sudjelovanjem, osvojila je nagradu za najbolju usmenu prezentaciju, a 2021.g. ostvarila je pravo *in extenso* objave stručnog rada na temu *Antioksidativni sinergizam cijedenog soka aronije i mješavine crnog vina triju sorti grožđa s područja Bujštine* u časopisu *Medicina Fluminensis*.