

# Učinak celastrola na ekspresiju parametara oksidacijskog stresa u BV-2 mikroglija staničnoj liniji

---

**Bulić, Sara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*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:184:722091>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Bulić

UČINAK CELASTROLA NA EKSPRESIJU PARAMETARA OKSIDACIJSKOG  
STRESA U BV – 2 MIKROGLIJA STANIČNOJ LINIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Bulić

UČINAK CELASTROLA NA EKSPRESIJU PARAMETARA OKSIDACIJSKOG  
STRESA U BV – 2 MIKROGLIJA STANIČNOJ LINIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

Mentori rada: Prof. dr. sc. Jasenka Mršić – Pelčić, dr. med.

Prof. dr. sc. Natalia Kučić, dr. med.

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 37 stranica, 8 slika, 1 tablicu, 51 literaturni navod.

## SAŽETAK

Oksidativni stres definira se kao poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu u kojem prooksidansi nadvladaju antioksidacijski potencijal. To može rezultirati nizom patofizioloških poremećaja praćenih upalom ili oštećenjem tkiva. Mikroglija stanice, kao rezidualni makrofazi mozga, imaju ulogu nadziranja zdravlja živčanog tkiva. U uvjetima hipoksije, kao što je moždani udar, dolazi do njihove aktivacije, pri čemu one eksprimiraju razne parametre, pa tako i enzim iNOS koji je jedan od indikatora oksidacijskog stresa. Celastrol, ekstrakt biljke *Tripterygium wilfordii*, spada u skupinu pentacikličkih triterpena. Zbog svojih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava učinkovito se upotrebljavao u tradicionalnoj medicini za liječenje autoimunih bolesti, astme, kroničnih upala i neurodegenerativnih bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti da li celastrol, kao potencijalno antioksidacijsko sredstvo, može spriječiti aktivaciju mikroglija stanica te na taj način prevenirati razvoj oksidacijskog stresa u uvjetima hipoksije. Dobiveni rezultati navode na zaključak da celastrol dovodi do smanjenja ekspresije iNOS-a, a posljedično tome i oksidacijskog stresa stanice.

Ključne riječi: oksidacijski stres, mikroglija stanice, celastrol, iNOS

## SUMMARY

Oxidative stress is defined as a non balanced redox condition where prooxidants overpower the antioxidant potential what can result in series of pathophysiological disorders followed by an infection or tissue damage. Microglial cells, as residual macrophages of the brain, have the function to monitor neural tissue health. They are activated in a case of hypoxia, like a stroke, when they express different parameters, including iNOS enzyme which is an indicator of oxidative stress. Celastrol, an extract of the plant *Tripterygium wilfordii*, is a member of pentacyclic triterpenes. It has been efficiently used in the traditional medicine to treat autoimmune diseases, asthma, chronic infections and neurodegenerative diseases owing to its antioxidative and anti-inflammatory characteristic. The purpose of this research was to perceive if celastrol, as a potential antioxidative agent, can prevent microglial cells activation and this way also prevent the oxidative stress growth in the case of hypoxia. The results indicate the number of microglial cells treated with celastrol have, in regard to control group, reduced and there is an after effect - a reduced induction of the iNOS enzymes. We can conclude that celastrol has revealed it self as a successful inhibitor of microglial cells activation, which also contributed oxidative stress reduction, and it can also be used as a potential antioxidative resort in various diseases treatments.

Key words: oxidative stress, microglial cells, celastrol, iNOS

# SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISPITIVANJA .....	1
1.1. OKSIDATIVNI STRES .....	1
1.1.1. Formiranje slobodnih radikala i uloga ROS – a u živom organizmu.....	1
1.1.2. Reaktivni dušikovi spojevi .....	3
1.1.3. Stanice CNS – a koje sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala.....	4
1.1.4. Lipidna peroksidacija .....	4
1.2. MIKROGLIJA STANICE .....	5
1.2.1. Glija stanice .....	5
1.2.2. Općenito o mikroglia stanicama.....	5
1.2.3. Aktiviranje mikroglia stanica .....	6
1.2.4. Membranski receptori .....	7
1.2.5. Istraživanja mikroglia stanica .....	10
1.3. CELASTROL .....	12
1.3.1. <i>Tripterygium wilfordii</i> .....	12
1.3.2. Celastrol kao potencijalni lijek .....	12
1.3.3. Rizici primjene celastrola.....	15
2. CILJ RADA.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18

<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Metode.....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Uzgoj adherentne BV – 2 stanične linije .....	19
3.2.2. Postizanje hipoksijskih uvjeta u izobaričnoj komori .....	19
3.2.3. Mikroskopska analiza.....	19
3.2.4. Priprema staničnog lizata .....	20
3.2.5. Gel – elektroforeza .....	20
3.2.6. Elektrolot proteina s akrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu.....	20
3.2.7. Kemiluminiscencija .....	20
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>21</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>27</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>28</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>34</b>
8.1. POPIS KRATICA .....	34
8.2. POPIS SLIKA.....	36
8.3. POPIS TABLICA.....	36
8.4. ŽIVOTOPIS .....	37

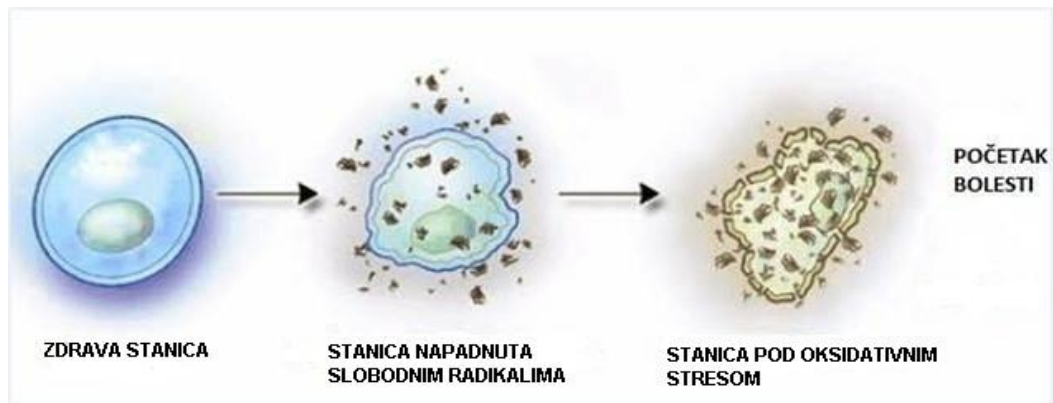


# **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISPITIVANJA**

## **1.1. OKSIDATIVNI STRES**

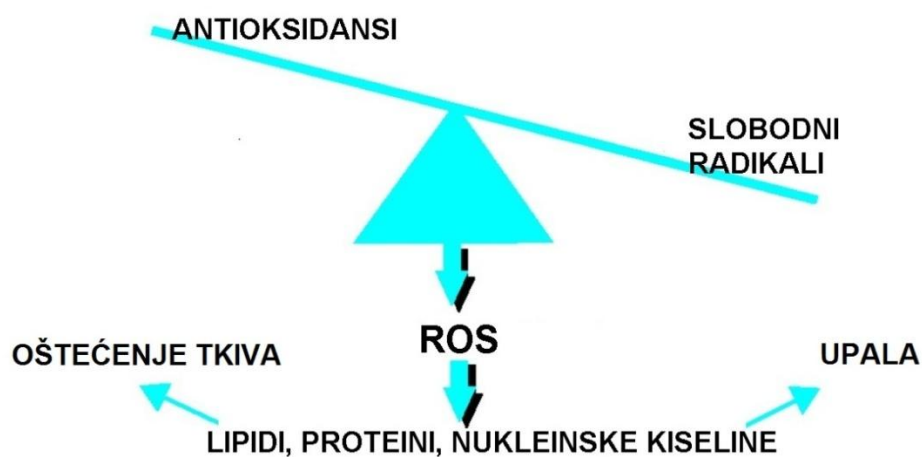
### **1.1.1. Formiranje slobodnih radikala i uloga ROS – a u živom organizmu**

Oksidativni stres definira se kao poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu u kojem prooksidansi nadvladaju antioksidacijski potencijal što može rezultirati nizom patofizioloških poremećaja.(1) Slobodni radikali su vrlo reaktivne molekule s nesparenim elektronom koje mogu postojati u reduciranom i oksidiranom stanju. Nastaju pod utjecajem raznih čimbenika kao što su UV ili ionizirajuće zračenje, upalni procesi, onečišćenje okoliša ili neki drugi okolišni ili unutarstanični procesi.(2) Slobodni radikali i njihovi reaktivni produkti koji se formiraju tijekom upalnog odgovora generalno se dijele na reaktivne kisikove spojeve (ROS) i reaktivne dušikove spojeve (RNS).(3) U svim aerobnim organizmima neprestano se proizvode relativno male količine reaktivnih kisikovih spojeva.(4) ROS se također proizvodi nakon fagocitoze, od strane aktiviranih fagocitnih stanica poput neutrofila, makrofaga, eozinofila i monocita, kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizama.(5) Međutim, istraživanja govore u prilog tome da se ROS najviše formiraju u procesima oksidativne fosforilacije tijekom prijenosa elektrona u mitohondrijima.(2)



**Slika 1: Prikaz utjecaja slobodnih radikala na zdravu stanicu (preuzeto i prilagođeno iz Tenderich A, 2008)**

U normalnim uvjetima količine kisika kontroliraju stanični endogeni antioksidansi, glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze.(7) ROS ima veliku važnost u mnogim procesima, kao što su proliferacija, apoptoza, unutarstanična signalizacija ili imunološki odgovor.(4) Nekontrolirana produkcija ROS-a povećava razinu oksidacijskog stresa i aktivira ključne transkripcijske faktore, kao što je nuklearni faktor NF- $\kappa$ B, koji regulira gensku ekspresiju za proupalne i adhezijske molekule.(8) Osim toga, ROS može uzrokovati oštećenje DNA i proteina, lipidnu peroksidaciju, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu.(9) Oksidativni stres izaziva oštećenje tkiva, praćeno hipoksijom i hiperoksijom, koje vode povećanju razine ROS - a.(10)



**Slika 2: Poremećaji uvjetovani oksidacijskim stresom (preuzeto i prilagođeno iz Kelly FJ, 2003)**

### 1.1.2. Reaktivni dušikovi spojevi

Osim reaktivnih kisikovih spojeva, važnu ulogu imaju i reaktivni dušikovi spojevi (RNS). Najvažniji spojevi RNS su dušikov (II) oksid (NO) i dušikov (IV) oksid (NO<sub>2</sub>).<sup>(12)</sup> NO je sveprisutni međustanični glasnik čija je uloga moduliranje širokog spektra fizioloških i patofizioloških procesa, uključujući i moduliranje krvnog protoka, tromboze i neuralne aktivnosti. Sintetizira ga NO sintetaza (NOS) tijekom enzimske oksidacije gvanino grupe na L-argininu.<sup>(13)</sup> NO sintetaza može biti neuralnog porijekla (nNOS), endotelnog porijekla (eNOS) ili izolirana iz makrofaga (iNOS) koja se naziva inducibilna jer se vrlo brzo stvara u mnogim tkivima od strane proupalnih citokina, pa tako i od strane aktiviranih mikroglija stanica. Povećana ekspresija iNOS-a rezultira povećanim stvaranjem ROS-a i RNS-a, koji u konačnici dovode do oštećenja neurona.<sup>(14)</sup> Kisikovi i dušikovi radikali producirani od strane neutrofila i monocita, povezuju se sa oštećenjem tkiva u CNS – u koje se događa u multiploj sklerozi, virusnom encefalitisu i ostalim neuroupalnim bolestima, sekundarnim upalama nakon ozljede CNS – a, te brojnim neurodegenerativnim stanjima, sa upalnim elementima kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest. Dokazano je i da njihovi citotoksični učinci doprinose propuštanju krvno moždane barijere, što se povezuje sa invazijom leukocita u oštećeno tkivo kod patoloških i protektivnih imunoloških odgovora CNS –a.<sup>(15)</sup> U ranoj fazi ishemijskog oštećenja eNOS može zaštititi mozak povećavanjem krvnog protoka, dok u postishemičnom periodu NO produciran od strane nNOS i iNOS može doprinijet staničnoj smrti.<sup>(16)</sup> Zbog ograničenog kapaciteta obnavljanja neurona, produkcija slobodnih radikala u centralnom živčanom sustavu predstavlja određeni rizik za razvoj neuropatoloških stanja.<sup>(17)</sup>

### **1.1.3. Stanice CNS – a koje sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala**

Tipovi stanica povezanih sa upalima u središnjem živčanom sustavu, a koje pretežno sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala su primarno polimorfonuklearni (PMN) neutrofil i monociti. Ove stanice koje se često nazivaju i upalnim stanicama, eksprimiraju visoke koncentracije triju ključnih enzima povezanih sa stvaranjem slobodnih radikala, a to su: izoforma Nox2, od NADPH oksidaze, koja katalizira stvaranje superoksida (18), iNOS koja je odgovorna za produkciju visokih razina dušikovog oksida (NO) i MPO (mijeloperoksidaza), enzim koji katalizira stvaranje hipoklorne kiseline iz vodikovog peroksida.(19)

Analiza ekspresije citokina može također dati uvid u produkciju radikala tijekom upalnog odgovora. Interferon – gama (IFN –  $\gamma$ ) je glavni upalni citokin koji doprinosi indukciji iNOS i Nox2 kod monocita i PMN neutrofila u većini upalnih odgovora CNS – a. On se u velikoj mjeri producira od aktiviranih CD4 Th1 stanica, CD8 T stanica i „natural killer“ (NK) stanica.(20) Proupalni citokini IL - 1 $\beta$ , TNF –  $\alpha$  i IL – 6 koje produciraju različiti tipovi stanica, pa tako i mikroglija stanice, čine važan doprinos u modulaciji ekspresije i aktivnosti spomenutih enzima.(21)

### **1.1.4. Lipidna peroksidacija**

Jedna od glavnih posljedica ozljede mozga posredovana slobodnim radikalima je lipidna peroksidacija. Peroksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), kao i njezini sekundarni produkti, dovode do strukturnog i funkcionalnog oštećenja membrana.(12) Neuralne membrane su bogate višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje su naročito ranjive pod utjecajem slobodnih radikala.(22) Specijalizirana neuronska provođenja i sinaptički prijenos ovise o funkcionalnoj učinkovitosti membrane.(23) Membrane postaju fluidnije, pada im vrijednost

membranskog potencijala, povećava se permeabilnost prema ionima, što u konačnosti može dovesti do pucanja stanice i otpuštanja staničnog sadržaja.(12) Produkti lipidne peroksidacije mogu također doprinijeti oštećenju neurona. Jedan od tih produkata je i 4 – hidroksi – nonenal koji djeluje isključivo citotoksično na neurone, povećavajući razinu kalcijevih iona, inaktiviraju transportere glutamata te oštećujući proteine.(22) Produkti lipidne peroksidacije su skupina spojeva široko prihvaćenih kao indikatori oksidacijskog stresa.

## **1.2. MIKROGLIJA STANICE**

### **1.2.1. Glija stanice**

U središnjem živčanom sustavu postoje dvije osnovne vrste stanica, a to su potporne ili glija stanice i neuroni. Glija stanice, za razliku od neurona, nemaju aksona niti natrijevih naponskih kanala, ali imaju naponske kanale za prolaz kalijevih iona. Nadalje, glija stanice ne stvaraju akcijske potencijale, a suprotno od neurona, posjeduju i sposobnost dijeljenja tijekom cijelog života, što ih čini sličnim sa tjelesnim stanicama. Glija stanice u središnjem živčanom sustavu se dalje dijele na mikrogliju i makrogliju koju čine astrociti i oligodendrociti.(24)

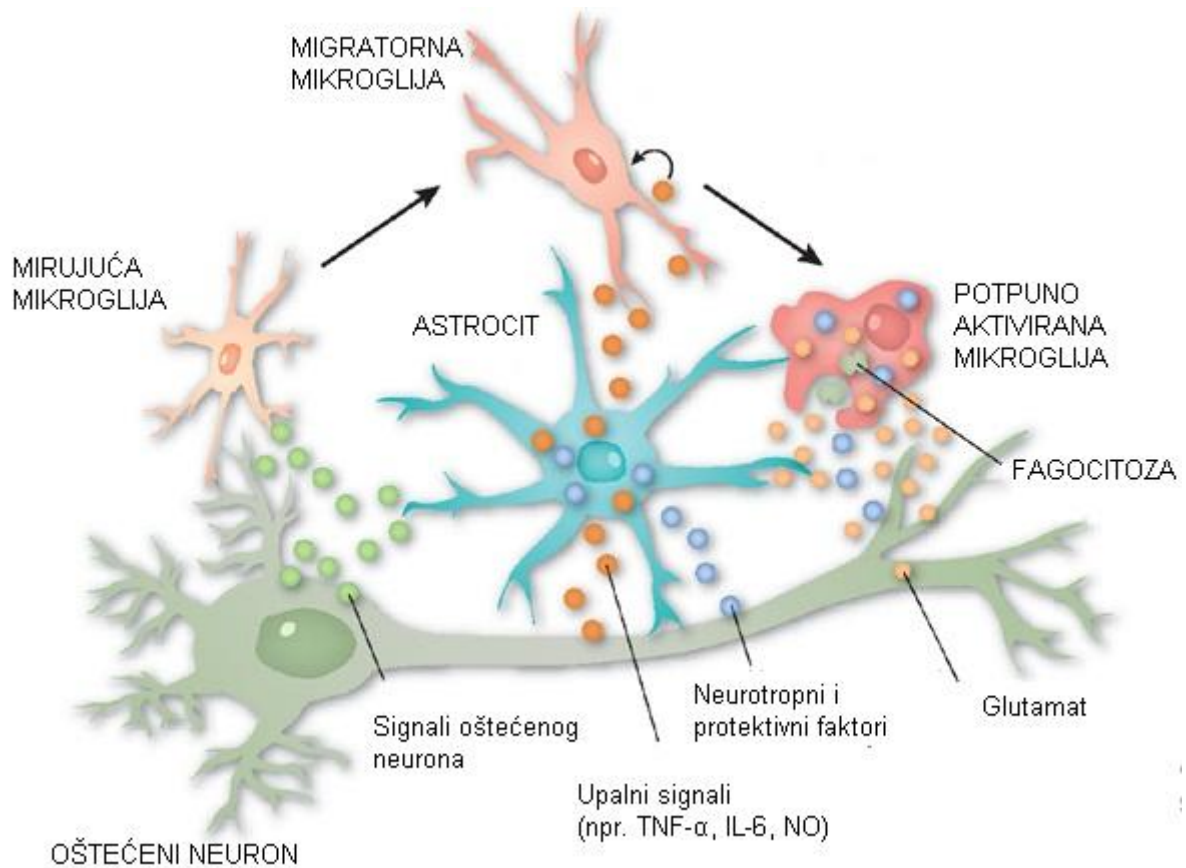
### **1.2.2. Općenito o mikroglija stanicama**

Mikroglija stanice se često nazivaju i mezoglija, Robertson – Hortegine ili Hortegine stanice. Mezodermalnog su podrijetla, a čine ih male, tanke jezgre obavijene citoplazmom s razgranatim izdancima. Formiraju se u krvnim žilama u ranom stadiju razvoja, kao dio imunološkog sustava, te na taj način ulaze u mozak, što predstavlja i njihov glavni izvor, a mogu se naći i u moždanim ovojnica i tela

chorioidei.(25,26) Glavna uloga im je nadziranje zdravlja živčanog tkiva pri čemu mogu detektirati i očistiti patogene i oštećene stanice putem receptora za prepoznavanje te fagocitozom.(26) Temeljem njihove aktivnosti mogu se naći u dva stanja: „mirujuća“ i „aktivirana“ mikroglia.

### **1.2.3. Aktiviranje mikroglia stanica**

Upalna reakcija, ozljeda mozga ili degenerativna bolest dovode do aktiviranja „mirujuće“ mikroglie pri čemu ona uvlači nastavke i odlazi prema mjestu lezije.(Slika 3) Migracija mikroglia stanica se događa ili tijekom spomenutih patoloških stanja ili tijekom razvoja kada monocitne stanice dolaze u mozak. Osim promijene samog oblika stanice, mijenja se i ekspresija gena te ponašanje stanice. Dodatni elementi koji se također mijenjaju su reorganizacija same površine stanica, promjene intracelularnih enzima te otpuštanje mnogih proupalnih i imunoregulatornih faktora.(27) Na mjestu lezija i oštećenja, aktivirane mikroglia stanice poprimaju ameboidan oblik i prelaze u fagocite koji nakon uklanjanja ostataka raspadnutih stanica, zbog većeg broja vakuola u citoplazmi, nalikuju na štapić ili poprimaju mrežasti izgled. Ovisno o vrsti lezije, ako dolazi do oštećenja i krvnih žila, uz mikrogliju dolaze i druge skupine fagocita, kao što su periciti i krvni monociti.(24) Lokalno se može povećati i gustoća mikroglia stanica postupkom proliferacije, pri čemu veći broj stanica osigurava lakšu zaštitu, obranu i obnovu tkivne homeostaze.(27)



**Slika 3: Aktivacija mikroglija stanica (preuzeto i prilagođeno iz Monk PN, 2006)**

#### 1.2.4. Membranski receptori

Na površini mikroglija stanica nalaze se mnogi membranski receptori, navedeni u Tablici 1. Osim posrednika koji sudjeluju u infekciji, aktivacijski signali mogu doći i od raznih molekula koje se kreću prema mjestu oštećenja tkiva, tako da i najmanja ozljeda može izazvati brzi odgovor mikroglija stanica.(29) Primjerice, dodatna indukcija intracelularnih proteina, koji u normalnim uvjetima prenose različite fiziološke poruke, mogu potaknuti aktivaciju mikroglija stanica.(30) U mnoštvu raznih receptora koji se nalaze na membrani, ove stanice mogu osjetiti i odstupanja u koncentraciji molekula neurotransmitera, pa tako neki neurotransmiteri i ko-transmiteri mogu indicirati oštećenje ili pretjeranu neuralnu aktivnost što mikroglija

stanice percipiraju kao znak ozljeda.(31) Signalne molekule koje također mogu prenositi poruku mikroglia stanicama o patološkim događajima u mozgu su: ATP, kanabinoidi, morfin, kemokin CCL21, lizofosfatična kiselina te bradikinin.(27) Osim navedenih molekula važnu ulogu kod pokretanja migracije imaju i ionski kanali kao što su  $K^+$  i  $Cl^-$  kanali. Ozljeda mozga veže za sebe masivno otpuštanje ATP – a, koji je u visokim koncentracijama prisutan u citosolu živih stanica. In vitro i in vivo istraživanja su dokazala da ATP i njegovi analozi izazivaju brzu reakciju mikroglia stanica, njihovo kretanje prema mjestu oštećenja, te otpuštanje citokina i proupalnih faktora.(32)



**Tablica 1: Vrste receptora na površini mikroglija stanica (preuzeto i prilagođeno iz Kettenmann H, 2011)**

<p>1. Receptori neurotransmitera</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Purinergični receptori: Adenozin P1, P2X, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y</li> <li>- Receptori glutamata: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ionotropni (AMPA, NMDA i kainatski receptori)</li> <li>Metabotropni</li> </ul> </li> <li>- GABA receptori</li> <li>- Kolinergički receptori</li> <li>- Adrenergički receptori</li> <li>- Dopaminski receptori</li> </ul>
<p>2. Neurohormonski i neuromodulatorni receptori</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PAF receptori</li> <li>- Receptori bradikinina</li> <li>- Histaminski receptori</li> <li>- Endotelinski receptori</li> <li>- Kanabinoidni receptori</li> <li>- Receptori angiotenzina II</li> <li>- Somatostatinski receptori</li> <li>- Glukokortikoidni i mineralokortikoidni receptori</li> <li>- Opioidni receptori</li> <li>- Neurokininski receptori</li> <li>- Receptori za vazoaktivne intestinalne polipeptide</li> <li>- Neurotropinski receptori</li> </ul>
<p>3. Citokinski i kemokinski receptori</p>
<p>4. Toll – like receptori</p>
<p>5. Receptori za kalcij</p>
<p>6. Leukotrienski receptori</p>
<p>7. Notch receptori</p>
<p>8. Komplement receptori</p>
<p>9. Trombinski receptori</p>
<p>10. M - CSF receptori (Macrophage Colony-Stimulating Factor)</p>
<p>11. Receptori za epidermalni faktor rasta</p>
<p>12. CD200 receptori</p>
<p>13. Receptori za lizofosfatičnu kiselinu</p>

### 1.2.5. Istraživanja mikroglija stanica

Aktivirane mikroglija stanice mogu doprinijeti očuvanju ili uništenju neurona koji se nalaze u blizini. S pozitivne strane, mogu odstraniti toksične materijale (npr. proteinske agregate), lučiti neurotropne faktore (npr. BDNF) i protektivne faktore kao što je to glutation. Međutim, s druge strane njihovo negativno djelovanje može rezultirati lučenjem proupalnih citokina, glutamata, slobodnih radikala i dušikovog oksida.(28) U in vitro istraživanjima aktivacija mikroglija stanica često se postiže stimulacijom sa LPS – om (lipopolisaharidom), endotoksinom izoliranim sa vanjske membrane gram negativnih bakterija (33), pri čemu se unutar 24 sata od same stimulacije, stanice aktiviraju i počinju sa lučenjem proupalnih medijatora kao što su TNF –  $\alpha$ , IL – 6, IL - 1 $\beta$  ili dušikov oksid.(34) U mehanizmima regulacije, prisutnost mikroglija stanica je neophodna za produkciju proupalnih i neurotropnih faktora tijekom LPS - inducirane astroglioze. Aktivirana mikroglija producira među prvima medijator upale TNF- $\alpha$ , koji je kritični faktor u aktivaciji astroglioze, abnormalnog povećanja broja astrocita, koji su kod ozljede neurona jedni od ključnih protektivnih faktora.(26) Lučenje neurotropnih faktora ili citokina, u nekim slučajevima se može pokazati korisno, dok u nekim drugim situacijama može izazvati štetne efekte.(27) Dokazano je da mikroglija posreduje u skraćivanju sinapsi, modulira ranu postnatalnu neurogenezu, a također sudjeluje i u pravilnom prijenosu signala u mozgu. Novija istraživanja ukazuju i da humane mikroglija stanice mogu biti i okidač za pojedine bolesti. U prilog tome govori i činjenica da ima sve više otkrivenih gena srodnih mikroglija stanicama, a povezanih sa neurološkim i neuropsihijatrijskim poremećajima. Tu su uključeni sljedeći geni: CD33 kod Alzheimerove bolesti, TREM2 kod frontotemporalne demencije ili TNFRSF1A i IRF8 kod multiple skleroze. Iz tog

razloga, za očekivati je da će u bliskoj budućnosti sve više bolesti centralnog živčanog sustava biti povezano sa defektima na mikroglija stanicama.(35) Aktivirane mikroglija stanice otpuštanjem citotoksičnih medijatora u različitim bolestima centralnog živčanog sustava pokazale su mogućnost uništavanja stanica neurona koji se nalaze u blizini. Aktivirana mikroglija može otpuštati iNOS, stvarajući visoke razine NO, koji u određenim okolnostima može uništavati neurone. Čak i niske razine NO, u prisutnosti aktivirane mikroglije, mogu izazvati moždanu smrt unutar uvjeta hipoksije.(36) Dokazano je da oksidativni stres u centralnom živčanom sustavu dolazi od ROS-a nastalih u mitohondrijima, ali i od aktiviranih mikroglija stanica.(37) U današnje vrijeme imamo sve veći broj istraživanja novih spojeva, kao što je to celastrol, koji imaju protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, te bi mogli potisnuti aktivaciju mikroglija stanica i spriječiti nastajanje ROS - a i RNS – a.(38)

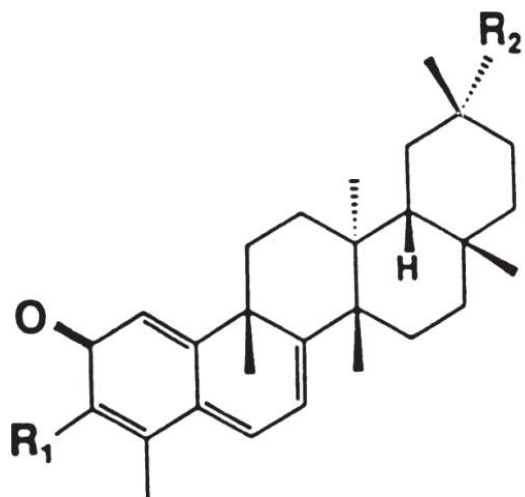
## 1.3. CELASTROL

### 1.3.1. *Tripterygium wilfordii*

*Tripterygium wilfordii* Hook., je višegodišnja, autohtona, puzava biljka iz obitelji *Celastraceae*, čije se stanište nalazi u južnim dijelovima Kine. Poznatija je pod nazivima lei gong tenk i Thunder of God Wine, dok se u Hrvatskoj koristi i naziv „grom boga vina“. Njezini ekstrakti upotrebljavali su se u tradicionalnoj biljnoj medicini za liječenje stanja kao što su vrućica, zimica, bolovi u zglobovima ili edema.(39) Neki ekstrakti biljke, kao što je to triptolid, pročišćeni diterpenoid triepoksid, osim što se može koristiti u liječenju različitih bolesti, također može biti veoma toksičan za ljude i životinje. Toksičnost biljke očituje se u listovima, korijenju, cvjetovima i deblu, a velike količine triptolida mogu izazvati oštećenje miokarda, zatajenje bubrega, oštećenje jetra te intestinalnog trakta, što u konačnici može rezultirati i smrću.(40)

### 1.3.2. Celastrol kao potencijalni lijek

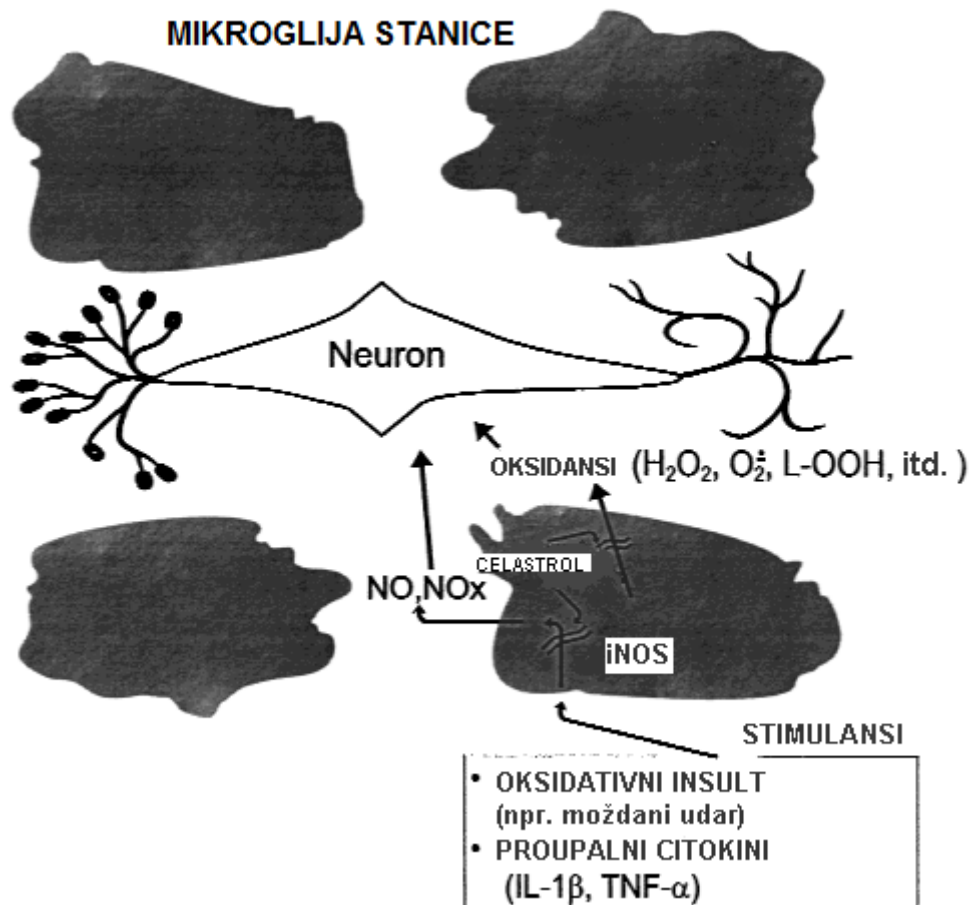
Jedan od mnogih aktivnih ekstrakta ove biljke je i istraživani spoj celastrol, poznatiji i pod nazivom tripterin. Spada u skupinu pentacikličkih triterpena, molekularne formule  $C_{29}H_{38}O_4$ . Zbog svojih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava, celastrol se učinkovito upotrebljavao u liječenju autoimunih bolesti, astme, kroničnih upala i neurodegenerativnih bolesti.(24) Osim navedenih učinaka, dokazano je da celastrol u malim dozama, kod štakora može poboljšati kapacitet učenja, pamćenja i psihomotorne sposobnosti.(42)



**Slika 4: Kemijska struktura celastrola,  $R_1 = -OH$  i  $R_2 = -COOH$  (preuzeto i prilagođeno iz Allison AC, 2000)**

Nadalje, u nekim in vivo istraživanjima na miševima dokazana je i učinkovitost celastrola kao prirodnog inhibitora proteosoma što mu daje veliki potencijal u prevenciji i tretiranju stanica raka.(24) U istraživanju na hipertenzivnim štakorima dokazano je da celastrol kao antioksidans može smanjiti stvaranje ROS – a, te povećati ekspresiju i aktivnost hem oksigenaze-1 (HO –1). U prilog tome govori i činjenica da može potisnuti mnoge korake u samom početku upale i oksidativnom stresu, uključujući i signalne puteve za heat – shock protein 90 i NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B je transkripcijski faktor za koji se smatra da igra važnu ulogu u genskoj regulaciji tijekom oksidacijskog stresa i upale koji mogu voditi do određenih bolesti. Osim kao djelotvoran inhibitor transkripcijskih faktora, nedavna istraživanja su prikazala celastrol i kao inhibitor upalnih citokina, uključujući IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  kod LPS-stimuliranih stanica RAW264.7. Nadalje, poznato je i da celastrol pobuđen ADP-om i Fe<sup>+2</sup>, sprječava produkciju iNOS (inducibilna sintetaza dušikovog oksida) i lipidne peroksidacije u mitohondrijskoj membrani jetre štakora, što govori u prilog njegovim antioksidacijskim svojstvima.(43) Prema istraživanjima, celastrol inhibira

peroksidaciju unutarnje i vanjske membrane mitohondrija vezivanjem radikala, te sprječava napad radikala na unutrašnju membranu povećanjem negativnog naboja površine.(41)



**Slika 5: Osnovni koncept neuralne upale (preuzeto i prilagođeno iz Floyd RA, 1999)**

Nakon različitih stimulacija dolazi do aktivacije mikroglija stanica, te indukcije iNOS-a i drugih gena (slika 5). Kao rezultat toga, mikroglija stanice produciraju oksidanse, između ostalog i dušikov oksid i njegove oksidanse, koji su toksični za neurone. Smatra se da bi celastrol kao potencijalni lijek mogao inhibirati indukciju iNOS i drugih gena, te produkciju oksidansa koji izazivaju disfunkciju ili smrt neurona.(44)

U posljednje vrijeme puno pažnje usmjereno je na modulaciju heat shock odgovora kao potencijalnog modela u liječenju ljudskih bolesti kao što su rak, trauma, ishemija – reperfuzija, transplantacijska kirurgija ili dijabetes.(45) Glavna uloga heat shock proteina je održavanje stanične homeostaze.(46) U normalnim uvjetima prisutni su u citoplazmi i jezgri stanica u manjim količinama (Hsp40, Hsp70, Hsp90), dok se kod uvjeta iznenadnog povećanja temperature ili drugog stresa, luče u visokim količinama. Istraživanja govore u prilog tome da celastrol djeluje citoprotektivno zahvaljujući samom mehanizmu djelovanja koje uključuje ekspresiju heat shock proteina uključujući Hsp27, Hsp40 i Hsp70.(33) Smatra se da djelovanje celastrola izaziva nuklearnu translokaciju transkripcijskog faktora, heat shock faktora 1 (HSF1), što dalje rezultira heat shock odgovorom (HSR), vodeći indukciji ekspresije heat shock proteina (HSP).(47)

### **1.3.3. Rizici primjene celastrola**

Neki od nedostataka korištenja celastrola kao lijek su njegova toksičnost i slaba topivost u vodi, što predstavlja problem u dovođenju lijeka na samo mjesto djelovanja. Sustavi za dovođenje lijeka na mjesto djelovanja temeljeni na tehnologiji nanočestica mogu unaprijediti topivost u vodenoj sredini i doprinijeti kontrolnom otpuštanju lijeka na mjestu djelovanja, pritom zadržavajući njegova antitumorska ili protuupalna svojstva. Međutim, negativni učinci ovakvog načina unošenja lijeka se očituju u kratkom trajanju učinka lijeka, značajnom propuštanju i njegovoj velikoj akumulaciji u jetri.(33)

Provedena su mnoga istraživanja o dokazivanju protektivnih svojstava celastrola kao lijeka, ali su istraživanja većinom bila usmjerena na njegova terapijska svojstva kod neurodegenerativnih bolesti, kao što su Alzheimerova i

Parkinsonova bolest. Međutim, istraživanja ukazuju na to da bi celastrol mogao biti koristan lijek u terapiji upalom praćenih neurodegenerativnih bolesti, u svrhu moduliranja upale i imunološkog odgovora.(48)



## **2. CILJ RADA**

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Razviti model in vitro hipoksije na BV – 2 mikroglia staničnoj liniji
2. Pratiti parametre aktivacije mikroglia stanica, pri čemu se prati izražaj proteina iNOS, kao jednog od indikatora oksidacijskog stresa
3. Pratiti učinak celastrola, koji ima potencijano protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, na potiskivanje aktivacije mikroglia stanica i posljedično na ekspresiju iNOS kao biljega oksidacijskog stresa

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Laboratorijsko posuđe:

- Petrijeve zdjelice (Greiner)
- Volumetrijske tikvice i staklene menzure (Carl Roth)
- Posuđe za Western blot analizu (BioRad)

Kemikalije:

- PBS (fiziološka otopina piferirana fosfatnim puferom)
- Natrij klorid 140 mM, Kemika
- Kalij klorid 2,7 mM, Kemika
- Natrij hodrogenfosfat-2-hidrat 6,5 mM, Kemika
- Kalij dihidrogenfosfat 1,5 mM, Kemika
- Kalcij klorid 0,7 mM, Kemika
- Magnezij klorid-6-hidrat 0,7 mM, Kemika

Mediji i puferi:

- Medij D-MEM (medij za uzgoj imortaliziranih linija), PAN Biotech
- Medij D-MEM 1,1 L – glutamin 2 mM, Penicilin  $1 \times 10^5$  U/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l, Gentamicin sulfat 0,05 g/l, Fetalni goveđi serum (FCS) 10%, PAN Biotech
- Running pufer (Tris base, ROTH + glicin, Fisher chemical + SDS, Fisher scientific + H<sub>2</sub>O)

- Transfer pufer (Tris base, ROTH + glicin, Fisher chemical + metanol, Kemika + H<sub>2</sub>O)

Protutijela:

- iNOS/NOS2 monoklonsko protutijelo, Santa Cruz
- Celastrol, kristalični, Cayman Chemicals

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Uzgoj adherentne BV – 2 stanične linije**

BV – 2 stanice dobivaju se od imortaliziranih mišjih neonatalnih mikroglia. Uzgojene su u plastičnim Petrijevim zdjelicama, u prisutnosti D – MEM medija i uvjetima od 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon što stanice prekriju dno Petrijeve zdjelice (3 – 5 dana uzgoja), prebacivanjem u nove zdjelice može se nastaviti sa njihovim uzgojem do željene gustoće. Promjenom medija uklanjaju se iz kulture ostalih stanica, zbog njihove sklonosti prianjanju uz plastiku.

### **3.2.2. Postizanje hipoksijskih uvjeta u izobaričnoj komori**

Nakon standardnog uzgoja BV – 2 mikroglia stanica, tim stanicama je inducirana *in vitro* hipoksija. Uvjeti hipoksije postižu se u izobaričnoj komori gdje se postupnim uvođenjem 98% dušika smanjuje razina kisika na < 2%. Ti uvjeti održavaju se tijekom 6 sati.

### **3.2.3. Mikroskopska analiza**

Neposredno nakon provedenih uvjeta hipoksije, te 24 h, 48 h, 72 h, i 168 h nakon hipoksije, BV – 2 stanice su analizirane svjetlosno fazno-kontrastnim mikroskopom (Olympus).

### **3.2.4. Priprema staničnog lizata**

Nakon što se BV – 2 stanice odljepe od podloge, inkubiraju se 10 minuta na ledu pri čemu se resuspendiraju u puferu za lizu (0,3 ml). Talog stanica je centrifugiran 5 minuta na 14 000 RPM, na temperaturi od 4 °C. Dobiveni supernatant uzima se kao uzorak za Western blot analizu.

### **3.2.5. Gel – elektroforeza**

Poliakrilamidna gel – elektroforeza (SDS–PAGE) služi za razdvajanje proteina dobivenog iz staničnog lizata. Elektroforeza se provodila u trajanju od otprilike sat vremena na 150 V, a korišteni su 8, 10 i 12 % gelovi. Nakon što su proteini razdvojeni na gelu, prebačeni su na nitroceluloznu membranu.

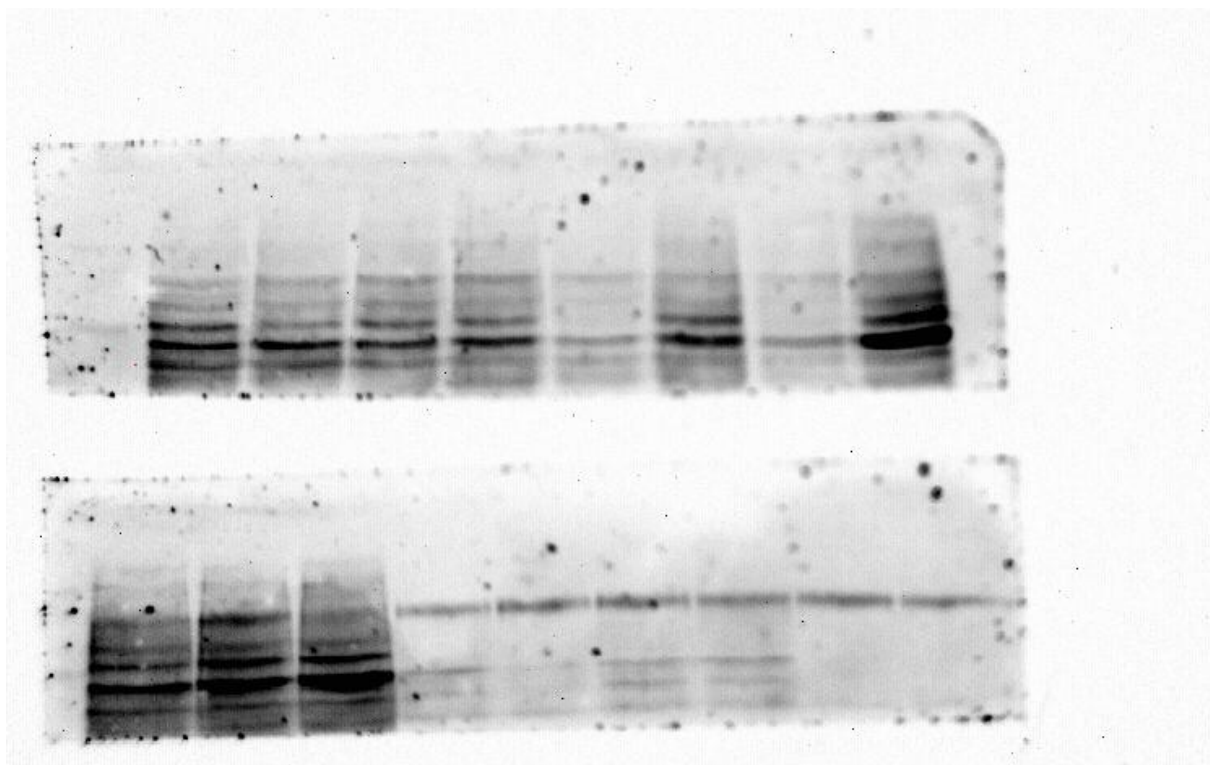
### **3.2.6. Elektroblob proteina s akrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu**

Nakon provedenog postupka elektroforeze, gel se uranja u renaturirajući pufer i inkubira 10 minuta. Transfer pufer (TBS + metanol) služi za prijenos proteina s gela na membranu (blotting). Prijenos se odvija u trajanju od 30 minuta na 25 V / 110 mA u transfer puferu.

### **3.2.7. Kemiluminiscencija**

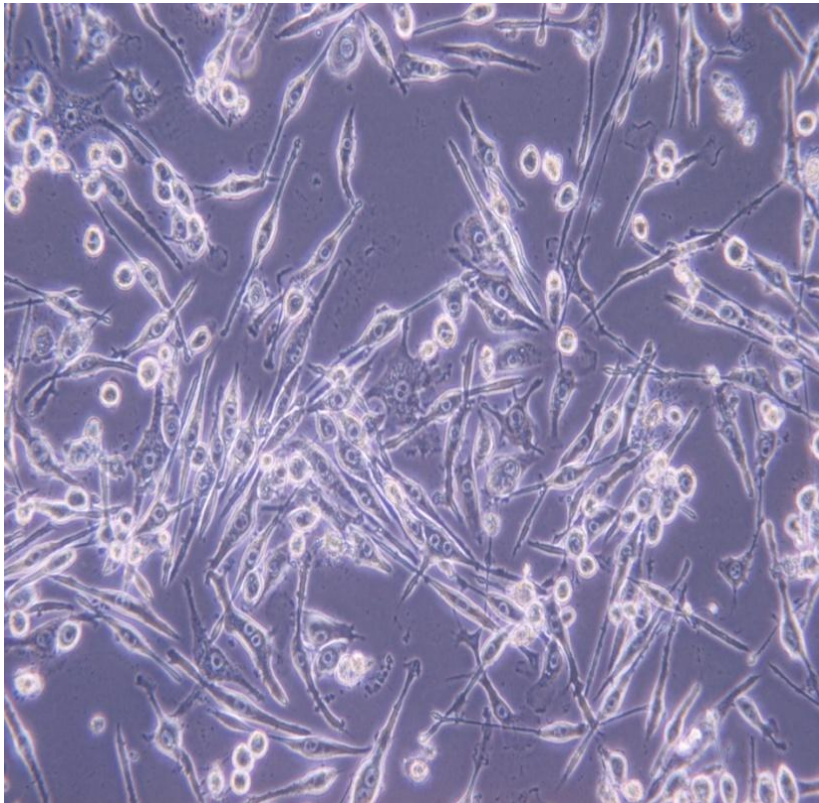
Membrana na kojoj se nalaze proteini inkubira se sa protutijelima obilježenim biotinom i streptavidinom konjugiranim s peroksidazom koja razgrađuje supstrat. Nakon razgradnje supstrata luminol/jodofenol, proteini postaju vidljivi. Nakon izlaganja membrane na film bilježi se kemiluminiscentni signal. Vrijeme ekspozicije bilježi se od nekoliko sekundi do 30 minuta.

#### 4. REZULTATI

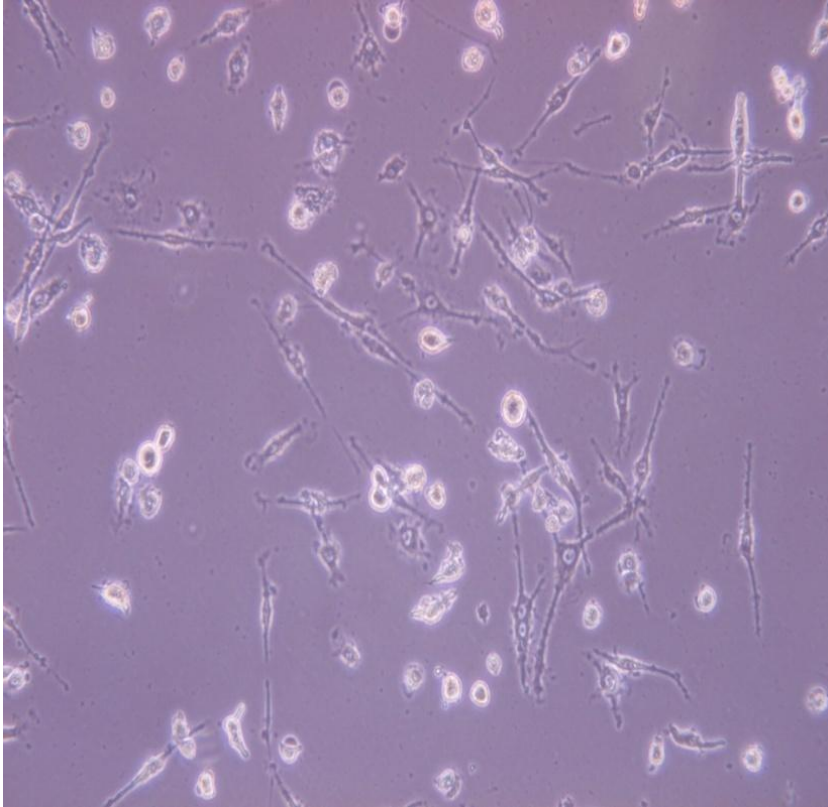


**Slika 6: Reprezentativni uzorci blotova mjerenja razine ekspresije parametra oksidacijskog stresa (iNOS) BV – 2 mikroglia stanica tretiranih celastrolom te izloženih uvjetima hipoksije tijekom 6 sati**

Nakon izlaganja BV – 2 mikroglia stanica tretiranih celastrolom uvjetima hipoksije tijekom 6 sati, učinjena je Western blot analiza ekspresije pokazatelja oksidativnog stresa (iNOS). Temeljem rezultata prikazanih na Slici 6, evidentno je da izlaganje BV – 2 stanica mikroglije tretirane celastrolom dovodi do smanjenja ekspresije iNOS – a, kao pokazatelja izloženosti oksidacijskom stresu.



**Slika 7: Mikroskopski prikaz kontrolne skupine BV – 2 mikroglia stanica nakon izlaganja uvjetima hipoksije u trajanju od 6 sati**



**Slika 8: Mikroskopska analiza BV – 2 mikroglia stanica tretiranih celastrolom nakon izlaganja uvjetima hipoksije u trajanju od 6 sati**

## 5. RASPRAVA

U posljednje vrijeme kod traženja mogućnosti liječenja neurodegenerativnih bolesti i oštećenja postoji tendencija da se pronađu načini liječenja koji bi mogli kontrolirati patofiziološke mehanizme koji kao posljedicu imaju razvitak upalnog odgovora ili oksidacijskog stresa. U tim istraživanjima svoju ulogu su pronašle i mikroglija stanice koje u patološkim stanjima mogu imati dvojak ulogu. S jedne strane mogu doprinijeti očuvanju neurona dok s druge strane mogu postati neurotoksične te prouzročiti nepopravljivu štetu na ljudskom mozgu. Aktivirane mikroglija stanice osim proupalnih faktora otpuštaju i kisikove slobodne radikale te dušikov oksid (NO). Poznato je da je NO uključen u različite procese upala u CNS -u, a ključni enzim za njegovu produkciju je iNOS. Ovaj enzim se u velikoj mjeri inducira od mikroglija stanica aktiviranih pod različitim uvjetima kao što su virusne infekcije, stimulacije LPS – om ili uvjeti hipoksije. Iz tog razloga, tvari koje posjeduju sposobnost inhibiranja ekspresije iNOS se proučavaju kao potencijalno korisne u liječenju stanja u kojima dolazi do visokih produkcija NO, uključujući septički šok, upale i neurodegenerativne bolesti.

U ovom istraživanju proučavali smo celastrol, prirodni sastojak biljke *Tripterygium wilfordii Hook.*, kao potencijalni inhibitor aktivacije mikroglija stanica, a posljedično tome i njegova antioksidacijska svojstva. Aktivacija mikroglija stanica postignuta je uvjetima hipoksije kroz 6 sati. Iz rezultata dobivenih Western blot analizom, prikazanih na slici 6, vidljivo je da mikroglija stanice koje su bile tretirane celastrolom prikazuju smanjenu indukciju iNOS enzima za razliku od stanica koje nisu bile tretirane celastrolom. Objašnjenje rezultata proizlazi iz mikroskopske analize



mikroglia stanica prikazanih na slikama 7 i 8. Iz tih rezultata vidljivo je da dolazi do smanjenja broja, ali i do promjena u morfologiji mikroglia stanica tretiranih celastrolom, nakon uvjeta hipoksije u odnosu na kontrolnu skupinu.

Dobiveni rezultati smanjenja indukcije iNOS enzima pod utjecajem celastrola u skladu su sa rezultatima dobivenih u istraživanju Yong i suradnika, koji su za aktivaciju BV - 2 mikroglia stanica upotrijebili stimulaciju LPS – om. Njihovi rezultati također ukazuju na smanjenje produkcije NO, te smanjenje ekspresije iNOS što ukazuje na to da inhibicijom ekspresije iNOS pod utjecajem celastrola posljedično dolazi i do inhibicije stvaranja NO.(43,48) Reaktivni kisikovi spojevi su male i visoko reaktivne molekule koje u stanicama imaju važnu signalnu ulogu ukoliko se nalaze u umjerenim koncentracijama. Ukoliko se stanice nalaze pod stresom, koncentracije ROS – a se mogu značajno povisiti što posljedično dovodi do oksidacije lipida ili proteina rezultirajući stvaranjem oksidativnog stresa. Lei Gu i suradnici su dokazali da celastrol može inhibirati oksidirani lipoprotein niske gustoće (oxLDL) koji izaziva produkciju ROS – a kod makrofaga. Dobiveni rezultati govore u prilog njegovim antioksidacijskim svojstvima te mogućnostima smanjenja oksidacijskog stresa.(43) Celastrol se pokazao i kao učinkovit inhibitor puteva djelovanja NF –  $\kappa$ B, što može doprinijeti u liječenju raznih upalnih bolesti kao što je ulcerozni kolitis. Smanjenjem produkata lipidne peroksidacije (malondialdehida i 4 – hidroksinonenala) te povećavajući koncentracije antioksidansa (smanjujući glutathione, glutathione – S – transferazu i superoksid dismutazu) celastrol se pokazao kao učinkovito sredstvo u sprječavanju DSS (natrijev dekstran sulfat) induciranog oksidativnog stresa.(49) U prilog tome govori i istraživanje Zhanga i suradnika koji su istraživali utjecaj celastrola na moždani udar kod štakora. Dokazali su da ukoliko se celastrol primjeni intraperitonealno odmah nakon moždanog udara može drastično smanjiti nastajanje

štete na neuronima te regulirati ekspresiju parametara p – JNK, p-c-Jun i NF – κB. Celastrol se pokazao kao potencijalno protektivno sredstvo kod moždanog udara, sprječavajući posljedični upalni odgovor i oksidativni stres.(50)

Nakamichi i suradnici su proučavali efekte celastrola na morfološke i transkripcijske odgovore kod MG6 linije mikroglija stanica. Dokazano je da prisutnost celastrola inhibira morfološke promjene te smanjuje ekspresiju proupalnih citokina i kemokina. Rezultati govore u prilog tome da celastrol inhibira morfološke i transkripcijske odgovore, te na taj način posljedično potiskuje aktivaciju mikroglija stanica.(51)

Iz svega iznesenog, evidentno je da celastrol na temelju svojih protuupalnih i antioksidacijskih svojstava može doprinijeti inhibiranju mnogih stanica i signalnih puteva u tijelu, pa tako i inhibiciji aktivacije mikroglija stanica, što u konačnici može rezultirati smanjenjem oksidativnog stresa.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U uvjetima *in vitro* hipoksije dolazi do promjene morfologije i broja mikroglia stanica
2. Promjena morfologije i pojačana ekspresija iNOS-a pokazatelji su oksidacijskog stresa stanice
3. Celastrol smanjuje ekspresiju iNOS-a i oksidacijski stres BV-2 mikroglia stanica.

## 7. LITERATURA

1. A. Fortuno, G. San Hose, M. U. Moreno, J. Diez, G. Zalba. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol* 2005; 90: 457-462
2. N. Gadoth, H. Hilmar Gobel. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Humana Press 2011.
3. A. Riccio, R. S. Alvania, B. E. Lonze. A nitric oxide signaling pathway controls CREB mediated gene experssion in neurons. *Mol Cell*. 2006;21-283-294
4. J. M. Mates, F. Sanchez – Jimenez. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4:339-45
5. J. T. Curnutte, B. M. Babior. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* 1987;16:229-45
6. A. Tenderich. What is Oxidative Stress? Healthline 2008.
7. S. Aid, S. H. Choi, C. D. Toscano, F. Bosetti. Dinstinct Roles of Cyclooxygenase -1 and Cyclooxygenase – 2 in Inflammatory and Excitotoxic Brain Injury. Humana Press 2011.
8. L. Cominacini, A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. L. Tosetti. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL reveptor-1in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2000; 275:12633-12638
9. J. M. McCord. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-9

10. B. H. Trachtenberg, J. M Hare. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Failure Clinics* 2009;5:561-577
11. Frank J. Kelly. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2003;60:612-616
12. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidčić, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 2007;43:84-93
13. I. A. Buhimschi, C. Buhimschi, M. Pupkin, C. P. Weiner. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:181-8
14. W. L. Dawson, T. M. Dawson, E.D. London, D. S. Bred, S. H. Snyder. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6368-6371
15. D. Craig Hooper, M. J. Fabis, A. Roy. *Free Radicals in Central Nervous System Inflammation*. Humana Press 2011.
16. P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard. The blood brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004;16:1-13
17. J. S. Liu, M. L. Zhao, C. F. Brosnan, S. C. Lee. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesion. *Am J Pathol*. 2001;158:2057-66
18. J. D. Lambeth, T. Kawahara, B. Diebold. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:319-31

19. A. Denicola, B. A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333:49-58
20. D. Miljkovic, V. Trajkovic. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin 17. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:21-32
21. G. C. Brown. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 2007;35;1119-21
22. C. T. Chen, J. T. Green, S. K. Orr, R. P. Bazinet. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008;79:85-91
23. F. Mailly, P. Marin, M. Israel, J. Growinski, J. Premont. Increases in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 1999;73:1181-88
24. M. Judaš, I. Kostović. *Temelji neuroznanosti.* Hrvatski institut za istraživanje mozga, 2013.
25. P. del Rio – Hortega. *Microglia. Cytology and cellular pathology of the nervous system.* 1932.
26. S. H. Chen, E. A. Oyarzabal, Y. F. Sung, C. H. Chu, Q. Wang, S. L. Chen, R. B. Lu, J. S. Hong. Microglial Regulation of Immunological and Neuroprotective Functions of Astroglia. *Glia* 2015;63:118-131
27. H. Kettenmann, U. K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky. *Physiology of Microglia.* *Physiol Rev.* 2011; 91: 461-553

28. P. N. Monk, P. J. Shaw. ALS: life and death in a bad neighborhood. *Nature Medicine* 2006;12:885-887
29. A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, F. Helmchen. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005;308:1314-1318
30. U. K. Hanisch, T. V. Johnson, J. Kipnis. Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci* 2008;31:176-182
31. C. Boucsein, R. Zacharias, K. Farber, S. Pavlovic, U. K. Hanisch, H. Kettenmann. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 2003;17:2267-2276
32. F. Bianco, E. Pravettoni, A. Colombo, U. Schenk, T. Moller, M. Matteoli, C. Verderio. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 $\beta$  release from microglia. *J Immunol* 2005;174:7268-7277
33. S. Boridy, G. M. Soliman, D. Maysinger. Modulation of inflammatory signaling and cytokine release from microglia by celastrol incorporated into dendrimer nanocarriers. *Nanomedicine* 2012;7:1149-65
34. U. K. Hanisch, H. Kettenmann. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007;10:1387-1394
35. P. Wieghofer, K. P. Knobloch, M. Prinz. Genetic Targeting of Microglia. *Glia* 2015;63:1-22
36. A. Asai, N. Tanahashi, J. H. Qui. Selective proteosomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:705-10

37. H. S. Chun, G. E. Gibson, L. A. DeGiorgio. Dopaminergic cell death induced by MPP (+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem* 2001;76:1010-21
38. R. L. Miller, M. James Kracke, G. Y. Sun. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2009;34:55-65
39. X. L. Tao, Y. Sun. Prospective, controlled, double-blind crossover trial of T2 (polyglycosides extracted from *Tripterygium wilfordii* Hook F) in the treatment of rheumatoid arthritis. *Chin J Med* 1987;26:399-402
40. A. M. Brinker, I. Raskin. Determination of triptolide in root extracts of *Tripterygium wilfordii* by solid-phase extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 2005;1070:65-70
41. A. C. Allison, R. Cacabelos, V. R. M. Lombardi, X. A. Alvarez, C. Vigo. Central Nervous System Effects of Celastrol, a Potent Antioxidant and Anti-inflammatory Agent. *Neva Press* 2000;6:45-62
42. Z. H. Ying, W. H. Zhu. *Natural Products R. & D.* 1991;3:17-21
43. L. Gu, W. Bai, S. Li, Y. Zhang, Y. Han, Y. Gu, G. Meng. Celastrol Prevents Atherosclerosis via Inhibiting LOX-1 and Oxidative Stress. *Plos One* 2013;
44. R. A. Floyd. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:236-45
45. S. Der Sarkissian, J. F. Cailhier, M. Borie, L. M. Stevens. Celastrol protects ischaemic myocardium through a heat shock response with up-regulation of haeme oxygenase-1. *British J of Pharmacology* 2014;171:5265-5279



46. S. Boridy. Nanocarriers to modulate glial cell responses in neurological disorders. McGill University, Montreal, 2013.
47. S. D. Westerheide, J. D. Bosman, B. N. A. Mbadugha, T. L. A. Kawahara, S. Kim. Celastrols as Inducers of the Heat Shock Response and Cytoprotection. *J Biol Chem* 2004;279:56053-56060
48. H. W. Yung, Y. S. Chung, Y. S. Kim, Y. K. Park. Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *Exp Mol Med* 2007;39:715-721
49. M. E. Shaker, S. A. Ashamalla, M. E. Housen. Celastrol ameliorates murine colitis via modulating oxidative stress, inflammatory cytokines and intestinal homeostasis. *Chem Biol Interac* 2014;210:26-33
50. X. Zhang, Y. Li, D. He, Z. Liu, L. Dong. Protective effect of celastrol in rat cerebral ischemia model: down-regulating p-JNK, p-c-Jun and NF –  $\kappa$ B. *Brain Res.* 2012;1464:8-13
51. K. Nakamichi, H. Kitani, M. Takayama-Ito, K. Morimoto, I. Kurane, M. Saijo. Celastrol suppresses morphological and transcriptional responses in microglial cells upon stimulation with double-stranded RNA. *Int J Neurosci.* 2010;120:252-257

## 8. PRILOZI

### 8.1. POPIS KRATICA

ROS (eng. *Reactive oxygen species*) – reaktivni kisikovi spojevi

RNS (eng. *Reactive nitrogen species*) – reaktivni dušikovi spojevi

NF –  $\kappa$ B – nuklearni faktor kapa B

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

NOS (eng. *Nitric oxide synthase*) – sintetaza dušikovog oksida

nNOS – nuklearna sintetaza dušikovog oksida

eNOS – endotelna sintetaza dušikovog oksida

iNOS – inducibilna sintetaza dušikovog oksida

CNS (eng. *Central nervous system*) – središnji živčani sustav

NO – dušikov (II) oksid

NO<sub>2</sub> – dušikov (IV) oksid

PMN – polimorfonuklearne stanice

Nox2 – NADPH oksidaza 2

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

MPO – mijeloperoksidaza

IFN - g - interferon gama

NK – natural killer stanice

IL – interleukin

TNF –  $\alpha$  (eng. *Tumor necrosis factor alpha*) – faktor nekroze tumora - alfa

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline

ATP – adenzin trifosfat

LPS – lipopolisaharid

HSP – heat shock protein

HSR – heat shock odgovor

HSF – heat shock faktor

## 8.2. POPIS SLIKA

Slika 1: Prikaz utjecaja slobodnih radikala na zdravu stanicu .....	2
Slika 2: Poremećaji uvjetovani oksidacijskim stresom .....	2
Slika 3: Aktivacija mikroglija stanica .....	7
Slika 4: Kemijska struktura celastrola, $R_1 = - OH$ i $R_2 = - COOH$ .....	13
Slika 5: Osnovni koncept neuralne upale.....	14
Slika 6: Reprezentativni uzorci blotova mjerenja razine ekspresije parametra oksidacijskog stresa (iNOS) BV – 2 mikroglija stanica tretiranih celastrolom te izloženih uvjetima hipoksije tijekom 6 sati.....	21
Slika 7: Mikroskopski prikaz kontrolne skupine BV – 2 mikroglija stanica nakon izlaganja uvjetima hipoksije u trajanju od 6 sati .....	22
Slika 8: Mikroskopska analiza BV – 2 mikroglija stanica tretiranih celastrolom nakon izlaganja uvjetima hipoksije u trajanju od 6 sati .....	23

## 8.3. POPIS TABLICA

Tablica 1: Vrste receptora na površini mikroglija stanica .....	9
---	---

## 8.4. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Sara Bulić

Ime oca i majke: Zlatko, Rina

Datum rođenja: 29. veljače 1992.

Mjesto rođenja: Pula, RH

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Bračno stanje: Neudata

Adresa: Benići 47/A, Pićan, Istra

### Školovanje

1998. – 2002. Osnovna škola Vladimir Nazor Potpićan, područna škola Sveta Katarina

2002. – 2006. Osnovna škola Vladimir Nazor Potpićan

2006. – 2010. Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile Pazin, opća gimnazija

2010. – 2013. Medicinski fakultet – Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2013. – 2015. – Medicinski fakultet – Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva