

# Utjecaj epigalokatehin-3-galata na staničnu smrt izazvanu okadaičnom kiselinom

---

Kopčok, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:119064>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Vedrana Kopčok

**Utjecaj epigalokatehin-3-galata na staničnu smrt izazvanu  
okadaičnom kiselinom**

Diplomski rad

Zagreb, 2015

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića, dr. med., predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem mentoru Goranu Šimiću na strpljenju, razumijevanju i stručnom vodstvu za vrijeme izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem i Mirjani Babić na vodstvu u eksperimentalnom radu, silnom strpljenju, korisnim savjetima, prijateljskoj atmosferi u zajedničkom radu i podršci u pisanju rada.*

*Zahvaljujem Ingi Marijanović na stručnom vodstvu, ljubaznosti i susretljivosti prilikom pisanja diplomskog rada*

*Hvala mojim prijateljima i kolegama koji su studij učinili lakšim i zabavnijim.*

*Hvala mojoj obitelji na razumijevanju i podršci tijekom studija.*

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Utjecaj epigalokatehin-3-galata na staničnu smrt izazvanu okadaičnom kiselinom**

Vedrana Kopčok

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Okadaična kiselina je selektivni inhibitor serin/treonin fosfataza (PP1 i PP2A) koje kataliziraju defosforilaciju tau proteina i pojačava ekspresiju gena *cdk5* i *p25*. Cdk5 inhibira fosfataze i time inducira hiperfosforilaciju tau proteina. Okadaična kiselina potiče tau patologije gotovo identičnu onoj kod Alzheimerove bolesti (AB) *in vivo* i *in vitro*. Epigalokatehin-3-galat (EGCG) je flavonoid iz skupine flavonola. Nalazimo ga u zelenom čaju i u brojnim *in vitro* pokusima su dokazana njegova neuroprotektivna svojstva. EGCG je antioksidans i ima protuupalna svojstva, a novija istraživanja pokazuju da je uključen u nekoliko neuroprotektivnih staničnih mehanizama. Cilj ovog rada je bio ustanoviti može li EGCG obustaviti staničnu smrt potaknutu okadaičnom kiselinom na modelu neuroblastomskih SH-SY5Y stanica i neurona dobivenih njihovom diferencijacijom. Utvrđeno je da EGCG u predtretmanu ili kotretmanu s okadaičnom kiselinom može zaustaviti njezino neurotoksično djelovanje neuroblastomske SH-SY5Y stanice i neurone dobivene njihovom diferencijacijom.

(39 stranica, 15 slika, 3 tablice, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** Alzheimerova bolest, fosforilacija tau proteina, EGCG

**Voditelj:** dr. sc. Goran Šimić, dr. med., red. prof.

**Suvoditelj:** dr. sc. Inga Marijanović, doc.

**Ocjenitelji:** dr. sc. Inga Marijanović, doc.

dr.sc. Martina Šeruga Musić, doc.

dr. sc. Ivana Ivančić Baće, doc.

**Rad prihvaćen:** 18.02.2015.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

## **Influence of epigallocatechin-3-gallate on okadaic acid-induced cell death**

Vedrana Kopčok

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Okadaic acid is a selective inhibitor of serine/threonine phosphatases (PP1 and PP2A) that catalyze dephosphorylation of tau protein and induce cdk5 and p25 (first write in full) expression. Cdk5 inhibits phosphatases and induces hyperphosphorylation of tau protein. Okadaic acid induces pathological changes of tau protein *in vivo* and *in vitro* in a way similar to that seen in Alzheimer's disease (AD). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is flavonoid found in green tea and is considered as one of the potentially neuroprotective agents for AD. EGCG is antioxidant and anti-inflammatory agent, and recent studies showed that it has several neuroprotective mechanisms of action. The aim of this work was to find out if EGCG can stop cell death induced by okadaic acid in neuroblastoma cell line SH-SY5Y and neurons derived therefrom. We have shown that EGCG pre-treatment and co-treatment with okadaic acid can decrease okadaic acid toxicity neuroblastoma SH-SY5Y cells and neurons differentiated therefrom.

(39 pages, including 11 figures, 3 tables, 42 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

**Key words:** Alzheimer's disease, tau phosphorylation, EGCG

**Supervisor:** dr. sc. Goran Šimić, dr. med., prof.

**Assistant supervisor:** dr. sc. Inga Marijanović, Asst. Prof.

**Reviewers:** dr.sc. Inga Marijanović, Asst.Prof.

dr.sc. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

dr.sc. Ivana Ivančić Baće, Asst. Prof.

**Thesis accepted:** 18.02.2015.

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Alzheimerova bolest.....	1
1.2. Genetička pozadina Alzheimerove bolesti .....	2
1.2.1. Obiteljski oblik bolesti .....	2
1.2.2. Sporadični oblik bolesti.....	2
1.3. Biološki biljezi Alzheimerove bolesti .....	3
1.3.1. Amiloid $\beta$ .....	3
1.3.2. Tau protein .....	4
1.3.3. Kombinacija bioloških biljega za ranu dijagnozu .....	6
1.4. Simptomi Alzheimerove bolesti .....	6
1.4.1. Presimptomatska faza .....	6
1.4.2. Rana faza .....	6
1.4.3. Simptomatska faza .....	6
1.5. Liječenje Alzheimerove bolesti .....	7
1.6. Neuroprotektivni učinci epigalokatehin-3-galata u Alzheimerovoj bolesti .....	8
2. Cilj istraživanja .....	11
3. Materijali i metode .....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Stanična kultura.....	12
3.1.2. Hranjivi medij .....	12
3.1.3. Otopine .....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Uzgoj stanica .....	13
3.2.2. Odmrzavanje stanica .....	14
3.2.3. Održavanje stanične kulture .....	14
3.2.4. Brojanje stanica .....	14

3.2.5.	Dizajn eksperimenta .....	15
3.2.6.	MTT test .....	16
3.3.	Statistička analiza .....	17
4.	Rezultati .....	18
4.1.	Vijabilnost SH-SY5Y stanica .....	18
4.2.	Vijabilnost neurona .....	20
5.	Rasprava .....	23
6.	Zaključci .....	26
8.	Literatura .....	27
9.	Životopis .....	31



## **Popis kratica**

**AB:** Alzheimerova bolešt

**A $\beta$ :** amiloid  $\beta$

**ACh:** acetilkolin

**Akt:** Protein kinaza B

**APP:** Prekursor amiloidnog proteina (od eng. *Amyloid Precursor Protein*)

**BDNF:** od eng. *Brain-derived neurotrophic factor*

**DMSO:** Dimetil-sulfoksid

**EGCG:** epigalokatehin-3-galat

**FBS:** Serum goveđeg fetusa (od eng. *Fetal bovine serum*)

**GSK-3 $\beta$ :** Kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$

**L-glut:** L-glutamin

**MRI:** magnetska rezonanca

**NMDA :** N–metil–D–aspartat

**Pen/strep:** penicilin/streptomycin

**PET:** pozitronska emisijska tomografija

**ROS:** reaktivnie kisikovie čestice (od eng. *Reactive oxygen species*)

# 1. Uvod

## 1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest i najčešći je tip demencije (60-80%). Demencija je pojam koji obuhvaća različite bolesti i stanja do kojih dolazi uslijed nepravilnog funkcioniranja ili odumiranja neurona. Nepravilno funkcioniranje ili odumiranje neurona dovodi do promjena u pamćenju, ponašanju i razmišljanju. Kod AB, promjene na mozgu u konačnici mogu dovesti do nemogućnosti obavljanja osnovnih tjelesnih funkcija, kao što su govor, hodanje, gutanje, itd. te AB u konačnici dovodi do smrti (Thies *i sur*, 2013).

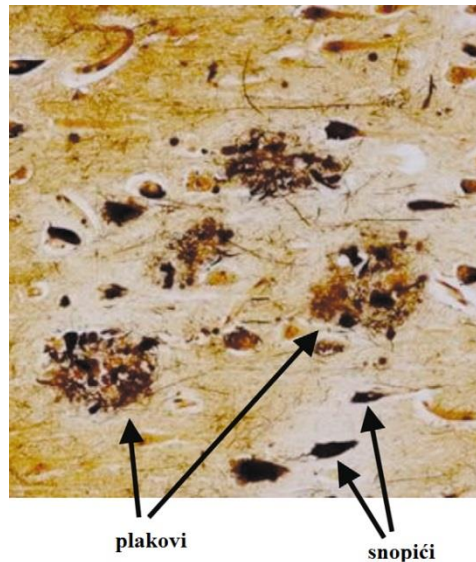
Broj pacijenata s AB i drugim tipovima demencije se drastično povećao u zadnjih nekoliko desetljeća. Otprilike 14 milijuna ljudi u Europi i SAD-u boluje od AB, a 40% ih čini populacija starija od 85 godina (Hort *i sur*, 2010).

Najveći faktor rizika je starenje, ali isto tako u faktore rizika se ubraja ozljeda glave koja može dovesti do stvaranja senilnih plakova, vaskularne bolesti kao što su visoki krvni tlak, arterioskleroza, koronarne bolesti srca, pušenje, pretilost i dijabetes. Nastanak AB može biti povezan i sa smanjenom veličinom mozga, postignutim obrazovanjem, slabijom mentalnom sposobnosti u ranijoj životnoj dobi. Različiti okolišni faktori mogu povećati rizik od pojave sporadičnog oblika bolesti (Blennow *i sur*, 2006).

Patološke promjene AB započinju u temporalnom (slijepoočnom) režnju mozga (točnije u hipokampusu i entorinalnim korteksu) čak i desetljećima prije pojave prvih kliničkih simptoma i postepeno se šire na područje neokorteksa (De Leon *i sur*, 1993). AB napreduje kroz 3 faze: a) presimptomatska ili pretklinička faza, b) rana faza s promjenama u epizodičkom semantičkom pamćenju, i c) simptomatska faza koja uključuje demenciju (Dubois *i sur*, 2007).

Do sada je proučavano nekoliko različitih mehanizama koji dovode do nastanka AB koji uključuju prekomjerno stvaranje amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ ) uz nastanak senilnih plakova, hiperfosforilaciju tau proteina i stvaranje snopića, neurovaskularnu disfunkciju, nepravilnosti staničnog ciklusa, upalne procese, oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija, a kao centralne hipoteze prihvaćene su amiloidna hipoteza i tau hipoteza (Blennow *i sur*, 2006).

Dvije neuropatološke karakteristike pacijenata oboljelih od AB su izvanstanični plakovi amiloida  $\beta$  i unutarstanični neurofibrilarni snopići koje čini hiperfosforilirani tau protein (**Slika 1.**). Te dvije vrste molekula su najpouzdaniji biološki biljezi Alzheimerove bolesti (Lewczuk *i sur*, 2014).



**Slika 1.** Izvanstanični plakovi amiloida  $\beta$  i unutarstanični neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog tau proteina u mozgu. Preuzeto iz Blennow *i sur*, 2006.

## 1.2. Genetička pozadina Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest javlja se u dva oblika, a oba imaju gotovo identičnu kliničku sliku: sporadični oblik koji obično nastaje nakon 65. godine života i obiteljski oblik koji se vrlo često javlja i prije 65. godine (Harvey *i sur*, 2003).

### 1.2.1. Obiteljski oblik bolesti

Ovaj oblik bolesti povezan je s mutacijama u genima za APP (prekursor amiloidnog proteina), PSEN1 (presenilin 1) i PSEN2 (presenilin 2). Presenilini su uključeni u regulaciju procesiranja APP-a jer utječu na  $\gamma$ -sekretazu, jedan od enzima koji cijepa APP. Pretpostavlja se da presenilini ili direktno reguliraju aktivnost  $\gamma$ -sekretaze ili djeluju kao proteaza (Scheuner *i sur*, 1996).

### 1.2.2. Sporadični oblik bolesti

Sporadični tip bolesti povezan je s različitim varijantama gena za apolipoprotein E (APOE) koji sudjeluje u metabolizmu kolesterola. Postoje tri varijante ovog gena,  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  i  $\epsilon 4$ . Najčešći oblik je  $\epsilon 3$  i javlja se u 60% populacije, dok su  $\epsilon 2$  i  $\epsilon 4$  puno rjeđi. Varijanta  $\epsilon 3$  nije povezan s

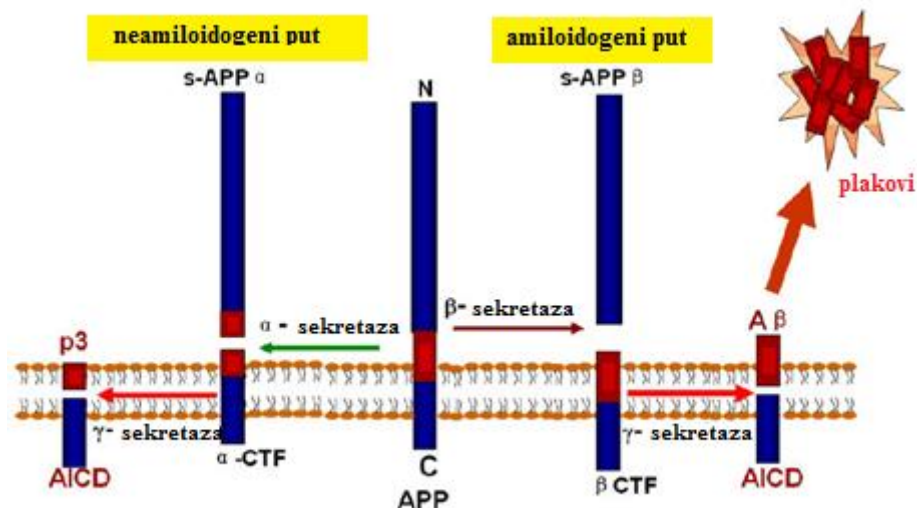
rizikom od nastanka AB, dok prisutnost  $\epsilon 2$  smanjuje rizik od nastanka bolesti (Thies *i sur*, 2013). Prisutnost  $\epsilon 4$  varijante povećava rizik od nastanka bolesti u ranijoj životnoj dobi (Petersen *i sur*, 2010) te potiče fibrilizaciju  $A\beta$  i formiranje senilnih plakova (Braak and Braak, 1991).

Nasljeđivanje APOE  $\epsilon 4$  ne znači da će se kod osobe razviti AB, ali još uvijek određivanje apoE- profila bolesnika, uz ostale dijagnostičke metode predstavlja jedan od elemenata važnih u postavljanju dijagnoze.

### 1.3. Biološki biljezi Alzheimerove bolesti

#### 1.3.1. Amiloid $\beta$

Amiloidni plakovi sastavljeni su od peptida nastalih enzimatskim cijepanjem prekursora amiloidnog proteina (od eng. *Amyloid Precursor Protein*; APP) (Kang *i sur*, 1987). Kod ljudi ovaj transmembranski protein je kodiran genom koji se nalazi na 21. kromosomu, a alternativnim cijepanjem može nastati barem 8 različitih formi. U mozgu dominira APP695, oblik koji sadrži 695 aminokiselina. Točna fiziološka uloga APP-a još uvijek nije poznata, pretpostavlja se da sudjeluje u međustaničnim interakcijama. Enzimatsko procesiranje APP-a započinje  $\beta$ -sekretaza, nakon toga  $\gamma$ -sekretaza što dovodi do oslobađanja nekoliko formi amiloida  $\beta$ . APP može procesirati i  $\alpha$ -sekretaza tzv. neamiloidogenim putem jer tada nastaje topivi  $APP\alpha$ , ali ne i amiloid  $\beta$  (Slika 2.) (Lewczuk *i sur*, 2014).



Slika 1. Put proteolitičkog procesiranja APP-a. Preuzeto iz Zhang i Saunders, 2009.

Dosadašnje studije pokazale su da je kod osoba oboljelih od AB u uzorcima cerebrospinalne tekućine pronađena smanjena koncentracija  $A\beta$  koji na C-terminusu završava na 42. poziciji

(A $\beta$ 42). Točan mehanizam još uvijek nije razjašnjen, a pretpostavlja se da do smanjenja dolazi zbog ugradnje A $\beta$ 42 u amiloidne plakove (Sjögren *i sur*, 2001).

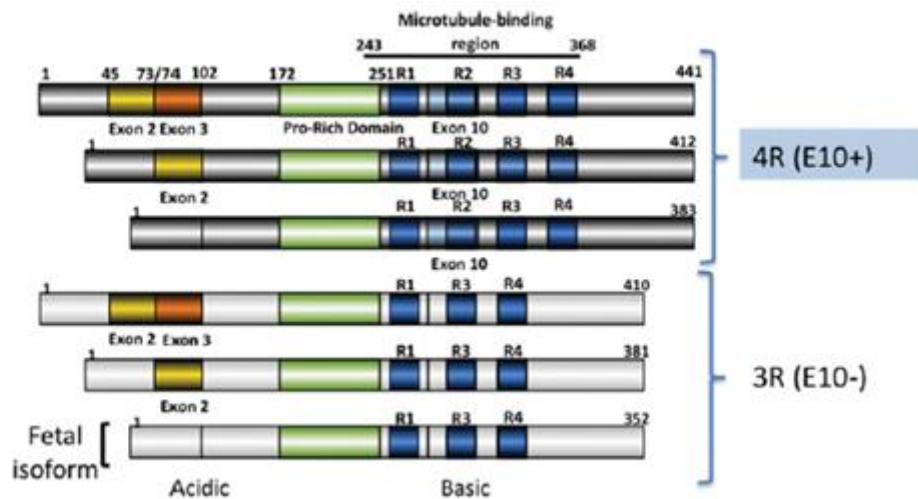
### 1.3.2. Tau protein

Tau proteini pripadaju skupini proteina povezanih s mikrotubulima (od eng. *Microtubule-Associated Protein; MAP*), a nalaze se u svim vrstama stanica. Tau protein potiče sklapanje mikrotubula, a fosforilacija tau proteina ima važnu ulogu u njegovoj interakciji s mikrotubulima te dovodi do odvajanja tau proteina od mikrotubula (Hanger *i sur*, 2014). Ljudski gen za tau protein (MAPT) nalazi se na dugačkom kraku 17. kromosoma, a u mozgu postoji u 6 izoformnih oblika koji nastaju alternativnim cijepanjem (Buée *i sur*, 2010). Primarna sekvenca proteina građena je od N-terminalne regije na koju se nastavlja prolinom bogata domena, zatim ponavljajući elementi za vezanje na mikrotubule i na kraju C-terminalni kraj (**Slika 3.**).

N-terminalana regija i domena bogata prolinom zajedno se nazivaju projekcijska domena. Ta nestrukturirana i negativno nabijena regija stupa u interakciju s plazmatskom membranom ili proteinima citoskeleta. C-terminalnu regiju karakterizira prisutnost tri (3R) ili četiri (4R) ponavljajuća motiva za vezanje mikrotubula i naziva se još i domena za vezanje mikrotubula (Buée *i sur*, 2000).

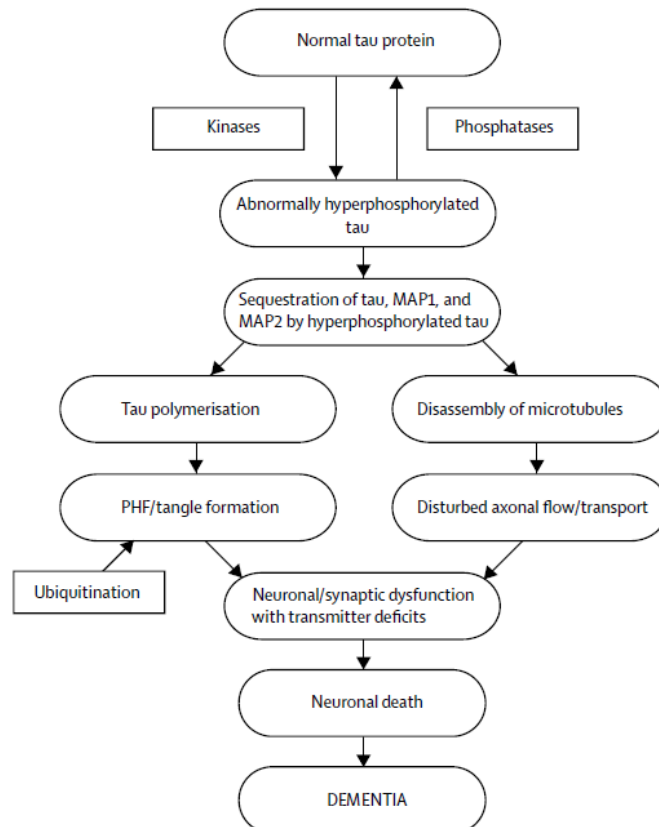
Postoji 85 potencijalnih mjesta fosforilacije tau proteina, ali ih samo 71 može biti fosforilirano pri fiziološkim ili patološkim uvjetima. Većina fosforilacijskih mjesta okružuje domenu za vezanje mikrotubula. Kada je fosforiliran, tau protein ne može polimerizirati  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin u mikrotubule niti ih može stabilizirati (Iqbal *i sur*, 2005).

Kod osoba oboljelih od AB u uzorcima cerebrospinalne tekućine su pronađene povišene koncentracije hiperfosforiliranog Tau proteina na treoninima 181, 199 i 231 (pTau181, pTau199 i pTau231) (Lewczuk *i sur*, 2014).



Slika 2. Izoforme tau proteina. Preuzeto iz Buée i sur, 2010.

Fosforilacija tau proteina regulirana je aktivnošću oko 20 kinaza, uključujući GSK-3 $\beta$  i CDK5 i fosfataza, PP1 i PP2A. Hiperfosforilacija tau proteina dovodi do raspadanja mikrotubula, zbog čega prestaje aksonalni transport, a to narušava funkciju neurona i sinapsi. Takav tau protein postaje sklon agregaciji te nastaju netopivi snopići koji dodatno narušavaju funkciju neurona (Slika 4.) (Blennow i sur, 2006).



Slika 3. Shematski prikaz fosforilacije tau proteina i formiranja snopića. Preuzeto iz Blennow i sur, 2006.

### **1.3.3. Kombinacija bioloških biljega za ranu dijagnozu**

Kombinacija pTau181 i A $\beta$ 42 bioloških biljega u uzorcima cerebrospinalne tekućine može pomoći u detekciji AB u vrlo ranoj fazi bolesti kada simptomi nisu izraženi ili ih uopće nema (Zetterberg *i sur*, 2003).

Uz likvorske biološke biljege se u dijagnozi AB dodatno koriste pozitronska emisijska tomografija (PET) te magnetska rezonanca (MRI) (Lewczuk *i sur*, 2014).

Da bi se postavila valjana dijagnoza, liječnik mora poznavati povijest bolesti osobe, ali i obiteljsku povijest bolesti, provesti kognitivne testove, obaviti fizikalne i neurološke preglede te magnetsku rezonancu kako bi se isključila mogućnost tumora ili moždanog udara koji bi mogli objasniti nastale simptome (Thies *i sur*, 2013).

## **1.4. Simptomi Alzheimerove bolesti**

### **1.4.1. Presimptomatska faza**

U ovoj fazi AB kod osobe postoje mjerljive promjene u mozgu i likvoru koje upućuju na rane znakove bolesti, ali još uvijek nema nikakvih simptoma poput gubitak pamćenja. Ova faza odražava ustaljeno mišljenje da promjene u mozgu povezane s AB mogu nastati i 20 godina prije nego što se pojave prvi simptomi bolesti (Babić *i sur*, 2014)

### **1.4.2. Rana faza**

Rana faza karakterizirana je blagim kognitivnim oštećenjima (od eng. *Mild cognitive impairment, MCI*) s promjenama u pamćenju i razmišljanju, ali još uvijek nema utjecaja na mogućnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti. Studije pokazuju da 10% do 20% osoba starijih od 65 godina pokazuje simptome MCI-a, dok samo 15% njih ima toliko izražene simptome zbog kojih potraže liječničku pomoć. Gotovo polovica osoba s MCI-om kroz 3 do 4 godine razviju neki oblik demencije, ali još uvijek nije jasno zašto se kod nekih pacijenata razvije demencija, a kod drugih ne (Petersen *i sur*, 1999).

### **1.4.3. Simptomatska faza**

Demencija nastala kao posljedica Alzheimerove bolesti karakterizirana je promjenama u pamćenju, razmišljanju, ponašanju i onemogućuju osobi funkcioniranje u svakodnevnom životu i obavljanu osnovnih funkcija.

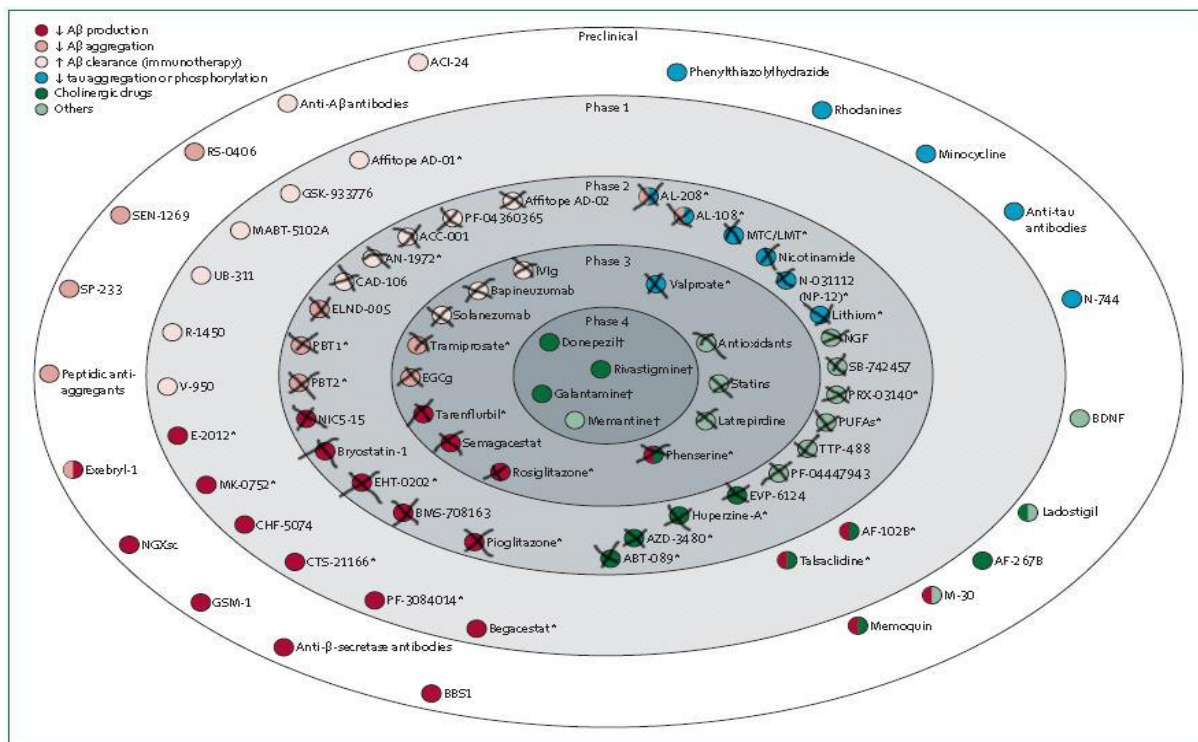
## 1.5. Liječenje Alzheimerove bolesti

Današnje liječenje AB je bazirano na ublažavanju simptoma. Iako je do danas testirano više od 400 lijekova za AB u 858 kliničkih studija, jedva je četvrtina spojeva došla u III fazu kliničkih istraživanja (**Slika 5.**) (Mangialasche *i sur*, 2010). Tacrin, donepezil, galantamin, rivastigmin i memantin su lijekovi koje se koriste u terapiji AB. Tacrin, donepezil, galantamin i rivastigmin su inhibitori acetil – kolinesteraze (AChE). U AB rano stradaju kolinergički neuroni mediobazalnog telencefalona (Terry Jr i Buccafusco, 2003). Budući da acetilkolinski neuroni imaju važnu ulogu u moduliranju aktivnosti moždane kore i talamusa, pozornosti, pamćenju, učenju te procesima budnosti i spavanja, nedostatak acetilkolina (ACh) vodi do smetnji u pamćenju i drugim kognitivnim domenama (Judaš i Kostović, 1997). Ovim lijekovima se nastoji smanjiti uklanjanje ACh iz sinaptičke pukotine, no njihovom upotrebom je zapaženo samo prolazno i kratkotrajno usporavanje demencije i to u ranom stadiju bolesti.

U AB dolazi i do povećane glutamatergičke aktivnosti te posljedično smanjene aktiviranosti N–metil–D–aspartat (NMDA) receptora (Areosa *i sur*, 2005). Memantin je ne kompetitivni antagonist NMDA receptora koji štiti neurone od glutamatne ekscitotoksičnosti. Kao i kod kolinomimetika upotrebom memantina je zapaženo blago smanjenje kognitivnih i bihevioralnih simptoma (Wilcock, 2003)

Današnje lijekove koji se nalaze u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima možemo podijeliti u više skupina; (1) kolinergički lijekovi, (2) anti-amiloidne terapije (lijekovi koji reduciraju produkciju A $\beta$ ; inhibitori  $\beta$ -sekretaze, modulatori i inhibitori  $\gamma$ -sekretaze, aktivatori  $\alpha$ -sekretaze), (3) lijekovi kojima se sprječava agregacija A $\beta$ , (4) lijekovi koji potiču uklanjanje A $\beta$  (aktivna i pasivna imunoterapija), (5) lijekovi koji ciljaju tau protein (inhibicija fosforilacije tau proteina i sprječavanje agregacije tau proteina), (6) lijekovi koji smanjuju disfunkciju mitohondrija, (7) neurotropini (Mangialasche *i sur*, 2010). Od svih navedenih spojeva najveće nade se polažu u imunizaciju A $\beta$ , inhibitore  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze, te inhibitore GSK3 $\beta$  (Shaw *i sur*, 2007).





**Slika 4.** Potencijalni terapeutici Alzheimerove bolesti. Preuzeto iz Mangialasche i sur, 2010.

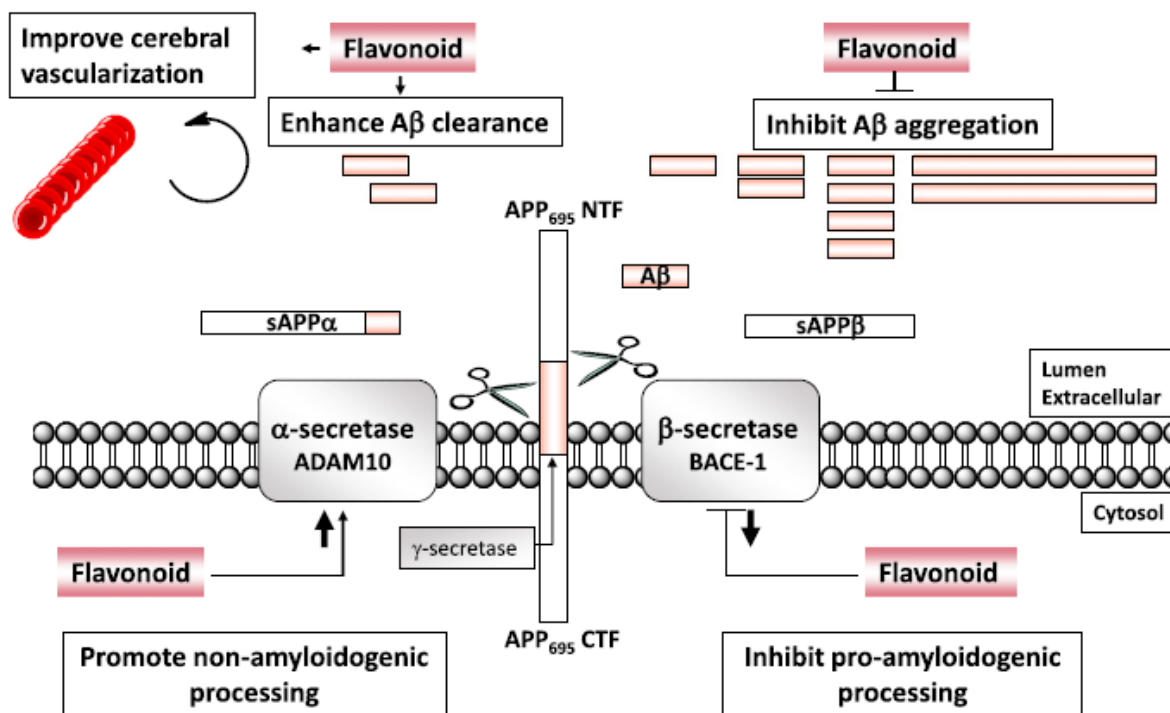
Budući da je AB kompleksni poremećaj, teško je razviti lijek bez neželjenih i toksičnih nuspojava. Veliki problem u pronalasku novih lijekova za AB je nepostojanje dobrog životinjskog modela za proučavanje AB. Također je bitna rana dijagnostika AB jer većina potencijalnih terapeutika djeluje u početku nastanka patoloških promjena u mozgu. S pojavom prvih simptoma bolesti, neurodegeneracija je jako uznapredovala. Vjeruje se da je budućnost liječenja AB više ciljna terapija. Iako se ovaj tip terapije može primjenjivati na više načina, najčešća je aplikacija više različitih lijekova (Hopkins, 2008). Na taj način se već danas zajedno primjenjuju inhibitori AChE i memantin s ciljem ublažavanja simptoma bolesti.

### 1.6. Neuroprotektivni učinci epigalokatehin-3-galata u Alzheimerovoj bolesti

Prehrana je vrlo važan faktor koji može utjecati na nastanak kardiovaskularnih, ali i neurodegenerativnih bolesti. Dokazano je da biljni flavonoidi unešeni hranom ili kao suplementi u prehrani mogu usporiti inicijaciju i/ili napredak AB ili drugih neurodegenerativnih poremećaja (Williams i Spencer, 2012). Flavonoidi štite osjetljive neurone, poboljšavaju njihovu funkciju, stimuliraju regeneraciju neurona i induciraju neurogenezu (Spencer, 2010).

Epigalokatehin-3-galat (EGCG) spada u skupinu flavonola, a nalazi se u zelenom čaju, crvenom vinu i čokoladi. Metabolizam katehina iz zelenog čaja proučavan je u različitim životinjskim modelima i kod ljudi (Pietta *i sur*, 1998).

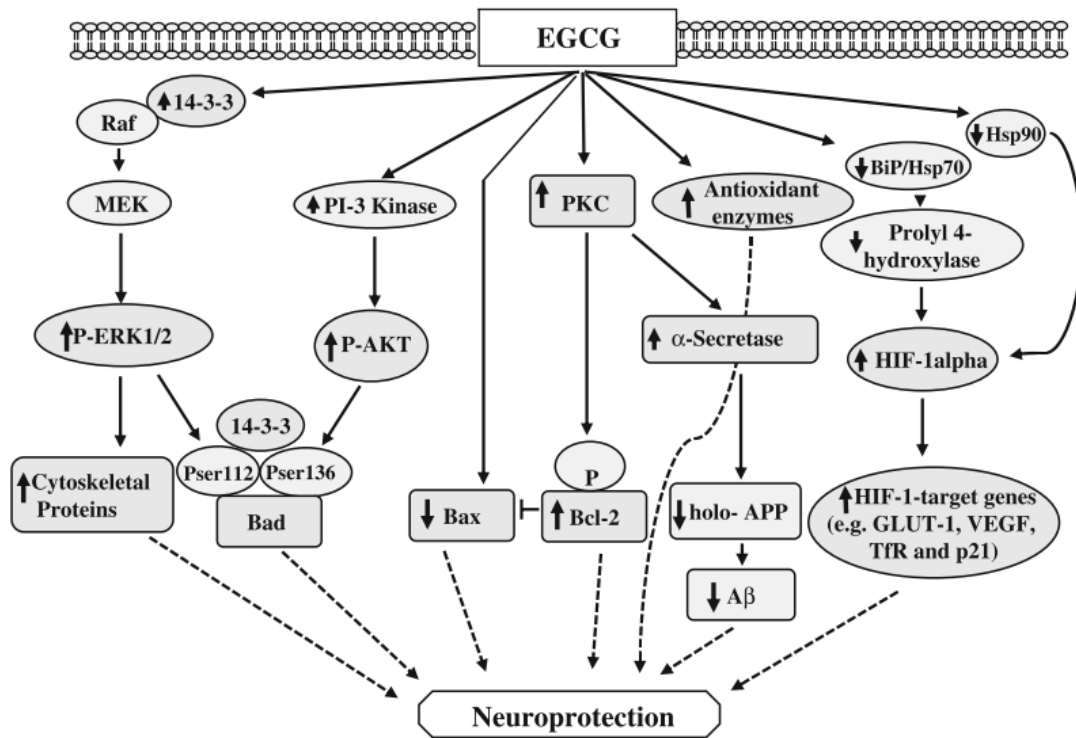
EGCG smanjuje nastanak A $\beta$  tako što potiče aktivnost  $\alpha$ -sekretaze (ADAM10), proteolitičkog enzima koji cijepa prekursore amiloidnih proteina (APP) potičući ne-amiloidogeni put proteolize, a također i inhibira  $\beta$ -sekretazu (BACE-1) i  $\gamma$ -sekretazu koje su odgovorne za agregaciju A $\beta$  (Slika 6.) (Rezai-Zadeh *i sur*, 2008). EGCG inhibira i tau fibrilizaciju i smanjuje već postojeće tau agregate tako što potiče fosforilaciju Akt (protein kinaza B), a time inhibira GSK-3 $\beta$  induciranu tau hiperfosforilaciju (Williams i Spencer, 2012).



Slika 5. Shematski prikaz utjecaja flavonoida na A $\beta$  patologiju. Preuzeto iz Williams i Spencer, 2012.

EGCG štiti i od oksidativnog stresa jer ima sposobnost vezanja reaktivnih kisikovih čestica ili bilo kojih drugih slobodnih radikala, a može i kelirati metalne ione željeza ili bakra u inaktivne komplekse i na taj način dodatno smanjiti nastanak slobodnih radikala. Ionsko željezo sudjeluje u nastajanju reaktivnih vodikovih čestica (ROS) koja aktiviraju kaskadu upalnih reakcija i dovodi do stanične smrti (Slika 7.) (Weinreb *i sur*, 2009).

EGCG utječe na mnoge signalne putove unutar stanice kao što su mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK), protein kinaza c (PKC), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI-3 kinaza) koji potiču preživljenje stanica (**Slika 1.7.**) (Weinreb *i sur*, 2009).



**Slika 6.** Model neuroprotektivnog djelovanja EGCG-a. Preuzeto iz Weinreb *i sur*, 2009.

## **2. Cilj istraživanja**

S obzirom da je dokazano da biljni flavonoidi unešeni hranom ili kao suplementi u prehrani mogu usporiti inicijaciju i/ili napredak AB ili drugih neurodegenerativnih poremećaja (Williams and Spencer, 2012), cilj ovog istraživanja je ustanoviti može li se primjenom epigalokatehin-3-galata obustaviti stanična smrt potaknuta okadaičnom kiselinom na modelu neuroblastomskih SH-SY5Y stanica i neurona dobivenih diferencijacijom SH-SY5Y stanica.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Stanična kultura**

U izradi ovog diplomskog rada korištena je komercijalno dostupna neuroblastomska stanična linija SH-SY5Y (ATCC®CRL-2266™). Ova linija je nastala kloniranjem podlinije neuroblastomske stanične linije SK-N-SH koja je dobivena biopsijom koštane srži četverogodišnje djevojčice oboljele od neuroblastoma (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y). Stanice su morfološki epitelne, a genetički su ženske, odnosno sadrže X i Y kromosome. U kulturi se mogu uzgajati na dva načina, u suspenziji ili adherirane za podlogu.

##### **3.1.2. Hranjivi medij**

Tekući hranjivi medij dobiva se upotpunjavanjem DMEM-a (*Dulbecco's modified Eagle medium*) za uzgoj stanične kulture (Gibco BRL, SAD) do konačnog volumena od 500 ml dodatkom slijedećih sastojaka:

- 10% Fetalni teleći serum (od eng. *Fetal bovine serum*, FBS) – 50 ml
- 2 mM L-glutamin – 5 ml 200 mM izvorne otopine
- Penicilin streptomycin (0.1 mg/ml streptomicina , 100 U/ml penicilina) – 5 ml
- 1% Neesencijalne aminokiseline – 5ml

### 3.1.3. Otopine

Tablica 3.1. Popis i sastav otopina korištenih u izradi ovog diplomskog rada

Otopine	
100 g NaCl 2,5 g KCl 14,35 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O do 1000 ml ph 7,1 – 7,3	Fosfatni pufer (od eng. <i>phosphate buffered saline, PBS</i> )
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red (Gibco)	Tripsin
100 µl 40% Trypan blue 10 ml PBS	Tripanско modriло
5 mg/ml Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide u PBS-u	MTT reagens
1.8 ml DMSO 10 ml DMEM	Medij za smrzavanje

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj stanica

SH-SY5Y neuroblastomske stanice su uzgajane *in vitro* u hranjivom mediju DMEM-u uz dodatak FBS-a, L-glutamina, neesencijalnih aminokiselina, penicilina i streptomicina kako je gore navedeno (potpuni hranjivi medij). Stanice su uzgajane u sterilnim plastičnim T-bocama u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, u atmosferi zasićenoj vlagom. Žive stanice prijanjaju za podlogu, a mrtve plutaju u mediju, što se može uočiti pomoću mikroskopa.

### **3.2.2. Odmrzavanje stanica**

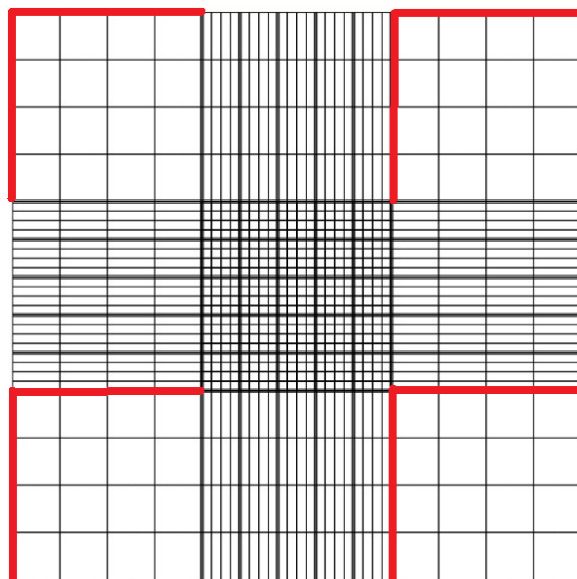
Prije početka pokusa, kriotubice sa stanicama se stave na led da se djelomično otope. Prije nego se potpuno otope, stanice se prebace u Falcon tubicu od 15 ml te se na njih dodaje 10 ml potpunog hranjivog medija. Zatim se stanice centrifugiraju 10 min na 1500 rpm pri 4°C kako bi se stanice odvojile od medija za zamrzavanje. Medij za zamrzavanje sadrži dimetil-sulfoksid (DMSO) otrovan za stanice pri sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u 2 ml hranjivog medija i prebaci u veliku T-bocu za uzgoj stanične kulture, u koju se doda još 13 ml hranjivog medija. Stanice se kultiviraju na 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2.3. Održavanje stanične kulture**

Svakih 2-3 dana, kad stanice potroše hranjive tvari iz podloge, ili ju popune (70-90% konfluentne), mijenja im se tekuća hranjiva podloga, ili ih se presađuje. Konfluentnost stanica se provjerava pod mikroskopom. Prije početka rada sa stanicama, potrebne kemikalije (npr. potpuni hranjivi medij) se zagriju na sobnu temperaturu. Sa stanica se ukloni hranjivi medij staklenom pipetom i dodaje se 5 ml tripsina. Tripsin odvaja stanice od podloge jer cijepa proteinske veze među stanicama, što se provjerava pod mikroskopom. Kada vidimo da su se stanice odlijepile od podloge, tripsin se inaktivira dodavanjem potpunog hranjivog medija. Stanice se isperu s podloge i sakupe u 15 ml potpunog hranjivog medija. Centrifugiraju se 10 minuta na 1500 rpm. Ukloni se supernatant i talog stanica se resuspendira u 2 ml potpunog hranjivog medija. Uzima se 20 µl stanične suspenzije za brojenje i nakon brojanja se odlučuje koliko stanica u kojem volumenu medija želimo nasaditi. Netom prije samog pasažiranja stanice opet resuspendiramo u željenoj količini tekuće hranjive podloge i prebacimo u nove T-boce ili na mikrotitarske pločice ako ih nasadujemo za eksperiment.

### **3.2.4. Brojanje stanica**

Kako bismo uzeli željeni broj stanica za presađivanje ili za eksperiment, stanice se moraju prebrojati. Za brojanje stanica koristi se otopina tripanskog modrila, koja ulazi u oštećene membrane mrtvih stanica i takve stanice boja u plavo, dok žive stanice nemaju oštećenu membranu i boja ne može ući u njih te one ostaju nebojene. Nakon što se stanice sakupe prema gore opisanom postupku i dobro se resuspendiraju, 20 µl stanične suspenzije pomiješa se sa 180 µl otopine tripanskog modrila i inkubira 3 minute. Nakon inkubacije 10 µL se nanosi s jedne i s druge strane pokrovnog stakalca Burker-Turk komorice za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom u 8 kvadratića komorice (4 kvadratića s jedne strane i 4 kvadratića s druge strane) prebroje se žive stanice unutar kvadratića i one koje padaju na gornji i lijevi brid kvadratića (**Slika 8.**).



**Slika 8.** Prikaz 4 kvadratića Burker-Turkove komorice; crvenom bojom označeni bridovi na kojima se broje stanice

Broj izbrojenih stanica preračunava se u broj stanica u mililitru prema slijedećoj formuli:

$$\text{Broj stanica u 1 ml} = \frac{1}{8} \times N \times R \times \frac{1}{V_{\text{komorice}}}$$

Gdje N predstavlja ukupan broj izbrojenih stanica u 8 kvadratića, R razrijeđenje suspenzije (u ovom slučaju 10 jer je 20  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije dodano u  $\mu\text{180 L}$  tripanskog modrila), a  $V_{\text{komorice}}$  predstavlja volumen komorice izražen u mililitrima i iznosi  $1 \times 10^{-4}$ . Formula za izračunavanje broja stanica u mililitru tada glasi:

$$\text{Broj stanica u 1 ml} = \frac{1}{8} \times N \times 10 \times 10^4$$

### 3.2.5. Dizajn eksperimenta

Eksperiment vršimo na neuroblastomskim SH-SY5Y stanicama i neuronima koji se dobiju diferencijacijom neuroblastomskih SH-SY5Y stanica.

#### *Tretiranje neuroblastomskih SH-SY5Y stanica*

Na mikrotitarske pločice nasadujemo 17500 stanica u svaku jažicu prema gore opisanom procesu presađivanja i brojanja stanica. Nakon dva dana u kulturi, stanice tretiramo 30 nM okadaičnom kiselinom u dva vremenska terminala 14:30h i 16h, a pogubni učinak na



vijabilnost stanica nastoji se spriječiti predtretmanima EGCG-om 1h ili kotretmanima EGCG-a različitih koncentracija (10, 20, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Kontrolne stanice nisu tretirane. Svaki od navedenih tretmana, uključujući i kontrolu rađen je 4 puta, tj. u 4 različite jažice sa stanicama.

### ***Tretiranje neurona***

Diferencijacija neuroblastomskih SH-SY5Y stanica potaknuta je sedmodnevnim tretmanom 10  $\mu\text{M}$  retinoičnom kiselinom i nakon toga četverodnevnim tretmanom 25 nM BDNF-om (od eng. *Brain-derived neurotrophic factor*). Na mikrotitarske pločice nasadeno je 2900 stanica u svaku jažicu (10000 stanica /  $\text{cm}^2$ ), a u medij s 10% FBS-om u koji je sljedeći dan dodana 10  $\mu\text{M}$  retinoična kiselina. Svako drugi dan, kroz 7 dana mijenja se tekući hranjivi medij s 10  $\mu\text{M}$  retinoičnom kiselinom. Nakon 7 dana, stanice se ispiru s DMEM-om ili PBS-om i svako drugi dan se kroz 4 dana tretiraju s 25 nM BDNF-om u tekućem hranjivom mediju s 1% FBS-om.

Nakon diferencijacije, dobivene neurone tretiramo 30 nM okadaičnom kiselinom u dva vremenska terminala 22h i 26h, a pogubni učinak na vijabilnost stanica nastoji se spriječiti predtretmanima EGCG-om 1h ili kotretmanima EGCG-a različitih koncentracija (20, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Kontrolne stanice nisu tretirane. Svaki od navedenih tretmana, uključujući i kontrolu rađen je 3 puta, odnosno u 3 različite jažice sa stanicama.

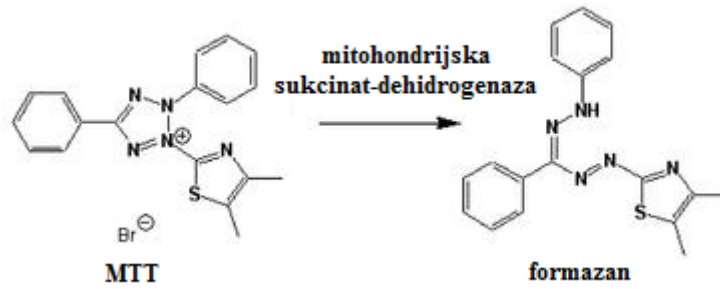
### **3.2.6. MTT test**

Citotoksični učinak okadaične kiselina na neuroblastomske SH-SY5Y stanice i na neurone ispitan je MTT-testom.

Ovo je vrlo jednostavna i brza kolorimetrijska metoda koja se temelji na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica. Žive stanice pomoću mitohondrijske sukcinat-dehidrogenaze reduciraju žuto obojenu tetrazolijevu sol MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid] u tamnoljubičaste kristale formazana koji se nakupljaju u stanicama (**Slika 9**). Na mikrotitarsku pločicu, u svaku jažicu dodajemo 40  $\mu\text{l}$  MTT reagensa, omotamo ju aluminijskom folijom i ostavimo 3 sata u inkubatoru. Nakon 3 sata dodaje se 160  $\mu\text{l}$  DMSO-a, te se pločica stavi na tresilicu na 5 minuta. Djelovanjem DMSO-a kristali formazana postaju topivi, a intenzitet ljubičastog obojenja proporcionalan je broju živih stanica i može se pratiti spektrofotometrijski automatskim čitačem mikrotitarskih pločica. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (model 680 Series; Biorad Laboratories, Hercules, USA). Iz očitanih vrijednosti apsorbancije postotak rasta, PG (od eng. percentage of growth) računa se prema sljedećoj formuli:

$$PG = 100 \times (OD_{\text{test}} - OD_{\text{zero}}) / (OD_{\text{ctrl}} - OD_{\text{zero}})$$

Gdje  $OD_{\text{test}}$  predstavlja prosjek mjerenja optičke gustoće tretiranih stanica,  $OD_{\text{zero}}$  srednju vrijednost optičke gustoće prazne probe, a  $OD_{\text{ctrl}}$  prosjek mjerenja optičke gustoće kontrolnih stanica.



**Slika 9.** *Reakcija redukcije MTT-a u formazan.*

### 3.3. Statistička analiza

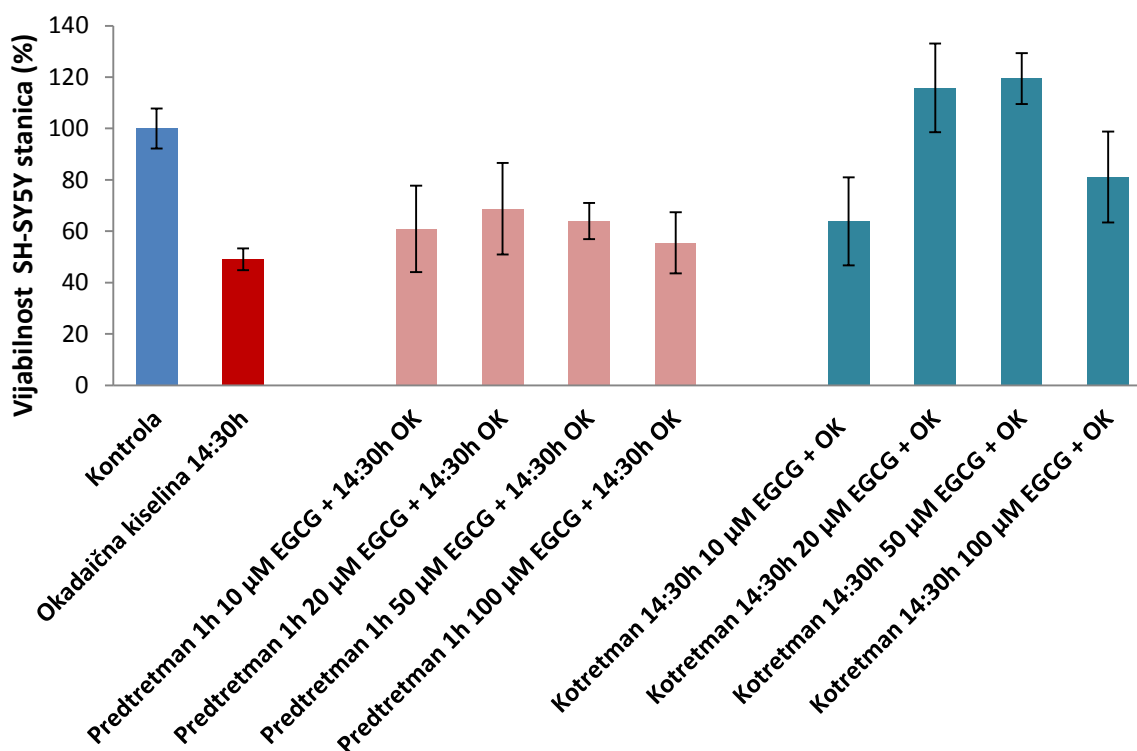
Za statističku analizu korišten je GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Statističke razlike između skupina analizirane se Studentovim  $t$  testom pri čemu je razina značajnosti bila podešena na  $p=0.05$ . Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. Rezultati

### 4.1. Vijabilnost SH-SY5Y stanica

Studentovim t-testom je dokazana statistički značajno manja vijabilnost SH-SY5Y stanica tretiranih 30 nM okadaičnom kiselinom (OK) 14:30 sati u odnosu na kontrolne stanice ( $t=11.45$ ,  $df=6$ ,  $p<0.001$ ). Jednosatni predtretmani 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  koncentracijama epigalokatehin-3-galata (EGCG), nakon čega je uslijedio tretman OK 14:30 sati, nisu povećali vijabilnost SH-SY5Y stanica narušenu OK; 10  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=1.361$ ,  $df=6$ ,  $p=0.222$ ), 20  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=2.141$ ,  $df=6$ ,  $p=0.076$ ), 100  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=1.005$ ,  $df=6$ ,  $p=0.353$ ). Tretman 50  $\mu\text{M}$  EGCG-om je značajno povećao vijabilnost SH-SY5Y stanica ( $t=3.611$ ,  $df=6$ ,  $p=0.011$ ).

Kotretman 10  $\mu\text{M}$  EGCG i 30 nM OK 14:30 sati nije značajno utjecao na preživljenje stanica ( $t=1.667$ ,  $df=6$ ,  $p=0.146$ ), dok su kotretmani 30 nM OK i 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-a značajno povećali preživljenje stanica (u odnosu na stanice tretirane samo OK 14:30 sati); 20  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=7.498$ ,  $df=6$ ,  $p<0.001$ ), 50  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=13.04$ ,  $df=6$ ,  $p<0.001$ ), 100  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=3.512$ ,  $df=6$ ,  $p=0.012$ ). Vijabilnost stanica nakon tretmana OK 14:30 sati je prikazana na slici 10.

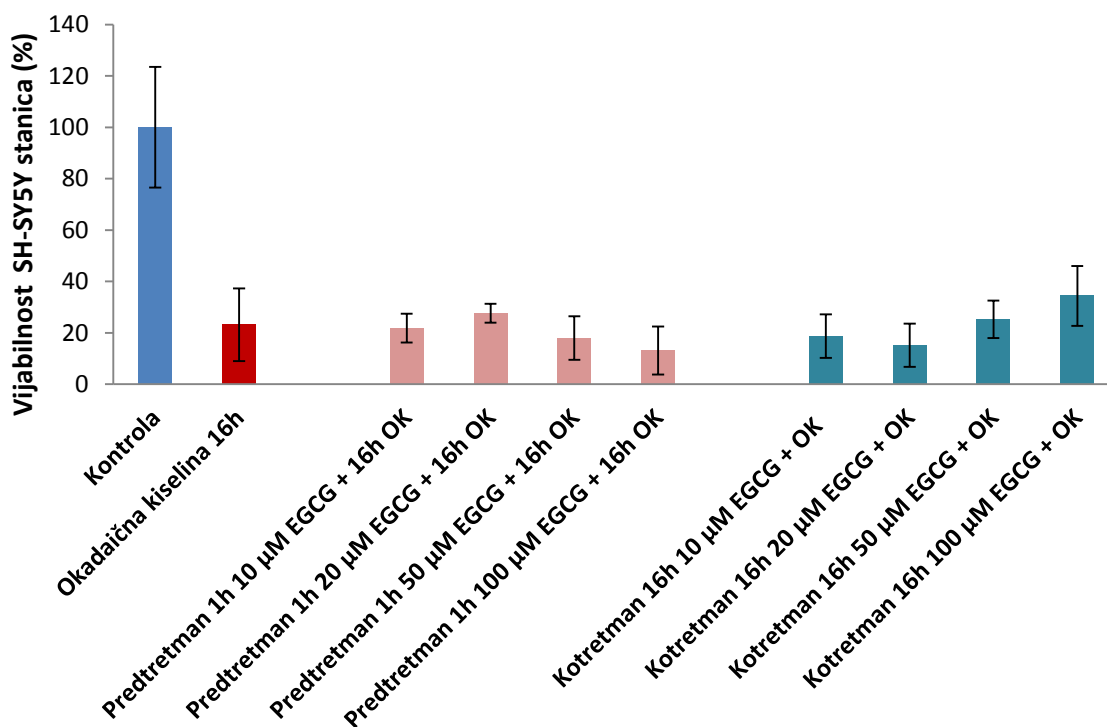


**Slika 10.** Vijabilnost SH-SY5Y stanica (%) nakon tretmana okadaičnom kiselinom (OK), jednosatnog predtretmana 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-om i tretmana 30 nM OK 14:30 sati te kotretmana 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-a i 30 nM OK 14:30 sati.

U drugom eksperimentu su SH-SY5Y stanice tretirane OK 16 sati. Dokazana je statistički značajno manja vijabilnost SH-SY5Y stanica tretiranih 30 nM okadaičnom kiselinom (OK) 16 sati u odnosu na kontrolne stanice ( $t=5.606$ ,  $df=6$ ,  $p=0.001$ ). Jednosatni predtretmani 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  koncentracijama EGCG-a, nakon čega je uslijedio tretman OK 16 sati, nisu povećali vijabilnost SH-SY5Y stanica narušenu OK; 10  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.180$ ,  $df=6$ ,  $p=0.863$ ), 20  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.612$ ,  $df=6$ ,  $p=0.562$ ), 50  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.631$ ,  $df=6$ ,  $p=0.550$ ), 100  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=1.180$ ,  $df=6$ ,  $p=0.282$ ). Ni kotretmani 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-a sa 30 nM OK kroz 16 sati nisu utjecali na preživljenje SH-SY5Y stanica (u odnosu na stanice tretirane samo OK 16 sati); 10  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.534$ ,  $df=6$ ,  $p=0.612$ ), 20  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.974$ ,  $df=6$ ,  $p=0.367$ ), 50  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=0.261$ ,  $df=6$ ,  $p=0.802$ ), 100  $\mu\text{M}$  EGCG ( $t=1.223$ ,  $df=6$ ,  $p=0.267$ ). Vijabilnost stanica nakon tretmana OK 16 sati je prikazana na **slici 11**. Točne vrijednosti vijabilnosti SH-SY5Y stanica (%) izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija nakon tretmana OK i različitim koncentracijama EGCG-a su prikazane u **tablici 4.1**.

**Tablica 4.1.** Vijabilnost SH-SY5Y stanica (%) nakon tretmana okadaičnom kiselinom (OK) i različitim koncentracijama epigalokatehin-3-galata (EGCG). Vrijednosti su izražene u postocima (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija).

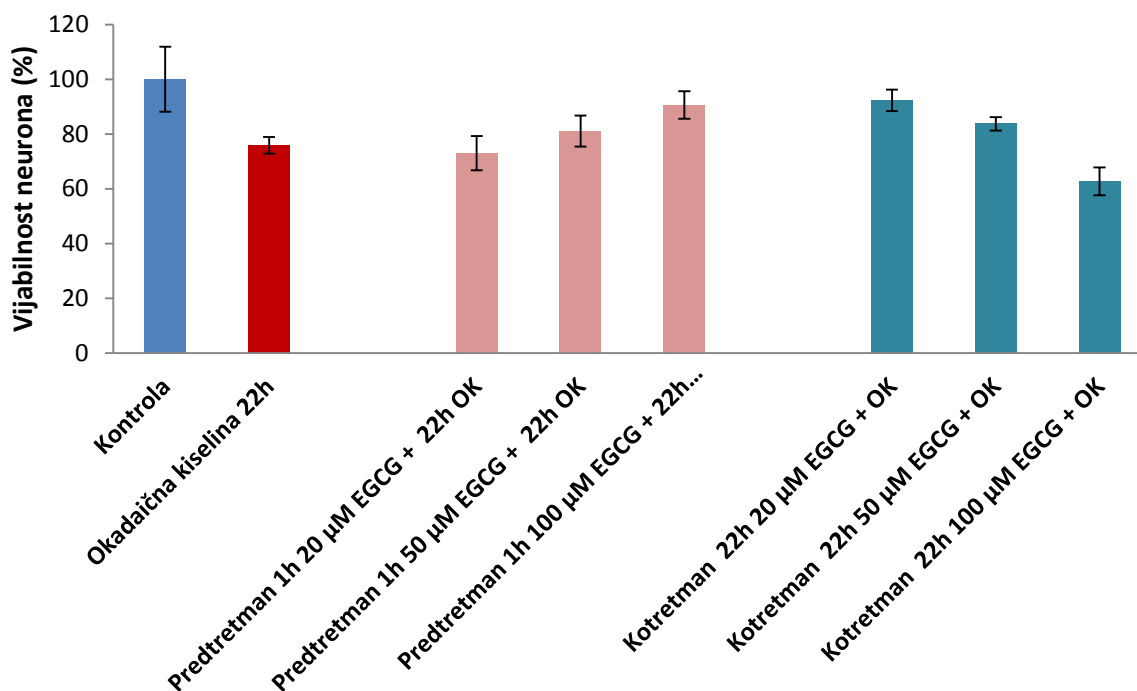
Vijabilnost SH-SY5Y stanica (%)		
	Tretman OK 14:30h	Tretman OK 16h
Kontrola	100 $\pm$ 7.82	100 $\pm$ 23.48
Okadaična kiselina	49 $\pm$ 4.23	23 $\pm$ 14.15
Predtretman 1h 10 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	61 $\pm$ 16.85	22 $\pm$ 5.6
Predtretman 1h 20 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	69 $\pm$ 17.84	28 $\pm$ 3.72
Predtretman 1h 50 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	64 $\pm$ 7.06	18 $\pm$ 8.47
Predtretman 1h 100 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	55 $\pm$ 11.91	13 $\pm$ 9.38
Kotretman 10 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	64 $\pm$ 17.13	19 $\pm$ 8.48
Kotretman 20 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	116 $\pm$ 17.27	15 $\pm$ 8.42
Kotretman 50 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	119 $\pm$ 9.92	25 $\pm$ 7.25
Kotretman 100 $\mu\text{M}$ EGCG + OK	81 $\pm$ 17.71	34 $\pm$ 11.68



**Slika 11.** Vijabilnost SH-SY5Y stanica (%) nakon tretmana OK, jednosatnog predtretmana 10 μM, 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-om i tretmana 30 nM OK 16 sati te kotretmana 10 μM, 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-a i 30 nM OK 16 sati.

#### 4.2. Vijabilnost neurona

U trećem eksperimentu su neuroni dobiveni diferencijacijom iz SH-SY5Y stanica tretirani OK 22 sata. Dokazana je statistički značajno manja vijabilnost neurona tretiranih 30 nM OK 22 sata u odnosu na kontrolne stanice ( $t=3.418$ ,  $df=4$ ,  $p=0.026$ ). Jednosatni predtretman 20 μM i 50 μM koncentracijama EGCG-a, nakon čega je uslijedio tretman OK 22 sata, nije povećao vijabilnost neurona narušenu OK; 20 μM EGCG ( $t=0.711$ ,  $df=4$ ,  $p=0.515$ ), 50 μM EGCG ( $t=1.409$ ,  $df=4$ ,  $p=0.231$ ). Predtretman 100 μM EGCG-om je značajno povećao vijabilnost neurona ( $t=4.328$ ,  $df=4$ ,  $p=0.012$ ). Također kotretman 20 μM i 50 μM EGCG-a sa 30 nM OK kroz 22 sata je značajno povećao preživljenje stanica; 20 μM EGCG ( $t=5.720$ ,  $df=4$ ,  $p=0.004$ ), 50 μM EGCG ( $t=3.475$ ,  $df=4$ ,  $p=0.025$ ). Kotretman 100 μM EGCG sa 30 nM OK kroz 22 sata je značajno smanjio preživljenje stanica ( $t=3.880$ ,  $df=4$ ,  $p=0.017$ ). Vijabilnost neurona nakon tretmana OK 22 sata je prikazana na **slici 12**.

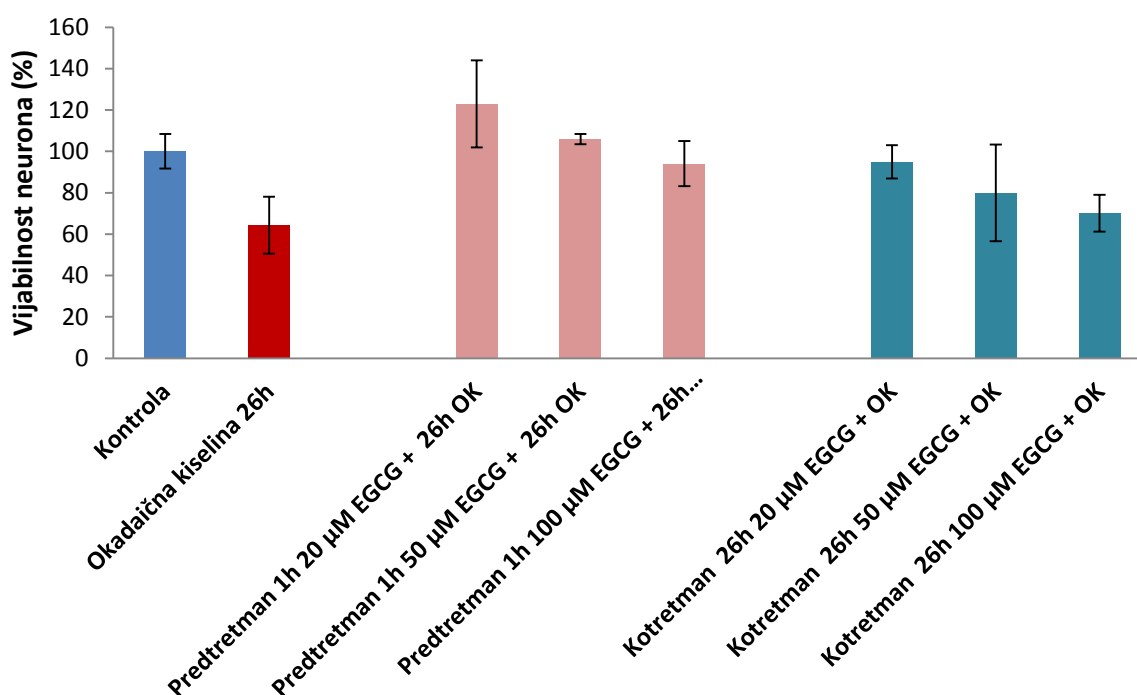


**Slika 12.** Vijabilnost neurona (%) nakon tretmana OK, jednosatnog predtretmana 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-om i tretmana 30 nM OK 22 sata te kotretmana 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-a i 30 nM OK 22 sata.

U četvrtom eksperimentu su neuroni dobiveni diferencijacijom iz SH-SY5Y stanica tretirani OK 26 sati. Tretman OK je značajno smanjio vijabilnost stanica u odnosu na kontrolu ( $t=3.842$ ,  $df=4$ ,  $p=0.018$ ). Jednosatni predtretman 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-om, nakon čega je uslijedio tretman OK kroz 26 sati je značajno povećao vijabilnost neurona narušenu OK; 20 μM EGCG ( $t=4.041$ ,  $df=4$ ,  $p=0.015$ ), 50 μM EGCG ( $t=5.162$ ,  $df=4$ ,  $p=0.006$ ), 100 μM EGCG ( $t=2.938$ ,  $df=4$ ,  $p=0.042$ ). Za razliku od predtretmana, jedino je kotretman 20 μM EGCG sa 30 nM OK kroz 26 sati značajno povećao preživljenje stanica ( $t=3.332$ ,  $df=4$ ,  $p=0.029$ ), dok kotretmani sa 50 μM i 100 μM EGCG-om nisu utjecali na preživljenje; 50 μM EGCG ( $t=0.994$ ,  $df=4$ ,  $p=0.376$ ), 100 μM EGCG ( $t=0.607$ ,  $df=4$ ,  $p=0.576$ ). Vijabilnost neurona nakon tretmana OK 26 sati je prikazana na **slici 13**. Točne vrijednosti vijabilnosti neurona (%) izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija nakon tretmana OK i različitim koncentracijama EGCG-a su prikazane u **tablici 4.2**.

**Tablica 4.2.** Vijabilnost neurona nakon tretmana okadaičnom kiselinom (OK) i različitim koncentracijama epigalokatehin-3-galata (EGCG). Vrijednosti su izražene u postotcima (srednja vrijednost ± standardna devijacija).

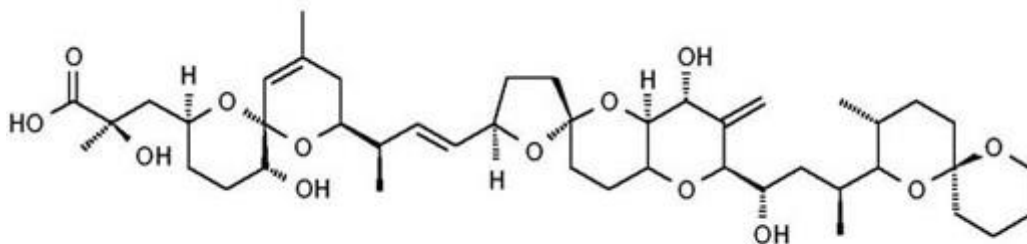
Vijabilnost neurona (%)		
	Tretman OK 22h	Tretman OK 26h
Kontrola	100 ± 11.85	100 ± 18.36
Okadaična kiselina	76 ± 3.02	64 ± 13.73
Predtretman 1h 20 μM EGCG + OK	73 ± 6.27	123 ± 21.03
Predtretman 1h 50 μM EGCG + OK	81 ± 5.66	106 ± 2.46
Predtretman 1h 100 μM EGCG + OK	91 ± 5.04	94 ± 10.91
Kotretman 20 μM EGCG + OK	92 ± 3.95	95 ± 8.07
Kotretman 50 μM EGCG + OK	84 ± 2.48	80 ± 23.42
Kotretman 100 μM EGCG + OK	63 ± 5.05	70 ± 8.87



**Slika 13.** Vijabilnost neurona (%) nakon tretmana OK, jednosatnog predtretmana 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-om i tretmana 30 nM OK 26 sati te kotretmana 20 μM, 50 μM i 100 μM EGCG-a i 30 nM OK 26 sati.

## 5. Rasprava

Okadaična kiselina je polieter C<sub>38</sub> masne kiseline izolirana iz spužve *Hallichondria okadaei* i djeluje kao selektivni inhibitor serin/treonin (Ser/Thr) fosfataze 1 i 2A (PP1 i PP2A). Pokazala se citotoksičnom za mnoge stanične linije *in vivo* i *in vitro* (Slika 14.) (Kamat *i sur*, 2014). Istraživanja su pokazala da serin/treonin fosfataze imaju višestruku ulogu u patologiji nastanka neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, ali i mnoge druge (Yi *i sur*, 2009). Okadaična kiselina povećava fosforilaciju tau proteina, ali i različitih proteina povezanih s mikrotubulima (od eng. *Microtubule-Associated Protein, MAP*) koji su povezani s ranim promjenama u citoskeletu neurona koje dovode do stanične smrti (Arias *i sur*, 1993). Također uzrokuje i kondenzaciju kromatina, reorganizaciju citoskeleta i fragmentaciju DNA karakterističnu za apoptozu (Bøe *i sur*, 1991). Okadaična kiselina uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih čestica (od eng. *Reactive oxygen species, ROS*), lipidnih peroksida, aktivira kaspaze 3/7 i disfunkciju mitohondrija tj. uzrokuje oksidativni stres koji može dovesti do stanične smrti (Yi *i sur*, 2009).



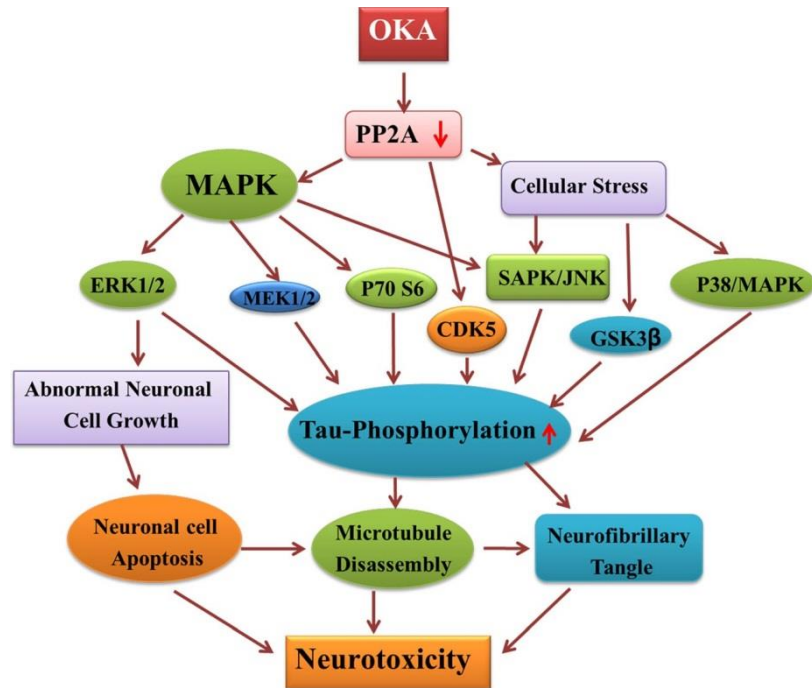
Slika 14. Kemijska struktura okadaične kiseline.

Okadaična kiselina reproducira karakterističnu hiperfosforilaciju tau proteina i nastajanje agregata amiloida  $\beta$ , stoga se pokazala kao dobar model stanične smrti karakteristične za Alzheimerovu bolest (del Barrio *i sur*, 2011). Dosadašnja istraživanja pokazuju da okadaična kiselina uzrokuje hiperfosforilaciju tau proteina *in vivo* (Tian *i sur*, 2004), ali i *in vitro* (Tanaka *i sur*, 1998) te potiče agregaciju amiloida  $\beta$  *in vivo* (Kamat *i sur*, 2014).

Postoji 5 skupina Ser/Thr protein fosfataza, PP1, PP2A, PP2B, PP2C i PP5 koje su u velikim količinama eksprimirane u mozgu. Sve te fosfataze osim PP2C defosforiliraju tau protein, a pokazana je smanjena razina njihove ekspresije u mozgu osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (Sontag *i sur*, 2004). Najvažnija je PP2A fosfataza koja regulira čitavu kaskadu kinaznih reakcija koje utječu na ekspresiju gena (Slika 15.) (Kamat *i sur*, 2014). Sprečavanje



djelovanja okadaične kiseline dovodi do smanjenja fosforilacije tau proteina i nastajanja agregata amiloida  $\beta$ , a u konačnici i do sprečavanja stanične smrti.



**Slika 15.** Shematski prikaz utjecaja okadaične kiseline na fosforilaciju tau proteina i neurotoksičnost. Preuzeto iz Kamat i sur, 2014.

Kod neuroblastomskih SH-SY5Y stanica tretiranih OK u trajanju od 14:30h se vidi pozitivan učinak EGCG-a na preživljenje. Stanice koje su imale predtretman EGCG-om nisu pokazale značajno povećanje preživljenja u odnosu na stanice tretirane samo OK, dok je kod kotretmana s EGCG-om došlo do značajnog povećanja preživljenja stanica. Kod tretmana u trajanju od 16h se nije vidio pozitivan učinak EGCG-a, niti u predtretmanu, niti u kotretmanu s OK. Pretpostavka je da je tretman OK u trajanju od 16h na SH-SY5Y stanicama predugačak i EGCG ne može imati povoljne učinke i spriječiti umiranje stanica.

Neurone dobivene diferencijacijom neuroblastomskih SH-SY5Y stanica treba tretirati okadaičnom kiselinom znatno duže jer su neuroni puno veći i razgranatiji od SH-SY5Y stanica i zbog toga je potrebno više vremena da OK prouzroči pogubne učinke na neuronima odnosno da izazove staničnu smrt.

Kod neurona tretiranih OK u trajanju od 22h vidi se pozitivan učinak EGCG-a kod stanica u predtretmanu s 100  $\mu\text{M}$  EGCG-om i u kotretmanu s 20  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  EGCG-om. Logično bi bilo za očekivati da veće koncentracije imaju povoljniji utjecaj na preživljenje stanica i to se vidi kod stanica u predtretmanu, dok kod stanica u kotretmanu dolazi do smanjenja preživljenja stanica pri najvećoj koncentraciji EGCG-a od 100  $\mu\text{M}$ . Kod neurona tretiranih OK 26h došlo je do značajnog preživljenja stanica u predtretmanu sa sve tri koncentracije EGCG-a i u kotretmanu sa 20  $\mu\text{M}$  EGCG-om, dok se kod stanica u kotretmanu s EGCG-om preživljenje nije mijenjalo s povećanjem koncentracije EGCG-a. S obzirom da se rezultati na neuronima pri tretmanima od 22h i 26h razlikuju, eksperiment bi trebalo ponoviti ili napraviti dodatne eksperimente.

Kao logični nastavak ovog eksperimenta, trebao bi se ispitati učinak EGCG-a na fosforilaciju tau proteina i agregaciju amiloida  $\beta$ .

Do sada su na tom području provedena istraživanja koja su pokazala pozitivan utjecaj EGCG-a na smanjenje agregata amiloida  $\beta$  i promjenu tau patologije *in vivo* kod miševa (Rezai-Zadeh *i sur*, 2008). Također je dokazan i pozitivan utjecaj flavonoida iz zelenog čaja, koji između ostalog sadrže i EGCG na smanjenje hiperfosforilacije tau proteina kod neurona u hipokampusu tretiranih štakora (Li *i sur*, 2014). Na neuronskoj staničnoj liniji MC65, EGCG je spriječio neurotoksičnost induciranu agregatima amiloida  $\beta$  tako što je inhibirao nuklearnu translokaciju c-Abl i aktivacijom GSK3 $\beta$  (Lin *i sur*, 2009).

EGCG je pokazao najbolji učinak na preživljenje stanica u kotretmanu s okadaičnom kiselinom. Slijedeći korak u istraživanju ovog flavonoida trebalo bi biti ispitivanje utjecaja EGCG-a na fosforilaciju tau proteina i na agregate amiloida  $\beta$ . Ako se pokaže učinkovitost EGCG-a u smanjivanju hiperfosforilacije tau proteina i sprečavanju nastanka amiloidnih agregata dobit ćemo potvrdu o njegovoj važnosti u prehrani koja može utjecati na odgađanje nastanka Alzheimerove bolesti.

## 6. Zaključci

- Predtretman od 1 sata, 50  $\mu\text{M}$  EGCG-om i kotretman s 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-om dovodi do značajnog povećanja preživljenja neuroblastomskih stanica SH-SY5Y narušenog 14:30h tretmanom okadaičnom kiselinom
- Predtretman i kotretman EGCG-om neuroblastomskih stanica SH-SY5Y ne dovodi do povećanog preživljenja narušenog 16h tretmanom okadaičnom kiselinom
- Predtretman od 1h 100  $\mu\text{M}$  EGCG-om i kotretman s 20  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  EGCG-om dovodi do značajnog povećanja preživljenja neurona narušenog 22h tretmanom okadaičnom kiselinom
- Predtretman od 1h 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  EGCG-om i kotretman s 20  $\mu\text{M}$  EGCG-om dovodi do značajnog povećanja preživljenja neurona narušenog 26h tretmanom okadaičnom kiselinom

## 8. Literatura

- Areosa SA, Sherriff F, McShane R (2005). Memantine for dementia. *Cochrane database Syst Rev* CD003154doi:10.1002/14651858.CD003154.pub3.
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B (1993). Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **61**: 673–682.
- Babić M, Švob Štrac D, Mück-Šeler D, Pivac N, Stanić G, Hof PR, *i sur* (2014). Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. *Croat Med J* **55**: 347–365.
- Barrio L del, Martín-de-Saavedra MD, Romero A, Parada E, Egea J, Avila J, *i sur* (2011). Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by  $\alpha 7$  and  $\beta 2^*$  nicotinic stimulation. *Toxicol Sci* **123**: 193–205.
- Blennow K, Leon MJ de, Zetterberg H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**: 387–403.
- Bøe R, Gjertsen BT, Vintermyr OK, Houge G, Lanotte M, Døskeland SO (1991). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res* **195**: 237–246.
- Braak H, Braak E (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* **33**: 95–130.
- Buée L, Troquier L, Burnouf S, Belarbi K, Jeugd A Van der, Ahmed T, *i sur* (2010). From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? *Biochem Soc Trans* **38**: 967–972.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, *i sur* (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**: 734–746.
- Hanger DP, Lau DHW, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, *i sur* (2014). Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis* **40 Suppl 1**: S37–45.
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**: 1206–1209.
- Hopkins AL (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* **4**: 682–690.

- Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, Pirttila T, Popescu BO, Rektorova I, *i sur* (2010). EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* **17**: 1236–1248.
- Iqbal K, Alonso A del C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, *i sur* (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**: 198–210.
- Judaš M, Kostović I (MD: Zagreb, 1997). *Temelji neuroznanosti*. 750.
- Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C (2014). Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Mol Neurobiol* **50**: 852–865.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, *i sur* (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**: 733–736.
- Leon MJ De, Golomb J, George AE, Convit A, Tarshish CY, McRae T, *i sur* (1993). The radiologic prediction of Alzheimer disease: The atrophic hippocampal formation. *Am J Neuroradiol* **14**: 897–906.
- Lewczuk P, Mroczko B, Fagan A, Kornhuber J (2014). Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. *Adv Med Sci* **60**: 76–82.
- Li H, Wu X, Wu Q, Gong D, Shi M, Guan L, *i sur* (2014). Green tea polyphenols protect against okadaic acid-induced acute learning and memory impairments in rats. *Nutrition* **30**: 337–342.
- Lin C-L, Chen T-F, Chiu M-J, Way T-D, Lin J-K (2009). Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses beta-amyloid-induced neurotoxicity through inhibiting c-Abl/FE65 nuclear translocation and GSK3 beta activation. *Neurobiol Aging* **30**: 81–92.
- Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **9**: 702–716.
- Petersen RC, Aisen PS, Beckett LA, Donohue MC, Gamst AC, Harvey DJ, *i sur* (2010). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): clinical characterization. *Neurology* **74**: 201–209.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* **56**: 303–308.
- Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E (1998). Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors* **8**: 111–118.
- Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, *i sur* (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* **1214**: 177–187.

- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, *i sur* (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **2**: 864–870.
- Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2007). Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 295–303.
- Sjögren M, Gisslén M, Vanmechelen E, Blennow K (2001). Low cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 42 in patients with acute bacterial meningitis and normalization after treatment. *Neurosci Lett* **314**: 33–36.
- Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, Ogris E, Speciale S, *i sur* (2004). Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A $\beta$  enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**: 287–301.
- Spencer JPE (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc* **69**: 244–260.
- Tanaka T, Zhong J, Iqbal K, Trenkner E, Grundke-Iqbal I (1998). The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett* **426**: 248–254.
- Terry Jr a. V, Buccafusco JJ (2003). The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease- Related Cognitive Deficits : Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 821–827.
- Thies W, Bleiler L, Association A (2013). 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* **9**: 208–245.
- Tian Q, Lin Z-Q, Wang X-C, Chen J, Wang Q, Gong C-X, *i sur* (2004). Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* **126**: 277–284.
- Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MBH (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes Nutr* **4**: 283–296.
- Wilcock GK (2003). Memantine for the treatment of dementia. *Lancet Neurol* **2**: 503–505.
- Williams RJ, Spencer JPE (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **52**: 35–45.
- Yi KD, Covey DF, Simpkins JW (2009). Mechanism of okadaic acid-induced neuronal death and the effect of estrogens. *J Neurochem* **108**: 732–740.
- Zetterberg H, Wahlund L-O, Blennow K (2003). Cerebrospinal fluid markers for prediction of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **352**: 67–69.

Zhang C, Saunders AJ (2009). Therapeutic Targeting of the Alpha-Secretase Pathway to Treat Alzheimer's Disease. *Discov Med* **7**: 113–117.

## 9. Životopis

Rođena sam 6.travnja 1989. Godine u Virovitici. Nakon završene osnovne škole (OŠ Nikole Tesle, Zagreb) upisala sam XV. gimnaziju u Zagrebu. Maturirala sam s odličnim uspjehom. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2008. godine. Titulu prvostupnika stekla sam 2012.godine s temom *Botoks- što sve znamo o genu koji kodira za toksin botulin*. Iste godine sam upisala diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, a 2013. Godine opredjeljujem se za modul Računalna biologija. Od 2011. godine volontiram u Volonterskom centru Zagreb kao mentor u individualnom radu s učenicima srednjih škola. Od 2012. Godine sujelujem u organizaciji Noći Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, a zadnje tri godine kao studentski koordinator na Zavodu za molekularnu biologiju. Izvrsno se služim engleskim jezikom u govoru i pismu.