

# Utjecaj Simvastatina na morfologiju stanica SH-SY5Y neuroblastoma

---

**Matešković, Antonela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:814701>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

*Antonela Matešković*

**UTJECAJ SIMVASTATINA NA**  
**MORFOLOGIJU STANICA SH-SY5Y**  
**NEUROBLASTOMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

*Antonela Matešković*

**UTJECAJ SIMVASTATINA NA**  
**MORFOLOGIJU STANICA SH-SY5Y**  
**NEUROBLASTOMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je napravljen na Medicinskom fakultetu Osijek, Katedri za medicinsku biologiju i genetiku.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Marija Heffer

Rad ima 47 radnih listova, 7 slika i 2 tablice.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Marija Heffer za savjete i smjernice tijekom školovanja, a osobito na strpljenju i svim korisnim uputama prilikom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala mag. biol. Miloradu Zjaliću na pomoći, strpljenju i uloženom vremenu i trudu kako bi ovo istraživanje bilo što bolje.*

*Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima, posebno Mariji Macan na pomoći, strpljenju i velikoj potpori tijekom mog školovanja i izrade ovog rada.*

## Sadržaj:

|   |    |
|---|----|
| POPIS KRATICA .....   | V  |
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Neurodegenerativne bolesti .....   | 1  |
| 1.1.1. Parkinsonova bolest .....  | 1  |
| 1.1.2. Alzheimerova bolest .....  | 2  |
| 1.2. Prehrana kao uzrok neurodegenerativnih bolesti.....  | 3  |
| 1.2.1. Prehrana bogata mastima .....  | 3  |
| 1.3. Utjecaj masnih kiselina na stabilnost i sastav stanične membrane.....                                      | 4  |
| 1.4. Utjecaj simvastatina na neurodegenerativne bolesti.....  | 5  |
| 1.4.1. Simvastatin.....   | 6  |
| 1.5. Lipidne splavi - građa i uloga .....   | 8  |
| 1.5.1. Proteinske i neproteinske sastavnice lipidnih splavi.....  | 9  |
| 1.5.2. Uloga lipidnih splavi u signalnim procesima.....   | 10 |
| 1.6. Stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y .....   | 11 |
| 1.6.1. Lipidne splavi u neurodegenerativnim bolestima - istraživanja provedena na SH-SY5Y staničnoj liniji..... | 12 |
| 2. Hipoteza .....   | 14 |
| 3. Ciljevi.....   | 15 |
| 4. Materijal i metode .....   | 16 |
| 4.1. Ustroj studije.....  | 16 |
| 4.2. Materijal.....   | 16 |
| 4.3. Metode .....   | 16 |
| 4.3.1. Uzgoj i diferencijacija stanica.....   | 16 |
| 4.3.2. Tretiranje stanica.....  | 16 |
| 4.3.3. Imunocitkemija .....   | 17 |
| 4.3.4. Bojenje kolera toksinom B.....   | 18 |
| 4.3.5. Izolacija lipidnih splavi.....   | 18 |
| 4.3.6. Dokazivanje proteina .....   | 19 |
| 4.3.7. Elektroforeza i Western blot metoda .....  | 19 |
| 4.4. Statističke metode.....  | 21 |
| 5. REZULTATI.....   | 22 |

|   |    |
|---|----|
| 5.1. Utjecaj simvastatina i lipidima obogaćenog medija na morfologiju SH-SY5Y stanične linije .....   | 22 |
| 5.1.1. Utjecaj simvastatina i lipidima obogaćenog medija na duljinu neurita SH-SY5Y stanične linije prikazan bojenjem kolera toksinom B ..... | 22 |
| 5.1.2. Utjecaj simvastatina i lipidom obogaćenog medija na staničnu liniju SH-SY5Y prikazan bojenjem SMI31, SMI32 i SMI312 .....              | 24 |
| 5.2. Promjena sastava lipidnih splavi SH-SY5Y stanične linije.....  | 29 |
| 6. RASPRAVA.....  | 34 |
| 7. ZAKLJUČCI.....   | 39 |
| 8. SAŽETAK.....   | 40 |
| 9. SUMMARY .....  | 41 |
| 10. LITERATURA.....   | 42 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....   | 47 |

## POPIS KRATICA

27-OH-C – 27-hidroksikolesterol (engl. *27-hydroxycholesterol*)

ADAM10 – transmembranska cink metaloproteinaza tip 1 (engl. *disintegrin and metalloproteinase domain – containing protein 10*)

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid*)

AMPK – AMP aktivirana protein kinaza (engl. *activated protein kinase*)

APP – preteča amiloidnog proteina (engl. *amyloid precursor protein*)

A $\beta$  –  $\beta$ -amiloid (engl. *amyloid  $\beta$* )

BACE1 – amiloidni prekursor proteina  $\beta$ -sekretaze-1 (engl.  *$\beta$ -secretase 1*)

DMPS – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (engl. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine*)

DTT – ditiotreitrol (engl. *dithiothreitol*)

ERK 1/2 – izvanstanična signal-regulirana kinaza  $\frac{1}{2}$  (engl. *extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$* )

GAP-43 – protein povezan s rastom (engl. *growth associated protein 43*)

GDNF – derivirani neurotropni faktor glija stanica (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GPI-sidro – glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol anchor*)

HGM-CoA reduktaza – hidroksimetil-glutamil-koenzim A reduktaza (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*)

LDH – laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)

LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)

NFT – neurofibrilarni čvorovi (engl. *neurofibrillary tangles*)

NMDA – N-metil D-aspartat (engl. *N-methyl-D-aspartate*)

NSE – neuron specifična enolaza (engl. *neuron specific enolase*)

PP2A – protein fosfataza 2A (engl. *protein phosphatase 2*)

RET – transmembranska tirozin kinaza (engl. *transmembrane tyrosine kinase*)

SYN – sinaptofizin (engl. *synaptophysin*)

VAMP2 – membranski protein povezan s vezikulima 2 (engl. *vesicle-associated membrane protein 2*)



## 1. UVOD

### 1.1. Neurodegenerativne bolesti

Glavno obilježje neurodegenerativnih bolesti je postupni gubitak neurona, a mogu se podijeliti prema kliničkim simptomima, dijelu mozga koji je zahvaćen degenerativnim procesom ili molekularnim obilježjima poremećaja. Neurodegeneraciju potiče nakupljanje netopljivih proteina unutar ili izvan neuronskih ili glija stanica. Amiloidoze, tauopatije,  $\alpha$ -sinukleinopatije i TDP-43 proteinopatije pripadaju najčešćim poremećajima, a nazvane su prema proteinu koji se nakuplja. Za amiloidoze tipično je izvanstanično nakupljanje tako zvanih amiloidnih plakova različite veličine, izgleda i raspodjele (1).

U tauopatijama dolazi do nakupljanja tau proteina, prvenstveno unutar citoplazme neurona. Tau protein, u svojoj fosforiliranoj formi, stabilizira mikrotubule te čini potporu dugim aksonskim nastavcima. Osim fosforilizacije, koja je najčešća i najvažnija posttranslacijska modifikacija ovog proteina, moguće su acetilacije i ubikvitinizacije. Ove posttranslacijske modifikacije dovode do prekomjernog nakupljanja i u konačnici do neurodegenerativnih premećaja. U jednom od nasljednih oblika Parkinsonove bolesti dokazana je mutacija na 17. kromosomu u genu *MAPT* koji je gen za tau protein. Posljedica mutacije je taloženje tau proteina što u konačnici dovodi do atrofije mozga (1, 2).

Sinukleinopatije predstavljaju nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina. Smatra se da ovaj protein ima ulogu u prometu molekula sinaptičkom pukotinom, a fiziološki se nalazi u presinaptičkim pukotinama. U sinukleinopatijama mutacije se nalaze u genu *SNCA* koji kodira  $\alpha$ -sinukleini. Ovaj protein je najčešći sastojak tzv. Lewijevih tjelešaca, patoloških nakupina, koje su pronađene u brojim neurodegenerativnim bolestima (1).

TDP-43 je protein koji je normalno prisutan u mozgu, a njegova uloga je transkripcija DNA i obrada RNA. Međutim mutacijom ovog proteina dolazi do njegovog nakupljanja u citoplazmi neurona što dovodi do oštećenja jezgre i citoplazme stanice. Mehanizam kojim mutacija utječe na promjenu TDP-43 još uvijek nije poznata (1, 3).

#### 1.1.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest je neurodegenerativna bolest u kojoj dolazi do postupnog propadanja nigrostriatalnih dopaminskih neurona. Bolest se liječi simptomatski, a točan uzrok nastanka Parkinsonove bolesti nije jasno definiran. Simptomi koji karakteriziraju ovu bolest uključuju bradikineziju (usporenosti pokreta), tremor (drhtavica) i rigor (ukočenost). Trenutno

ne postoje valjani biomarkeri koji bi ukazali na ranu prisutnost bolesti, kao ni na trenutni stadij bolesti. Zabilježeni su slučajevi mutacije proteina A53T u genu *SNCA* povezani s obiteljskim parkinsonizmom (1). Jedno od glavnih obilježja ove bolesti su Lewyjeva tjelešca i mutacije gena za protein  $\alpha$ -sinuklein. Protein se sastoji od N-terminalne lipid-vezajuće  $\alpha$ -uzvojnice, amiloid vezajuće središnje domene i C-terminalnog kiselog kraja (1, 4). Fiziološka uloga  $\alpha$ -sinukleina nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da se veže s membranskim proteinom povezanim s vezikulima 2 (VAMP2, engl. *vesicle-associated membrane protein 2*). Takav kompleks pomaže pri grupiranju sinaptičkih vezikula, a nastaje povezivanjem pentapeptidne regije na C terminalnom kraju  $\alpha$ -sinukleina s VAMP2. Razgradnja  $\alpha$ -sinukleina odvija se autofagijom koja je posredovana šaperonom, pri čemu se  $\alpha$ -sinuklein sa šaperonom povezuje na istom mjestu kao i s VAMP2 (4). Prekomjerna agregacija  $\alpha$ -sinukleina dovodi do sinukleinopatija. Stanične membrane koje u svom sastavu sadrže 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (DMPS, engl. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine*) potiču agregaciju  $\alpha$ -sinukleina. Stanične se membrane razlikuju jedna od druge po sastavu i omjeru proteina i lipida koji su ugrađeni u njih. Svaka od komponenata stanične membrane ima svoja jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva koja utječu na njenu propusnost i međudjelovanje s tvarima u i izvan stanice. Sve te varijabilnosti utječu i na nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina i promjenu morfologije neurona (5). Formiranje agregata  $\alpha$ -sinukleina u zrelih neuronima ima velik utjecaj na patologiju Parkinsonove bolesti, a razina agregata raste s godinama. Agregati se početno formiraju unutar aksona, a tamo dospijevaju endocitozom. Formiranje male količine agregata u aksonima doprinosi smanjenju funkcije neurona što ukazuje na činjenicu da i male količine  $\alpha$ -sinukleina bitno doprinose patologiji. Nagomilavanje agregata u neuronima prvenstveno uključuje smanjenje koncentracije presinaptičkih proteina, što dovodi do oslabljene funkcije i podražljivosti, a to u konačnici izaziva smrt neurona (6).

### **1.1.2. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest je najučestalija demencija koja pripada skupini miješanih proteinopatija, a očituje se postupnim propadanjem kognitivnih funkcija. Karakteriziraju je neurofibrilarni čvorovi, neuropilne niti i senilni plakovi i amiloidna angiopatija (1). Neurofibrilarne čvorove (NFT, engl. *neurofibrillary tangles*) prvi je opisao Alois Alzheimer, po kome je ova bolest i dobila ime, a opisao ih je kao nitaste nakupine smještene u piramidalnim neuronima. Sačinjeni su od uparenih spiralnih filamenata, a na okupu ih drže hiperfosforilirani tau. Poznata su tri morfološka tipa NFT-a. Pre-NFT ili difuzni NFT koji ne

mijenja morfologiju neurona. Drugi tip je zreli NFT koji pomiče jezgru neurona prema periferiji i često se širi do dendrita pa samim tim bitno izobličuje neuron. Posljednji tip naziva se ekstraneuronski NFT koji nastaje nakon smrti neurona, a karakterizira ga odsutnost jezgre i citoplazme (7). Tau protein i  $\beta$ -amiloid ulaze u međusobnu interakciju: izolirani  $\beta$ -amiloidni dimeri izazivaju prekid komunikacije koja ide putem mikrotubularnog citoskeleta te konačno dovode do neuritske degeneracije pri kojoj dolazi do povećanja koncentracije fosforiliranog tau proteina. Osim tau proteina i preteča amiloidnog proteina (APP, engl. *amyloid precursor protein*) ima važnu ulogu u patologiji ove bolesti. APP je transmembranski protein koji se cijepa pomoću  $\beta$ -sekretaze,  $\alpha$ -sekretaze ili  $\gamma$ -sekretaze. Cijepanje  $\beta$ -sekretazom i  $\gamma$ -sekretazom stvara  $\beta$ -amiloidne peptide dok cijepanje  $\alpha$ -sekretazom stvara neamiloidne ulomke APP-a. Cijepanje APP-a je fiziološki proces, međutim, može dovesti i do pojave patoloških stanja. Kao što je to slučaj kod Parkinsonove bolesti s  $\alpha$ -sinukleinima, i  $\beta$ -amiloidi se fiziološki nalaze u mozgu, a uloga im je stvaranje ugrušaka vezanjem na fibrinogen (8).

Supstitucija promašenog smisla u genu *PS1* izaziva najagresivniji oblik Alzheimerove bolesti, dok je mutacija u genu *PS2* izuzetno rijetka. Jedna od uloga ovih gena je regulacija aktivnosti  $\gamma$ -sekretaze, pa samim tim njihove mutacije dovode do prekomjerne agregacije  $\beta$ -amiloida (9).

Trenutno ne postoji lijek za Alzheimerovu bolest pa se stoga terapija provodi u svrhu ublažavanja simptoma. Neki od lijekova koji se koriste su memantini, inhibitori acetilkolinesteraze, antipsihotici, antidepresivi. U Alzheimerovoj bolesti dolazi do povećanja acetilkolinesteraze koja ometa komunikaciju između neurona u mozgu. Iz tog se razloga koriste inhibitori acetilkolinesteraze poput donepezila i rivastigmina. S druge strane memantini inhibiraju glutamat i nisu lijekovi izbora - propisuju se pacijentima zbog postojanja intolerancije na inhibitore acetilkolinesteraze (10).

## **1.2. Prehrana kao uzrok neurodegenerativnih bolesti**

### **1.2.1. Prehrana bogata mastima**

Bioaktivni lipidi imaju važnu ulogu u mozgu. Oni sudjeluju u procesima homeostaze, sinaptičke plastičnosti, imaju enzimske funkcije, djeluju na aktivnosti ionskih kanala, ekspresiju gena i upale. Iako njihova regulacija nije još do kraja shvaćena promjene u njihovoj ravnoteži povezane su s neurodegenerativnim bolestima. Prehrana bogata mastima dovodi do sniženja koncentracije alkenilfosfatidiletanolamina i alkenilfosfatidilkolina za koje se smatra da imaju zaštitnu ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa, kardiovaskularnih i

neurodegenerativnih poremećaja. Također, smatra se da se koncentracije fosfatidiletanolamina u plazmi smanjuju prije pojave demencije te na taj način fosfatidiletanolamin može pronaći svoju ulogu u otkrivanju rizika za demenciju. Dugoročna prehrana obogaćena mastima uzrokuje promjene lipidoma hipokampusa i korteksa mozga, a to može prouzrokovati razne varijacije istih i na taj način pokrenuti niz patoloških procesa mozga (11).

Dopaminski receptori vezani su na G-protein. Postoji pet podvrsta dopaminskih receptora: D1-slični receptori (DRD1, DRD5) koji sudjeluju u aktivaciji adenilil ciklaze i D2-slični receptori (DRD2, DRD3, DRD4) koji djeluju kao inhibitori enzima u postsinaptičkim neuronima. Tijekom hranjenja pretilih životinja brzo se povećava razina dopamina, dok se između obroka njegova koncentracija vrlo brzo smanjuje. U mozgu pretilih životinja dolazi do smanjenja ekspresije DRD2, a istodobno se povećavaju razine dopamina. Smatra se da su razine bazalnog dopamina kod pretilih osoba povećane jer je dopaminski sustav uključen u nagradu, u ovom slučaju hranu. Samim tim niske razine dopamina u mozgu pretilih služe kao dio nagradnog sustava (12).

Mutacije u genu *APOE* povećavaju vjerojatnost pojave bolesti u kasnoj dobi. Gen se sastoji od tri alela: epsilon 4, epsilon 3 i epsilon 2. Alel epsilon 4 ima povećanu učestalost u osoba koje su razvile bolest, dok je učestalost alela epsilon 3 kod pacijenata smanjena. Vođeni ovim saznanjima ispitan je utjecaj alela epsilon 4 u nastanku Alzheimerove bolesti kod oboljelih pacijenata kako bi se ispitala veza između hrane bogate mastima i nastanka bolesti. Njegove koncentracije nakon dijete obogaćene zasićenim masnim kiselinama bile su mnogo veće. Stoga se izvodi zaključak da unos hrane bogate mastima doprinosi pojavi Alzheimerove bolesti (13).

### **1.3. Utjecaj masnih kiselina na stabilnost i sastav stanične membrane**

Stanične membrane građene su kao lipidni dvosloj koji se u najvećoj mjeri sastoji od fosfolipida i kolesterola. Osim toga sastoje se i od raznih proteina, receptora, enzima i transportera integriranih u membranu. Masne kiseline su glavni građevni element fosfolipida, a sastoje se od lanca koji sadrži od 4 do 28 ugljikovih atoma. Najčešće masne kiseline staničnih membrana su palmitinska kiselina - koja pripada skupini zasićenih masnih kiselina, dok su oleinska i linolinska kiselina nezasićene. Ovisno o tome kojoj vrsti masnih kiselina pripadaju svaka od njih drugačije djeluje na stabilnost i sastav stanične membrane. Tako je primjerice otkriveno kako palmitinska kiselina uzrokuje veću toksičnost od nezasićenih masnih kiselina povećavajući razinu oksidativnog stresa što je utvrđeno mjerenjem

koncentracije laktat dehidrogenaze (LDH, engl. *lactate dehydrogenase*) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u mediju tretiranih stanica. Zasićene masne kiseline su hidrofobnije od nezasićenih, što smanjuje fluidnost membrane i doprinosi pakiranju fosfolipida u dvosloju, dok nezasićene imaju suprotan učinak. Struktura Membranski dvosloj ima veću širinu nakon tretmana nezasićenim masnim kiselinama (14).

Uz pretpostavku da smanjenje fluidnosti stanične membrane može dovesti do još većeg taloženja amiloida u Alzheimerovoj bolesti ispitan je učinak stearinske, oleinske, linolne,  $\alpha$ -linolenske, arahidonske, eikosapenteinske i dokozaheksaenske kiseline. Sve navedene kiseline su nezasićene, a razlikuju se po broju dvostrukih veza u ugljikovodičnim lancima. Za dokozaheksaensku i arahidonsku kiselinu od prije je poznato da poremećaj njihovog metabolizma dovodi do neuroloških poremećaja. Međutim, neka istraživanja navode kako dokozaheksaenska kiselina osim što povećava fluidnost membrane, povećava neurotransmittersku i sinaptičku funkciju, djeluje neuroprotektivno, kao i da smanjuje količinu krvožilnog taloženja APP-a, ali isto tako može povećati oksidativni stres. S druge strane arahidonska kiselina regulira aktivnost protein kinaze A i C, NADPH - oksidaze, te ima važnu ulogu u produljivanju neurita. Patološke koncentracije uzrokuju mitohondrijsku disfunkciju, smrt neurona i stvaranje protuupalnih posrednika. U spomenutom istraživanju utvrđeno je da samo masne kiseline s četiri ili više od četiri dvostruke veze imaju sposobnost povećanja fluidnosti membrane, a u ovom slučaju radi se o arahidonskoj, dokozaheksaenskoj i eikosapentaenoičnoj kiselini. Koncentracija tih polinezasićenih kiselina uvelike ovisi o učinku na staničnu membranu. Smatra se da mijenjaju fluidnost membrane i povećavaju izlučivanje amiloida u rasponu koncentracija od 100 nM do 1  $\mu$ M. Položaji dvostrukih veza u ugljikovodičnim lancima nemaju utjecaj na fluidnost membrane i precipitaciju amiloida. Ovim i sličnim istraživanjima nastoji se osmisliti strategija prehrane kako bi se spriječila pojava neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (15).

### **1.4. Utjecaj simvastatina na neurodegenerativne bolesti**

Antilipemici su lijekovi koji se koriste u liječenje hiperlipidemije, a u njih se ubrajaju statini, fibrati, niacin, vezivači žučnih kiselina i ezetimib. Statini, poznatiji i kao inhibitori hidrosimetil-glutamil-koenzim A reduktaze (HGM-CoA reduktaza, engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*), lijekovi su izbora u liječenju hiperlipidemija. Oni smanjuju koncentraciju lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*) u krvi na način da inhibiraju sintezu kolesterola u jetri zbog čega dolazi do povećane ekspresije LDL

receptora u jetri i time do povećavanja preuzimanja LDL kolesterola iz krvotoka u jetru, što ukupno rezultira smanjenjem LDL-a u krvi. Osim što primarno snižavaju koncentracije LDL kolesterola snižavaju i koncentraciju triglicerida, a povećavaju koncentracije HDL kolesterola. Najteža zabilježena nuspojava ove skupine antilipemika je rabdomioliza, što može rezultirati akutnim bubrežnim zatajenjem. Ovo stanje je reverzibilno, pa se nakon prekida terapije pacijent oporavlja (16).

Vezivači žučnih kiselina sprječavaju enterohepatičku cirkulaciju kolesterola vežući žučne kiseline. Tim mehanizmom potiče se ponovno sintetiziranje žučnih kiselina u jetri iz kolesterola unesenog putem LDL kolesterola, što rezultira smanjenjem koncentracije u krvi. Međutim vezivači žučnih kiselina imaju slabiji učinak od statina, a mogu dovesti i do povećanja koncentracije triglicerida u krvi. Niacin odnosno vitamin B3, najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim lijekovima. Jedan od najvažnijih mehanizama djelovanja je smanjenje razgradnje kolesterola i triglicerida u perifernim tkivima. Fibrati aktiviraju lipoprotein lipazu koja dovodi do smanjenja VLDL i LDL kolesterola u cirkulaciji, smanjuju oslobađanje masnih kiselina iz masnog tkiva, inhibiraju sintezu triglicerida u jetri, što dovodi do smanjenja njihove koncentracije u krvi, povećavaju izlučivanje kolesterola u žuč, što može uzrokovati sklonost nastanku žučnih kamenaca, te povećavaju razinu HDL kolesterola. Ezetimib se primjenjuje kako bi snizio visoke koncentracije LDL kolesterola u krvi, a funkcionira na način da sprječava apsorpciju kolesterola iz crijevnog lumena, kao i enterohepatičku cirkulaciju kolesterola (10).

### **1.4.1. Simvastatin**

Simvastatin pripada velikoj skupini lijekova pod nazivom statini. Kao što je već objašnjeno, statini su inhibitori HMG-CoA reduktaze. Hidrolizom simvastatina nastaje njegov glavni metabolit  $\beta$ -hidroksiacid simvastatin koji ima najznačajniju ulogu u inhibiranju HMG-CoA reduktaze. Simvastatin se metabolizira u jetri, a eliminira pomoću žuči. Nuspojave koje ovaj lijek može izazvati su u većini slučajeva blage i kratkotrajne. Može uzrokovati povećanje serumske kreatin fosfokinaze, stoga je tijekom duže terapije ovim lijekom potrebno pratiti njenu koncentraciju u serumu (17).

Istraživanja sugeriraju kako je hiperkolesterolemija jedna od nekoliko faktora rizika za nastanak demencije. Upravo je zbog toga ispitan učinak statina, kao zlatnog standarda u liječenju hiperkolesterolemija na pojavu demencije. Činjenica da se upravo simvastatin od svih ostalih predstavnika statina probija u prvi plan prilikom istraživanja neurodegenerativnih

## UVOD

promjena leži u činjenici da on ima mnogo veći potencijal prelasku krvno-moždane barijere od ostalih statina. Simvastatin ima važnu ulogu u induciranju neuritogeneze. Smatra se je ta pojava povezana s primarnom funkcijom statina te da zbog toga simvastatin održava kolesterol na površini stanica. U prilog tome ide činjenica da u lipidnom sastavu neurita nalazimo veću koncentraciju kolesterola nego kod odraslih neurona. Istovremeno simvastatin uzrokuje potrošnju kolesterola putem protein fosfataze 2A (PP2A, (engl. *protein phosphatase 2*) koja inaktivira AMP aktiviranu protein kinazu (AMPK, engl. *activated protein kinase*). Sve to dovodi do aktivacije acetil CoA karboksilaze, što u konačnici rezultira sintezom novih masnih kiselina koje sudjeluju u rastu neurita (18).

N-metil D-aspartat (NMDA, engl. *N-methyl-D-aspartate*) receptor je jedan od receptora glutamata koji ima ulogu u apoptozi neurona, kretanju lokomotornog sustava, anksioznosti, pažnji i depresiji. Njegova prekomjerna aktivacija dovodi do smrti neurona. Dokazano je da dopaminergički poremećaji mozga dovode do promjena u NMDA receptoru, što je važno otkriće u borbi protiv Parkinsonove bolesti. Kako je anksioznost jedna od popratnih pojava Parkinsonove bolesti, ispitan je učinak NMDA receptora na anksioznost. Naime, NMDA receptor ima smanjenu aktivnost ukoliko je prisutna anksioznost. Međutim, podvrgavanjem eksperimentalnih životinja tretmanu simvastatinom nakon induciranja anksioznosti uvidjelo se da simvastatin ublažava simptome anksioznosti. Osim toga, simvastatin je pokazao neuroprotektivni učinak na jednoj staničnoj liniji snižavajući koncentraciju glutamata i NR1, odnosno podjedinice NMDA receptora. Njihova povećana koncentracija pokazuje izrazitu toksičnost za stanice. Ovim otkrićima otvara se novo polje za istraživanje povezanosti između NMDA receptora i Parkinsonove bolesti (19). Receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA, engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid*) je također predstavnik receptora glutamata. AMPA u svom receptorskom kompleksu sadrži podjedinicu GluR2, a varijabilnost ekspresije ove podjedinice predstavlja ključnu ulogu u neurotoksičnosti. Naime, niska razina ekspresije GluR2 dovodi do povećane propusnosti AMPA receptora za kalcijeve ione, što u konačnici rezultira degeneracijom neurona. Kao i kod NMDA receptora, simvastatin pokazuje neuroprotektivni učinak za AMPA receptor (20).

Oksidativni stres je stanje koje nastaje u trenutku kada antioksidansi ne mogu neutralizirati slobodne kisikove radikale. Tijekom oksidativnog stresa može doći do oštećenja DNA, oksidacije proteina, modifikacije ionskih kanala, peroksidacije lipida i drugih oštećenja staničnih elemenata. Stanice kojima je potaknut oksidativni stres dodatkom MPP<sup>+</sup>-a podvrgnute su tretmanu sa simvastatinom. Dodatkom simvastatina preživljenje stanica bilo je

znatno veće nego u kontrolnoj grupi kojoj nije dodan simvastatin. PCR metodom utvrđena je povećana ekspresija Nrf2 transkripcijskog faktora kod stanica tretiranih simvastatinom i to na način da simvastatin uzrokuje povećanu ekspresiju Nrf2 regulacijom izvanstanične signal-regulirane kinaze 1/2 (ERK 1/2, engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*). Nrf2 ima veliku ulogu u obrani od oksidativnog stresa. Aktivirani oblik transkripcijskog faktora Nrf2 sudjeluje u indukciji ekspresije enzima i proteina i na taj način regulira metabolizam lijekova, antioksidaciju i signalizaciju oksidanata. Smatra se da su saznanja o Nrf2 velik korak k liječenju mnogih bolesti poput karcinoma, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (21).

Rezultati obdukcije pacijenata s Alzheimerovom bolesti otkrili su abnormalnu mitohondrijsku ultrastrukturu što je popraćeno smanjenjem aktivnosti enzima koji su lokalizirani u mitohondrijima, smanjenjem broja mitohondrija, kao i smanjenjem potrošnje mitohondrijskog kisika. Taloženje izvanstaničnog amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ , engl. *amyloid  $\beta$* ) povezano je s patogenezom mitohondrijske disfunkcije. Dokazano je da kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti koji imaju blaga kognitivna oštećenja simvastatin može imati ključnu ulogu u ublažavanju simptoma i odgađanju napredovanja kognitivnog oštećenja.

Istraživanjem neuroprotektivnog učinka simvastatina na neurotoksičnost  $A\beta$  dokazano je da simvastatin, kroz regulaciju mitohondrijskog puta apoptoze i mitohondrijske funkcije, djeluje neuroprotektivno (22).

S obzirom na to da je simvastatin u prethodnim studijama pokazao potencijal zaustavljanja neuropatoloških procesa vezanih za staničnu membranu on bi mogao imati učinak na staničnu morfologiju u smislu poticanja neuroplastičnosti.

## 1.5. Lipidne splavi - građa i uloga

Lipidne splavi otkrivene su ekstrakcijom stanične membrane neionskim detergentima. Nakon takve ekstrakcije netopljivi lipidi razdvajaju se od ostatka membrane i nazivaju se mikrodomenama otpornim na detergente. Sam naziv „lipidne splavi” povezuje se s mnogo različitih membranskih sklopova. Lipidne splavi su prolazne, relativno uređene domene unutar tekuće faze, a koje su čvršće „spakirane” ili uređenije od ostalih dijelova stanične membrane. Razlika u pakiranju nastaje zbog zasićenja lanaca ugljikovodika u sfingolipidima i fosfolipidima splavi u usporedbi s tzv. nezasićenim masnim kiselinama fosfolipida koje dolaze u sastavu tzv. „neuređene faze”. Lipidne splavi sastoje se od zasićenih fosfolipida, sfingolipida, glikolipida, kolesterola, lipidnih proteina i glikozilfosfatidilinozitola (GPI-sidra, engl. *glycosylphosphatidylinositol anchor*) (23). Zbog svih navedenih tvari koje su sastavni



dio lipidnih splavi, njihove glavne funkcije uključuju pojačano pakiranje, redukciju lipida i smanjenje fluidnosti stanične membrane. Lipidne splavi mogu biti kratkotrajna pojava na površini stanice, ali mogu pokrivati i znatnu površinu. Ovaj fenomen povezan je s vrstom stanice kojoj stanična membrana pripada, vrstom membrane i specifičnim stanjima u kojima se sama stanica nalazi poput staničnog ciklusa. Formiranje lipidnih splavi potaknuto je lipid-lipid i lipid-protein interakcijama. Vezanje kolesterola na sfingolipide predstavlja najčešću interakciju. Glavni proteini koji ulaze u sastav lipidnih splavi su GPI-sidra, dvostruko acilirani proteini, poput kinaza iz porodice Src ili  $\alpha$ -podjedinice G proteina, proteini povezanih s kolesterolom i palmitoiliranih proteina i transmembranski proteini, posebno palmitoilirani (24).

### **1.5.1. Proteinske i neproteinske sastavnice lipidnih splavi**

Brojni proteini povezani su s lipidnim splavima kako trajno tako i privremeno. GPI-sidra povezuju se s lipidnim splavima zahvaljujući zasićenim lancima koja sadrži u svojoj strukturi. Vidljiva su na vanjskoj strani stanične površine. Smatra se da se GPI-sidra kidaju i otpuštaju u izvanstanični prostor, no taj mehanizam još nije do kraja razjašnjen (25).

Flotilini su proteini koji se nalaze u lipidnim splavima. Oni regrutiraju druge proteine u lipidne splavi i na taj način izravno sudjeluju u njihovoj organizaciji. Upravo je to jedan od glavnih razloga zašto se flotilin koristi kao marker za dokazivanje lipidnih splavi. Osim navedenih, flotilin ima funkciju u regeneraciji neurona, signalizaciji inzulina u adipocitima i sazrijevanju fagosoma u makrofazima. Stoga poremećaj aktivnosti flotilina može uzrokovati neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (26).

Glavni protein neuronskih splavi je NAP-22. On se veže na kolesterol i tim vezanjem izaziva promjenu morfologije splavi. NAP-22, neovisno o kolesterolu, stupa u interakciju sa staničnom membranom. Ukoliko je NAP-22 prošao proces miristilacije, afinitet vezanja za membranu je veći, ali ta posttranslacijska modifikacija ne mijenja afinitet vezanja za kolesterol. Smatra se da mu je bočna pokretljivost u splavima smanjena upravo zbog vezanja za kolesterol (25).

Okosnicu neproteinskog dijela splavi čini kolesterol i manjim dijelom sfingolipidi jer njihovo međusobno vezanje predstavlja najučestaliju interakciju. Sfingolipidima osnovu čini sfingozin u kojem je vodikov atom amino skupine zamijenjen masnom kiselinom, dok je vodikov atom jedne od preostalih hidroksilnih skupina zamijenjen nekom drugom molekulom ili je netaknut. Struktura sfingolipida omogućuje lako međusobno spajanje, što predstavlja

jednu od ključnih uloga u pakiranju lipidnih splavi. Kolesterol je tvar koja čini osnovu ne-proteinskog dijela lipidnih splavi, sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu odakle se transportira do membrane. Pretpostavlja se da kolesterol razdijeljuje ugljikovodične lance sfingolipida, a druga važna funkcija je održavanje lipidnih splavi na okupu. Kolesterol koji se nalazi u lipidnim splavima, za razliku od onoga koji je integriran u ostatak stanične membrane, ima veći afinitet za sfingolipide. Ukoliko se kolesterol koji se nalazi u splavima makne, dolazi do disocijacije proteina i sama splav postaje nefunkcionalni dio membrane što govori o važnosti kolesterola u održavanju lipidnih splavi (27). Kako kolesterol ima važnu ulogu u organizaciji splavi, smatra se da je on odgovoran za činjenicu da lipidne splavi ne postoje u gel fazi. Naime, dodavanjem kolesterola fosfolipidnom dvosloju mijenja se faza stanične membrane. Međutim, dokazano je da različita miješanja između kolesterola i fosfolipida i različita razdvajanja u fazama mogu postojati u isto vrijeme. Kako dodatkom kolesterola dolazi do stvaranja domena koje sadrže uređenu tekuću fazu, smatra se da lipidne splavi postoje upravo u toj ili sličnim fazama. Splavi se isto tako mogu stvoriti u uvjetima niske koncentracije sfingolipida upravo zbog prethodno objašnjenog mehanizma (28).

### **1.5.2. Uloga lipidnih splavi u signalnim procesima**

Jedna od funkcija lipidnih splavi je i prijenos signala. Smatra se da se unutar splavi događa vezanje ligand-receptora nakon čega slijedi aktivacija nizvodnih signalnih molekula. Ukoliko se signalizacija događa na području lipidnih splavi - signalni kompleks je zaštićen od djelovanja enzima karakterističnih za dio membrane koji ne pripada splavima, poput membranske fosfataze koja svojim djelovanjem utječe na ishod signalizacije. Imunoglobulin E svoj signalni put aktivira vezanjem Fc fragmenta na receptor na membrani mastocita ili bazofila, što u konačnici dovodi do oslobađanja medijatora alergijske reakcije. Pretpostavlja se da se ovaj signalni put odvija pomoću lipidnih splavi zbog nepotpune topljivosti membranskog receptora, kao i toga da receptor dovodi do preraspodjele u splavima koje su uočljive fluorescentnim mikroskopom. Dokazano je i da, ukoliko je površinski kolesterol potrošen, ne dolazi do aktivacije signalnog puta (29). Derivirani neurotropni faktor glija stanica (GDNF, engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*) služi za razvoj i održavanje živčanog sustava, a smatra se da njegovoj signalizaciji također posreduju lipidne splavi. GDNF receptorski kompleks sastoji se od receptora GFR $\alpha$  i transmembranske tirozin kinaze (RET, engl. *transmembrane tyrosine kinase*). Nakon međusobnog vezanja GDNF i RET, RET

se premiješta u lipidne splavi gdje se veže s GFR $\alpha$ . Kao i kod signalizacije IgE-a, do signalizacije ne dolazi ukoliko je površinski kolesterol potrošen (30).

Navedeni signalni putevi samo su neki za koje se smatra da se događaju unutar lipidnih splavi. Međutim, još uvijek nije poznato na koji način funkcionira takva signalizacija. Smatra se da se receptor na ligand veže tek nakon oligomerizacije. Fosforilacija receptora odvija se pomoću Src-kinaze koja se nalazi na splavi. Nakon fosforilacije receptora aktiviraju se signalni putevi koji mogu uključivati fosfatidil inozitol, a koji se nalazi na unutrašnjoj strani splavi. Nakon fosforilacije, fosfatidil inozitol može poslužiti i kao vezno mjesto za enzim od interesa i kao supstrat za fosfolipazu C. Nakon vezanja fosfolipaze C stvaraju se drugi glasnici – inozitol trifosfat i diacil glicerol koji imaju ulogu u daljnjoj signalizaciji. No, treba imati na umu da je potrebno dodatno istražiti ove mehanizme kako bi se dodatno rasvijetlila uloga i funkcija lipidnih splavi (29).

## 1.6. Stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y

Stanična linija SH-SY5Y ljudskog neuroblastoma subklon je roditeljskoj staničnoj liniji SK-N-SH. Roditeljska stanična linija dobivena je iz metastatskih stanica 1970. godine punkcijom koštane srži četverogodišnje djevojčice oboljele od neuroblastoma. Uz pomoć retinoične kiseline, forbol-estera ili različitih čimbenika rasta SH-SY5Y stanice mogu se diferencirati u zrele ljudske neurone i pri tome steći različite fenotipe. Stanice koje su potpuno diferencirane izražavaju velik broj različitih markera specifičnih za zrele neurone poput neuron specifične enolaze (NSE, (engl. *neuron specific enolase*), sinaptofizina (SYN, engl. *synaptophysin*), proteina povezanog s rastom (GAP-43, engl. *growth associated protein 43*), te fenotipom nalikuju zrelim neuronima (31).

Retinoična kiselina najčešće je upotrebljavana prilikom procesa diferencijacije SH-SY5Y stanične linije. Ispitivanjem ekspresije transkripcijskih faktora nakon tretmana retinoičnom kiselinom utvrđena je aktivacija 103 transkripcijska čimbenika od kojih 20 reguliraju stanični razvoj i potiče diferencijaciju. Povećana je ekspresija 6 transkripcijskih čimbenika čija je uloga razvoj i diferencijacija neurona - NCOA7, TLX2, ID3, NFE2L2, HOXD10 i ZNRF1. Smanjena je ekspresija 4 negativna regulatora razvoja neuralnih stanica; TFAP2B, ATF5, ISL1 i SIX3. Ekspresija MEF2C, kao pozitivnog regulatora diferencijacije je jedina smanjena. Primijećeno je da se kroz produljivanje vremena inkubacije stanica s retinoičnom kiselinom smanjuje aktivnost MSX2 i PHOX2B koji su pozitivni regulatori. Imunocitokemijskom analizom TH i VMAT2, proteina uključenih u sintezu dopamina,

utvrđeno je da i nediferencirane i diferencirane stanice proizvode dopamin. Međutim, imunoreaktivnost je znatno povećana nakon tretmana retinoičnom kiselinom u trajanju od 8 dana za razliku od stanica koje nisu bile podvrgnute tretmanu. Također, aktivnost inhibitora dopaminskog receptora, proteina NCS1, čija je uloga desenzibilizacija, kod diferenciranih stanica opada. DRD2 receptor izražen je u SH-SY5Y stanicama, a ima važnu ulogu u signalizaciji putem dopamina pa se linija često diferencira baš u ovom smjeru da bi se promatrao utjecaj okolišnih čimbenika na preživljavanje dopaminergičkih neurona (32).

### **1.6.1. Lipidne splavi u neurodegenerativnim bolestima - istraživanja provedena na SH-SY5Y staničnoj liniji**

U regulaciji razine  $\beta$ -amiloida ključnu ulogu imaju ekspresija APP u membrani i amiloidni prekursor proteina  $\beta$ -sekretaze-1 (BACE1, engl.  *$\beta$ -secretase 1*). Regulacija BACE1 određena je membranskim lipidima, što uključuje i lipidne splavi. Enzimi koji kontroliraju razinu lipida su HMG-CoA reduktaza i sfingomijelinaza. Glavni sastojak neuronskih membrana je kolesterol koji u fiziološkim uvjetima ne prelazi krvno-moždanu barijeru, međutim, njegovi oksidirani oblici poput 27-hidroksikolesterola (27-OH-C, engl. *27-hydroxycholesterol*) imaju tu mogućnost. Utvrđeno je nakupljanje 27-OH-C u mozgu u pacijenata s Alzheimerovom bolesti, a nije isključena ni njegova povećana koncentracija u plazmi. Dokazano je da 27-OH-C povećava razinu BACE1 u SH-SY5Y stanicama, što povezuje hiperkolesterolemiju s nastankom Alzheimerove bolesti u starijoj životnoj dobi. Također, povećavanje koncentracije 27-OH-C mijenja aktivnost sfingomijelinaze, što rezultira ubrzanom nastanku lipidnih splavi. LDL, između ostalog, sudjeluje i u prijenosu kolesterola, a dokazana je povećana koncentracija oksidiranog oblika LDL-a u Alzheimerovoj bolesti. Izloženost stanica oksidiranom obliku LDL-a može uzrokovati oksidativni stres i iscrpljivanje glutationa. Istraživanje ukazuje na to da aktiviranje sfingomijelinaze netoksičnim koncentracijama oksidiranog LDL-a i 27-OH-C uzrokuje smanjenje koncentracije glutationa što rezultira u povećanju izlučivanja  $\beta$ -amiloida u SH-SY5Y staničnoj liniji. Spomenutim istraživanjem skreće se pažnja na sfingomijelinazu kao jedan od ključnih čimbenika lipidnog oksidativnog stresa koji kasnije može rezultirati neurodegeneracijom (33). Transmembranska cink metaloproteinaza tip 1 (ADAM10, engl. *disintegrin and metalloproteinase domain – containing protein 10*) je  $\alpha$ -sekretaza odgovorna za neamiloidogeno kidanje APP-a. Oslabljena proteoliza posredovana ADAM10 dovodi do povećanog kidanja preostalim sekretazama što rezultira povećanju koncentracije  $\beta$ -amiloida, a njegovo nagomilavanje uzrokuje smrt neurona. Kako se amiloidogeno kidanje APP-a odvija unutar lipidnih splavi za

## UVOD

pretpostaviti je da se kidanje posredovano s ADAM10 vrši u ne-splavima. Vodeći se ovom hipotezom, stanična linija SH-SY5Y transfekcirana vektorom kojem je bio ugrađen APP695 ili BACE1 koji su bili označeni s ADAM10. Ovim istraživanjem potvrđeno je da isključivanje ADAM10 iz lipidnih splavi može smanjiti amiloidogeneza i na taj način spriječiti neurodegeneraciju neurona (34).

Istraživanje funkcije, građe i uloge lipidnih splavi u neurodegenerativnim bolesti sve više uzima maha, međutim, postoje brojna neriješena pitanja koja se trebaju rasvijetliti daljnjim istraživanjima. Okolišni čimbenici jedan su od bitnih uzroka brojnih bolesti, no utjecaj okoliša na lipidne splavi još uvijek nije istražen jer se većina istraživanja zasniva na idealnom prikazu ovog fenomena. Nadalje, još uvijek nije istraženo jesu li potrebni specifični gangliozidi i gdje se oni nalaze kako bi došlo do komunikacije splavi s proteinima, enzimima ili nekom drugom molekulom (35). Varijacije u koncentraciji kolesterola u splavima i njihov utjecaj na signalizaciju i promet koji u konačnici može doprinijeti razvoju bolesti također ostavljaju dosta prostora za nova istraživanja. Iz prijašnjih istraživanja dokazano je da brzo smanjenje koncentracije kolesterola dovodi do pojačane ekspresije GM1 koji povećava nakupljanje  $\beta$ -amiloida. Međutim, utjecaj statina na regulaciju ekspresije GM1 nije istražen. Za rasvjetljavanje utjecaja lipidnih splavi u neurodegenerativnim bolestima potrebno je do kraja istražiti signalne puteve splavi i molekule koje sudjeluju u signalizaciji. Razumijevanjem signalizacije i identifikacijom agonista i antagonista među molekulama otvara se put sintetiziranju novih lijekova u borbi protiv neurodegenerativnih bolesti (36).

## **2. Hipoteza**

Hipoteza ovog istraživanja je da stanice SH-SY5Y neuroblastoma uzgojene u mediju obogaćenom lipidima imaju veću površinu neurita od stanica uzgojenih u standardnom mediju te da dodavanje simvastatina i mijenjanje sastava lipidnih splavi staničnih membrana u oba uzgojna uvjeta i dovodi do smanjenja broja grananja neurita.

### 3. Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi utjecaj lipidima obogaćenog medija na morfologiju retinoičnom kiselinom diferencirane stanične linije SH-SY5Y.
2. Utvrditi utjecaj simvastatina na morfologiju stanica uzgojenih u standardnom ili lipidima obogaćenom mediju.
3. Izolirati lipidne splavi te odrediti njihov sastav koristeći se Western blot metodom.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao istraživanje parova.

### 4.2. Materijal

Istraživanje obuhvaća SH-SY5Y staničnu liniju ljudskog neuroblastoma. Istraživanje je provedeno u sklopu HRZZ projekta „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ voditeljice M. Heffer, HRZZ-IP-2014-09-2324.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Uzgoj i diferencijacija stanica

Stanična linija SH-SY5Y ljudskog neuroblastoma uzgojena je u DMEM/F12 mediju u omjeru 1:1. Medij sadrži 10 % FBS-a i 1 % penicilina i streptomocina. Uz navedeno sadrži i 4 mM L-glutamina i 15 mM HEPES pufera. Za postupak diferencijacije korišteno je 10  $\mu$ M retinoične kiseline. Postupak diferencijacije zasniva se na promjeni medija koji sadrži retinoičnu kiselinu svakih 48 sati, potom 96 sati i 132 sata. Diferencijacija stanica u ovom istraživanju trajala je 9 dana.

#### 4.3.2. Tretiranje stanica

Tretiranje stanica provedeno je tijekom 24 sata, a stanice su bile podvrgnute sljedećim tretmanima:

1. Standardni medij
2. Standardni medij + 10  $\mu$ M simvastatina
3. Medij obogaćen lipidima (oleinska kiselina 25  $\mu$ M, palmitinska kiselina 125  $\mu$ M, stearinska kiselina 40  $\mu$ M)
4. Medij obogaćen lipidima + 10  $\mu$ M simvastatina
5. Standardni medij + DMSO (u istom volumenu u kojemu je korišten kod otapanja lipida)
6. Standardni medij + DMSO + 10  $\mu$ M simvastatina



### 4.3.3. Imunocitokemija

Imunocitokemija je metoda koja služi za vizualizaciju distribucije i lokalizaciju specifičnih komponenti (antigena) unutar stanica. Lokalizacija i vizualizacija moguća je uz pomoć označenog protutijela koje se veže na određeni antigen. U ovoj studiji korištena je indirektna metoda koja podrazumijeva vezanje sekundarnog, označenog protutijela na primarno protutijelo. Imunokemijske metode korištene su zato što pripadaju jednim od najosjetljivijih i najspecifičnijih metoda (37).

Imunocitokemija se u ovom istraživanju izvodila u pločicama s 24 jažice. Na dnu svake jažice bilo je staklo koje je prethodno oprano u 1 M NaOH i barem 10 puta isprano destiliranom vodom. Potom je slijedila kolagenizacija stakalaca kako bi stanice ostale „priljepljene” na svako stakalce. Kolagenizacija se provodila otapanjem kolagena tip I u 70 %-tnom etanolu. Dodana je suspenzija kolagena i etanola u koncentraciji od 5,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Pripremljena je suspenzija dodana u volumenu od 100  $\mu\text{l}$  po jažici. Potom su otvorene pločice s 24 jažice ostavljene u laminaru pod UV lampom do sljedećeg dana kako bi bilo sigurno da su potpuno sterilne.

Za imunocitokemiju bilo je potrebno 50 000 stanica/ml, a odstupanja od te vrijednosti mogu biti do 33 %. Prethodno tretirane stanice u pločicama s 24 jažice bile su fiksirane, a kao fiksativ korišten je 4 % paraformaldehid. Fiksacija se provodila na +4 °C kroz 30 minuta. Potom su stanice isprane 3x10 minuta u pothlađenom fosfatnom puferu. Slijedilo je dodavanje blokirajuće otopine koja sadrži 1 % goveđeg serumskog albumina (BSA, ThermoFisher Scientific, St. Louis, MO, SAD;16210072) i 5 % seruma životinje iz kojeg je proizvedeno sekundarno protutijelo, detergent 1 %-tni Triton x-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD; 93443), a kao otapalo koristio se 1x PBS (800 ml destilirane vode, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Blokirajuća otopina dodana je kako bi se spriječilo pozadinsko obojenje prije dodavanja primarnog protutijela, kao i nespecifična vezanja primarnog i sekundarnog protutijela. Stanice su inkubirane u blokirajućoj otopini 2 sata na +4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju su - SMI312 (Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, SAD;837904, miš), SMI31 (Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, SAD;801601, miš) i SMI32 (Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, SAD;801701, miš). U jažicu namijenjenu za kontrolu primarna protutijela se nisu dodavala već je dodana blokirajuća otopinu koja je zatim isprana 3x10 minuta u 1x PBS-u, a nakon čega je slijedilo dodavanje sekundarnog protutijela te se dalje nastavio tretman istim protokolom. Primarna protutijela razrjeđena su u 1 %-tnoj blokirajućoj

otopini u omjeru 1:10 000 i dodana u jažice. Nakon dodavanja primarnih protutijela uslijedila je inkubacija od 24 sata na +4 °C. Poslije 24-satne inkubacije u primarnom protutijelu, stanice u jažicama ispirane su 3x10 minuta pothlađenim fosfatnim puferom, a potom je dodano sekundarno protutijelo. Sekundarno protutijelo korišteno za ovo istraživanje je kozje anti-mišje IgG protutijelo (Alexa Fluor, Salt Lake City, UT, SAD;115605068). Sekundarno protutijelo razrjeđeno je u blokirajućoj otopini u omjeru 1:300. Inkubacija je trajala 4 sata na +4 °C, a nakon nje uslijedilo je ispiranje 3x10 minuta u pothlađenom fosfatnom puferu. Prvo ispiranje mora sadržavati HOECST (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD;654434) boju za jezgre koja je razrjeđena u omjeru 1:10 000. Nakon zadnjeg ispiranja u jažice dodan je fosfatni pufer i ostavljen preko noći na +4 °C. Sljedeći dan stakalca su spremna za montiranje.

#### **4.3.4. Bojenje kolera toksinom B**

Kolera toksin B (Cholera toxin B from *Vibrio cholerae*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD;C1655) dodan je u šest jažica iz svake od šest eksperimentalnih grupa. Nakon razrjeđivanja u blokirajućoj otopini u omjeru 1:1000 dodan je kolera toksin na stanice. Inkubacija je trajala 2 sata, a poslije nje slijedilo je ispiranje 3x10 minuta pothlađenim fosfatnim puferom. Prvo ispiranje sadržavalo je HOECST boju za jezgre u omjeru 1:10 000. Nakon zadnjeg ispiranja dodan je fosfatni pufer u kojem su stanice bile tijekom cijele noći. Sutradan je izvršeno montiranje stakalaca na predmetnice.

Preparati su pokriveni pokrovnim staklom (Menzel-Glaser Coverslips) i slikani konfokalnim mikroskopom, slike su zatim kvantificirane u Fiji ImageJ programu.

#### **4.3.5. Izolacija lipidnih splavi**

Procesu izolacije lipidnih splavi prethodilo je struganje tretiranih stanica. Struganje se provelo mehaničkim putem. Stanice su ispirane 1x PBS-om 3x15 sekundi, a nakon ispiranja dodano je još 1-2 ml 1x PBS-a te ih se sterilnom, plastičnom strugalicom sastrugalo s dna Petrijeve zdjelice. Sastrugane stanice su zatim centrifugirane na 120-150 g 5 minuta kako bi se peletirale. Nakon peletiranja započeo je proces izolacije. Za početak priređen je pufer s inhibitorima. U 1000 µl karbonatnog pufera koncentracije 0,5 M dodani su: 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 5 mM natrijevog fluorida (NaF), 1 mM natrijevog ortovanadata (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) i 1 x smjesa inhibitora proteaza (Complete Mini EDTA-free Roche;11836170001). Iz sterilne falkonice u kojoj su se nalazile peletirane stanice odliven je supernatant i dodan pufer s inhibitorima nakon čega su stanice vorteksirane. Vorteksiranje se

provodi dok se pelet u potpunosti ne resuspendira, nakon čega je uslijedila sonifikacija, 2x10 sekundi. Potom je otpipetirano 600 µl suspenzije na dno plastične epruvete koju koristimo za ultracentrifugu. Za svaku od 6 grupa tretiranih stanica korištena je ista količina suspenzije koja je nadslojena gradijentom saharoze. Masu sparenih epruveta za ultracentrifugu (1-4;2-5;3-6) izjednačena je na drugu decimalu. Ultracentrifuga (Optima XPN-90, Beckman Coulter) provela se tijekom 20 sati na 200 000 g.

### 4.3.6. Dokazivanje proteina

Nakon završetka ultracentrifugiranja frakcionirani su uzorci na način da svaka eksperimentalna grupa ima 11 frakcija. U ovom istraživanju za dokazivanje proteina u pojedinim frakcijama koristila se metoda po Bradfordu.

Metoda po Bradfordu je kolorimetrijska metoda koja se bazira na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 u kiselom mediju. Coomassie Brilliant Blue G-250 reagira najčešće s grupama arginina u proteinima. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama. To dovodi do promjene boje iz smeđe u plavu, pri čemu se apsorpcijski maksimum mijenja s 465 nm na 595 nm, što mjerimo spektrofotometrom (38). Za metodu po Bradfordu korištena je pločica s 96 jažica s ravnim dnom kako ne bi došlo do rasapa svjetlosti prilikom spektrofotometrijskog mjerenja. Napravljen je standard pomoću 5 %-tnog BSA. Standard je razrijeđen 1 x PBS-om, počevši od koncentracije 10 mg/ml, a krajnja koncentracija iznosila je 0,0097 mg/ml, u svakoj jažici osim 10 µl standarda nalazilo se i 200 µl Bradford reagensa. Negativnu kontrolu predstavljale su jažice sa 200 µl Bradford reagensa (Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus Protein Assay, Massachusetts, SAD;23238). Svaki uzorak je rađen u duplikatu zbog veće preciznosti mjerenja. Pločica s 96 jažica ostala je na sobnoj temperaturi 5-10 minuta. Uslijedilo je očitavanje apsorbance na Bio Rad uređaju (iMark™ Microplate Absorbance Reader) na 595 nm.

### 4.3.7. Elektroforeza i Western blot metoda

Elektroforeza je tehnika koja služi za razdvajanje nabijenih molekula u električnom polju. Celuloza acetat, škrobni gel, agarozni gel i poliakrilamidni gel vrste su nosača za elektroforezu. Za razdvajanje proteina koriste se agarozni ili poliakrilamidni gelovi (36). U ovom istraživanju korišten je poliakrilamidni gel kao nosač. Vrsta elektroforeze za ovo istraživanje bila je SDS-PAGE elektroforeza.

## MATERIJALI I METODE

SDS-PAGE elektroforeza je vrsta denaturirajuće elektroforeze. Denaturacija proteina događa se kuhanjem s dodatkom merkaptoetanolu ili ditiotreitola (DTT) koji reducira disulfidne mostove. Dodecil sulfat (SDS) je detergent koji daje naboj razmjerni masi svim proteinima. U konačnici u SDS-PAGE elektroforezi proteini se razdvajaju na temelju njihove veličine i svi putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi (39).

Prije elektroforeze dodan je DTT u frakcije uzoraka u omjeru 1:4. Frakcije su potom izložene temperaturi od 95 °C tijekom 5 minuta. SDS-PAGE elektroforeza se u ovom istraživanju izvela u 12 %-tnom poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza se provodila u kadicama (Mini Gel Tank) koje su napunjene 1x *running* puferom (25mM Tris, 192mM glicin, 0,1% SDS) do oznake na kadici. U prvu jažicu gela dodano je 3 µl standarda (SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD;LC5925), a u sljedeće po 25 µl frakcije uzoraka za svaku eksperimentalnu grupu. Jakost električnog polja elektroforeze iznosila je 25 mA. Elektroforeza se provela u okvirnom vremenu od 2 sata.

Western blot predstavlja transfer proteina s gela na membranu. Za detekciju proteina od interesa na membranu se dodaje primarno protutijelo specifično za određeni protein od interesa. Sekundarno protutijelo mora biti specifično za primarno kako bi došlo do njihovog međusobnog vezanja. Sekundarno protutijelo mora biti obilježeno kako bi vizualizacija bila uspješna (39).

Nakon završetka elektroforeze slijedi Western blot metoda. Membrana koja se koristi za prijenos proteina s gela prvo je aktivirana 10-ak sekundi u metanolu, a potom isprana destiliranom vodom. Redom su poslagane: spužva, filter papir, elektroforeski gel, membrana, filter papir i spužva. Kadica u kojoj je izvršen prijenos proteina s gela na membranu napunjena je do oznake 1x transfer puferom (184mM Tris, 140mM glicin i 20% metanol). Western blot metoda provela se u Thermo Fisher mini blot sustavu na +4 °C, jakost električnog polja iznosila je 200 mA, a sam proces trajao je 16 sati. Nakon Western blot metode membrane su izrezane na specifičnim mjestima – između vrpce transferina 80kDa i vrpce flotilina (48kDa). Primarna su protutijela razrijeđena u 3 % BSA u omjeru 1:2000. Korištena su primarna protutijela za transferin (Thermo Fisher, Massachusetts, SAD;13-6800, miš) i flotilin (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD;610821, zec). Membrane su potom inkubirane 24 sata na +4 °C na tresalici. Nakon inkubacije membrane se ispiru 3x10 minuta u 1x PBST-u. Sekundarno protutijelo korišteno u istraživanju je IgG anti-mišje HRP protutijelo (Santa Cruz, Dallas, TX, SAD;SC-2034) razrijeđeno u 3 % BSA u omjeru 1:5000. Inkubacija sekundarnog protutijela trajala je 4 sata na sobnoj temperaturi na tresalici, nakon čega je

uslijedilo ispiranje 3x10 minuta 1x PBST-om. Membrane su vizualizirane na Bio Rad ChemiDoc Imaging sistemu.

Elektroforeza, Western blot i vizualizacija AMPA receptora rađena je istim principom, međutim, za elektroforezu korištene su samo frakcije 3, 4 i 9 od svake eksperimentalne grupe, a u jažice za elektroforezu stavljena je količina od 30 µg protina. Za proces vizualizacije AMPA receptora nakon Western blot metode korišteno je primarno protutijelo - anti-GluR2 IgG (Neuro Mab, Davis, CA, SAD;L21/32, miš) u omjeru 1:5000. Sekundarno protutijelo razrijeđeno je u omjeru 1:1000, a radi se o 647 AffiniPure kozjem anti - mišjem IgG + IgM antitijelu (Alexa Flour, Salt Lake City, UT, SAD;115 – 605 – 068).

#### **4.4. Statističke metode**

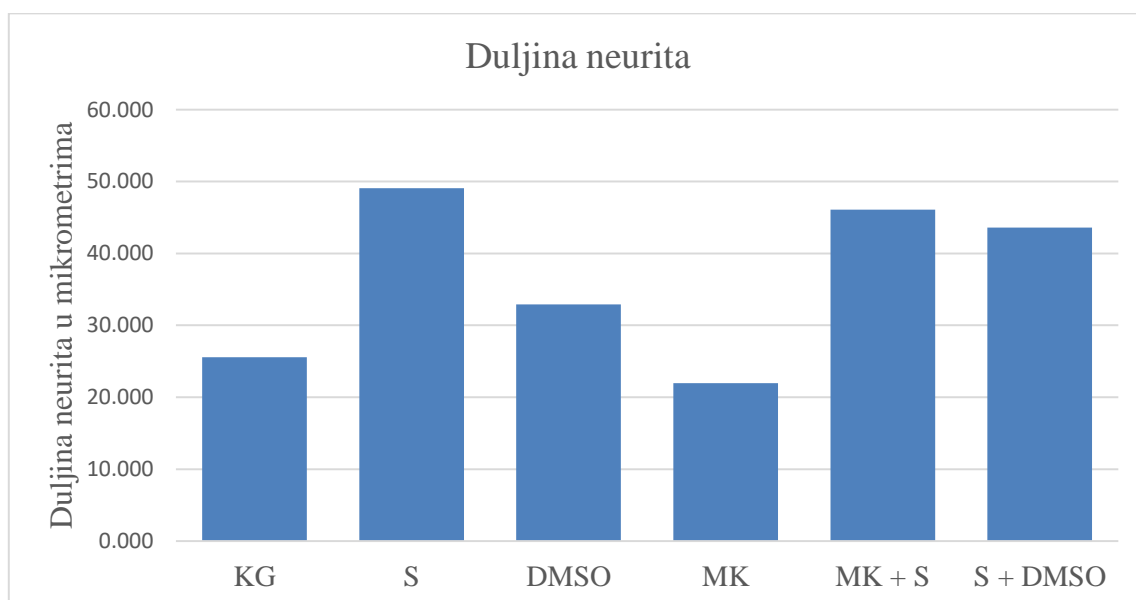
Prikupljeni podatci prikazani su numerički aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom u ostalim slučajevima. Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike između varijabli nezavisnih skupina utvrđene su Studentovim t-testom i analizom varijance ANOVA u slučaju normalne raspodjele, odnosno Kruskal-Wallisovim i Mann-Whitneyjevim U-testom u ostalim slučajevima. Razina značajnosti je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program (Statistica, inačica 13, Dell, SAD).

## 5. Rezultati

### 5.1. Utjecaj simvastatina i lipidima obogaćenog medija na morfologiju SH-SY5Y stanične linije

#### 5.1.1. Utjecaj simvastatina i lipidima obogaćenog medija na duljinu neurita SH-SY5Y stanične linije prikazan bojenjem kolera toksinom B

Kolera toksin B povezuje se s gangliozidom GM1 koji je prisutan na membranama neurona. Budući da je GM1 rasprostranjen po cijeloj membrani, korišten je kao epitop kako bi se preliminarno odredila duljina neurita prilikom različitih tretmana na SH-SY5Y stanicama neuroblastoma. Stanice su podijeljene u 6 skupina: kontrolna grupa, stanice tretirane simvastatinom, stanice tretirane DMSO-om, stanice tretirane masnim kiselinama, stanice tretirane masnim kiselinama i simvastatinom i stanice tretirane simvastatinom i DMSO-om.



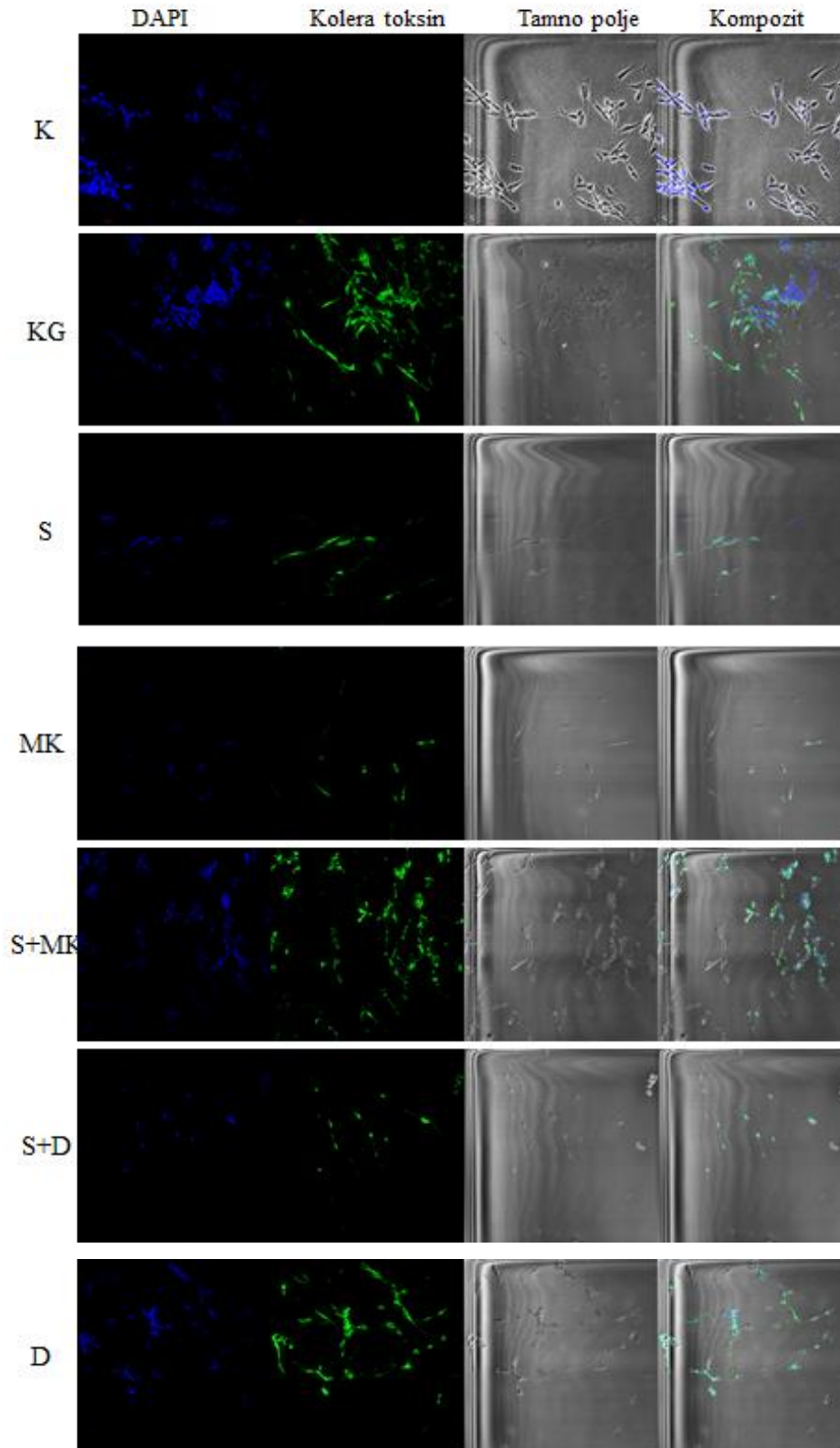
Graf 1. Duljina neurita procijenjena bojenjem tretiranih stanica kolera toksinom.

**Legenda:** KG - kontrolna grupa, S - simvastatin, MK - masne kiseline, S+MK - simvastatin + masne kiseline, S+D - simvastatin + DMSO, D - DMSO.

Primjena kolera toksina B pokazala je kako je najbolji tretman za stanice, tretman simvastatinom. U odnosu na kontrolnu grupu, najmanju duljinu neurita pokazuje tretman masnim kiselinama.

Primijećeno je da kolera toksin B prikazuje neurite određene debljine (do 25  $\mu\text{m}$ ), stoga se provodilo i mikroskopiranje u tamnom polju kao što je prikazano na slici 1.

## REZULTATI



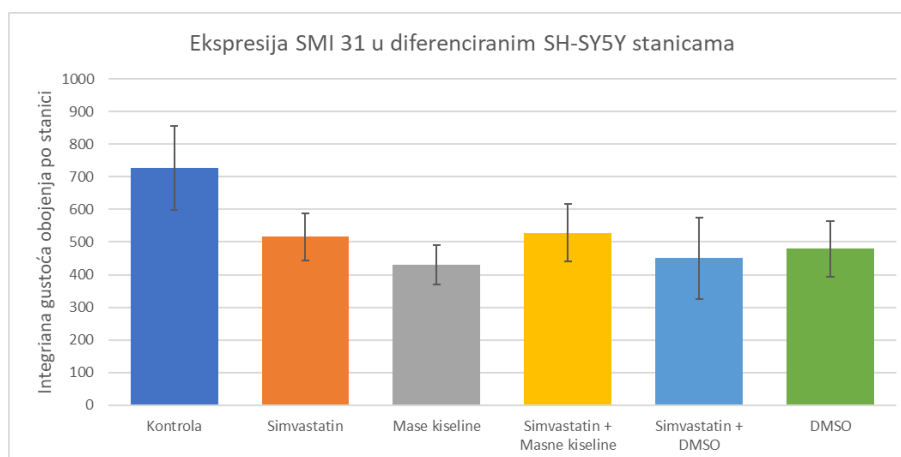
Slika 1. Imunocitokemijsko bojenje stanične linije SH-SY5Y kolera toksinom B. Povećanje 200 x, skala – 50  $\mu\text{m}$ . **Legenda:** K - kontrola, KG - kontrolna grupa, S - simvastatin, MK - masne kiseline, S+MK - simvastatin + masne kiseline, S+D - simvastatin + DMSO, D - DMSO.

## REZULTATI

Na početku ove studije testirana je prikladna metoda za mjerenje neurita. Kolera toksin B dobro obilježava membrane SH-SY5Y stanične linije pa je stoga i upotrijebljen, zajedno s tamnim poljem, za procjenu duljine neurita. Ako se upotrijebi ovaj marker – simvastatinom tretirane stanice imaju najdulje neurite. U tamnom polju rezultat nije isti kao s kolera toksinom B, pa su testirani epitopi citoskeleta.

### 5.1.2. Utjecaj simvastatina i lipidom obogaćenog medija na staničnu liniju SH-SY5Y prikazan bojenjem SMI31, SMI32 i SMI312

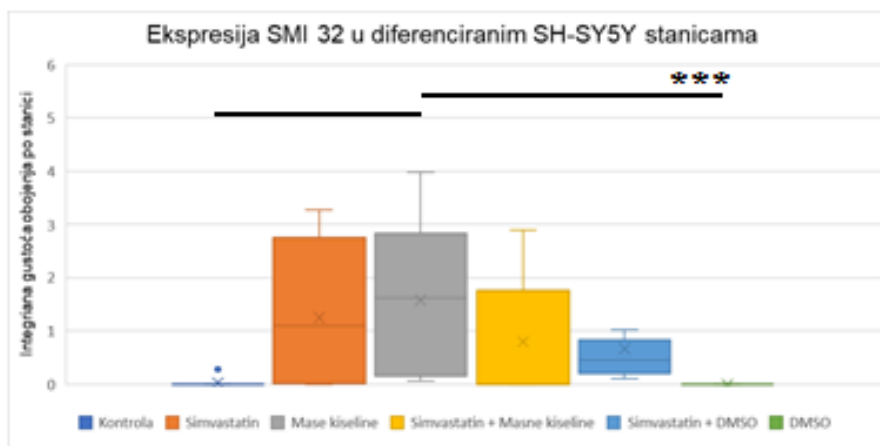
Stanična linija SH-SY5Y prvo je testirana na SMI31 koji prepoznaje fosforilirani epitetop u neurofilamentima. Zatim je testirana na SMI32 koji prepoznaje nefosforilirane epitope neurofilamentnih proteina i prikazuje neuroplastičnost te na SMI312 koji prepoznaje epitope aksona.



Graf 2. Prikaz kvantificirane ekspresije SMI31 u diferenciranoj staničnoj liniji SH-SY5Y. Ekspresija SMI31 u staničnoj liniji SH-SY5Y nije pokazala statističku značajnost.

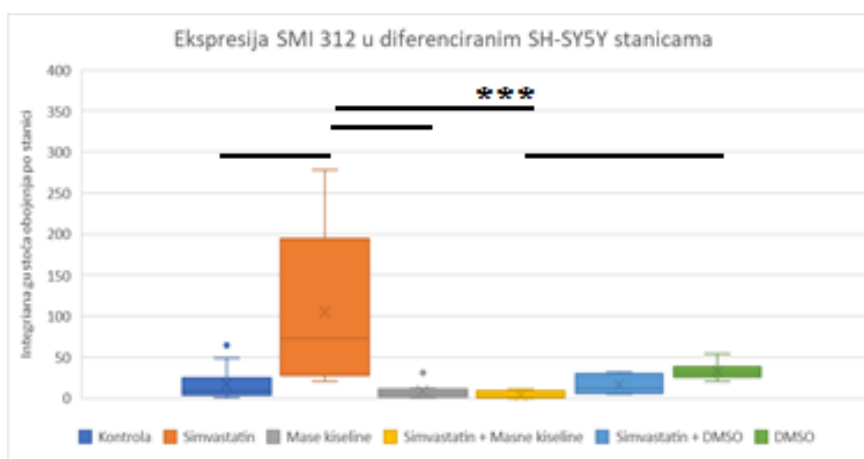


## REZULTATI



Graf 3. Prikaz kvantificirane ekspresije SMI32 u diferenciranoj staničnoj liniji SH-SY5Y. **Legenda:** Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - x , kružići - stršeće vrijednosti, \*\*\* statistička značajnost < 0,001.

Ekspresija SMI32 u diferenciranoj staničnoj liniji SH-SY5Y pokazuje statističku značajnost ( $p=0,0003$ ) između stanica tretiranih masnim kiselinama i kontrolne grupe, kao i stanicama tretiranih masnim kiselinama i DMSO-om. Budući da SMI32 prikazuje neuroplastičnost stanica, iz grafa je vidljivo da stanice tretirane masnim kiselinama imaju veću mogućnost prilagodbe od ostalih tretmana. Iako kolera toksin B pokazuje da je najmanja duljina stanica tretirana masnim kiselinama, primjećuje se da stanice mogu preživjeti u uvjetima koji nisu karakteristični za kvalitetan rast i diferencijaciju.

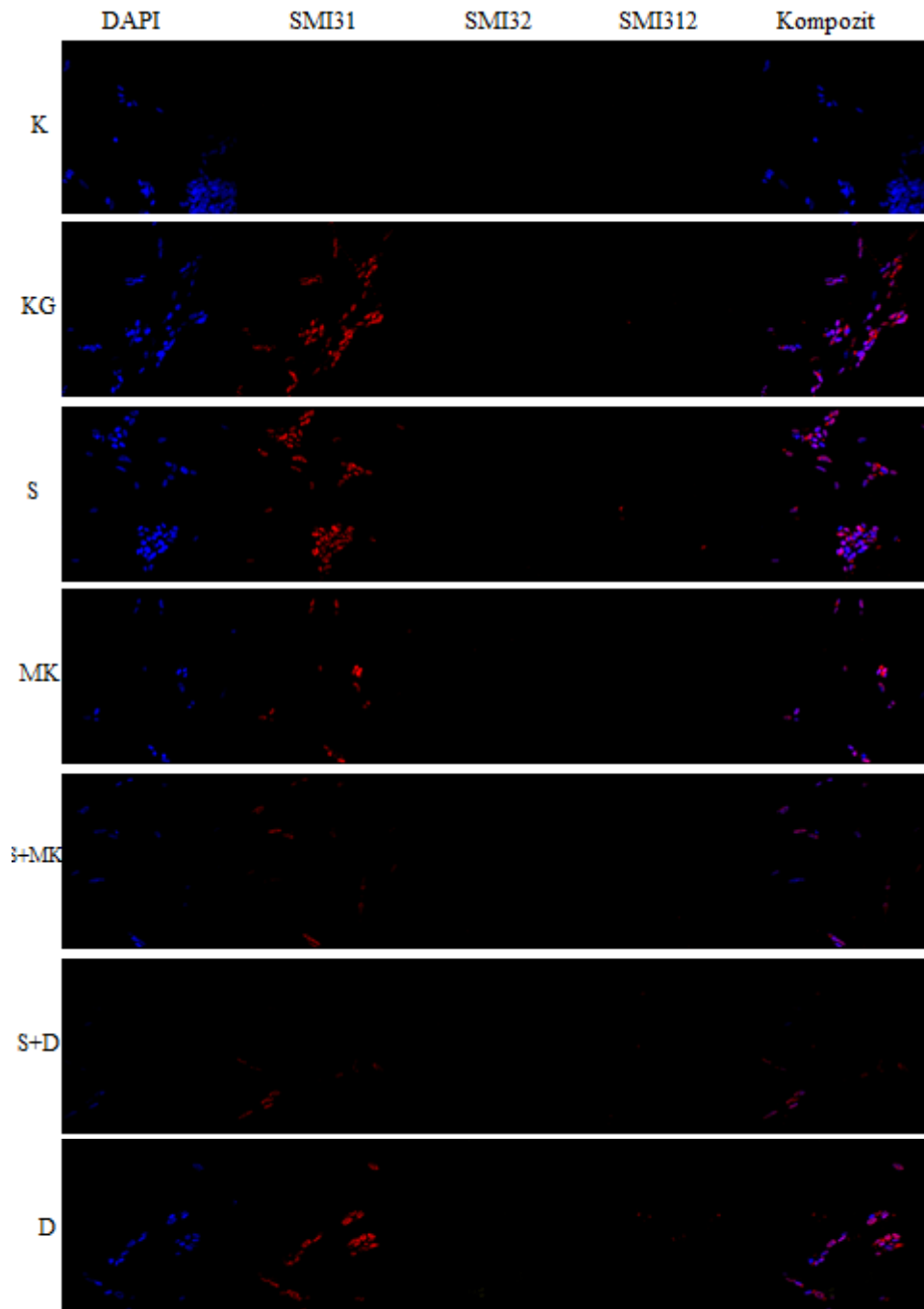


Graf 4. Prikaz kvantificirane ekspresije SMI312 u diferenciranoj staničnoj liniji SH-SY5Y. **Legenda:** Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - x , kružići - stršeće vrijednosti, \*\*\* statistička značajnost < 0,001.

## REZULTATI

Ekspresija SMI312 u diferenciranoj SH-SY5Y staničnoj liniji pokazala je statističku značajnost ( $p < 0,001$ ) između stanica tretiranih simvastatinom i onih tretiranih masnim kiselinama, stanica tretiranih simvastatinom i masnim kiselinama uz dodatak simvastatina, kao i stanica tretiranih masnim kiselinama uz dodatak simvastatina i onih tretiranih s DMSO. Primjećena je statistička značajnost i između stanica tretiranih simvastatinom i kontrolne grupe. Pomoću SMI312 najbolje su vizualizirane stanice tretirane samo simvastatinom.

## REZULTATI



Slika 2. Prikaz imunocitokemijskog bojenja SMI31, SMI32 i SMI312 stanične linije SH-SY5Y kontrolne grupe i tretiranih stanica. Povećanje 400 x, skala – 50  $\mu\text{m}$ . **Legenda:** K - kontrola, KG - kontrolna grupa, S - simvastatin, MK - masne kiseline, S+MK - simvastatin + masne kiseline, S+D - simvastatin + DMSO, D - DMSO. Stanice tretirane simvastatinom i obojene pomoću SMI31 imaju veći intenzitet obojenja od kontrolne grupe.

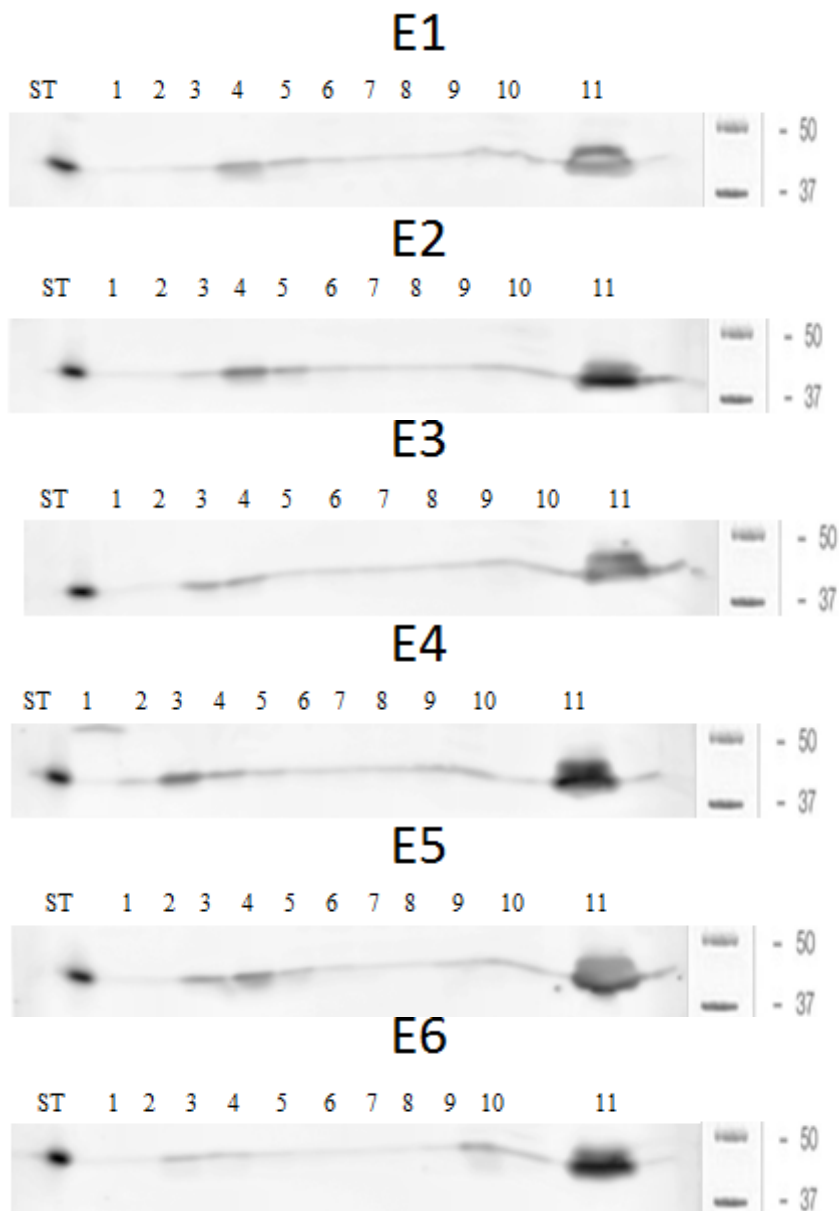
## REZULTATI

Imunocitokemijsko bojenje na markere neuroplastičnosti - SMI31, SMI32 i SMI312 u ovoj studiji pokazalo se neadekvatnim za određivanje duljine neurita stanične linije SH-SY5Y, vidljivo iz slike 2. Stoga je analizirana integrirana gustoća obojenja po stanicama. Iz statistički obrađenih podataka vidljivo je kako tretman simvastatinom (bojenje SMI312) i tretman masnim kiselinama (bojenje SMI32) utječe na neuroplastičnost tretirane stanične linije.

Najtanji filamenti prikazani su pomoću SMI312 budući da on daje obojenje aksonima, odnosno izdancima neurona. Kao *cut-off* vrijednost najmanje debljine neurona uzeta je veličina od 2 500  $\mu\text{m}$  do 62 500  $\mu\text{m}$ , budući da je prosječna površina neurona 250 000  $\mu\text{m}^2$ , a duljina neurona se kreće od 4 – 100  $\mu\text{m}$ .

## 5.2. Promjena sastava lipidnih splavi SH-SY5Y stanične linije

Metodom bez detergenta napravljeno je razdvajanje lipidnih splavi od ne-splavi. Pozitivne frakcije proteina u sastavu lipidnih splavi očekuju se u frakcijama 3 i 4.



Slika 5. Vizualizacija Flotillina 1 na Western blot membranama. **Legenda:** ST – standard, brojevi 1 – 11 označavaju broj frakcija pojedine eksperimentalne skupine, E1 – kontrolna grupa, E2 – tretman simvastatinom, E3 – tretman masnim kiselinama, E4 – tretman masnim kiselinama i simvastatinom, E5 – tretman s DMSO, E6 – tretman s DMSO i simvastatinom. Na membranama E1 i E2 vizualiziran je Flotillin 1 u frakcijama 4, 5 i 11. Na membranama E3, E4, E5 i E6 vizualiziran je Flotillin 1 u frakcijama 3, 4 i 11.

## REZULTATI

Na osnovu očekivanog, većina tretmana imala je pozitivne reakcije u željenim frakcijama. Iako membrane E1 i E2 nisu imale pozitivnu reakciju na Flotillin 1 u frakciji 3 i dalje ne odstupaju od postavljenih očekivanja.

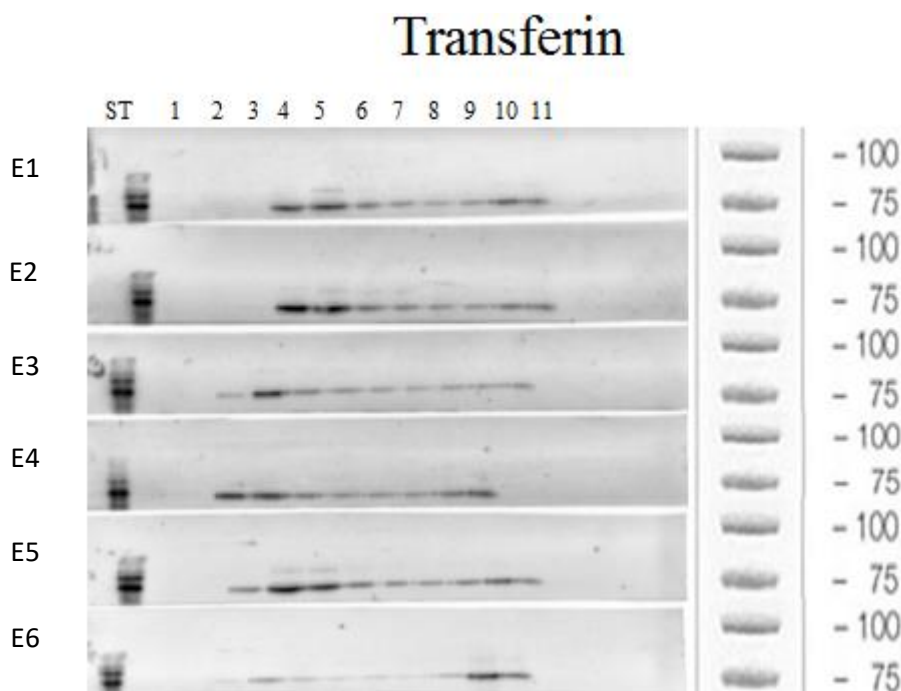
Tablica 1. Prikaz relativnog odnosa intenziteta obojenja Flotillina 1 na membrani Western blot metodom. **Legenda:** brojevi 1 – 11 označavaju broj frakcija pojedine eksperimentalne skupine, x – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, E1 – kontrolna grupa, E2 – tretman simvastatinom, E3 – tretman masnim kiselinama, E4 – tretman masnim kiselinama i simvastatinom, E5 – tretman DMSO-om, E6 – tretman DMSO-om i simvastatinom.

| Relativan odnos intenziteta obojenja (%) - Flotillin 1 |          |           |          |           |          |           |          |           |          |           |          |           |
|--|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| Frakcija   | E1       |           | E2       |           | E3       |           | E4       |           | E5       |           | E6       |           |
| 11   | 31,18    |           | 49,30    |           | 48,36    |           | 50,70    |           | 47,60    |           | 55,89    |           |
| 10   | 0,67     |           | 6,03     |           | 3,36     |           | 1,71     |           | 4,22     |           | 4,93     |           |
| 9  | 2,02     |           | 2,48     |           | 0,82     |           | 5,97     |           | 1,95     |           | 16,61    |           |
| 8  | 4,50     |           | 1,37     |           | 0,76     |           | 4,11     |           | 1,69     |           | 3,23     |           |
| 7  | 0,68     |           | 0,39     |           | 2,40     |           | 3,24     |           | 1,76     |           | 2,16     |           |
| 6  | 0,18     |           | 0,72     |           | 4,57     |           | 2,95     |           | 6,18     |           | 2,29     |           |
| 5  | 0,62     |           | 2,50     |           | 2,06     |           | 3,96     |           | 2,48     |           | 2,62     |           |
| 4  | 62,77    |           | 8,83     |           | 20,64    |           | 8,40     |           | 19,95    |           | 5,48     |           |
| 3  | 0,06     |           | 24,06    |           | 10,86    |           | 17,14    |           | 13,15    |           | 5,77     |           |
| 2  | 0,02     |           | 3,35     |           | 0,87     |           | 1,76     |           | 1,01     |           | 1,01     |           |
| 1  | 0,00     |           | 0,00     |           | 0,00     |           | 0,00     |           | 0,00     |           | 0,00     |           |
|  | <b>x</b> | <b>SD</b> | <b>x</b> | <b>SD</b> | <b>x</b> | <b>SD</b> | <b>x</b> | <b>SD</b> | <b>x</b> | <b>SD</b> | <b>x</b> | <b>SD</b> |
|  | 10,2     | 20,7      | 9        | 14,9      | 9        | 14,3      | 10,0     | 15,0      | 10,0     | 14,6      | 10,0     | 16,7      |

Iz tablice 1. Prikaz relativnog odnosa intenziteta obojenja Flotillin 1 u stanicama SH-SY5Y primjećuje se da je pozitivna frakcija 11 u svim tretiranim stanicama, a ostale pozitivne frakcije su frakcije 3 i 4 na eksperimentalnim tretmanima. Posebice se primjeti razlika između grupa E2 i E3 u 3. frakciji.

## REZULTATI

Frakcije proteina vizualizirane su protutijelima na Transferin Western blot metodom. Transferin je upotrebljen kao marker lipidnih ne-splavi. Pozitivne frakcije proteina u sastavu lipidnih ne-splavi očekuju se u frakcijama 3, 4 i 11.



Slika 6. Vizualizacija Transferina na Western blot membranama. **Legenda:** ST – standard, brojevi 1 – 11 označavaju broj frakcija pojedine eksperimentalne skupine. Na membrani E1, E2, E4 vizualiziran je Transferin u frakcijama 4, 5 i 11. Na membrani E3 vizualiziran je Transferin u frakciji 4. Na membrani E5 vizualiziran je Transferin u frakcijama 4, 5 i na membrani E6 vizualiziran je Transferin u frakcijama 10 i 11.

Na membranama je predočen vizualizirani transferinski receptor. U skoro svim frakcijama može se primijetiti da je došlo do pozitivne reakcije. Frakcije u kojima je došlo do jače reakcije su frakcije 4, 5, 10 i 11, što je vidljivo na slici 6.

## REZULTATI

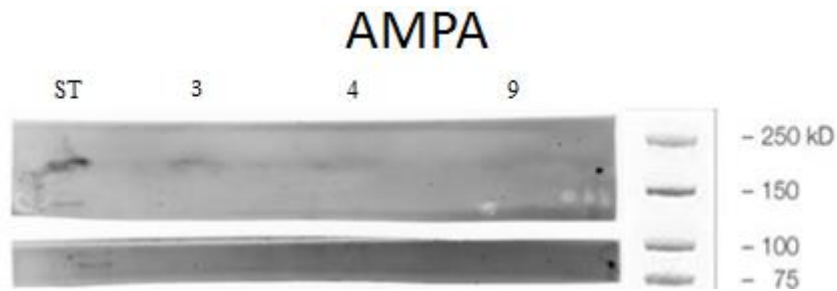
Tablice 2. Prikaz relativnog odnosa intenziteta obojenja Transferina na membrani Western blot metodom. **Legenda:** brojevi 1 – 11 označavaju broj frakcija pojedine eksperimentalne skupine, x-aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, E1 – kontrolna grupa, E2 – tretman simvastatinom, E3 – tretman masnim kiselinama, E4 – tretman masnim kiselinama i simvastatinom, E5 – tretman s DMSO, E6 – tretman s DMSO i simvastatinom.

| <b>Relativan odnos intenziteta obojenja (%) – Transferin</b> |           |            |           |            |           |            |           |            |           |            |           |             |
|--|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|-------------|
| <b>Frakcija</b>  | <b>E1</b> |            | <b>E2</b> |            | <b>E3</b> |            | <b>E4</b> |            | <b>E5</b> |            | <b>E6</b> |             |
| 11   | 21,58     |            | 7,02      |            | 0,67      |            | 1,56      |            | 1,42      |            | 17,53     |             |
| 10   | 8,99      |            | 9,26      |            | 11,88     |            | 14,38     |            | 5,82      |            | 38,95     |             |
| 9  | 6,58      |            | 6,11      |            | 8,16      |            | 6,41      |            | 5,83      |            | 7,70      |             |
| 8  | 8,12      |            | 6,20      |            | 8,73      |            | 6,19      |            | 11,15     |            | 5,47      |             |
| 7  | 10,26     |            | 7,97      |            | 8,18      |            | 6,04      |            | 8,41      |            | 5,08      |             |
| 6  | 2,38      |            | 9,80      |            | 9,48      |            | 2,63      |            | 6,76      |            | 4,66      |             |
| 5  | 15,81     |            | 18,79     |            | 9,58      |            | 5,75      |            | 6,49      |            | 6,73      |             |
| 4  | 21,10     |            | 26,95     |            | 27,23     |            | 9,42      |            | 17,79     |            | 11,05     |             |
| 3  | 1,68      |            | 5,45      |            | 12,12     |            | 8,16      |            | 9,39      |            | 1,95      |             |
| 2  | 3,05      |            | 1,52      |            | 3,98      |            | 2,09      |            | 2,06      |            | 0,87      |             |
| 1  | 0,44      |            | 0,94      |            | 3,28      |            | 1,85      |            | 6,35      |            | 6,35      |             |
|  | <b>x</b>  | <b>SD</b>  | <b>x</b>  | <b>SD</b>  | <b>x</b>  | <b>SD</b>  | <b>x</b>  | <b>SD</b>  | <b>x</b>  | <b>SD</b>  | <b>x</b>  | <b>SD</b>   |
|  | <b>9</b>  | <b>7,5</b> | <b>9</b>  | <b>7,6</b> | <b>9</b>  | <b>6,9</b> | <b>7</b>  | <b>5,2</b> | <b>9</b>  | <b>5,5</b> | <b>9</b>  | <b>10,7</b> |

Iz relativnog odnosa intenziteta obojenja Transferina Western blot metodom uočeno je da većina tretmana stanične linije SH-SY5Y ima veći relativni odnos intenziteta obojenja u frakcijama 4, 5, 10 i 11 u odnosu na ostale frakcije.



## REZULTATI



Slika 7. Vizualizacija AMPA receptora Western blot metodom. **Legenda:** ST – standard, brojevi 3, 4, 9 označavaju broj frakcije jedne eksperimentalne skupine. Nema vidljive reakcije AMPA receptora tehnikom Western blota. Western blot metoda nije uspjela.

AMPA receptor eksprimiraju diferencirane stanice. Budući da Western blot metodom nije dobivena pozitivna reakcija, može se pretpostaviti da protutijelo na AMPA receptor nije valjano. Sukladno s tim relativni odnos intenziteta obojenja AMPA receptora nije napravljen.

## 6. RASPRAVA

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi utjecaj lipidima obogaćenog medija na morfologiju stanične linije SH-SY5Y ljudskog neuroblastoma, utvrditi utjecaj simvastatina na morfologiju stanica uzgojenih u standardnom ili lipidima obogaćenom mediju i izolirati lipidne splavi te odrediti njihov sastav koristeći se Western blot metodom.

U istraživanju objavljenom 2018. godine napravljena je usporedba metode bojenja kolera toksinom B i fluorogolda na retinalnim ganglijskim stanicama. Rezultati istraživanja pokazuju kako je bojenje kolera toksinom povoljnija metoda ukoliko je u interesu pokazati morfologiju živčane stanice, dok je metoda bojenja fluorogoldom bolja metoda ukoliko je stavljan naglasak na kvantifikaciju pojedinih struktura, u ovom slučaju na retinalne ganglijske stanice (40). Osim navedenih pozitivnih strana, smatra se da bojenje kolera toksinom ne bi trebalo biti bojenje izbora ukoliko se želi utvrditi porijeklo neurona. Stoga se može zaključiti kako ovo bojenje nije povoljno ukoliko uključuje veliko tkivo poput ishijatičnog živca (41).

U ovom istraživanju bojenje kolera toksinom B poslužilo je kao dobar pokazatelj duljine neurita stanične linije SH-SY5Y. Ta činjenica može biti povezana sa svojstvom kolera toksina B da se veže na gangliozid GM1 koji se koristi kao marker za dokazivanje lipidnih splavi koji je ravnomjerno raspoređen duž membrane. Naime, iz rezultata ovog bojenja vidljivo je da je simvastatin izrazito utjecao na rast SH-SY5Y stanične linije, a samim tim i na neuritogenezu.

Iako istraživanje provedeno 2015. godine kao zaključak studije navodi da je specifičnost vezanja kolera toksina B na GM1 ograničena te da postoje tri vrste vezanja kolera toksina na GM1. Specifično vezanje, nespecifično te ono koje se događa prilikom vezanja kolera toksina na glikozilirane površinske proteine i nespecifično vezanje FITC-a za staničnu površinu (42).

Istraživanje objavljeno 2014. godine govori o neurotoksičnosti palmitinske kiseline. Naime, SH-SY5Y stanična linija tretirana je 0,1 – 0,5 mM stock otopinom palmitinske kiseline tijekom 24 – 48 sati. Interpretacijom rezultata zaključuje se kako palmitinska kiselina u staničnoj liniji neuroblastoma dovodi do apoptoze, povišenja razine oksidativnog stresa, nakupljanja  $\beta$ -amiloida, a djeluju i na stanični ciklus na način da zaustavlja G2/M fazu istog (43).

Stanice tretirane masnim kiselinama i obojene kolera toksinom B u ovom istraživanju imaju kraće neurite u odnosu na kontrolnu skupinu, što ide u prilog istraživanjima koja govore o njihovoj citotoksičnosti. Kako je između ostalog korištena palmitinska kiselina u lipidima obogaćenom mediju koji se koristio za tretiranje SH-SY5Y stanične linije, za pretpostaviti je kako je ona uzrokovala najviše negativnih učinaka na rast neurita.

U jednom od istraživanja ispitana je morfologija neuroaksonskog oštećenja pomoću SMI31, SMI32 i SMI312. Zaključeno je kako je gubitak signala SMI32 dobar pokazatelj skraćanja i fragmentacije dendrita i atrofije stanica. Isto tako gubitak signala SMI31 u ovom istraživanju ekvivalentan je smanjenju aksonskih fosforiliranih neurofilamenata. Ovim je zaključeno da su SMI31 i SMI32 dobri pokazatelji neurodegeneracije (44). Istražen je i utjecaj simvastatina na traumatsku aksonsku ozljedu te je donesen zaključak da simvastatin smanjuje aksonsku ozljedu mozga te potiče rast neurita. Rezultati su prikazani imunocitokemijskom vizualizacijom traumatske aksonske ozljede pomoću SMI312 koji se koristi kao marker za aksone (45).

Kako je u ovom istraživanju korištena diferencirana stanična linija SH-SY5Y, a ne zreli neuroni, imunocitokemijsko bojenje nije zadovoljavajuće. To se dogodilo prvenstveno zbog toga što u staničnoj liniji neuroblastoma ne dolazi do migracije proteina u ogranke neurita što znači da ne postoje valjani epitopi za svaki od pojedinih SMI-jeva. Na prikazanoj slici imunocitokemijskog bojenja vidljivo je da su signali SMI31, SMI32 i SMI312 sadržani u jezgrama stanice.

Brojna istraživanja navode citotoksičnosti palmitinske kiseline. Primjerice, Yung-Hsuan i suradnici ispitali su utjecaj palmitinske, oleinske i laurinske kiseline na SH-SY5Y staničnu liniju. Otopine masnih kiselina dodane su u medij u različitim koncentracijama u rasponu od 100 do 500  $\mu\text{M}$ . Utvrđeno je da samo palmitinska kiselina izaziva citotoksičnost i to u koncentracijama većim od 300  $\mu\text{M}$  tijekom 24-satne inkubacije (48). Za učinke oleinske kiseline na staničnu liniju neuroblastoma izvjestili su Zhu i suradnici koji zaključuju da oleinska kiselina ima proapoptotski učinak. Oni smatraju da oleinska kiselina uzrokuje pojačanu ekspresiju i defosforilaciju Bad proteina koji je član Bcl-2 obitelji proteina, a inaktiviran je fosforilacijom (46). U Španjolskoj, 2018. godine ispitan je utjecaj nanočestica željezovog oksida presvučenih oleinskom kiselinom na staničnu liniju SH-SY5Y. Uočena su stanična oštećenja membrane koja su povezana s citotoksičnošću, smetnje stančnog ciklusa i izazivanje apoptoze (47). S pretpostavkom da smanjenje fluidnosti stanične membrane može

dovesti do još većeg izlučivanja prekursora APP-a u Alzheimerovoj bolesti ispitan je učinak stearinske, oleinske, linolne,  $\alpha$ -linolenske, arahidonske, eikosapenteinske i dokozaheksaenske kiseline. U ovom istraživanju utvrđeno je da samo masne kiseline s četiri ili više od četiri dvostruke veze imaju sposobnost povećati fluidnost membrane, a u ovom slučaju radi se o arahidonskoj, dokozaheksaenskoj i eikosapentaenoičnoj kiselini. Koncentracija tih polinezasićenih kiselina uvelike ovisi o učinku na staničnu membranu. Smatra se da mijenjaju fluidnost membrane i povećavaju izlučivanje APP-a u rasponu koncentracija od 100 nM do 1  $\mu$ M. Položaji dvostrukih veza u ugljikovodičnim lancima nemaju utjecaj na fluidnost membrane i izlučivanje APP-a (48).

Utvrđen je neuroprotektivni učinak statina na SH-SY5Y staničnoj liniji. Testirano je kako kombinacija koncentracije od 0,1 mM tri statina, među kojima se nalazi i simvastatin utječe na oslobađanje APP-a iz stanica. Također, statini sudjeluju u regulaciji ekspresije  $\alpha 7$  nikotin acetilkolin receptora, inhibiraju acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu. Također, simvastatin regulira ekspresiju i koncentraciju antiapoptotskog proteina Bcl-2 na način da povećava razinu ET-1 proteina, što dovodi do povećanja Bcl-2 u SH-SY5Y stanicama (49, 50).

U ovom istraživanju kvantifikacijom ekspresije SMI31, SMI32 i SMI312 diferencirane stanične linije SH-SY5Y primjećeno je da ekspresija SMI31 nije pokazala statističku značajnost ( $p > 0,05$ ). Ekspresija SMI32 pokazuje statističku značajnost ( $p < 0,05$ ) između stanica tretiranih masnim kiselinama i kontrolne grupe te stanicama tretiranim masnim kiselinama i DMSO. Kvantifikacijom imunocitokemijskog bojenja stanične linije SH-SY5Y pomoću SMI312 uočena je statistička značajnost ( $p < 0,05$ ). Statistička značajnost prisutna je između stanica tretiranih simvastatinom i kontrolnom grupom, stanica tretiranih simvastatinom i masnim kiselinama, stanica tretiranih simvastatinom i masnim kiselinama s dodatkom simvastatina i stanica tretiranih masnim kiselinama s dodatkom simvastatina i onih tretiranih s DMSO.

Kako su floitilini dio lipidnih splavi, smatra se da imaju ulogu i u samoj patogenezi neurodegenerativnih bolesti. Istraživanja ukazuju kako se  $\beta$ -amiloidi akumuliraju u flotilin-1 pozitivnim endocitnim vezikulima. Također, neki od lijekova korišteni u istraživanjima u svrhu otkrivanja valjane terapije neurodegenerativnih bolesti, poput statina smanjili su ekspresiju flotilina-1 (51). Poznato je da željezo prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru uzrokuje oksidativni stres što u konačnici dovodi do odumiranja neurona. Upravo zbog toga

utjecaj željeza na neurone povezuje se s nastankom neurodegenerativnih bolesti. Iako sam mehanizam prolaska željeza kroz krvno-moždanu barijeru još uvijek nije do kraja razjašnjen, istraživanja ukazuju da u tom prolasku transferin i transferinski receptor imaju vrlo važnu ulogu (52, 53).

Provedenim istraživanjem vizualiziran je flotilin, koji predstavlja marker splavi na Western blot membrani i transferin kao marker ne-splavi. Dokazom flotilina u frakcijama 3 i 4 u području oko 48 kDa potvrđena je uspješna izolacija lipidnih splavi u ovom istraživanju. Mjerenjem relativnog odnosa intenziteta obojenja Western blot membrane tretirane protutijelom na Flotillin 1 vidljiva je razlika u intenzitetu obojenja 3. frakcije stanica tretiranih simvastatinom i onih tretiranih masnim kiselinama. Pregledom tablice relativnog odnosa intenziteta obojenja Flotilina 1 može se ustanoviti sljedeće: E1 (kontrolna grupa) ima najveći postotak intenziteta obojenja u frakciji 4 koja je specifična za lipidne splavi, nadalje tretiranjem stanica samo simvastatinom ili simvastatinom i masnim kiselinama primijećen je pad i preko 50 % u frakciji 4 u odnosu na kontrolnu grupu. Iz toga se može zaključiti da simvastatin i masne kiseline djeluju sinergistički; stanice tretirane s DMSO u potpunosti remete sastav lipidnih splavi, promjena koncentracije masnih kiselina i kolesterola nije dovoljna kako bi kompenzirala remećenje stanične membrane koju je DMSO izazvao. Osim toga, tretman simvastatinom sa ili bez masnih kiselina održava duljinu neurita, dok DMSO ne djeluje na duljinu, ali kompletno mijenja sastav lipidnih splavi. Pregledom tablice relativnog odnosa intenziteta obojenja transferina vidljivo je da su lipidne ne-splavi izolirane u svim tretmanima stanične linije SH-SY5Y. Tretman simvastatinom i masnim kiselinama (E4) djeluje sinergistički na sastav lipidnih ne-splavi obzirom da odnos intenziteta obojenja ne prikazuje značajne razlike među frakcijama. Tretiranje stanica simvastatinom (E2) i masnim kiselinama (E3) pokazuje intenzivniju reakciju na transferin u 4. frakciji.

Znanstvenici u istraživanju objavljenom 2018. godine iznose zaključak da AMPA receptori mogu utjecati na razinu izvanstaničnog  $\beta$ -amiloida. Smatra se da pobuđeni AMPA receptori pokreću složen odgovor u koji je uključeno povećano oslobađanje interleukina-6 što u konačnici dovodi do smanjena izvanstanične koncentracije  $\beta$ -amiloida (54). Istraživanje provedeno 2018. godine upućuje na to da aktiviranje AMPA receptora omogućuje brz ulazak cinkovih iona u dopaminergičke neurone, što uzrokuje njihovu degeneraciju. Ovaj slijed događaja doveo je do poremećaja kretanja ispitivanih štakora u spomenutom istraživanju (55).

## RASPRAVA

U ovom istraživanju AMPA receptor vizualizacijom Western blot membrane nije dokazan. Dokaz GluR2 podjednice AMPA receptora predstavljao bi bend na membrani na oko 100 kDa. Pretpostavlja se da vizualizacija AMPA receptora nije uspjela zbog nevaljanog protutijela koje je korišteno za vizualizaciju.

### 7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Lipidima obogaćen medij sprječava rast neurita SH-SY5Y stanične linije,
2. Simvastatin potiče neuritogenezu SH-SY5Y stanične linije,
3. Flotilin u 3. i 4. frakciji upućuje na uspješno izolirane lipidne splavi. Stanice tretirane simvastatinom i masnim kiselinama za 50 % su smanjile količinu epitopa u lipidnim splavima u odnosu na kontrolnu grupu, dok stanice tretirane DMSO-om kompletno mijenjaju sastav lipidnih splavi.

## 8. SAŽETAK

### Utjecaj simvastatina na morfologiju stanica SH-SY5Y neuroblastoma

**Ciljevi istraživanja:** Utvrditi utjecaj lipidima obogaćenog medija na morfologiju stanične linije SH-SY5Y ljudskog neuroblastoma, utvrditi utjecaj simvastatina na morfologiju stanica uzgojenih u standardnom ili lipidima obogaćenom mediju i izolirati lipidne splavi, te odrediti njihov sastav koristeći se Western blot metodom.

**Nacrt studije:** Studija parova.

**Ispitanci i metode:** U ovom istraživanju korištena je SH-SY5Y stanična linija ljudskog neuroblastoma. Stanice su tretirane sa standardnim medijem, simvastatinom, medijem obogaćenim lipidima, medijem obogaćenim lipidima s dodatkom simvastatina, DMSO-om, DMSO-om s dodatkom simvastatina. Nakon 24 sata tretiranja morfologija je prikazana imunocitokemijskim bojenjem na markere citoskeleta - SMI31, SMI32 i SMI312. Rezultati su analizirani pomoću ImageJ računalnog programa. Izolacija lipidnih splavi izvršena je ultracentrifugiranjem. Western blot metodom utvrđen je sastav lipidnih splavi uz pomoć markera splavi i nesplavi, te protutijela na AMPA receptor kao marker neuroplastičnosti.

**Rezultati:** Bojenje kolera toksinom pokazuje da stanice tretirane simvastatinom imaju najveću duljinu neurita u odnosu na kontrolnu skupinu, dok one tretirane masnim kiselinama imaju najmanju duljinu neurita. Kvantifikacija imunocitokemijskog bojenja na SMI312 pokazuje statistički značajne razlike između stanica tretiranih simvastatinom i kontrolnom grupom, stanica tretiranih simvastatinom i kiselinama, stanica tretiranih simvastatinom i masnim kiselinama s dodatkom simvastatina i stanica tretiranih masnim kiselinama s dodatkom simvastatina i onih tretiranih DMSO. Statistički su značajne razlike između stanica tretiranih masnim kiselinama u odnosu na kontrolnu grupu i DMSO kod stanica bojenim na SMI32. Bojenje na SMI31 nije pokazalo statistički značajne razlike.

**Zaključak:** Simvastatin potiče neuritogenezu SH-SY5Y stanične linije.

**Ključne riječi:** simvastatin; SH-SY5Y; imunocitokemijske metode; lipidne splavi



## 9. SUMMARY

### **The effect of Simvastatin on morphology of SH-SY5Y neuroblastoma**

**Objectives:** The aim of this study is to determine the effect of lipid enriched medium on the morphology of the cell line SH-SY5Y human neuroblastoma, also to determine the effect of simvastatine on the morphology of cells grown in standard or in lipid enriched medium and to isolate lipid rafts and to determine their composition using the Western blot method.

**Study design:** Matched pair study.

**Material and methods:** This research has been conducted by using the SH-SY5Y cell line of human neuroblastoma. The cells were then treated with a standard medium, simvastatine, lipid enriched medium, lipid enriched medium with the addition of simvastatine, DMSO, DMSO with the addition of simvastatine. After 24 hours of treating, the morphology of cells prepared this way has presented itself with an immunocytochemical staining onto the markers of cytoskeletons SMI31, SMI32, SMI312. The results were analyzed with ImageJ computer program. The isolation of lipid rafts has been done by ultracentrifugation. Using the Western blot method, the composition of lipid rafts was determined with the help of raft and non-raft markers, as well as the antibodies on the AMPA receptor as a neuroplasticity marker.

**Results:** Staining with the Cholera toxin shows that cells treated with simvastatine have the longest length of neurites compared to control group and cells treated with fatty acids have the shortest length of neurites. The quantification of immunocytochemical staining on SMI312 displays statistically significant differences between cells treated with simvastatine in comparison to the control group, simvastatine and fatty acids, simvastatine and fatty acids combined with simvastatine, furthermore fatty acids combined with simvastatine display a significant difference compared to cells treated with DMSO. Statistically there is an important difference between cells treated with fatty acids compared to the control group and DMSO at cells stained on SMI32. Staining on SMI31 did not show any statistically important differences.

**Conclusion:** Simvastatine encourages SH-SY5Y cell line neuritogenesis.

**Key words:** simvastatine; SH-SY5Y; immunocytochemical methods; lipid rafts

**10. LITERATURA**

1. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.
2. Sündermann F, Fernandez M-P, Morgan RO. An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. BMC Genomics. 2016;17.
3. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA. Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. Elegans*. PLOS ONE. 2012.
4. Brown JWP, Ouberai MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, Buell AK, Sparr E, i sur. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of  $\alpha$ -synuclein. PNAS. 2016;113;7065-7070.
5. Flagmeier P, Meisl G, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Dobson CM, Buell AK, i sur. Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of  $\alpha$ -synuclein aggregation. PNAS. 2016;37;10328-10333.
6. Kim WS, Kågedal K, Halliday GM. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. Alzheimer's Research & Therapy. 2014;6;5-8.
7. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2011.
8. Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. The Yale journal of biology and medicine. 2016.
9. Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. Genetics in Medicine. 2016;18;421-430.
10. Francetić I, Vitezić D. Klinička farmakologija. 2 izd. Zagreb. Medicinska naklada;2014.
11. Giles C, Takechi R, Mellett NA, Meikle PJ, Dhaliwal S, Mamo JC. The Effects of Long-Term Saturated Fat Enriched Diets on the Brain Lipidome. PloS one. 2016.
12. Lee AK, Mojtahed-Jaberi M, Kyriakou T, Aldecoa-Otalora E, Arno M, Marshall NJ, i sur. Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. Nutrition. 2009;26;411-422.

## LITERATURA

13. Barbard ND, Bunner AE, Agarwal U. Saturated and trans fats and dementia: a systematic review. *Neurobiology of Aging*. 2015;8;40-47.
14. Leekumjorn S, Cho HJ, Wu Y, Wright NT, Sum AK, Chan C. The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788;1508-1516.
15. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC-M. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry international*. 2011;58;321-329.
16. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacological research*. 2014;88;3-11.
17. Todd PA, Goa KL. Simvastatin. SpringerLink. Springer International Publishing. 2012;40;583-607.
18. Raina V, Gupta S, Yadav S, Surolia A. Simvastatin induced neurite outgrowth unveils role of cell surface cholesterol and acetyl CoA carboxylase in SH-SY5Y cells. *PloS ONE*. 2013.
19. Yan J, Xu Y, Zhu C, Zhang L, Wu A, Yang Y, i sur.. Simvastatin Prevents Dopaminergic Neurodegeneration in Experimental Parkinsonian Models: The Association with Anti-Inflammatory Responses. *PLOS ONE*. 2011.
20. Dong X-xia, Wang Y, Qin Z-hong. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Nature News*. 2009;30;379-387.
21. Yan J., Qiao L., Wu J., Fan H., Sun J., Zhang Y. Simvastatin protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress and regulates the endogenous anti-oxidant system through ERK. *Cell physiol biochem*. 2018;51:1957-1968.
22. Li Y., Liu Q., Sun J., Wang J., Liu X., Gao J. Mitochondrial protective mechanism of simvastatin protects against amyloid  $\beta$  peptide-induced injury in SH-SY5Y cells. *International journal of molecular medicine*. 2018;41:2997-3005.
23. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2017;18;361-374.
24. Levental I, Veatch S. The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *Journal of molecular biology*. 2016;428;4749-4764.
25. Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004;426;208-224.

## LITERATURA

26. Bramkamp M, Lopez D. Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria, microbiology and Molecular Biology Reviews. 2015.
27. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110;597-603.
28. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275;17221-17224.
29. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Molecular cell biology*. 2000;1;31-39.
30. Saarma M. GDNF recruits the signaling crew into lipid rafts. *Trends in neurosciences*. 2001;24;427-429.
31. Shipley M.M., Mangold C.A., Szpara M.L. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J. Vis.* 2016;108.
32. Korecka J.A., van Kesteren R.E., Blaas E., Spitzer S.O., Kamstra J.H., Smit A.B. i sur. Phenotypic characterization of retionic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PloS ONE*. 2013.
33. Diasa IHK, Mistrya J, Fella S, Reisa A, Spicketta CM, Polidori MC, i sur. Oxidized LDL lipids increase  $\beta$ -amyloid production by SH-SY5Y cells through glutathione depletion and lipid raft formation. *Free radical biology and medicine*. 2014;75;48-59.
34. Harris B, Parkin E, Pereira I. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Research*. 2009;1296;203-215.
35. Sonnino S, Aureli M, Grassi S, Mauri L, Prioni S, Prinetti A. Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Molecular Neurobiology*. 2014;50;130–148.
36. Stefani M, Liguri G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Current Alzheimer research*. 2009;6;15-29.
37. Gloria H. Seeing Is Believing: Use of Antibodies in Immunocytochemistry and In situ Hybridization. *Scribd*. 2008.
38. Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen I-J, Mæhre HK. Protein Determination-Method Matters. *Foods (Basel, Switzerland)*. MDPI; 2018.
39. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods in molecular biology*. 2015;46;904-912.
40. Yao F, Zhang E, Gao Z, Ji H, Marmouri M, Xia X. Did you choose appropriate tracer for retrograde tracing of retinal ganglion cells? The differences between cholera toxin subunit B and Fluorogold. *PLOS ONE*. 2018;13.

## LITERATURA

41. Lai B-Q, Qio X-C, Zhang R-Y, Jin H, Li G, i sur. Cholera Toxin B Subunit Shows Transneuronal Tracing after Injection in an Injured Sciatic Nerve. *PLOS ONE*. 2015.
42. Baldauf K, Royal J, Hamorsky K, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins*. 2015;7;974-996.
43. Yung-Hsuan Hsiao C-IL, Hsiang Liao Y-HC. Palmitic Acid-Induced Neuron Cell Cycle G2/M Arrest and Endoplasmic Reticular Stress through Protein Palmitoylation in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15;20876-20899.
44. Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C. Axonal Loss and Neurofilament Phosphorylation Changes Accompany Lesion Development and Clinical Progression in Multiple Sclerosis. *Brain Pathology*. 2011;21;428-440.
45. Wu H, Mahmood A, Qu A, Xiong Y, Chopp M. Simvastatin attenuates axonal injury after experimental traumatic brain injury and promotes neurite outgrowth of primary cortical neurons. *Brain Research*. 2012;14886;121-130.
46. Ng Y, SayY. Palmitic acid induces neurotoxicity and gliatotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ*; 2018.
47. Zhu Y, Schwarz S, Ahlemeyer B, Grzeschik S, Klumpp S, Kriegelsteina J. Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. *Neurochemistry International*. 2004;46;127-135.
48. Roensch J, Crisby M, Nordberga A, Xiao Y, Zhang L, Guan Z. Effects of statins on  $\alpha 7$  nicotinic receptor, cholinesterase and  $\alpha$ -form of secreted amyloid precursor peptide in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*. 2007;50;800-806.
49. Butterick TA, Igbavboa U, Eckert GP, Sun GY, Weisman GA, Müller WE, i sur. Simvastatin Stimulates Production of the Antiapoptotic Protein Bcl-2 via Endothelin-1 and NFATc3 in SH-SY5Y Cells. *Molecular neurobiology*. 2010;41;384-391.
50. Ng Y, SayY. Palmitic acid induces neurotoxicity and gliatotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ*; 2018.
51. Zhao1 F, Jie Zhang1 Y-SL, Li2 L. Research advances on flotillins. *Virology Journal*. 2011;8;479.
52. Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature News*. 2004;5;863-873.
53. Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends in Molecular Medicine*. 2001;7;103-108.

## LITERATURA

54. Hettinger JC, Lee H, Bu G, Holtzman DM, Cirrito JR. AMPA-ergic regulation of amyloid- $\beta$  levels in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecular neurodegeneration*. 2018;13.
55. Tamano H, Morioka H, Nishio R, Takeuchi A, Takeda A. AMPA-induced extracellular Zn<sup>2+</sup> influx into nigral dopaminergic neurons causes movement disorder in rats. *Neurotoxicology*. 2018.

## 11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Antonela Matešković

Datum i mjesto rođenja: 26. 11. 1995., Nova Gradiška

Adresa: Roždanik 22, 44323 Rajić

E-mail: am261195@gmail.com

Obrazovanje:

2002. - 2010. Osnovna škola Rajić

2010. - 2014. Gimnazija Novska

2014. - 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Osijek

2017. - 2019. Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Osijek