

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Gordana I. Tovilović

**Mehanizam zaštitnog dejstva
arilpiperazinskih liganada za
dopaminske D2 receptore u azot
monoksidom i 6-hidroksidopaminom
izazvanoj smrti SH-SY5Y ćelija humanog
neuroblastoma**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Gordana I. Tovilović

**Protective mechanism of arylpiperazine
dopaminergic D2 ligands on nitric oxide
and 6-hydroxydopamine induced
SH-SY5Y human neuroblastoma cell
death**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

dr Pavle Anđus

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Nevena Zogović

naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za
biološka istraživanja „Siniša Stanković“

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Vladimir Trajković

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

dr Mirko Tomić

viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za
biološka istraživanja „Siniša Stanković“

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se

prof. dr Pavlu Anđusu na korisnim savetima pri pisanju teze,

dr Neveni Zogović i prof. dr Vladimiru Trajkoviću na neposrednom rukovođenju pri izradi i pisanju doktorske teze i radova koji su iz nje proistekli,

dr Mirku Tomiću na korisnim savetima i iskrenoj podršci pri izradi i pisanju disertacije,

dr Vukiću Šoškiću i dr Slađani Kostić-Rajačić za poklon arilpiperazina koji su ispitivani u ovoj studiji,

dr Ljubici Harhaji-Trajković na pomoći prilikom uobličavanja teze i

svim kolegamicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije.

Mehanizam zaštitnog dejstva arilpiperazinskih liganada za dopaminske D2 receptore u azot monoksidom i 6-hidroksidopaminom izazvanoj smrti SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma

IZVOD

U ovom radu je ispitivan uticaj 20 novosintetisanih arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada na vijabilnost humanih SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija tretiranih donorom azot monoksida (*engl.* nitric oxide, NO) natrijum nitroprusidom (*engl.* sodium nitroprusside, SNP) i uzročnikom oksidativnog stresa dopaminergičkim neurotoksinom 6-hidroksidopaminom (6-OHDA). Supstanca koje je pružala najjaču zaštitu od donora NO je bio N-{4-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid (arilpiperazin **6a**), dok je N-{3-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid (arilpiperazin **6b**) najefikasnije štitio humanu neuroblastomsku ćelijsku liniju SH-SY5Y od 6-OHDA. Arilpiperazin **6a** je delimično sprečavao povećanje sadržaja superoksid anjon radikala, smanjenje potencijala membrane mitohondrija i unutarćelijskog sadržaja adenzin-trifosfata (ATP), aktivaciju kaspaza i sledstvenu fragmentaciju DNK koje je izazivao NO. Uočeno smanjenje unutarćelijske koncentracije superoksida nije bilo posledica direktne interakcije ispitivanog arilpiperazina sa $O_2^{\cdot-}$, niti je supstanca **6a** uticala na akumulaciju NO unutar ćelije. Arilpiperazin **6a** je sprečavao inhibiciju protektivnog Akt, kao i aktivaciju proapoptotskih ERK, JNK i AMPK signalnih puteva izazvane SNP-om, ukazujući na bitnu ulogu ovih molekula u njegovom zaštitnom delovanju. Potencijalni značaj arilpiperazina **6a** u sprečavanju neurodegenerativnih/neurozapaljenskih procesa posebno naglašava činjenica da je štitio neuronima slične SH-SY5Y ćelije i od citotoksičnog efekta NO-a poreklom od stimulisanih makrofaga. Slično, arilpiperazin **6b** je sprečavao povećanje unutarćelijskog sadržaja superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), smanjenje potencijala membrane mitohondrija i posledične apoptotske događaje – aktivaciju kaspaza i fragmentaciju DNK – koje je izazivao 6-OHDA. Stabilizacija potencijala mitohondrijalne membrane pod dejstvom arilpiperazina **6b** se vremenski poklapala sa smanjenjem unutarćelijskog sadržaja $O_2^{\cdot-}$,

što ukazuje da je supstanca **6b** inhibirala oslobađanje superoksida iz oštećenih mitohondrija stabilizacijom potencijala njihove membrane. Arilpiperazin **6b** nije pokazao značajnu sposobnost direktnog uklanjanja superoksid anjon radikala. Zaštitni mehanizam supstance **6b** nije uključivao interakciju sa JNK i ERK proapoptotskim putevima, koje je aktivirao 6-OHDA. Međutim, arilpiperazin **6b** je izazvao dodatnu prolaznu aktivaciju preživljavajućeg Akt signalnog puta u ćelijama tretiranim 6-OHDA-om, pa se ne može isključiti doprinos Akt-a antiapoptotskom efektu arilpiperazina **6b**. Pored apoptoze, 6-OHDA je izazivao i citotoksičnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama smanjujući aktivnost ključnog inhibitora autofagije u ćeliji – mTOR proteina. Arilpiperazin **6b** je delimično sprečavao inhibiciju aktivnosti mTOR-a i posledičnu autofagiju zabeležene u prisustvu 6-OHDA. Ovaj efekat arilpiperazina **6b** je bio nezavisan od aktivnosti pozitivnog regulatora autofagije AMPK. Iako su oba arilpiperazina pokazivala parcijalnu agonističku aktivnost na D2 receptorima njihov neuroprotektivni efekat je bio nezavisan od vezivanja za dopaminske receptore, jer ga visokoafinitetni blokatori D1/D2 receptora butaklamol (u slučaju **6a**) ili selektivni blokator D2 receptora sulpirid (u slučaju **6b**) nisu poništavali. Ovi rezultati ukazuju da arilpiperazini predstavljaju dobre kandidate za razvoj potencijalnih neuroprotektivnih lekova.

Ključne reči: arilpiperazini, neuroprotekcija, azot monoksid, oksidativni stres, 6-hidroksidopamin, apoptoza, autofagija, dopaminski D2 receptori

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: neurobiologija

UDK broj: 547.639:[613.8–003.8:[591.481.8:[612.811.3:611.81]] (043.3)

Protective mechanism of arylpiperazine dopaminergic D2 ligands on nitric oxide and 6-hydroxydopamine induced SH-SY5Y human neuroblastoma cell death

ABSTRACT

We investigated the protective ability of 20 novel arylpiperazine-based dopaminergic ligands against nitric oxide (NO) and dopaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-mediated neurotoxicity. The most potent neuroprotective compound against NO-induced toxicity was N-{4-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (arylpiperazine **6a**), while N-{3-[2-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-picolinamide (arylpiperazine **6b**) most effectively protected SH-SY5Y human neuron-like cells from 6-OHDA-generated oxidative injury. Arylpiperazine **6a** diminished the proapoptotic action of NO donor sodium nitroprusside (SNP) by decreasing superoxide anion content, mitochondrial membrane depolarization, decline in intracellular adenosine-triphosphate (ATP) content, caspase activation and subsequent phosphatidylserine externalization/DNA fragmentation. The observed decrease of intracellular superoxide concentration was not mediated by direct $O_2^{\cdot -}$ scavenging. Arylpiperazine **6a** did not interfere with NO accumulation within the cell. The protective effect of arylpiperazine **6a** in NO-induced stress was associated with activation of anti-apoptotic (Akt) and the inhibition of proapoptotic (JNK, ERK, AMPK) signaling pathways. A potential therapeutic value of the arylpiperazine **6a** in neurodegenerative/neuroinflammatory diseases prevention was additionally supported by the ability of this arylpiperazine to protect SH-SY5Y neuron-like cells from macrophage-derived NO. Similarly, arylpiperazine **6b** prevented 6-OHDA-induced increase in superoxide anion content, mitochondrial membrane depolarization and following apoptotic related events – caspase activation and DNA fragmentation. The stabilization of 6-OHDA-disrupted mitochondrial membrane potential by arylpiperazine **6b** correlated with the decrease in intracellular superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) content, suggesting that decline in $O_2^{\cdot -}$ concentration resulted from

mitochondrial membrane stabilization. Arylpiperazine **6b** did not possess significant O_2^- scavenging ability. The mechanism underlying the protection provided by the compound **6b** was independent of JNK- and ERK-proapoptotic pathways, as 6-OHDA-provoked activation of these proapoptotic pathways was not modified by arylpiperazine **6b**. However, arylpiperazine **6b** caused additional transient activation of pro-survival Akt signaling pathway in 6-OHDA-treated cells, which probably contributed to its anti-apoptotic effect. In addition to apoptosis, 6-OHDA induced deleterious autophagy in SH-SY5Y cells by silencing the activity of mTOR, a key autophagy inhibitor in the cell. Arylpiperazine **6b** partially prevented 6-OHDA-triggered decrease of mTOR activity and autophagy in AMPK-independent manner. Although both compounds showed partial agonist activity on hD2 receptors, their neuroprotective action was independent of dopamine receptor binding, as it was not affected by the high-affinity D1/D2 receptor blocker butaclamol (**6a**) or selective D2 receptor blocker sulpiride (**6b**). These results support further study of arylpiperazines as potential neuroprotective drugs.

Keywords: arylpiperazines, neuroprotection, nitric oxide, oxidative stress, 6-hydroxydopamine, apoptosis, autophagy, dopamine D2 receptors

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

UDC number: 547.639:[613.8-003.8:[591.481.8:[612.811.3:611.81]] (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Neurodegeneracija	1
1.1.1. Uloga oksidativnog stresa i mitohondrija u neurodegeneraciji.....	2
1.1.1.1. 6-hidroksidopamin.....	4
1.1.2. Uloga nitrozativnog stresa u neurodegeneraciji	5
1.1.2.1. Azot monoksid.....	6
1.1.3. Uloga apoptoze i autofagije u neurodegeneraciji izazvanoj reaktivnim kiseoničnim i reaktivnim azotnim vrstama	7
1.1.4. Protein kinaze u apoptozi i autofagiji izazvanoj reaktivnim kiseoničnim i reaktivnim azotnim vrstama	10
1.1.5. Uloga dopaminskih liganada u neurodegeneraciji	13
1.1.5.1. Arilpiperazini.....	15
2. CILJEVI	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. REAGENSI I RASTVORI	18
3.1.1. Reagensi	18
3.1.2. Rastvori	19
3.2. ĆELIJE I KULTURE ĆELIJA	20
3.2.1. Kulture ćelijskih linija i tretmani	20
3.2.2. Izolovanje makrofaga.....	21
3.3. PRIMENJENE METODE	22
3.3.1. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija	22
3.3.2. Test kompetitivnog vezivanja radioaktivno obeleženog spiperona i ispitivanih arilpiperazina za humani D2 receptor	22

3.3.3. Određivanje unutrašnje aktivnosti arilpiperazina na humanim D2 receptorima	24
3.3.4. Test aktivnosti kisele fosfataze	26
3.3.5. Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze	26
3.3.6. Fazno kontrastna mikroskopija	27
3.3.7. Detekcija apoptoze i nekroze	28
3.3.8. Detekcija aktivacije kaspaza	29
3.3.9. Merenje potencijala membrane mitohondrija	30
3.3.10. Merenje unutarćelijske produkcije superoksidnog anjona i azot monoksida	31
3.3.11. Detekcija autofagije pomoću protočnog citofluorimetra	31
3.3.12. Određivanje sadržaja nitrita Griess-ovom metodom.....	32
3.3.13. Određivanje interakcije ispitivanih supstanci sa superoksid anjon radikalom u odsustvu ćelija.....	33
3.3.14. Procena antiradikalnih osobina ispitivanih supstanci pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil testa.....	33
3.3.15. HPLC analiza sadržaja adenzin trifosfata u ćeliji	34
3.3.16. Imunoblot analize	36
3.3.17. Određivanje koncentracije proteina po uzorku	38
3.3.18. Statističke analize	39
4. REZULTATI	41
4.1. VEZIVANJE NOVOSINTETISANIH ARILPIPERAZINA ZA hD2 RECEPTORE I UTICAJ NA TOKSIČNOST NATRIJUM NITROPRUSIDA I 6-HIDROKSIDOPAMINA U KULTURI HUMANOG NEUROBLASTOMA	41
4.1.1. Interakcija arilpiperazina sa humanim dopaminskim D2 receptorima.....	41
4.1.2. Uticaj arilpiperazina na toksičnost natrijum nitroprusida i 6-hidroksidopamina u kulturi SH-SY5Y humanih neuroblastoma.....	43

4.2. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6a U KULTURI HUMANIH NEUROBLASTOMA TRETIRANIH NATRIJUM NITROPRUSIDOM	46
4.2.1. Uticaj arilpiperazina 6a na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu natrijum nitroprusidom	46
4.2.2. Uticaj arilpiperazina 6a na potencijal mitohondrija i sadržaj adenzin trifosfata u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih natrijum nitroprusidom.....	49
4.2.3. Uticaj arilpiperazina 6a na oksidativni stres izazvan natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija	50
4.2.4. Uticaj arilpiperazina 6a na toksičnost donora peroksinitrita u kulturi SH-SY5Y ćelija.....	52
4.2.5. Efekat arilpiperazina 6a na toksičnost azot monoksida ćelijskog porekla u kulturi SH-SY5Y ćelija	53
4.2.6. Antiradikalske osobine arilpiperazina 6a u sistemu bez ćelija	56
4.2.7. Uticaj arilpiperazina 6a na signalne puteve povezane sa apoptozom u SH-SY5Y ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom.....	58
4.2.8. Unutrašnja aktivnost arilpiperazina 6a na humanim dopaminskim D2 receptorima i uticaj blokade dopaminskih receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6a u SH-SY5Y ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom.....	60
4.3. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6b U KULTURI HUMANIH NEUROBLASTOMA TRETIRANIH 6-HIDROKSIDOPAMINOM... ..	62
4.3.1. Uticaj arilpiperazina 6b na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu 6-hidroksidopaminom	62
4.3.2. Uticaj arilpiperazina 6b na potencijal mitohondrija i oksidativni stres u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom.....	64
4.3.3. Uticaj arilpiperazina 6b na kinetiku nastanka superoksid anjon radikala i smanjenje potencijala mitohondrija u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom	65
4.3.4. Antiradikalske osobine arilpiperazina 6b u sistemu bez ćelija	67
4.3.5. Modulacija signalnih puteva uključenih u apoptozu SH-SY5Y ćelija izazvanu 6-hidroksidopaminom	68
4.3.6. Uticaj arilpiperazina 6b na autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija	70

4.3.7. Uticaj arilpiperazina 6b na signalne puteve koji modulišu autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija.....	73
4.3.8. Unutrašnja aktivnost arilpiperazina 6b na humanim dopaminskim D2 receptorima i uticaj blokade dopaminskih receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6b u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom.....	74
5. DISKUSIJA	76
5.1. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6a U KULTURI SH-SY5Y ĆELIJA TRETIRANIH DONOROM AZOT MONOKSIDA	77
5.2. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6b U KULTURI SH-SY5Y ĆELIJA TRETIRANIH 6-HIDROKSIDOPAMINOM	83
5.3. ZAVISNOST ZAŠTITNOG EFEKTA ARILPIPERAZINA 6a I 6b OD VEZIVANJA ZA DOPAMINSKE D2 RECEPTORE	89
6. ZAKLJUČCI	93
7. LITERATURA	94

1. UVOD

1.1. Neurodegeneracija

Neurodegenerativna oboljenja su bolesti centralnog nervnog sistema (CNS), koje karakterišu oštećenja i poremećena funkcija nervnih ćelija. Krajnji rezultat ovih promena može biti smrt neurona, što se manifestuje neurološkim i/ili mentalnim poremećajima. Dva neurodegenerativna poremećaja, koja najčešće pogađaju populaciju razvijenih zemalja su Alchajmerova demencija (AD), koja se karakteriše poremećajem funkcije viših kortikalnih struktura, i Parkinsonova bolest (PB), koju prate poremećaji motornih funkcija. U primarne neurodegenerativne promene ubrajaju se i Hantingtonova horeja (HH) i amiotrofična lateralna skleroza (ALS). Povrede kičmene moždine i moždani udar, kao i neka hronična oboljenja, na primer shizofrenija, mogu dovesti do sekundarnih oštećenja neurona.

Mehanizmi nastanka neurodegenerativnih bolesti nisu do kraja objašnjeni. Smatra se da one nastaju kao posledica više kombinovanih patofizioloških mehanizama, a napušta se ideja o jednom poremećaju koji vodi razvoju jedne bolesti. Tako, postoje četiri zajednička fenomena prisutna u većini ovih oboljenja:

1. oksidativni stres,
2. poremećena funkcija mitohondrija,
3. poremećena homeostaza redoks aktivnih prelaznih metala, koji katalizuju stvaranje slobodnih radikala (gvožđe, bakar) i
4. nakupljanje neuvijenih, pogrešno uvijenih ili pogrešno fosforilisanih proteina u nervnim ćelijama, zbog čega se AD, PB, HH i ALS zovu „protein-konformacione bolesti“ (Sayre i sar., 2008).

Ovi procesi nisu međusobno nezavisni, poremećena funkcija mitohondrija je često u vezi sa oksidativnim stresom, dok sa druge strane oksidativni stres može izazvati pogrešno uvijanje proteina. Takođe, akumulacija gvožđa u mitohondrijama može

dovesti do poremećaja funkcije tih organela i istovremeno direktno pospešiti nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje su posrednici oksidativnog stresa (Gille i Reichmann, 2011).

1.1.1. Uloga oksidativnog stresa i mitohondrija u neurodegeneraciji

Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između nastanka i uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) u ćeliji. U RKV se ubrajaju superoksid anjon radikal (O_2^-), hidroksil anjon (OH^-) i vodonik peroksid (H_2O_2). Do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala dolazi usled neefikasnosti respiratornog lanca mitohondrija, koji u normalnim okolnostima nepotpuno metabolizuje 1-3% unetog kiseonika. Kompleksi I i III transportnog lanca elektrona su mesta gde se najčešće dešava „curenje“ elektrona do kiseonika (Kirkinezos i Moraes, 2001) što dovodi do stvaranja O_2^- . Neutralizacijom superoksid anjon radikala pomoću enzima superoksid dismutaze (SOD) nastaje vodonik peroksid, koji dalje reaguje sa redukovanim prelaznim metalima (obično Fe^{2+} ili Cu^{1+}) dajući pri tome OH^- (Fentonova reakcija). U fiziološkim uslovima stvorene RKV se neutrališu pod dejstvom antioksidativnih enzima (SOD, katalaza i glutation peroksidaza) i neenzimskih antioksidanasa (glutation, alfa-tokoferol, askorbinska kiselina i beta-karoten). Pored RKV, mitohondrije mogu stvarati i endogeni NO i ONOO⁻, jer poseduju sopstvenu NO sintazu (Giulivi i sar., 1998).

Ono što mozak čini posebno osetljivim na oksidativni stres je velika količina kiseonika koju neuroni koriste – oko 20% kiseonika unesenog u organizam odlazi u CNS (Moreira i sar., 2005). Zbog neefikasnosti respiratornog lanca, ali i usled oštećenja mitohondrija i opadanja antioksidativnog kapaciteta neurona koji nastaju kao posledica starenja, u mozgu se sa godinama povećava koncentracija RKV i raste nivo oksidativnog stresa. Neuroni su posebno podložni oksidativnim oštećenjima zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani, niske aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima, brzog metabolizma i relativno visokih nivoa prelaznih metala, naročito gvožđa. Kao posledica pojačanog oksidativnog stresa nakupljaju se oštećeni biomakromolekuli u mozgu – karbonilovani i nitrirani proteini,

lipidni peroksidi, kao i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, koji je marker oksidacije DNK (Mariani i sar., 2005).

Poremećaj funkcionisanja mitohondrija može dovesti i do energetskeg disbalansa, jer mitohondrije obezbeđuju energiju u obliku adenozin trifosfata (ATP) za normalno funkcionisanje ćelije. Pošto neuroni imaju jedinstvene elektrofiziološke osobine i visoke energetske potrebe, ova neravnoteža ima značajnu ulogu u neurodegeneraciji. Posledica poremećenog transporta elektrona i sledstvenog smanjena koncentracije ATP-a su povećana produkcija RNV, pad potencijala mitohondrijalne membrane i deregulacija homeostaze kalcijuma u neuronima. Sve navedeno može dovesti do smrti ćelije. Iako je hipoteza o ulozi energetskeg disbalansa u neurodegeneraciji opšte prihvaćena, smatra se da on ipak nije glavni uzrok propadanja neurona (Schon i Przedborski, 2011).

U prilog navedenoj tezi o nefunkcionalnom prenosu elektrona u neurodegeneraciji ide i činjenica da toksini koji u *in vitro* i *in vivo* uslovima izazivaju oštećenja ćelija kao što su 6-OHDA, rotenon i MPP⁺, inhibiraju funkciju kompleksa I (6-OHDA, rotenon i MPP⁺) i IV transportnog lanca elektrona (6-OHDA) (Glinka i Youdim, 1995; Li i sar., 2003; Ali i sar., 1994). Takođe, poremećena aktivnost kompleksa I transportnog lanca elektrona zapažena je u *substantia nigra* (Schapira i sar., 1990) i trombocitima (Parker i sar., 1989) obolelih od PB, kompleksa IV u AD (Mutisya i sar., 1994) i ALS (Borthwick i sar., 1999), kao i kompleksa I i III u HH (Schapira, 1999).

Kod transgenih miševa, koji su podložni oksidativnom stresu usled nedostatka AIF proteina (*engl.* mitochondrial apoptosis-inducing factor, AIF) (Klein i sar., 2002) i kod kojih je tau protein (protein od kog su sastavljena neurofibrilarna vlakna – histopatološki pokazatelj AD i PB) eksprimiran iznad fizioloških granica smanjena je funkcija transportnog lanca elektrona u mitohondrijama i nivoi ATP-a, što prethodi povećanju markera oksidativnog stresa i neurodegenerativnim promenama (Kulic i sar., 2011). Smanjenje nivoa glutaciona u *substantia nigra* je rani biohemijski pokazatelj oštećenja vezanih za PB (Sofic i sar., 1992), dok je aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze u oštećenim delovima mozga kod obolelih od AD umanjena (Pappolla i sar., 1992). *Post mortem*

studije su pokazale povećane nivoe oksidovanih proteina, lipida i DNK u mozgovima obolelih od AD, PB, ALS i drugih neurodegenerativnih oboljenja (Contestabile, 2001).

1.1.1.1. 6-hidroksidopamin

6-hidroksidopamin je hidroksilovani analog neurotransmitera dopamina. On je prvi otkriveni dopaminergički neurotoksin koji se koristi u *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnom modelu PB više od 30 godina (Blum i sar., 2001). Najpre se smatralo da se 6-OHDA preuzima iz ekstraćelijske tečnosti preko dopaminskih i noradrenalinskih transportera i da ispoljava selektivnu toksičnost prema kateholaminergičkim neuronima. Međutim, pokazano je da pored dopaminergičkih neurona iz mezencefalona (Lotharius i sar., 1999), 6-OHDA oštećuje i ćelije koje ne poseduju kateholaminske transportere, kao što su mišji fibrosarkom NIH3T3 i C6 ćelije pacovskog glioma (Blum i sar., 2000; Raicevic i sar., 2005). U prilog teoriji o neselektivnosti 6-OHDA, govori i podatak da blokada kateholaminskih transportera ne sprečava njegove efekte u kulturi humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SH5Y (Storch i sar., 2000). Toksičnosti 6-OHDA značajno doprinosi vanćelijska produkcija štetnih hinona i RKV, koji nastaju njegovom autooksidacijom (Storch i sar., 2000). Pored vanćelijskih, od 6-OHDA i u ćeliji nastaju reaktivni produkti kiseonika – H_2O_2 , pod dejstvom monoamino oksidaza, i $O_2^{\cdot -}$ i OH^{\cdot} , u Fentonovoj reakciji (Miller i sar., 2009). Posredstvom stvorenih RKV, 6-OHDA izaziva pad potencijala mitohondrijalne membrane (Lotharius i sar., 1999). Takođe, smatra se da 6-OHDA direktno remeti rad mitohondrija inhibicijom kompleksa I i IV transportnog lanca elektrona (Glinka i Youdim, 1995). Ovo rezultira daljim povećanjem koncentracije slobodnih radikala i smanjenom sintezom ATP-a.

Uloga oksidativnog stresa u toksičnosti 6-OHDA pokazana je i u eksperimentima na ćelijskim linijama, primarnim ćelijama i glodarima. 6-hidroksidopamin posredstvom $O_2^{\cdot -}$ i hidroperoksil radikala (HO_2) izaziva smrt SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma (Iglesias-González i sar., 2012), a oksidativni stres je odgovoran i za oštećenja koja 6-OHDA izaziva u kulturi primarnih neurona korteksa pacova (Tseng i sar., 2012) i MES23.5 dopaminergičkih ćelija (Wang i sar.,

2009). Na životinjskim modelima je pokazano da tretman sa 6-OHDA smanjuje aktivnost ćelijskog antioksidansa glutaciona i SOD u moždanom stablu, strijatumu, hipokampusu, frontalnom korteksu i nukleusu akumbensu pacova (Perumal i sar., 1992), a da su nivoi malonildialdehida (produkt oksidacije lipida) povišeni u strijatumu miševa nakon intraventrikularne injekcije 6-OHDA (Kabuto i sar., 2007). Takođe, pretretman pacova antioksidansom vitaminom E i inhibitorom MAO-B enzima selegilinom sprečava neurotoksične efekte 6-OHDA (Cadet i sar., 1989; Knoll, 1986).

1.1.2. Uloga nitrozativnog stresa u neurodegeneraciji

U neurodegenerativnim oboljenjima i starenju zapaženo je nakupljanje azot monoksida (*engl.* nitric oxide, NO) koji proizvode aktivirani astrociti i mikroglijalne ćelije u koncentracijama višim od fizioloških (Brown i Bal-Price, 2003). Posledica povišenih koncentracija NO je nitrozativni stres, koji se karakteriše nastankom reaktivnih azotnih vrsta (RAV) i koji može biti uzrok smrti neurona (Gu i sar., 2010). U RAV se ubrajaju peroksinitrit (ONOO⁻), nitroksil radikal (NO[•]), nitrozilovani tioli i amini, koji nastaju u reakciji NO sa drugim jedinjenjima (Wink i sar., 2001). Peroksinitrit, na primer, nastaje u reakciji između ekvimolarnih količina NO i O₂^{-•}. Ova dva radikala se oslobađaju u toku inflamatornih oboljenja iz aktiviranih makrofaga i mikroglija ćelija u CNS-u (Sayre i sar., 2008).

Na životinjskim modelima je pokazano da nitrozativni stres igra važnu ulogu u procesu neurodegeneracije. Miševi kojima je nokautiran gen za inducibilnu NO sintazu (iNOS) su zaštićeni od neuronskih oštećenja u eksperimentalnim modelima za PB (Dehmer i sar., 2000) i ALS (Martin i sar., 2007). Pored toga, miševi koji ekspimiraju humani APOE4 lipoprotein koji povećava rizik od nastanka AD, stvaraju više NO nego miševi sa ekspimiranim APOE3 lipoproteinom (Colton i sar., 2002). Nitrozativni stres je delimično odgovoran i za oštećenja neurona u AD (Colton i sar., 2002), nakon traumatske (Besson, 2009) i ishemijske povrede mozga (Liang i sar., 2004). Prisustvo iNOS, koja proizvodi povišene koncentracije NO, je imunohistohemijskim analizama potvrđeno u patološkim lezijama u mozgovima obolelih od AD (Vodovotz i sar., 1996),

dok je kolokalizacija SOD1 i NOS enzima pronađena u motornim neuronima obolelih od ALS (Chou i sar., 1996).

Međutim, i niže koncentracije NO mogu, u kombinaciji sa dodatnim faktorima kao što je poremećaj oksidativnog statusa, izazvati smrt neurona (Borutaite i Brown, 2005). Tako, smanjena koncentracija glutationa u *substantia nigra* obolelih od PB umanjuje sposobnost direktnog uklanjanja (*engl.* scavenging) peroksinitrita i povećava njegovu toksičnost u neuronima (Heales i sar., 1999), prisustvo mutiranih formi Cu/Zn-superoksid dismutaze (SOD1) u ALS doprinosi nastanku štetnog ONOO⁻ (Trumbull i Beckman, 2009), a hipoksija potencira azot monoksidom izazvanu inhibiciju ćelijskog disanja (Mander i sar., 2005). Pored navedenih procesa, RKV i RAV stimulišu transkripciju proinflamatornih gena u glijalnim ćelijama, i na taj način pojačavaju inflamaciju (Sayre i sar., 2008).

1.1.2.1. Azot monoksid

Azot monoksid je slobodno radikalski gas, koji difunduje kroz ćelijsku membranu. Sintetišu ga azot monoksid sintaze (*engl.* nitric oxide synthase, NOS) postepenom oksidacijom L-arginina do L-citrulina. Postoje tri različite forme NOS, dve konstitutivne – endotelna (eNOS), neuronska (nNOS) i jedna inducibilna (iNOS). Fiziološke količine NO učestvuju u održavanju tonusa vaskularnih mišića i kontroli krvnog pritiska, a široko rasprostranjena mreža nerava NO-zavisnim mehanizmima reguliše brojne gastrointestinalne, respiratorne i funkcije genitourinarnog trakta. U CNS-u, NO sintetisan od strane konstitutivnih formi NOS-a reguliše proces neurotransmisije i ima veoma važnu ulogu u procesima učenja i memorije. Sa druge strane, iNOS se aktivira pod dejstvom različitih proinflamatornih nadražaja, a NO nastao u aktiviranim makrofagima u CNS služi kao odbrana od infektivnih agenasa. Smatra se da je zbog jakih citotoksičnih efekata uloga NO u imunitetu nespecifična (Moncada i Higgs, 1993). Jednom stimulisana, iNOS ostaje aktivna duži vremenski period (4-8 dana) i stvara nanomolarne količine NO, koje su 100 do 1000 puta više od koncentracija NO koje nastaju pod dejstvom nNOS (Pannu i Singh, 2006). Povećana

produkcija NO pod dejstvom iNOS je usko povezana sa neuroinflamacijom i neurodegeneracijom u ishemijskim stanjima, AD, PB, kao i sa oštećenjima u demijelinizacionim stanjima, na primer, u multiploj sklerozi (Heales i sar., 1999).

Toksičnost NO je posledica njegove visoko reaktivne prirode i štetni efekti mogu biti direktni (efekti samog NO) ili indirektni, kada svoje efekte ostvaruje preko stvorenih RAV. Direktno toksične efekte NO ostvaruje formiranjem kompleksa gvožđe-NO sa enzimima koji sadrže gvožđe, kao što su katalaza (Brown, 2010) i citohrom *c* oksidaza (Cooper, 2002; Brown, 2010). Azot monoksid kompetitivnom inhibicijom sprečava vezivanje kiseonika za citohrom *c* (Bal-Price i Brown, 2001) i izaziva inhibiciju ćelijskog disanja i smanjenje koncentracije ATP-a u ćeliji. Najvažnija RAV peroksinitrit oksiduje sulfhidrilne grupe proteina (Radi i sar., 1991), nitrira (dodaje NO₂⁺ grupu) tirozinske ostatke proteina (Ischiropoulos i sar., 1992), nitroziluje (dodaje NO grupu) nukleinske kiseline (Wink i sar., 1991), čime moduliše njihovu aktivnost i remeti normalno funkcionisanje ćelije. Direktni i indirektni efekti preterane količine NO dovode do smanjenja ATP depoa u ćeliji i smrti ćelije apoptozom, ukoliko je sadržaj ATP-a dovoljan za aktivaciju kaspaza, ili nekrozom, ukoliko nema dovoljno ATP-a. Pored toga, krajnji efekti NO zavise od koncentracije NO kojoj su ćelije izložene, vremena izlaganja, prisustva/odsustva određenih RKV i prisustva/odsustva određenih signalnih puteva u ćelijama (Brown i sar., 2010).

1.1.3. Uloga apoptoze i autofagije u neurodegeneraciji izazvanoj reaktivnim kiseoničnim i reaktivnim azotnim vrstama

Smatra se da je dominantan oblik ćelijske smrti u hroničnim neurodegenerativnim oboljenjima apoptoza (tip I programirane ćelijske smrti) (Friedlander, 2003), iako sve više podataka ukazuje na značaj autofagije (tip II programirane ćelijske smrti) u nastanku i razvoju neurodegeneracije (Li i sar., 2011; Batlevi i La Spada, 2011; Xilouri i Stefanis., 2010). U regulaciji procesa apoptoze veoma važnu ulogu imaju mitohondrije. Brojni štetni signali, između ostalih i RKV (Simon i sar., 2000) i RAV (Brown i Borutaite, 2001), izazivaju otvaranje pora na

spoljašnjoj membrani mitohondrija i izlazak citohroma *c* u citosol. Citohrom *c* preko kaspaze-9 aktivira kaskadu kaspaza, enzima koji proteolitički razgrađuju ćelijski sadržaj dovodeći do fragmentacije DNK, kondenzacije hromatina i pojave fosfatidil-serina na spoljašnjoj strani membrane, što predstavlja signal za fagocitovanje ćelije. Otvaranje mitohondrijalnih pora je proces kontrolisan od strane pro- i anti-apoptotskih proteina iz Bcl-2 (*engl.* B cell lymphoma 2) porodice (Gross i sar., 1999).

Aktivacija kaspaza pod dejstvom NO je zabeležena u uslovima nitrozativnog stresa u kulturi SH-SY5Y ćelija, a nitrozilovani (inaktivisani) inhibitori kaspaza su pronađeni *post mortem* u mozgovima obolelih od PB, AD i HH (Nakamura i sar., 2010). Takođe, toksičnost izazivača oksidativnog stresa i neurotoksina MPP⁺ u kulturi dopaminergičkih neurona iz mezencefalona je povezana sa aktivacijom kaspaza (Bilsland i sar., 2002). Važan podatak koji ukazuje na značaj apoptoze u neurodegeneraciji uopšte je da primena inhibitora kaspaza, kao i povećana ekspresija antiapoptotskog Bcl-2 proteina, odlažu pojavu oštećenja neurona na animalnom modelu ALS (Li i sar., 2000). Pored toga, i inhibitor oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija minociklin je pokazao značajne neuroprotektivne efekte na mišjim modelima PB, HH, ALS i multiple skleroze (Chen i sar., 2000; Zhu i sar., 2002; Du i sar., 2001; Maier i sar., 2007) i već su pokrenuta klinička ispitivanja efikasnosti minociklina u PB, HH i ALS (Kim i Suh, 2009). Kaspazno-zavisna apoptoza je zabeležena i u mozgovima obolelih od AD (Masliah i sar., 1998), PB (Hartmann i sar., 2000; Tatton, 2000) i HH (Sánchez i sar., 1999; Kiechle i sar., 2002).

Makroautofagija (u daljem tekstu poistovećena sa autofagijom) je proces u toku kog ćelija razlaže sopstvene proteine i organele, tako što ih najpre odvoji u vakuole sa dvoslojnom membranom – autofagozome. Autofagozomi se zatim spajaju sa lizozomima i formiraju autofagolizosome (autolizosome) u kojima se sadržaj degradira pod dejstvom lizozomskih enzima. Funkcija autofagije je uklanjanje oštećenih ćelijskih organela (npr. mitohondrija), proteina modifikovanih oksidacijom i makromolekulskih agregata, kao i obezbeđivanje energije i makromolekula neophodnih za preživljavanje pod stresnim uslovima. Pored toga što pomaže u održavanju homeostaze i preživljavanju pod stresnim uslovima, u slučaju da oštećenja prevladaju ćelijske odbrambene mehanizme, autofagija može biti alternativni put ćelijske smrti (Maiuri i

sar., 2007). U ćeliji se uvek može detektovati bazalni nivo autofagije.

S obzirom na veoma važnu ulogu autofagije u uklanjanju proteina i proteinskih agregata oštećenih oksidacijom, jasna je veza autofagije sa procesima u toku kojih dolazi do pojačanog oksidativnog stresa i nakupljanja pogrešno uvijenih proteina, kao što su starenje i neurodegeneracija. Tako je sa starenjem zabeleženo nakupljanje autofagnih vakuola u jetri miševa (Terman, 1995), kao i u oštećenim humanim i mišjim neuronima kod nekoliko neurodegenerativnih oboljenja (Nixon i sar., 2005; Kegel i sar., 2000). Nakupljanje autofagnih vakuola u toku starenja je najverovatnije povezano sa poremećajem funkcije lizozoma i eliminacije autolizozoma (Terman, 1995), i samim tim posledičnom funkcionalnom inhibicijom autofagije i smanjenom sposobnošću ćelije da ukloni proteine oštećene oksidacijom (Vittorini i sar., 1999). Sa druge strane, iako je starenje u tesnoj vezi sa neurodegeneracijom, poremećaji autofagije izazvani drugim stimulusima su najverovatnije razlog za povećanje broja autofagnih vakuola u modelima neurodegeneracije. Mnoge studije ukazuju na značaj autofagije u uklanjanju mutiranih proteina, koji se često nalaze u osnovi neurodegenerativnih promena (Rubinsztein, 2006; Martinez-Vicente i Cuervo, 2007). Tako se autofagijom razgrađuju mutirane forme alfa-sinukleina koji je povezan sa patogenezom PB, kao i proteini koji sadrže produženi poliglutaminski niz koji uzrokuju HH i spinocerebelarnu ataksiju (Rubinsztein, 2006; Martinez-Vicente i Cuervo, 2007). Stoga, povećan broj autofagnih vakuola može biti odbrambeni mehanizam, kojim se ćelija trudi da ukloni „loše“ proteine. Istovremeno je pokazano da je masovna akumulacija nerazgrađenih autofagnih vakuola štetna za neurone (Uchiyama i sar., 2009) i da inhibicija formiranja autofagozoma poboljšava vijabilitet neurona u frontotemporalnoj demenciji, ishemijskoj povredi i AD (Cherra i Chu, 2008; Lee i Gao, 2009). Nefunkcionalna autofagija za posledicu ima i nagomilavanje oštećenih i nerazgrađenih mitohondrija u citosolu (Dagda i sar., 2009), koje mogu biti dodatni izvor štetnih RKV u ćeliji. Nastale RKV pogoršavaju u neurodegeneraciji već prisutan oksidativni stres, a poznato je da i same RKV (naročito $O_2^{\cdot-}$) mogu aktivirati autofagiju (Scherz-Shouval i sar., 2007; Chen i sar., 2009). Preterana aktivacija autofagije dovodi do daljih oštećenja i završava se smrću ćelije. To je pokazano i na životinjskom modelu moždanog udara, gde je prolazna fokalna ishemija izazvala masovnu smrt neurona autofagijom (Puyal i sar., 2009).

1.1.4. Protein kinaze u apoptozi i autofagiji izazvanoj reaktivnim kiseoničnim i reaktivnim azotnim vrstama

Nakon izlaganja RKV i RAV dolazi do aktivacije brojnih signalnih puteva u ćeliji. Posebno važnu ulogu u odgovoru na štetne uticaje imaju protein kinaze aktivirane mitogenom (*engl.* mitogen-activated protein kinases, MAPK) i anti-apoptotski Akt protein. S obzirom na činjenicu da je tkivo mozga metabolički izuzetno aktivno i da troši veliku količinu energije, jako je bitan i uticaj oksidativnog i nitrozativnog stresa na energetske status ćelije i signalne molekule koji učestvuju u održavanju energetske ravnoteže u ćeliji, kao što su protein kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (*engl.* AMP-activated protein kinase, AMPK) i njen ciljni protein mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin).

Familiju MAPK čine tri grupe proteina: protein kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinase, ERK), c-Jun NH₂-terminalne kinaze (*engl.* c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK) i p38-kinaze. Članovi ERK podfamilije učestvuju u odgovoru na faktore rasta (Tibbles i Woodgett, 1999), dok se JNK i p-38 kinaze aktiviraju posle delovanja brojnih unutarćelijskih i vanćelijskih stresora, kao što su oštećenja DNK (Dent i sar., 2003), ishemija (Zeng i sar., 2011), inflamatorni citokini (Johnson i Lapadat, 2002), oksidativni stres (Saeki i sar., 2002).

Međutim, ovakva podela je suviše pojednostavljena, jer stvarne uloge MAP kinaza zavise od tipa ćelije i uslova u kojima su aktivirane. Tako, iako je ERK signalni put uglavnom povezan sa procesima proliferacije i diferencijacije (Johnson i Lapadat, 2002), pokazano je i da ima dvojnu ulogu u stresnim uslovima. Naime, ERK inhibira efekte proapoptotskih članova Bcl-2 familije proteina (Ewings i sar., 2007) i stabilizuje antiapoptotski protein Mcl-1 (*engl.* myeloid cell leukaemia 1) (Balmanno i Cook, 2009). Ovaj mehanizam zaštite od apoptoze je verovatno zajednički za sve tipove ćelija (Ewings i sar., 2007). Sa druge strane, postojana aktivacija ERK proteina može imati negativne posledice u toku ishemijske povrede mozga, epilepsije i oksidativnog stresa (Chu i sar., 2004). U kulturi SH-SY5Y neuroblastomskih i B65 neuronskih ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom je zabeležena štetna aktivacija ERK proteina (Dagda i

sar., 2008; Kulich i Chu, 2003), do koje dolazi i u primarnim kortikalnim neuronima izloženim dejstvu glutamata (Stanciu i sar., 2000). Pored toga, aktivacija ERK-a posreduje i u apoptozi hipokampalnih neurona izazvanoj nitrozativnim stresom (Yun i sar., 1998).

Jedna od najvažnijih funkcija JNK signalnog puta je regulacija apoptoze (Cui i sar., 2007). Aktivacija JNK povezana je sa oslobađanjem citohroma *c* iz mitohondrija (Tournier i sar., 2000), kao i sa smanjenjem antiapoptotskog (Yamamoto i sar., 1999) i povećanjem proapoptotskog potencijala članova Bcl-2 familije proteina (Lei i Davis, 2003). JNK put se aktivira u toku apoptotske smrti neurona izazvane brojnim stresorima, između ostalih i pod dejstvom oksidativnog stresa (Maroney i sar., 1999), 6-OHDA (Ries i sar., 2008) i povećanih nivoa NO koji nastaju preteranom aktivacijom iNOS-a (Chung i sar., 1999). Inhibitor JNK proteina CEP-1347 smanjuje toksičnost beta-amiloid proteina u kulturi primarnih kortikalnih neurona u *in vitro* modelu AD (Bozyczko-Coyne i sar., 2001) i dopaminergičkog toksina MPTP u *in vivo* modelu PB na miševima (Saporito i sar., 1999). Iako veliki broj studija ukazuje na štetnu ulogu aktivacije JNK u neurodegeneraciji, tačna uloga JNK u odgovoru na stresore nije potpuno jasna, jer je zabeleženo da JNK može biti posrednik kako apoptoze, tako i protektivnih signala koje inicira izlaganje ćelije stresu (Davis, 2000).

Kao i MAPK, Akt (*engl.* v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene) ili PKB (*engl.* Protein Kinase-B) učestvuje u regulaciji metaboličkih procesa, sinteze proteina, apoptoze i ćelijskog ciklusa (Brazil i sar., 2004). Aktivacija Akt signalnog puta, koja se odigrava posredstvom fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K), uvek vodi ćeliju u proliferaciju i ima antiapoptotske efekte. Pored endogenih signala koji promovišu rast (faktori rasta, citokini, hormoni), ovaj signalni put kao odbrambeni mehanizam mogu pokrenuti i brojni stresori, kao što su ishemija, RKV ili nedostatak nutrijenata. Podsticanje rasta je posledica direktnog pozitivnog delovanja Akt kinaze na mTOR i p70S6 proteine (Scott i sar., 1998; Kenessey i Ojamaa, 2006), koji su glavni aktivatori sinteze proteina u ćeliji. Antiapoptotski efekat Akt ostvaruje inhibicijom proapoptotskih molekula u ćeliji, kao što su Bad, član Bcl familije proteina, i kaspaza-9 (Datta i sar., 1997; Zhou i sar., 2000). Aktivacija Akt signalnog puta doprinosi preživljavanju neuronskih ćelijskih linija, kao i primarnih hipokampalnih neurona koji su izloženi dejstvu oksidativnog stresa

(Matsuzaki i sar., 1999; Salinas i sar., 2001; Hwang i Chun, 2012) i NO radikala (Kang i sar., 2003a; Kang i sar., 2003b). Konstitutivno aktivna forma Akt proteina spašava dopaminergičke neurone u *substantia nigra*, kao i aksonske nastavke ovih neurona u strijatumu nakon ubrizgavanja 6-OHDA u mozak miševa (Ries i sar., 2006).

AMPK je unutarćelijski energetska senzor, koji se aktivira u uslovima manjka ATP-a. Nakon delovanja stimulusa kao što su hipoksija, nedostatak nutrijenata i neki hormoni, aktivirana AMPK pokreće kataboličke (glikoliza, oksidacija glukoze i masnih kiselina), a inhibira anaboličke procese (sinteza proteina, masnih kiselina, holesterola) u ćeliji sa ciljem obezbeđenja energije. Takođe, AMPK aktiviraju i citokini i ćelijski stresori, koji ne utiču na nivo ATP-a (Ronnett i sar., 2009). AMPK je visoko eksprimirana u neuronima i brzo se aktivira pod dejstvom hipoksije, gladovanja i ishemijske povrede mozga (Ramamurthy i Ronnett, 2006). Međutim, *in vitro* studije još uvek ne pružaju jasnu sliku o tome da li je ova aktivacija AMPK indukovana stresom u neuronima protektivna ili štetna. Aktivacija AMPK štiti SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma od toksičnog efekta beta-amiloida (Greco i sar., 2009) i kulturu primarnih hipokampalnih neurona pacova od stresa izazvanog gladovanjem (Culmsee i sar., 2001), dok, sa druge strane, aktivator AMPK AICAR pospešuje apoptozu u toku oksidativnog stresa u kulturi mišjih Neuro 2a neuroblastoma (Jung i sar., 2004). Dosadašnji podaci iz *in vivo* studija su takođe kontroverzni. Tako akutna farmakološka inhibicija AMPK smanjuje veličinu pogođenog područja na modelu ishemijom-izazvane neurodegeneracije na miševima (McCullough i sar., 2005), dok rezultati novije studije na istom *in vivo* modelu govore u prilog neuroprotektivnoj ulozi hroničnog tronedeljnog pretretmana aktivatorom AMPK metforminom (Li i sar., 2010). Efekat aktivacije AMPK u navedenim *in vivo* studijama verovatno je delimično posredovan azot monoksidom i peroksinitritom. U prilog ovoj tezi govori činjenica da je kod nNOS nokaut miševa istovremeno sa smanjenom aktivacijom AMPK zabeleženo i smanjenje veličine područja pogođenog ishemijom (McCullough i sar., 2005). Slično, neuroprotektivni efekat hroničnog pretretmana aktivatorom AMPK metforminom je izgubljen kod nNOS nokauta (Li i sar., 2010). Pored toga, Zou i saradnici (Zou i sar., 2002; Zou i sar., 2003) su pokazali da egzogeno dodat peroksinitrit aktivira AMPK u kulturi endotelne ćelije.

Svoje efekte na energetski status AMPK ostvaruje i inhibicijom mTOR proteina. Glavna funkcija mTOR-a je promovisanje rasta ćelije, što postiže fosforilacijom i aktivacijom regulatora translacije proteina – p70S6K (kinaza koja fosforiliše S6 subjedinicu ribozoma) i 4E-BP (*engl.* eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein) kao i inhibicijom autofagije (Wullschleger i sar., 2006). U uslovima gladovanja, hipoksije i pod dejstvom RKV (Kroemer i sar., 2010) usled pojačanih energetskih potreba, AMPK inhibira mTOR i aktivira autofagiju. Pored obezbeđenja energije, inhibicija aktivnosti mTOR-a može imati i negativne posledice po ćeliju. Pokazano je da apoptoza izazvana oksidativnim stresom u kulturi PC12 ćelija pacovskog feohromocitoma i primarnih mišjih neurona uključuje aktivaciju AMPK i inhibiciju mTOR-a (Chen i sar., 2010).

1.1.5. Uloga dopaminskih liganada u neurodegeneraciji

Dopamin je neurotransmiter koji učestvuje u kontroli ponašanja, raspoloženja, voljnih pokreta, učenja. Svoje efekte ispoljava nakon vezivanja za jedan od pet tipova dopaminskih receptora – D1-D5. Dopaminski receptori su nishodno povezani sa G-proteinima i prenose signal preko sekundarnog glasnika cikličnog adenozin-monofosfata (cAMP). D1 i D5 receptori su povezani sa subjedinicom G-proteina koji aktivira enzim adenilat ciklazu i povećava koncentraciju cAMP-a u ćeliji, dok su D2, D3 i D4 receptori povezani sa subjedinicom G-proteina koja inhibira adenilat ciklazu i smanjuje količinu unutarćelijskog cAMP-a. Postoje 2 forme D2 receptora – D2s (short), koja je smeštena presinaptički i ima funkciju autoreceptora i D2l (long), koja funkcioniše kao klasični postsinaptički receptor (Missale i sar., 1998). Iako je zastupljenost dopaminergičkih neurona u mozgu mala (manje od 1/100000) oni su organizovani u 4 veoma važna puta – mezolimbčki, mezokortikalni, nigrostrijatalni i tuberoinfundibularni, čiji su poremećaji povezani sa nekoliko neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (Girault i Greengard, 2004). Propadanje dopaminergičkih neurona u nigrostrijatalnom putu dovodi do PB, dok se preterana aktivacija mezolimbčkog i mezokortikalnog puta javlja u shizofreniji, hroničnom

neurodegenerativnom oboljenju (Girault i Greengard, 2004).

Ligandi za dopaminske receptore sa uspehom se koriste u terapiji PB i shizofrenije. Pošto se nedostatak dopamina nalazi u osnovi PB, glavna terapijska strategija je potenciranje dopaminergičke transmisije nadoknađivanjem samog dopamina u obliku derivata levodope koji prolazi krvno-moždanu barijeru i korišćenjem agonista dopaminskih receptora. Agonisti D2 i D3 receptora predstavljaju lekove izbora u ranoj PB, kada još uvek nije došlo do potpunog razaranja dopaminergičkih neurona u nigrostrijatalnom putu. Sa druge strane, antagonisti, a poslednjih decenija i parcijalni agonisti D2 i D4 receptora, koriste se za blokiranje halucinacija i deluzija koje kod obolelih od shizofrenije izaziva preterana aktivnost dopaminergičkog sistema (Rang, 2003). Efekti koje ovi lekovi postižu preko dopaminskih receptora su razlog za poboljšanje simptoma u PB i shizofreniji. Takođe, kliničke studije ukazuju na mogućnost da dopaminski ligandi, pored sprečavanja simptoma, usporavaju napredovanje neurodegenerativnih promena u PB i shizofreniji i utiču pozitivno na tok obe bolesti (Parkinson Study Group, 2002; Lieberman i sar., 2005). Još uvek se ne zna tačan mehanizam kojim dopaminski ligandi ostvaruju neuroprotektivan efekat, ali *in vitro* studije pokazuju da ti efekti mogu biti i zavisni (Chen i sar., 2008) i nezavisni od vezivanja za dopaminske receptore. Dejstva nezavisna od vezivanja za receptore dopaminski ligandi ostvaruju direktnim vezivanjem OH[•] i NO radikala (Gómez-Vargas i sar., 1998), zatim povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Hara i sar., 2006), stabilizacijom membrane mitohondrija (Gille i sar., 2002) i inhibicijom sledstvene apoptoze (Carvey i Ling, 2000; Wang i sar., 2005). Sposobnost nekih dopaminskih liganada da direktno vezuju slobodne radikale može se objasniti prisustvom hidroksilovane benzenske strukture u molekulu, ali druge zajedničke osobine ovih liganada koje bi mogle biti odgovorne za ostale neuroprotektivne efekte još uvek nisu identifikovane (Le i sar., 2000). Dejstva zavisna od vezivanja za dopaminske receptore uključuju inhibiciju oslobađanja dopamina u sinaptičku pukotinu, kao i aktivaciju preživljavajućih signalnih puteva u ćeliji zavisnih od fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) (Bozzi i Borrelli, 2006; Nair i Sealfon, 2003).

1.1.5.1. Arilpiperazini

Arilpiperazinska grupa ulazi u sastav nekoliko grupa jedinjenja sa različitim farmakološkim efektima. Tako arilpiperazinsku grupu sadrže ligandi za dopaminske i serotoninske receptore koji se koriste kao antipsihotici i anksiolitici, antihipertenzivi iz grupe kalcijumskih blokatora, acetilholinesterazni inhibitori i antinociceptivi (Romero i sar., 2006). Najpoznatiji arilpiperazin je atipični antipsihotik aripiprazol (Abilify[®], Bristol-Myers Squibb), parcijalni agonista D2 receptora koji se koristi u terapiji shizofrenije, bipolarnog poremećaja i kliničke depresije, i pokazuje značajne neuroprotektivne efekte *in vitro* (Yang i Wang, 2008; Koprivica i sar., 2011) i *in vivo* (Cosi i sar., 2005). Iako je ublažavanje simptoma psihoze posledica vezivanja antipsihotika za dopaminske (i serotoninske) receptore u mozgu, neuroprotektivni efekti aripiprazola ne mogu se jasno povezati sa afinitetom za ove receptore, jer postoje podaci koji govore u prilog „receptorske“ teorije (Yang i Wang, 2008), ali i protiv nje (Koprivica i sar., 2011). Smatra se da je neuroprotektivno dejstvo aripiprazola delimično posredovano inhibicijom toksičnih efekata ekscitatorne aminokiseline glutamata (Koprivica i sar., 2011; Yang i Wang, 2008), čija disfunkcija može biti važna za razvoj neurodegeneracije kod obolelih od shizofrenije (Deutsch i sar., 2001), ali i poboljšanjem protektivnih potencijala neurona. Tako, u kulturi SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma aripiprazol povećava nivo neurotrofičkog faktora koji se sintetisuje u mozgu (*engl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF), a koji je zadužen za rast i diferencijaciju neurona, povećava ekspresiju antiapoptotskog Bcl-2 proteina i inhibira proapoptotsku kinazu glikogen sintaze-3 β (Park i sar., 2009).

Uticaj dopaminskih liganada sa arilpiperazinskom strukturom na oksidativni stres u ćelijskim kulturama sličnim neuronima do sada je ispitan samo za aripiprazol. Utvrđeno je da on štiti PC12 ćelije pacovskog feohromocitoma od stresa izazvanog MPP⁺-om tako što smanjuje nivo unutarćelijskih RKV, povećava aktivnost SOD i smanjuje ekspresiju proapoptotskog Bax proteina (Park i sar., 2011). Međutim, iako je pokazano da aripiprazol može inhibirati oslobađanje NO iz mišjih mikroglialnih ćelija stimulisanih interferonom-gama (Kato i sar., 2008), uticaj arilpiperazina na stres izazvan azot monoksidom još uvek nije ispitan. Takođe, nije ispitan ni efekat

arilpiperazina u oksidativnom stresu izazvanom 6-OHDA-om.

2. CILJEVI

Imajući u vidu veoma bitnu ulogu NO i oksidativnog stresa u neurodegeneraciji, kao i da je već pokazano da arilpiperazinski ligandi štite neuronima slične ćelije od oksidativnog stresa, postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitati potencijal 20 novosintetisanih arilpiperazina da štite SH-SY5Y neuroblastomske ćelije od toksičnog delovanja 6-OHDA i azot monoksida poreklom od NO donora SNP i makrofaga.
- Ispitati unutarćelijske mehanizme kojima arilpiperazini sa najjačim neuroprotektivnim delovanjem štite od toksičnog delovanja NO i 6-OHDA, odnosno ispitati sposobnost arilpiperazina da modulišu NO-om i 6-OHDA-om indukovanu apoptozu, autofagiju, aktivaciju kaspaza, smanjenje potencijala mitohondrija, oksidativni stres, aktivaciju ili inhibiciju osnovnih signalnih puteva uključenih u regulaciju ćelijske smrti (MAP kinaze, Akt, AMPK, mTOR).
- Ispitati afinitete arilpiperazina za humane dopaminske D2 receptore, unutrašnju aktivnost najaktivnijih arilpiperazina, kao i zavisnost njihovog neuroprotektivnog delovanja od vezivanja za dopaminske receptore.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. REAGENSI I RASTVORI

3.1.1. Reagensi

U izradi ovog rada su korišćeni sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (*engl.* fetal calf serum, FCS), medijumi za kultivaciju ćelija – DMEM (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO, Paisley, Velika Britanija), MEM (*engl.* Modified Eagle Medium), Ham F12, RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute Medium), L-glutamin, MEM neesencijalne aminokiseline, rastvor antibiotika i antimikotika, geneticin (G418) (PAA, Linz, Austrija), natrijum piruvat (GIBCO), tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), etilen glikol tetrasirćetna kiselina (EGTA), Tris, HEPES, natrijum nitroprusid (*engl.* sodium nitroprusside, SNP), 6-hidroksidopamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), ³H-spiperon (specifična aktivnost 18.8 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Piscataway, SAD), (+)-butaklamol (Sigma-Aldrich), 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX; Acros Organics, Geel, Belgija), forskolin (Biochemica, St. Louis, SAD), klozapin (ICN Biomedicals, Solon, SAD), spiperon, dopamin (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil fosfat, Tween 20, akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (SERVA, Heidelberg, Nemačka), jodonitrotetrazolijum hlorid, mlečna kiselina, N-metilfenazonijum metilsulfat, β-nikotinamid adenin dinukleotid, triton X-100, bafilomicin-A1, sulpirid (Sigma-Aldrich), MgCl₂, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KOH, Na₂CO₃, NaOH, natrijum tartarat, Cu₂SO₄, toluen (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika), NaNO₂ (Merck, Darmstadt, Nemačka), pacovski rekombinantni IFN-γ (PeproTech, Rocky Hill, SAD), lipopolisaharid *E. coli* (LPS), akridin oranž (Sigma-Aldrich), aneksin V-FITC, propidijum jodid (PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), ApoStat (R&D Systems, Minneapolis, SAD), dihidroetidijum (DHE), 4,5-diaminofluorescein diacetat (DAF) (Invitrogen), JC-1 (R&D Systems), albumin iz

seruma govečeta (*engl.* bovine serum albumin, BSA), RNaza, naftilendiamin dihidroklorid, sulfanilamid, nitrotetrazolijum plavo (*engl.* nitroblue tetrazolium, NBT), dimetilsulfoksid (DMSO), N-acetilcistein, askorbinska kiselina, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (*engl.* 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) (Sigma-Aldrich), zečja antitela protiv fosforilisanih i totalnih formi Akt, ERK, JNK, AMPK, p70S6K, LC-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, SAD) i β -aktina (Abcam, Cambridge, SAD), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (SouthernBiotech, Birmingham, SAD), metanol, H_3PO_4 , natrijum acetat, metanol, etanol, hlorovodonična kiselina, glicerol (Zorka, Šabac, Srbija), adenzin trifosfat, perhlorna kiselina, K_2CO_3 , KH_2PO_4 , tertrabutil amonijum hidrogen fosfat, fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, NP-40, natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Folin-Ciocalteu fenol reagens, 2,5-difeniloksazol (PPO) (Sigma-Aldrich), 1,4-bis-(5-feniloksazol-2-il)-benzen (POPOP) (Backman Instruments, Fullerton, SAD), odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka) i cAMP kit (Assay Designs, New York, SAD).

3.1.2. Rastvori

Medijum za gajenje SH-SY5Y ćelija je bio kombinovani MEM/Ham F12 (1:1) obogaćen sa 10% FCS, 2 mM L-glutaminom, rastvorom neesencijalnih aminokiselina i 0.25 μ g/ml amfotericina B. Medijum za gajenje CHO (*engl.* chinese hamster ovary) ćelija sa stabilno eksprimiranim humanim D2s receptorom je bio DMEM obogaćen sa 5% FCS, 2 mM L-glutaminom, rastvorom neesencijalnih aminokiselina, 1 mM natrijum piruvat, 100 IJ/ml penicilina, 0.1 mg/ml streptomycin sulfata i 400 μ g/ml aktivnog geneticina radi održavanja pozitivnog selekcionog pritiska. Medijum za gajenje pacovskih peritonealnih makrofaga je bio RPMI-1640 puferisan 25 mM HEPES-om i obogaćen sa 10% FCS, 2 mM L-glutaminom, 10 mM natrijum piruvat, 100 IJ/ml penicilina, 0.1 mg/ml streptomycin sulfata i 0.25 μ g/ml amfotericina B.

Za odlepljivanje adherentnih ćelija od podloge je korišćen 0.25% rastvor tripsina

u PBS-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4), uz dodatak 0.02% EDTA. Za brojanje ćelija je korišćen 0.1% rastvor boje tripan plavog u PBS-u. Za ispitivanje ćelijske smrti testom aktivnosti kisele fosfataze je korišćen rastvor 10mM *p*-nitrofenil fosfata u 0.1 M natrijum acetatu (pH 5.5) uz dodatak 0.1% tritona X-100. Za ispitivanje citotoksičnosti neurotoksina testom oslobađanja laktat dehidrogenaze je korišćen rastvor koji je sadržao 54 mM mlečnu kiselinu, 0.28 mM N-metilfenazonijum metilsulfat, 0.66 mM jodonitro-tetrazolijum hlorid i 1.3 mM β-nikotinamid adenin dinukleotid u 0.2 M Tris puferu, pH 8.2. Griess-ov reagens je dobijan mešanjem istih zapremina 0.1% rastvora naftilendiamina dihidrohlorida i 1% rastvora sulfanilamida u 5% H₃PO₄ i korišćen je za određivanje koncentracije nitrita u supernatantima kultura ćelija. Za određivanje antiradikalske aktivnosti ispitivanih supstanci korišćeni su 0.1 mg/ml rastvor nitrotetrazolijum plavog u DMSO-u i 50 μM rastvor DPPH u metanolu. Arilpiperazini su čuvani na +4°C u obliku osnovnih štokova koncentracije 10 mM u DMSO. Neposredno pre eksperimenta su rastvarani u rastvoru koji se sastojao od DMSO i medijuma za gajenje SH-SY5Y ćelija (1:1). Zatim su finalno razblaženi do koncentracije od 10 μM, tako da koncentracija DMSO u eksperimentu nije prelazila 0.5%.

3.2. ĆELIJE I KULTURE ĆELIJA

Sve ćelijske linije gajene su u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37°C, pri koncentraciji CO₂ od 5%.

3.2.1. Kulture ćelijskih linija i tretmani

Humana neuroblastomska ćelijska linija SH-SY5Y je nabavljena od Američke kolekcije ćelijskih kultura (American Type Culture Collection, SAD), a CHO ćelije stabilno transfektovane kratkom formom humanog D2 receptora (D2s) su poklon

profesora P.S. Strange-a (University of Reading, Reading, Velika Britanija). Po dostizanju konfluentnosti SH-SY5Y ćelije su blago tripsinizovane, centrifugirane i korišćene za eksperimente. CHO ćelije su nakon dostizanja konfluentnosti skidane sa flaska pomoću rastvora 4 mM EDTA u PBS-u. Zatim su centrifugirane i dalje gajene u odgovarajućem medijumu do momenta izolovanja receptora ili određivanja unutrašnje aktivnosti arilpiperazina.

Za testove vijabilnosti i kokultivacije SH-SY5Y ćelije su sađene u polistirenske pločice sa 96 bunarića sa ravnim dnom (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) u gustini od 1.5×10^4 ćelija/bunaru, dok su za FACS analize sađene u polistirenske pločice sa 24 bunara sa ravnim dnom (Sarstedt) u gustini od 1.2×10^5 ćelija/bunaru. Za imunoblot analize aktivnosti kinaza i HPLC analizu unutarćelijskog sadržaja ATP-a SH-SY5Y ćelije su sađene u gustini od 1×10^6 ćelija u Petrijeve posude prečnika 10 cm (Sarstedt) i tretirane nakon dostizanja 80% konfluentnosti. Za ispitivanje unutrašnje aktivnosti arilpiperazina na hD2 receptorima, CHO ćelije su sađene u pločice sa 24 bunara sa ravnim dnom u gustini od 1×10^5 ćelija/bunaru. Nakon 24 h, ćelije su tretirane po postupcima koji su opisani u legendama figura.

Pre svakog eksperimenta ćelije su pretretirane 30 minuta arilpiperazinima u finalnoj koncentraciji $10 \mu\text{M}$, a zatim su izložene delovanju SNP-a, 3-morfolinosidnonimina, LPS i IFN- γ ili 6-OHDA.

3.2.2. Izolovanje makrofaga

Makrofagi su izolovani iz peritonealnog ispirka pacova mužjaka Wistar soja starih od 2-4 meseca uz pomoć hladnog rastvora PBS. Životinje su gajene pod standardnim uslovima u Odgajivačnici životinja Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Pacovi su žrtvovani giljotiniranjem, nakon čega je sterilno u peritonealnu duplju ubrizgivan PBS. Nakon par minuta, ispirak je sakupljan Pasterovom pipetom i centrifugiran na $300 \times g$, 10 minuta. Ćelije u talogu su resuspendovane do željene gustine u medijumu za kultivaciju i razlivanje u plastične ploče.

Za eksperimente kokultivacije SH-SY5Y ćelije su posađene u pločice sa 96 bunarića u naznačenoj gustini, a nakon 24 h su dodati peritonealni makrofagi u gustini od 5×10^4 ćelija po bunaru. Nakon 4 h inkubacije neadherirani makrofagi su isprani i ćelije su tretirane kako je navedeno u legendama figura. Za ispitivanje uticaja arilpiperazina na produkciju NO od strane stimulisanih makrofaga, makrofagi su sađeni u pločice sa 96 bunarića u gustini od 5×10^4 ćelija po bunaru (za određivanje nitrita Griess-ovom metodom) ili u ploče sa 24 bunara u gustini od 5×10^5 ćelija po bunaru (za FACS analizu sadržaja NO pomoću DAF-a). Pacovski peritonealni makrofagi su stimulisani da stvaraju NO pomoću LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) i pacovskog IFN- γ (10 ng/ml).

3.3. PRIMENJENE METODE

3.3.1. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Ukupan broj živih ćelija određivan je brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u nakon bojenja sa rastvorom boje tripan plavo. Pošto se mrtve ćelije zbog narušene građe membrane boje plavo, bilo ih je jednostavno razlikovati od živih, neobojenih ćelija.

3.3.2. Test kompetitivnog vezivanja radioaktivno obeleženog spiperona i ispitivanih arilpiperazina za humani D2 receptor

Membrane sa D2 receptorima su izolovane iz CHO ćelija po ranije opisanoj proceduri (Roberts i sar., 2004) uz manje modifikacije. Konfluentne ćelije iz posuda za kultivaciju (flaskovi) su ispirane HEPES puferom (20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , pH 7.4, titrirano pomoću KOH) i skinute struganjem sa površine flaska. Nakon centrifugiranja ($900 \times g$, 10 minuta, 4°C) i odlivanja

supernatanta, ćelije u talogu su resuspendovane pomoću ručnog homogenizera sa teflonskim tučkom (B. Braun, Melsungen, Nemačka) u puferu za vezivanje liganda (20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.4). Tako dobijena suspenzija ćelijskih membrana je prečišćena centrifugiranjem (600 x g, 10 minuta, 4°C), a membrane su istaložene iz supernatanta ultracentrifugiranjem na 48000 x g, 60 minuta, 4°C (centrifuga Beckman L7-55, rotor tip Ti-50). Konačni talog membrana sa humanim D2 receptorom je resuspendovan u puferu za vezivanje liganda u finalnoj koncentraciji proteina od 3 mg/ml, alikvotiran, zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -70°C do upotrebe. Koncentracija proteina je određivana metodom po Markwell-u uz korišćenje BSA kao standarda (Markwell i sar., 1978).

Test kompetitivnog vezivanja ispitivanih arilpiperazina i ³H-spiperona za humani D2 receptor je korišćen da bi se procenio afinitet arilpiperazina za hD2 receptor i izveden je po ranije opisanoj proceduri (Roberts i sar., 2004). Ćelijske membrane sa hD2 receptorima (25 µg proteina/ml) i različite koncentracije testiranih supstanci (od 10⁻⁵ do 10⁻¹¹ M) su inkubirane 3 h na 25°C sa ³H-spiperonom (finalna koncentracija 0.4 nM) u puferu za vezivanje liganda. Finalna zapremina svakog uzorka je bila 1 ml. Nespecifično vezivanje radioaktivnog liganda je određivano u prisustvu (+)-butaklamola (3 µM). Reakcija je prekidana brzim filtriranjem kroz Whatman GF/C filtre pod vakuumom. Filtri su ispirani 2 puta sa po 4ml hladnog PBS-a da bi se uklonila nevezana radioaktivnost i sušeni preko noći na sobnoj temperaturi. U plastične vaje sa suvim filtrima je sipano po 4 ml scintilacionog koktela na bazi toluena (0.3 g/l PPO, 5 g/l POPOP u toluenu) i radioaktivnost je merena pomoću scintilacionog brojača (LKB Wallac 1219 RACKBETA).

Vrednost konstante disocijacije (K_d) za ³H-spiperon je prethodno određena metodom vezivanja radioliganda za receptore do zasićenja (*engl.* saturation binding assay).

3.3.3. Određivanje unutrašnje aktivnosti arilpiperazina na humanim D2 receptorima

Da bi se odredilo da li se izabrane supstance ponašaju kao antagonisti, parcijalni ili puni agonisti na hD2 receptorima, određena je njihova unutrašnja aktivnost na hD2 receptorima. CHO ćelije su sađene u pločice sa 24 bunara u gustini od 1×10^5 ćelija/bunaru. Nakon 24 h ćelije su ispirane DMEM-om bez seruma, a zatim su inkubirane sa inhibitorom fosfodiesteraze IBMX-om (1 mM) 40 minuta. Fosfodiesteraza razgrađuje cAMP i u ovom koraku je inhibirana kako bi se sprečila pojava lažno negativnih rezultata. Po isteku inkubacije dodat je stimulator adenilat ciklaze forskolin (10 μ M) i u odgovarajuće bunare su dodate standardne supstance (spiperon, klozapin ili dopamina) ili ispitivani arilpiperazini (svi u finalnoj koncentraciji od 10 μ M). Nakon 10 minuta medijum je odlivan, a ćelije su lizirane na sobnoj temperaturi dodatkom 0.1% tritona X 100 u 0.1 M HCl. Lizati su zatim centrifugirani 10 minuta na 600 x g, a supernatanti su zamrznuti. Iz supernatanta je dalje pomoću cAMP kita određivana koncentracija cAMP-a u uzorcima.

Princip rada cAMP kita zasniva se na interakciji između antigena i antitela sa ciljem da se u lizatu ćelija odredi koncentracija određenog antigena, u ovom slučaju cAMP-a. Neobeleženi cAMP iz uzorka se u reakciji kompeticije sa cAMP-om obeleženim alkalnom fosfatazom vezuje za zečje poliklonsko antitelo na cAMP. Ovo antitelo se zatim vezuje za afinitetno prečišćeno anti-zečje IgG antitelo, kojim je fabrički obložena ploča sa 96 bunara. Ispiranjem ploče puferom uklanja se višak slobodnog obeleženog i neobeleženog cAMP-a. Količina obeleženog cAMP-a koja ostaje vezana za površinu bunara je obrnuto proporcionalna količini cAMP-a iz uzorka. Kvantifikacija se obavlja spektrofotometrijski, nakon reakcije alkalne fosfataze sa supstratom *p*-nitrofenil fosfatom u kojoj nastaje žuti *p*-nitrofenolat, čija se apsorbanca meri na 405 nm. Za izvođenje ove metode u bunare ploče obložene prečišćenim anti-zečjim IgG antitelom najpre je sipan reagens za neutralizaciju, a zatim i uzorci i serijska razblaženja standarda cAMP-a. Nakon toga u bunare su dodati i alkalnom fosfatazom obeleženi cAMP i zečje poliklonsko antitelo na cAMP. Tokom inkubacije 2 h na sobnoj temperaturi, na šejkeru, odigravala se reakcija kompetitivnog vezivanja

obeleženog i neobeleženog cAMP-a za antitelo na cAMP, kao i reakcija vezivanja između zečjeg antitela na cAMP i anti-zečjeg IgG antitela. Po završetku inkubacije ploča je tri puta isprana puferom za ispiranje (0.05 % Tween 20 u Tris puferu), čime je iz bunara uklonjen višak cAMP-a i nevezanog antitela. Nakon ovog koraka u bunare je dodat supstrat za alkalnu fosfatazu i ploča je ostavljena 1 h u mraku na sobnoj temperaturi bez mešanja. U ovom koraku se odigravala reakcija između alkane fosfataze i *p*-nitrofenil fosfata. Reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora natrijum fosfata u bunare i apsorbancu nastalog žutog jedinjenja je merena na 405 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Apsorbancu koja je izmerena u bunarima u kojima je inkubiran samo obeleženi cAMP i *p*-nitrofenil fosfat u 0.1 M HCl i reagensu za neutralizaciju, bez zečjeg antitela na cAMP, je smatrana nespecifičnom i oduzimana je od ostalih očitanih vrednosti. Maksimalni kapacitet vezivanja u jednom bunaru (A_{max}) je određen inkubacijom obeleženog cAMP-a sa zečjim antitelom na cAMP u 0.1 M HCl i reagensu za neutralizaciju, bez uzorka ili standarda, i naknadnim dodavanjem *p*-nitrofenil fosfata. Procenat vezanog cAMP-a po standardu i uzorku u odnosu na maksimalni kapacitet je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$\text{procenat vezanog cAMP-a} = A(\text{uzorka ili standarda}) / A_{max} * 100$$

Nakon što su izračunati procenti vezivanja cAMP-a u svakom standardu i uzorku, u GraphPad Prism programu je nanošenjem log koncentracije standarda cAMP na x-osu i procenta vezanog cAMP-a na y-osu napravljena standardna kriva iz koje je izračunata koncentracija cAMP-a po uzorku. Normalizacija sadržaja cAMP-a je urađena deljenjem dobijenih koncentracija cAMP-a po uzorku sa koncentracijom proteina određenom u tom uzorku.

3.3.4. Test aktivnosti kisele fosfataze

Test se zasniva na merenju aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze koja predstavlja meru vijabilnosti SH-SY5Y ćelija (Connolly i sar., 1986). Ćelije, koje su na kraju tretmana žive i poseduju aktivnu kiselu fosfatazu, liziraju se pomoću tritona X-100. Na taj način ovaj lizozomalni enzim izlazi iz citosola u vanćelijski prostor, gde reaguje sa supstratom *p*-nitrofenil fosfatom. Kisela fosfataza katalizuje nastanak žutog *p*-nitrofenolata, a apsorbance nastalog proizvoda je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Test je izvođen tako što je na kraju inkubacije medijum za kultivaciju odstranjen i u svaki bunar je dodato po 100 μ l sveže pripremljenog rastvora sa supstratom za kiselu fosfatazu i tritonom X-100 (10 mM *p*-nitrofenil fosfat i 0.1% triton X-100 u 0.1 M natrijum acetatu, pH 5.5). Nakon inkubacije od 1 h na 37°C, reakcija je prekinuta dodavanjem 50 μ l 1 M NaOH. Apsorbance dobijenog žutog produkta je merena na talasnoj dužini od 405 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Od svake vrednosti je oduzeta apsorbance samog rastvora sa supstratom i NaOH i rezultati su izraženi kao procenat vijabilnosti kontrole, tj. netretiranih ćelija. Vijabilnost tumorskih ćelija u kokultivaciji sa makrofagima dobijena je oduzimanjem vrednosti absorbance za makrofage inkubirane same i izražavana je kao % vijabilnosti u odnosu na kontrolne kulture bez makrofaga.

3.3.5. Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze

Aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) je uzimana kao mera citotoksičnosti neurotoksina 6-OHDA. LDH se oslobađa iz citosola u medijum nakon oštećenja ćelijske membrane ili posle lize ćelija, što se može desiti i u toku apoptoze i u toku nekroze. Aktivnost LDH u medijumu za kultivaciju direktno je proporcionalna broju ćelija sa oštećenom membranom u kulturi i zato se može smatrati merom citotoksičnosti agensa koji je ta oštećenja izazvao. Princip testa se sastoji u tome da

LDH katalizuje oksidaciju laktata do piruvata uz istovremenu redukciju NAD^+ do NADH i H^+ . U drugom koraku se uz pomoć N-metilfenazonijum metilsulfata kao prenosnika nastalog H^+ jodonitrotetrazolijum redukuje do intenzivno crveno obojenog rastvorljivog formazana, koji apsorbuje svetlost talasne dužine 492 nm.

Test je izvođen tako što je na kraju inkubacije po 50 μl medijuma za kultivaciju iz svakog bunara preneto u novu ploču i mešano sa istom zapreminom supstrata za LDH (54 mM mlečna kiselina, 0.28 mM N-metilfenazonijum metilsulfat, 0.66 mM jodonitrotetrazolijum hlorid, 1.3 mM β -nikotinamid adenin dinukleotid u 0.2 M Tris pufferu, pH 8.2). Nakon inkubacije od 10 minuta, očitana je apsorbancu na 492 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Da bi se procenila maksimalna moguća aktivnost LDH u kulturi, netretirane ćelije su razarane 3% tritonom X-100 i supernatant iz tih kultura je takođe mešan sa supstratom za LDH. Kao kontrola je uzeta aktivnost LDH u netretiranim ćelijama. Od svake vrednosti je oduzeta apsorbancu smeše supstrata za LDH i čistog medijuma i citotoksičnost je računata po sledećoj formuli:

$$\text{citotoksičnost (\%)} = (\text{Auzorka} - \text{Akontrola}) / (\text{Atritona} - \text{Akontrola}) * 100$$

gde Auzorka predstavlja apsorbancu tretiranih ćelija, Akontrola apsorbancu kontrolnih ćelija, a Atritona apsorbancu ćelija tretiranih tritonom X-100.

3.3.6. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke promene humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y analizirane su na Leica DCF320 mikroskopu pri čemu je izabrano uveličanje od 20x.

3.3.7. Detekcija apoptoze i nekroze

Apoptoza i nekroza analizirane su na FACSCalibur protočnom citofluorimetru (BD, Heidelberg, Nemačka) nakon dvostrukog bojenja sa aneksin V-FITC i PI. Aneksin V-FITC se vezuje za fosfatidilserinske ostatke koji se kod apoptotičnih ćelija nalaze sa spoljašnje strane ćelijske membrane čiji integritet je očuvan (rana faza apoptoze), dok PI ulazi u ćelije sa oštećenom membranom i vezuje se za DNK (kasna faza apoptoze ili nekroza). Aneksin V-FITC takođe ulazi u ćelije sa oštećenom membranom i u njima se vezuje za fosfatidilserinske ostatke. Zato se smatra da su Aneksin⁻/PI⁻ ćelije žive, Aneksin⁺/PI⁻ ćelije u ranoj fazi apoptoze, a Aneksin⁺/PI⁺ ćelije u kasnoj fazi apoptoze/nekrotične.

Nakon tretmana, ćelije su centrifugirane na 500 x g, 5 minuta, resuspendovane u 100 µL aneksin vezujućeg pufera sa aneksin V-FITC (2 µg/ml) i propidijum jodidom (20 µg/ml) i inkubirane 15 minuta u mraku. Neposredno pre analize na FACSCalibur-u u suspenziju ćelija je dodato 400 µl pufera. Procenat Aneksin⁻/PI⁻, Aneksin⁺/PI⁻ i Aneksin⁺/PI⁺ ćelija određivan je korišćenjem CellQuest Pro softvera (BD, Heidelberg, Nemačka).

Pored bojenja sa aneksin V-FITC/PI, za detekciju apoptoze je korišćeno i obeležavanje ćelija sa PI. Princip ove metode zasniva se na osobini PI da se umeće u dvolančani molekul nukleinskih kiselina i produkuje crvenu fluorescencu proporcionalnu sadržaju DNK u ćeliji. U kasnoj fazi apoptoze endonukleaze razgrađuju DNK u male fragmente veličine oko 180 baznih parova, koji se akumuliraju u ćeliji. Ovi oligomeri se mogu ukloniti fiksiranjem ćelija pomoću etanola i ispiranjem PBS-om, čime se smanjuje sadržaj DNK u ćeliji. S obzirom na manji sadržaj DNK, apoptotične ćelije se nakon bojenja sa PI i očitavanja crvene fluorescence na protočnom citofluorimetru distribuiraju ispred vijabilnih ćelija na histogramu formirajući zonu specifičnu za apoptozu koja se naziva sub-G₀/G₁ ili hipodiploidni region. Pošto se PI vezuje i za RNK neophodno je razgraditi RNK prisutnu u uzorku primenom RNAze.

Analiza je izvođena tako što su nakon isteka inkubacije supernatanti iz kultura sakupljeni, a ćelije oprane u PBS-u i odlepljivane tripsinom. Nakon fiksiranja ćelija u

70% etanolu 60 minuta na 4°C, sledilo je pranje u PBS-u da bi se uklonio etanol i centrifugiranje na 800 x g 7 minuta. Čelije su resuspendovane u 500 µl PBS-a, dodata im je RNAza (70 µg/ml) i inkubirane su 2 minuta na 37°C. Odmah potom je suspenziji ćelija dodat i PI (20 µg/ml) i inkubacija je nastavljena još 30 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije crvena fluorescenca poreklom od kompleksa PI-DNK je očitana na protočnom citofluorimetru. Nakon što su ćelijski agregati kompjuterski isključeni iz analize, udeo hipodiploidnih ćelija u sub-G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa je analiziran korišćenjem Cell Quest Pro softvera.

3.3.8. Detekcija aktivacije kaspaza

Aktivacija kaspaza merena je protočnom citofluorimetrijom nakon obeležavanja ćelija permeabilnim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om, koji je konjugovan sa zelenom fluoroforom fluorescein izotiocijanatom (FITC). Kaspaze su cistein proteaze koje nakon aktivacije razgrađuju ćelijske proteine i dovode do reorganizacije skeleta, fragmentacije DNK, kondenzacije hromatina i smrti ćelije apoptozom. ApoStat se selektivno vezuje za aktivirane kaspaze, dok nevezani ApoStat izlazi iz ćelije i eliminiše se ispiranjem. Intenzitet fluorescence FITC-a, koji se detektuje na protočnom citofluorimetru, direktno je proporcionalan aktivnosti kaspaza u ćeliji.

Po isteku inkubacije ćelije su isprane u PBS-u i tripsinizovane. Nakon centrifugiranja na 500 x g 5 minuta, ćelijama je dodato 100 µl rastvora ApoStat-a (0.5 µg/ml) u medijumu za kultivaciju i smeša je inkubirana 30 minuta na 37°C u mraku. Potom, da bi se isprala nevezana boja u svaku epruvetu je dodat PBS i ćelije su centrifugirane na 500 x g 5 minuta. Čelije su resuspendovane u 500 µl PBS-a, a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Porast zelene fluorescence u odnosu na kontrolu predstavljao je meru aktivnosti kaspaza u tretiranoj populaciji ćelija.

3.3.9. Merenje potencijala membrane mitohondrija

Potencijal membrane mitohondrija je procenjen protočnom citofluorimetrijom ćelija bojenih fluoroforom JC-1 (5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin jodid). Ova boja je lipofilni katjon koji zahvaljujući pozitivnom naelektrisanju prolazi kroz membranu mitohondrija kada je potencijal membrane mitohondrija ($\Delta\psi$) očuvan (tj. kada je unutrašnjost mitohondrija negativno naelektrisana). U mitohondrijalnom matriksu formiraju se JC-1 agregati koji fluoresciraju narandžasto-crveno (detekcija na FL-2 kanalu FACSCalibura). Ukoliko je $\Delta\psi$ narušen, kao što je to slučaj u apoptozi usled formiranja pora u mitohondrijalnoj membrani, JC-1 ne može da se akumulira u mitohondrijama, već ostaje u citoplazmi u svojoj monomernoj formi i fluorescira zeleno (detekcija na FL-1 kanalu FACSCalibura). Stoga je povećanje zelene fluorescence u odnosu na crvenu (porast FL1/FL2) pokazatelj pada $\Delta\psi$, tj. depolarizacije mitohondrija, dok je povećanje crvene fluorescence u odnosu na zelenu (porast FL2/FL1) pokazatelj porasta $\Delta\psi$, tj. hiperpolarizacije mitohondrija.

Analiza je izvođena tako što su po završetku inkubacije supernatanti sakupljeni, ćelije ispirane PBS-om i tripsinizovane. Nakon centrifugiranja (500 x g, 5 minuta), talog ćelija je resuspendovan u 100 μ l boje JC-1 (finalna koncentracija 5 μ g/ml) rastvorene u JC-1 vezujućem puferu i smeša je inkubirana 20 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije ćelijama je dodat PBS i centrifugirane su na 500 x g 5 minuta. Postupak je ponovljen još jednom kako bi se uklonio višak nevezane boje. Ćelije su resuspendovane u 500 μ l PBS-a i fluorescencija zelenih monomera i crvenih agregata boje JC-1 je detektovana na FACSCalibur protočnom citofluorimetru. Rezultati su predstavljeni kao odnos crvene i zelene fluorescence (FL2/FL1) pri čemu porast ovog odnosa u poređenju sa kontrolom odražavao povećanje (hiperpolarizaciju), a smanjenje ovog odnosa pad (depolarizaciju) potencijala membrane mitohondrija.

3.3.10. Merenje unutarćelijske produkcije superoksidnog anjona i azot monoksida

Nastanak superoksidnog anjon radikala je detektovan na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija fluorescentnom bojom DHE, dok je unutarćelijska produkcija nitrozonijum jona (NO^+) merena takođe protočnom citofluorimetrijom nakon obeležavanja ćelija fluorescentnom bojom DAF. Dihidroetidijum slobodno ulazi u ćeliju i nakon reakcije sa superoksidnim anjon radikalom daje crveni fluorescentni produkt etidijum, koji se interkalira u DNK i čiji intenzitet fluorescence se meri. Diaminofluorescein diacetat takođe slobodno difunduje u ćeliju, gde ga ćelijske esterase prevode u nepermeabilni diaminofluorescein. Na taj način se sprečava gubitak signala do koga bi došlo izlaskom DAF-a van ćelije. Diaminofluorescein u ćeliji reaguje sa NO u prisustvu kiseonika pri čemu nastaje triazolofluorescein, koji fluorescira zeleno.

Testovi su izvođeni tako što su ćelije u poslednjih 30 minuta tretmana inkubirane sa fluorescentnim bojama DHE i DAF (20 μM). Nakon tripsinizacije, ćelije su centrifugirane na 500 x g 5 minuta. Talogu je dodat PBS i nakon centrifugiranja (500 x g, 5 minuta), ćelije su resuspendovane u 500 μl PBS-a. Crvena fluorescencija poreklom od DHE (FL-2), odnosno zelena fluorescencija poreklom od DAF-a (FL-1) su merene na FACSCalibur protočnom citofluorimetru. Povećanje fluorescence u odnosu na kontrolu je bilo pokazatelj povećane unutarćelijske koncentracije superoksid anjona (DHE) ili NO (DAF) radikala.

3.3.11. Detekcija autofagije pomoću protočnog citofluorimetra

Prisustvo kiselih autofagnih vezikula u ćelijama je detektovano na protočnom citofluorimetru korišćenjem fluorescentne supravitalne boje akridin oranž. Ova boja je pH senzitivna i u kiselim vezikulama fluorescira crveno-narandžasto, a u citoplazmi i jedru zeleno. Intenzitet crvene fluorescence je proporcionalan stepenu kiselosti i zapremini kiselih vezikula u ćeliji. Zato povećanje crveno-narandžaste fluorescence pod dejstvom tretmana, uz nepromenjenu zelenu, ukazuje na pojavu autofagije u tretiranim

ćelijama.

Analiza je izvođena tako što su ćelije 15 minuta pred kraj tretmana inkubirane sa 1 μM boje akridin oranž. Po isteku inkubacije ćelije su tripsinizovane i centrifugirane na 500 x g 5 minuta. Nakon jednog pranja u PBS-u, talog je resuspendovan u 500 μl PBS-a i crveno-narandžasta (FL-3) i zelena (FL-1) fluorescenca su merene na FACSCalibur-u. Rezultati su predstavljeni kao odnos FL-3/FL-1, pri čemu povećanje ovog odnosa u odnosu na kontrolu ukazuje na pojavu autofagije.

3.3.12. Određivanje sadržaja nitrita Griess-ovom metodom

Koncentracija nitrita, kao odraz produkcije NO, određivana je u supernatantima ćelijskih kultura Griess-ovom metodom (Green i sar., 1982). Azot u NO se nalazi u oksidacionom stanju +2 i lako prelazi u stabilnije +3 stanje, pri čemu nastaju nitriti (NO_2^-) odnosno +5 stanje, pri čemu nastaju nitrati (NO_3^-). Količina nastalih NO_2^- i NO_3^- direktno je proporcionalna količini NO koji se oksiduje. U Griess-ovoj reakciji je iskorišćena osobina nitrita da u kiseloj sredini kvantitativno reaguju sa sulfanilnom kiselinom, prevodeći je u diazonijum so. Ova so se kupluje sa naftilendiaminom pri čemu nastaje crvenkasta azo boja koja apsorbuje svetlost talasne dužine 570 nm. Intenzitet apsorbanca je direktno proporcionalan količini nitrita, odnosno količini NO koja se oksidovala do nitrita.

Supernatanti kultura su sakupljani nakon odgovarajućeg perioda inkubacije, a zatim je po 50 μl supernatanata mešano sa istom zapreminom Griess-ovog reagensa u pločama sa 96 bunarčića ravnog dna. Posle inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi očitana je absorbanca nastalog azo jedinjenja na 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Titertek Multiscan PLUS MK II 314). Koncentracija nitrita je određivana interpolacijom sa standardne krive dobijene korišćenjem poznatih koncentracija rastvora NaNO_2 .

3.3.13. Određivanje interakcije ispitivanih supstanci sa superoksid anjon radikalom u odsustvu ćelija

Sposobnost direktne interakcije ispitivanih arilpiperazina sa superoksid anjon radikalom je procenjena spektrofotometrijski korišćenjem boje nitrotetrazolijum plavo (NBT). Ovo žuto jedinjenje se u prisustvu $O_2^{\cdot -}$ redukuje do formazana plave boje, koji su rastvorni u DMSO. Kao izvor superoksid anjon radikala u *in vitro* uslovima je iskorišćen alkalni DMSO (1 mM NaOH u DMSO). Opadanje intenziteta plave boje poreklom od nastalih formazana u prisustvu ispitivanih supstanci je pokazatelj njihove sposobnosti da direktno reaguju sa $O_2^{\cdot -}$.

Različite koncentracije ispitivanih arilpiperazina (finalno 5, 10, 20 i 40 μ M) i standardnog antioksidansa N-acetilcisteina (finalno 1.25, 2.5, 5, 10 i 20 mM) su pomešane sa rastvorom NBT-a (rastvoren u DMSO, finalna koncentracija 0.1 mg/ml) i alkalnim DMSO-om (finalna koncentracija NaOH 1 mM) tako da ukupna zapremina smeše bude 150 μ l. Apsorbanca nastalog plavog jedinjenja je odmah merena na talasnoj dužini od 560 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Nakon oduzimanja vrednosti apsorbance samog DMSO, rezultati su predstavljeni kao % nastanka superoksid anjon radikala u kontroli (alkalni DMSO), pri čemu je kontroli dodeljena vrednost od 100%.

3.3.14. Procena antiradikalnih osobina ispitivanih supstanci pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil testa

Antiradikalne osobine ispitivanih arilpiperazina su procenjene spektrofotometrijski praćenjem obezbojavanja metanolnog rastvora DPPH u njihovom prisustvu. DPPH je ljubičasto obojeni stabilni radikal, koji se često koristi za procenu antioksidativnog kapaciteta različitih supstanci. Zbog prisustva nesparenog elektrona u molekulu ovaj radikal apsorbuje svetlost talasne dužine 517 nm, a obezbojava se u prisustvu supstanci koje mu doniraju elektron i neutrališu ga. Zato se obezbojavanje

rastvora DPPH, tj. smanjenje apsorbance na 517 nm, može uzeti kao mera antiradikalnog kapaciteta neke supstance.

Različite koncentracije ispitivanih arilpiperazina (finalno 5, 10, 20 i 40 μM) i standardnog antioksidansa askorbinske kiseline (finalno 6.25, 12.5, 25, 50 i 100 μM) su napravljene rastvaranjem u 50 mM Tris puferu (pH 7.4). Zatim je 50 μl tih rastvora mešano sa istom zapreminom metanolnog rastvora DPPH (finalna koncentracija 50 μM). Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, intenzitet preostale boje je meren na talasnoj dužini od 517 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Nakon oduzimanja vrednosti apsorbance metanola, rezultati su predstavljeni kao % kontrole, koja je sadržala samo rastvarač i DPPH.

3.3.15. HPLC analiza sadržaja adenzin trifosfata u ćeliji

Sadržaj ATP-a u ćelijama neuroblastoma je meren gradijentnom visokoeffikasnom tečnom hromatografijom (*engl.* high-performance liquid chromatography, HPLC). HPLC je metoda kojom se uzorak razdvaja na komponente zahvaljujući razlikama u njihovoj polarnosti. Razdvajanje se obavlja propuštanjem uzorka kroz odgovarajuću kolonu (stacionarna faza) pod kontinuiranim pritiskom mobilne faze. Ako je stacionarna faza nepolarna, mobilna je polarna, i obrnuto. Sastojci uzorka koji imaju veći afinitet prema stacionarnoj fazi će se kasnije eluirati (eluiranje = izlazak sa kolone). U gradijentnoj HPLC, sastav mobilne faze se menja u toku analize tako što se povećava % organskog rastvarača u mobilnoj fazi, čime se postiže brže eluiranje komponenti koje imaju veoma visok afinitet prema stacionarnoj fazi. Vreme koje protekne od momenta ubacivanja uzorka u sistem do izlaska određene komponente sa kolone se zove retenciono vreme. Retenciono vreme je karakteristično za svaku supstancu na određenom tipu kolone, pri korišćenju određene mobilne faze i služi kao parametar za identifikaciju nepoznatih supstanci iz uzorka. Naime, upoređivanjem sa retencionim vremenom standarda pod istim eksperimentalnim uslovima, sa sigurnošću se može utvrditi o kojoj supstanci je reč. Takođe, HPLC metoda omogućava i

određivanje koncentracije identifikovane supstance, jer je površina ispod pika na hromatogramu direktno proporcionalna količini te supstance u uzorku.

Za izvođenje HPLC analize, najpre su pripremljeni uzorci u kojima je određivan ATP. Cela procedura je izvedena na ledu. Po isteku tretmana, ćelije su stavljene na led, tripsinizovane i centrifugirane na 500 x g 5 minuta. Talog ćelija je liziran u 500 µl 3% tritona X-100 rastvorenog u PBS-u i dobijeni lizat je centrifugiran 15 minuta na 1400 x g (4°C). Supernatant je podeljen na dva dela od po 200 µl. Svaki deo je pomešan sa 100 µl 0.1 N HCl u metanolu i smešten na -20°C, 5 minuta. Nakon inkubacije svakom uzorku je dodato 300 µl rastvora 0.3 M perhlorne kiseline i 100 µl rastvora 1 mM EDTA. Uzorci su dobro promešani na vorteksu i centrifugirani 5 minuta na 12000 x g (4°C). Supernatanti su zatim neutralisani dodatkom 50 µl rastvora 1.5 M K₂CO₃ i ponovo centrifugirani 5 minuta na 12000 x g (4°C). Bistri supernatanti su profiltrirani kroz filtre veličine pora 0.2 µm, alikvotirani i čuvani na -80°C do analize.

Analiza ATP-a iz uzoraka je izvedena na aparatu Agilent Technologies 1200 Series (Agilent, Palo Alto, SAD), na koloni Zorbax SB-C18 5 µm, 250 x 4,6 mm. Kao mobilna faza korišćena je kombinacija rastvora A (0.1 mM KH₂PO₄ sa 8 mM tetrabutilamonijum hidrogen fosfatom, pH 6.0) i rastvora B (metanol) sa protokom mobilne faze 1.5 ml/min. Eluiranje je teklo gradijentno po sledećoj šemi: 0-6 min 75% A, 6-8 min 75-60% A, 8-13 min 60% A, 13-15 min 60-57% A, 15-18 min 57-55% A, 18-20 min 55% A. Kolona je ekvilibrisana 5 minuta pre ubacivanja svakog uzorka. Injekciona zapremina uzorka je bila 50 µl, a ispitivana komponenta je detektovana na 254 nm. Pikovi ATP-a na hromatogramu su identifikovani po retencionom vremenu standarda, a koncentracija ATP-a u uzorku je dobijena interpolacijom sa standardne krive. Standardna kriva je dobijena korišćenjem rastvora poznatih koncentracija ATP-a i konstruisana je nanošenjem poznatih koncentracija standarda na x-osu i odgovarajućih površina ispod pika na y-osu.

3.3.16. Imunoblot analize

Aktivnost i ekspresija proteina je određena iz ukupnog ćelijskog ekstrakta imunoblot analizom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina. Neposredno po završetku inkubacije ćelije su lizirane na ledu u sveže pripremljenom puferu za lizu ćelija uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1mM PMSF, 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora, 2 mM Na₃VO₄ i 50 mM NaF). Potpuno razaranje ćelija je postignuto inkubacijom ćelijske suspenzije 15 minuta na ledu, uz povremeno snažno mešanje na vorteksu. Lizati su zatim centrifugirani na 14000 x g, 20 minuta (4°C), a supernatanti, koji su predstavljali ukupan ćelijski ekstrakt, su čuvani na -20°C do upotrebe.

Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 min, 100°C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptetanol, 0.002% bromfenol plavo, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima. Dodatkom 2-merkaptetanola u pufer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS-u svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i razlikovali su se međusobno samo po molekulskim masama.

Proteini iz skuvanih uzoraka su zatim razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama elektroforezom u 10% (za analizu Akt, ERK, JNK, AMPK, p70S6K proteina i β-aktina) ili 12% (za analizu LC-3 proteina) poliakrilamidnom gelu. U bunare su sipane jednake količine proteina (od 10 µg do 50 µg, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje proteina (4% akrilamid/0.14% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0.34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0.41% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare u kojem je tekla elektroforeza se sastojao od 192 mM

glicina, 0.1% SDS i 25m M Tris-HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 min pri konstantnom naponu. Prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska).

Po završetku elektroforeze proteini sa gela su odmah transferisani na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) pomoću aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir, koji je prethodno natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela je smešten još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine (0.8 mA/cm^2 membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi proteini su zaustavljani od strane membrane, koja ih je vezivala za sebe. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 minuta.

Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) sa 0.05% Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na temperaturi od 4°C uz blago mešanje, pri čemu su se antitela vezivala za odgovarajuće proteinske epitope. Korišćena su sledeća razblaženja antitela u rastvoru za blokiranje: 1:600 za anti-p-JNK i anti-p-p70S6K, 1:900 za anti-LC-3, 1:1000 za anti-p-Akt, anti-p-ERK, anti-p-AMPK, anti-Akt, anti-ERK, anti-JNK, anti-AMPK i anti-p70S6K i 1:8000 za anti- β -aktin. Nakon 3 ispiranja u TBST-u, membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom (1:5000 u rastvoru za blokiranje) 75 minuta na sobnoj

temperaturi. Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta u TBST-u i prelivane 3 minuta sa supstratom za peroksidazu rena (ECL; GE Healthcare). U ovom koraku peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, je razgrađivala H_2O_2 iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji je emitovao foton. Nastala svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), a intenzitet hemiluminiscence je bio direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Nakon razvijanja filma relativna optička gustina imunoreaktivnih traka je kvantifikovana pomoću programa ImageJ. Aktivnost Akt, ERK, JNK, AMPK i p70S6K je izražena deljenjem gustine trake fosforilisane forme sa gustinom trake totalne forme proteina, dok je intenzitet trake LC3-II forme proteina uzet kao pokazatelj pojave autofagije u ćelijama.

3.3.17. Određivanje koncentracije proteina po uzorku

Sadržaj proteina u izolovanim membranama sa hD2 receptorima i lizatima za određivanje sadržaja cAMP-a je određivan metodom po Markwell-u (Markwell i sar., 1978). Ovaj postupak je modifikacija Lowry-jeve metode i koristi se kada su u uzorku prisutni lipidi koji mogu ometati normalno bojenje proteina, kao što su fosfolipidi iz ćelijskih membrana. U prvom koraku ovog postupka, lipidi iz uzorka se rastvaraju pomoću deterdženta natrijum dodecil sulfata u alkalnoj sredini. Rastvaranje lipida omogućuje da peptidne veze proteina iz uzorka neometano reaguju sa jonima Cu^{2+} u alkalnoj sredini redukujući ga do Cu^+ , pri čemu nastaje kompleks plave boje (biuretska reakcija). Nakon toga, u drugom koraku postupka aminokiseline tirozin, triptofan i cistein prisutne u proteinima iz uzorka redukuju fosfomolibdensku i fosfovolframovu kiselinu iz Folin-Ciocalteu fenol reagensa do jedinjenja plave boje. Apsorbanca nastalih plavih jedinjenja se meri na talasnoj dužini od 660 nm i direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku.

Određivanje koncentracije proteina metodom po Markwell-u je izvedeno mešanjem 200 μ l razblaženog uzorka sa 600 μ l reagensa za određivanje proteina. Ovaj

reagens je dobijen mešanjem 100 delova rastvora A (2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.16% natrijum tartarat, 1% SDS) sa 1 delom rastvora B (4% Cu₂SO₄ x 5H₂O) neposredno pre početka testa. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, svakom uzorku je dodato po 60 µl Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog destilovanom vodom u odnosu 1:1 (takođe sveže pripremljen) i inkubacija na sobnoj temperaturi je nastavljena narednih 45 minuta. Intenzitet nastale plave boje je meren na talasnoj dužini od 660 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Titrek Multiscan PLUS MK II 314, Flow). Prilikom svakog određivanja proteina konstruisana je standardna kriva korišćenjem rastvora poznatih koncentracija BSA u opsegu od 0.02 mg/ml do 0.1 mg/ml. Uzorci su razblaživani od 25 do 100 puta da bi njihova apsorbance bila u okviru standardne krive. Standardna kriva je konstruisana nanošenjem poznatih koncentracija standarda na x-osu, i odgovarajućih apsorbanci na y-osu. Interpolacijom sa standardne krive iz nepoznate apsorbance je dobijena koncentracija proteina u uzorku.

Koncentracija totalnih proteina u lizatima ćelija iz kojih je rađena imunoblot analiza je određivana metodom po Bradford-u (Bradford, 1976). Princip ovog testa zasniva se na pomeraju apsorbance boje Coomassie Brilliant Blue G-250 iz crvene u plavu oblast vidljivog spektra nakon vezivanja za proteine u kiseloj sredini. Intenzitet dobijene plave boje je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Test je izvođen mešanjem 980 µl Bradfordovog reagensa (0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (v/v) etanol, 10% (v/v) H₃PO₄ u vodi) sa 20 µl uzorka (1:2 razblaženje proteina). Nakon 10 minuta očitavana je apsorbance na talasnoj dužini od 595 nm i koncentracija proteina u uzorku je izračunavana u odnosu na standardnu krivu. Standardna kriva je dobijena korišćenjem rastvora poznatih koncentracija BSA u opsegu od 5 µg/ml do 30 µg/ml.

3.3.18. Statističke analize

Eksperimenti vezivanja ispitivanih arilpiperazina za hD2 receptor su rađeni u

duplikatu. Vrednosti K_d za ^3H -spiperon i K_i za ispitivane arilpiperazine su određene nelinearnom regresijom u GraphPad Prism softveru (opcija „one site binding“ za eksperimente saturacije i „one site competition“ za eksperimente kompeticije).

Ostali tretmani su urađeni u triplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama ($SV \pm SD$) triplikata kultura reprezentativnog eksperimenta. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednost parametra p manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

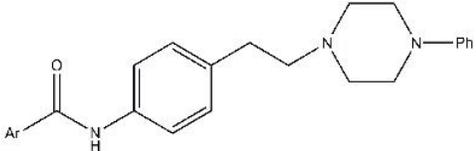
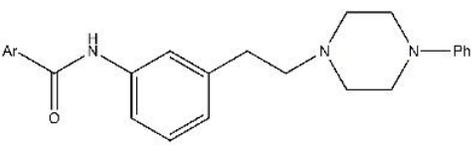
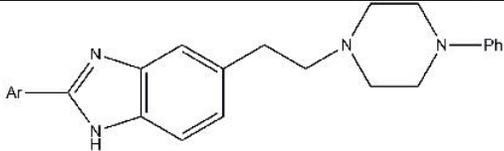
4.1. VEZIVANJE NOVOSINTETISANIH ARILPIPERAZINA ZA hD2 RECEPTORE I UTICAJ NA TOKSIČNOST NATRIJUM NITROPRUSIDA I 6-HIDROKSIDOPAMINA U KULTURI HUMANOG NEUROBLASTOMA

4.1.1. Interakcija arilpiperazina sa humanim dopaminskim D2 receptorima

Arilpiperazine, koji su ispitivani u ovoj studiji, je sintetisala grupa profesora Vukića Šoškića (ProteoSys AG, Majnc, Nemačka) (Tabela 1) (Tovilovic i sar., 2012). Osamnaest jedinjenja je podeljeno u 2 serije – **4-12a** i **4-12b**, koje su se međusobno razlikovale po položaju amido grupe na benzenovom prstenu i radikal (Ar), koji je vezan za ugljenikov atom amido grupe. Kod serije **a** amido grupa se nalazila u *para* položaju, dok je kod serije **b** amido grupa bila u *meta* položaju benzenovog prstena u odnosu na arilpiperazinski ostatak. Supstance **14** i **15** u strukturi su, umesto amido, sadržavale imidazolsku grupu vezanu za benzenov prsten.

Afinitet arilpiperazina za humane dopaminske D2 receptore je određen eksperimentom kompeticije između ispitivanih supstanci i dopaminskog antagoniste spiperona obeleženog radioaktivnim tricijumom, na receptorima izolovanim iz CHO ćelijske linije stabilno transfektovane plazmidom za kratku formu humanog D2 receptora (hD2s). Konstante inhibicije, kao mere afiniteta supstanci za hD2s receptor, su se kretale u rasponu od 15.4 ± 2.3 nM (supstanca **14**) do 722.1 ± 8.2 nM (supstanca **5a**), pri čemu niža K_i vrednost ukazuje na viši afinitet za receptor (Tabela 1).

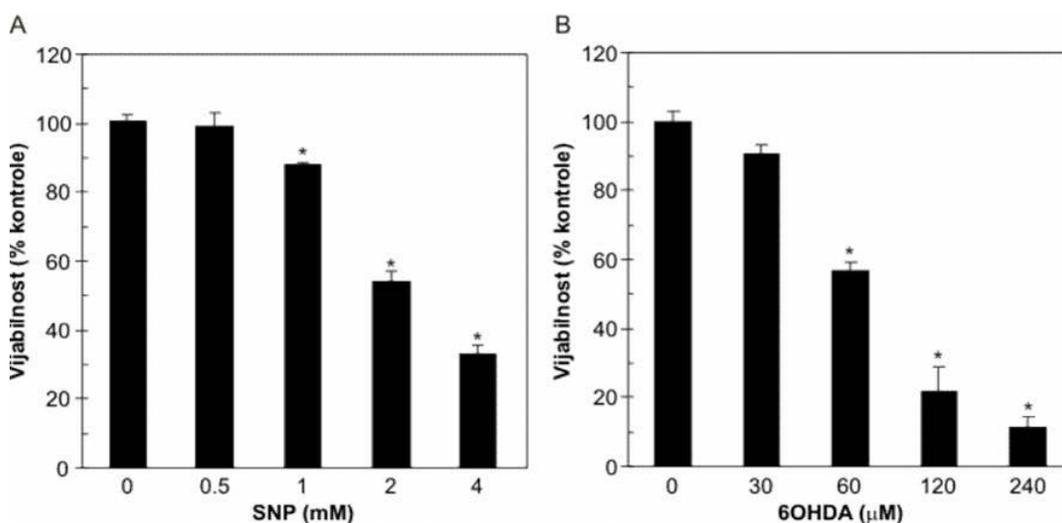
Tabela 1. Strukture i konstante vezivanja ispitivanih arilpiperazina za hD2s receptore.

					
Supstanca	Ar	Ki (nM)	Supstanca	Ar	Ki (nM)
4a		457.4±5.1	4b		151.7±3.4
5a		722.7±8.2	5b		219.7±2.2
6a		183.0±1.9	6b		92.0±2.1
7a		126.6±2.8	7b		119.9±2.5
8a		19.4±1.6	8b		470.8±6.8
9a		55.9±1.8	9b		270.4±5.6
10a		183.1±1.2	10b		171.9±3.3
11a		154.3±6.0	11b		120.1±1.8
12a		19.5±0.9	12b		95.9±3.4
					
Supstanca	Ar	Ki (nM)	Supstanca	Ar	Ki (nM)
14		15.4±2.3	15		36.9±3.9

Konstante inhibicije (Ki) ispitivanih arilpiperazina su prikazane kao SV±SD iz tri nezavisna eksperimenta.

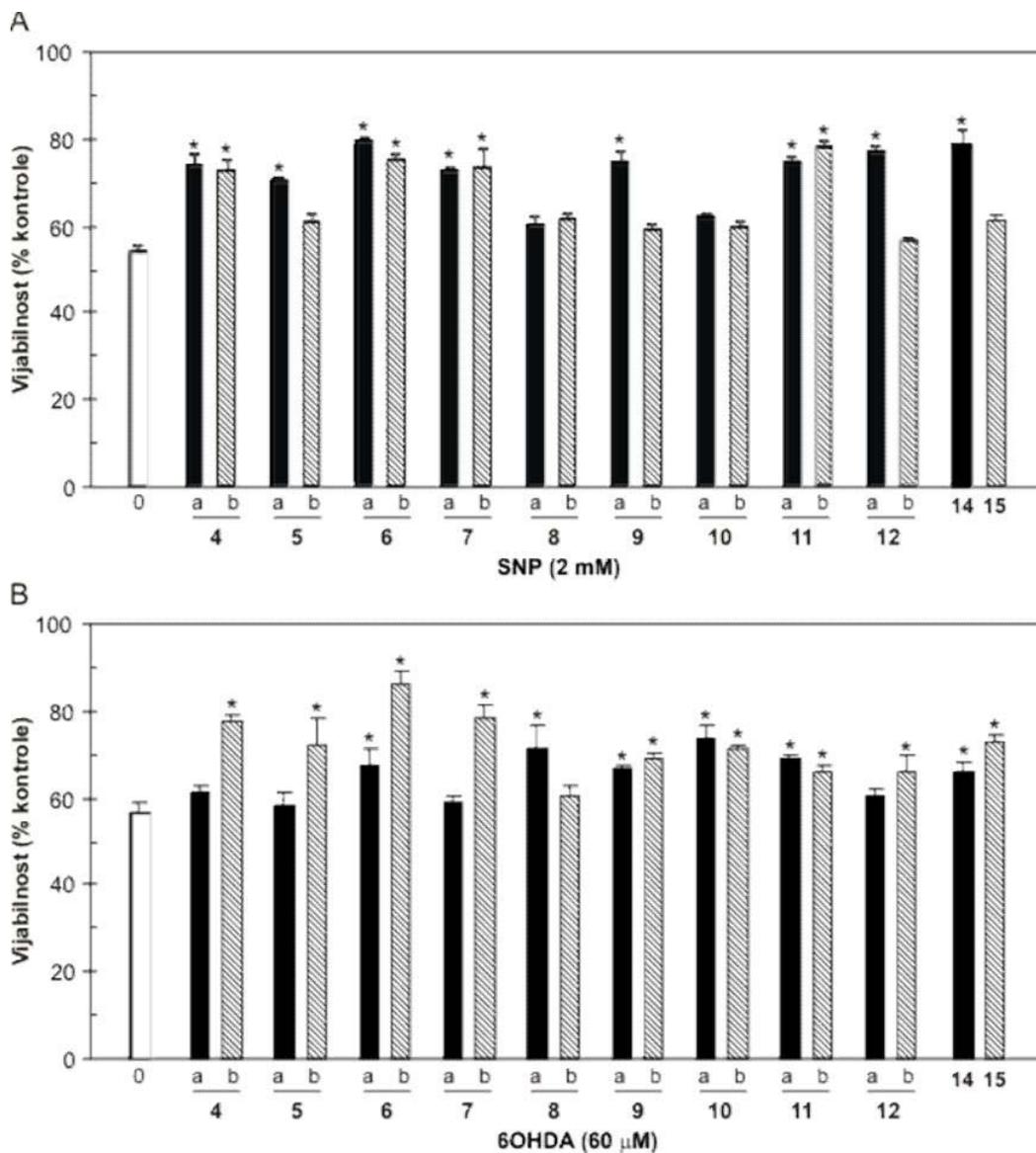
4.1.2. Uticaj arilpiperazina na toksičnost natrijum nitroprusida i 6-hidroksidopamina u kulturi SH-SY5Y humanih neuroblastoma

Potencijalne zaštitne osobine arilpiperazina su ispitivane na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma. Ova linija se često koristi kao model za neuronima slične ćelije, jer poseduje mnoge biohemijske i funkcionalne osobine neurona (Xie i sar., 2010). Da bismo ispitali osetljivost SH-SY5Y ćelija na dejstvo NO i oksidativnog stresa, one su najpre tretirane različitim koncentracijama natrijum nitroprusida, donora NO, i 6-OHDA, dobro opisanog neurotoksina i uzročnika oksidativnog stresa (Slike 1A i 1B). Vijabilnost neuroblastomskih ćelija je merena testom aktivnosti kisele fosfataze nakon tretmana koji je trajao 24 časa. Oba toksina su snižavala vijabilnost ćelija na dozno-zavisan način, a njihove IC₅₀ vrednosti su bile 2.73 mM za SNP i 68.9 μM za 6-OHDA. Za ispitivanje zaštitnog svojstva arilpiperazina korišćene su koncentracije toksina koje su bile bliske IC₅₀ vrednostima (2 mM za SNP i 60 μM za 6-OHDA).



Slika 1. Uticaj natrijum nitroprusida i 6-hidroksidopamina na vijabilnost SH-SY5Y ćelija. SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama SNP-a (0.5-4 mM) (A) i 6-OHDA (30-240 μM) (B) i vijabilnost je određena testom aktivnosti kisele fosfataze nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao SV±SD triplikata kultura iz jednog od 3 eksperimenata. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih ćelija). Rezultati vijabilnosti su prikazani kao % kontrole, pri čemu je za kontrolu uzeta vrednost aktivnosti kisele fosfataze u netretiranim kulturama.

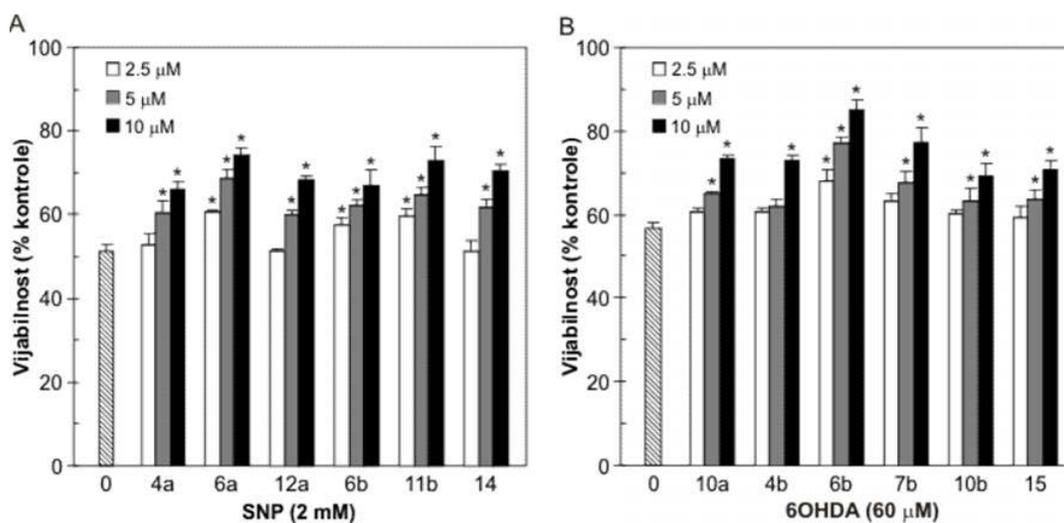
Da bi utvrdili koji od ispitivanih liganada imaju neuroprotektivni potencijal, SH-SY5Y ćelije su tretirane donorom NO, odnosno 6-OHDA-om, nakon polučasovnog pretretmana odgovarajućim arilpiperazinom. 12 ispitivanih jedinjenja je značajno smanjilo toksične efekte SNP-a (Slika 2A), dok je 15 supstanci štitilo kulturu SH-SY5Y humanih neuroblastoma od efekata 6-OHDA (Slika 2B).



Slika 2. Uticaj arilpiperazina na toksičnost natrijum nitroprusida i 6-hidroksidopamina u kulturi SH-SY5Y ćelija. Ćelije su najpre tretirane različitim arilpiperazinima (10 μM), a zatim izložene dejstvu SNP-a (2 mM) (A) ili 6-OHDA (60 μM) (B) naredna 24 časa. Vijabilnost je određena testom aktivnosti

kisele fosfataze. Rezultati su prikazani kao SV±SD triplikata kultura iz jednog od izvedena 3 eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane SNP-om (A, beli stubić) ili 6-OHDA (B, beli stubić)).

Na osnovu dobijenih rezultata (Slike 2A i 2B) izabrano je po 6 najaktivnijih liganada i detaljnije je ispitivan njihov efekat na vijabilnost ćelija tretiranih SNP-om i 6-OHDA-om. Utvrđeno je da sve izabrane supstance spašavaju SH-SY5Y ćelije od SNP-a i 6-OHDA na dozno-zavisian način (Slike 3A i 3B).



Slika 3. Uticaj izabranih arilpiperazina na citotoksičnost izazvanu natrijum nitroprusidom i 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija. Ćelije su tretirane naznačenim arilpiperazinima u različitim koncentracijama (2.5, 5 i 10 μM), a zatim izložene dejstvu stresora (2 mM SNP (A) ili 60 μM 6-OHDA (B)) u toku 24 sata. Vijabilnost ćelija je određena testom aktivnosti kisele fosfataze. Prikazani rezultati su SV±SD triplikata kultura iz jednog od tri izvedena eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane SNP-om (šrafirani stubić, A) ili 6-OHDA-om (šrafirani stubić, B)).

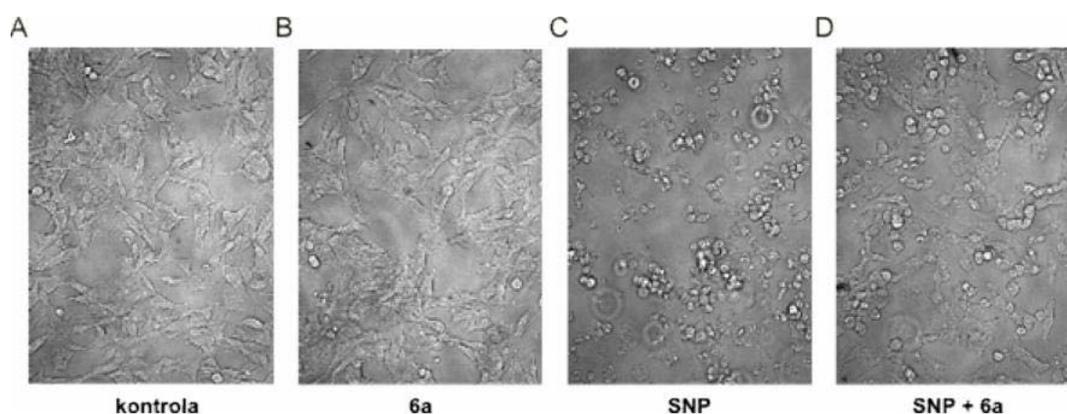
Najjači zaštitni efekat u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om je pokazala supstanca **6a** (N-{4-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid), dok je supstanca **6b** (N-{3-[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil}-pikolinamid) najefikasnije štitila neuroblastome od toksičnosti 6-OHDA. Zato su ova dva arilpiperazina izabrana za dalja ispitivanja.

4.2. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6a U KULTURI HUMANIH NEUROBLASTOMA TRETIRANIH NATRIJUM NITROPRUSIDOM

4.2.1. Uticaj arilpiperazina 6a na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu natrijum nitroprusidom

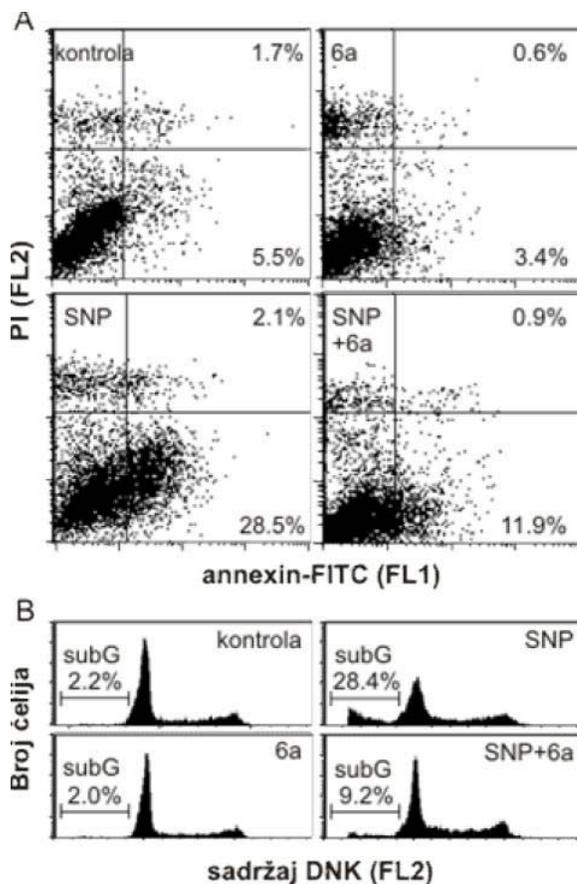
Nakon što je u preliminarnim ispitivanjima izabran arilpiperazinski ligand sa najpotetnijim zaštitnim efektom u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om, pristupili smo detaljnijem ispitivanju mehanizma njegovog zaštitnog delovanja.

U skladu sa rezultatima dobijenim merenjem aktivnosti kisele fosfataze, fazno kontrastnom mikroskopijom je pokazano da arilpiperazin **6a** sprečava nastanak morfoloških promena ćelija izazvanih SNP-om. Netretirane ćelije su rasle grupisane u klustere i posedovale su brojne neurite (Slika 4A). Tretman arilpiperazinom **6a** nije doveo do promene njihove morfologije (Slika 4B), dok je natrijum nitroprusid izazvao promene karakteristične za umiranje ćelija – smanjenje ćelijskog volumena i zaokrugljivanje SH-SY5Y ćelija (Slika 4C). Tretman supstancom **6a** značajno je sprečio ove promene ćelijske morfologije izazvane SNP-om (Slika 4D).



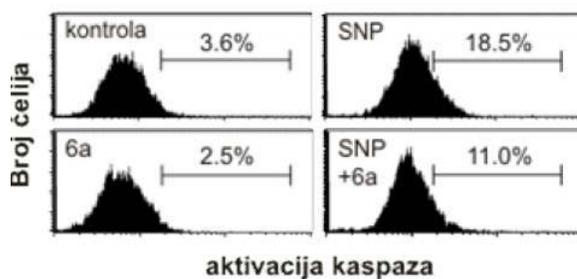
Slika 4. Uticaj arilpiperazina 6a na morfologiju humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y tretirane natrijum nitroprusidom. Kulture neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y su gajene u medijumu (A), prisustvu arilpiperazina **6a** (10 μ M) (B), SNP-a (2 mM) (C) ili u kombinaciji **6a** i SNP-a (D). Ćelije su fotografisane svetlosnim miroskopom (uveličanje 20 puta).

Poznato je da NO, zavisno od koncentracije, dužine tretmana i tipa ćelija na koje deluje može izazvati apoptotične ili nekrotične promene (Brown, 2010), pa smo prvo ispitivali tip ćelijske smrti koji u našim eksperimentalnim uslovima izaziva donor NO. Najpre, u kulturu SH-SY5Y ćelija je nakon kratkog pretretmana sa supstancom **6a** dodat natrijum nitroprusid. Ćelije su nakon 24-očasnog tretmana bojene aneksinom V i propidijum jodidom (PI) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Aneksin V detektuje fosfatidilserinske ostatke sa spoljašnje strane ćelijske membrane, što je pokazatelj rane faze apoptoze (Aneksin⁺/PI⁻ ćelije), dok se PI umeće u DNK ćelija sa oštećenom membranom, koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze i/ili nekroze (Aneksin⁺/PI⁺ ćelije). Tretman kulture neuroblastoma natrijum nitroprusidom je izazvao porast broja ćelija u ranoj fazi apoptoze, dok je supstanca **6a** značajno smanjila povećanje broja Aneksin⁺/PI⁻ ćelija zabeleženo u prisustvu SNP-a (Slika 5A). Sam arilpiperazin **6a** nije značajno uticao na broj SH-SY5Y ćelija u ranoj apoptozi (Slika 5A). Pored toga, bojenje ćelija sa propidijum jodidom i naknadna analiza na protočnom citofluorimetru je potvrdila da donor azot monoksida povećava broj apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G₀/G₁ faza ćelijskog ciklusa), a pretretman supstancom **6a** značajno smanjuje udeo ćelija sa fragmentisanom DNK (Slika 5B). Dakle, arilpiperazin **6a** sprečava apoptozu SH-SY5Y ćelija izazvanu SNP-om.



Slika 5. Uticaj arilpiperazina 6a na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu natrijum nitroprusidom. (A, B) SH-SY5Y ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu arilpiperazina **6a** (10 μ M) i u prisustvu ili odsustvu natrijum nitroprusida (2 mM). Nakon 24 časa ćelije su bojene aneksin V-FITC/PI (A) ili PI (B) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu tačaka koje predstavljaju pojedinačne ćelije (dot plot) (A) ili histograma (B). Prikazani rezultati su iz reprezentativnog, od tri nezavisna eksperimenta.

Dalje, bojenje ćelija sa fluorescentnim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om je pokazalo da SNP izaziva aktivaciju kaspaza, pa je apoptoza koja je zabeležena u našim eksperimentalnim uslovima verovatno kaspazno-zavisna. Pretretman supstancom **6a** je smanjio aktivaciju kaspaza izazvanu SNP-om (Slika 6).

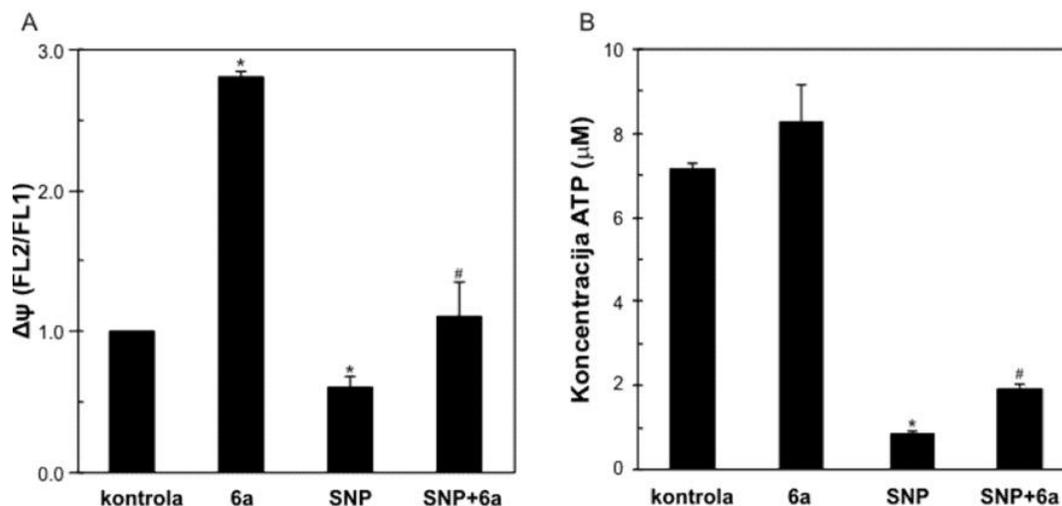


Slika 6. Uticaj arilpiperazina 6a na aktivaciju kaspaza izazvanu natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija. SH-SY5Y ćelije su tretirane supstancom **6a** (10 μ M), a zatim izložene dejstvu SNP-a (2 mM) 24 časa. Nakon bojenja sa ApoStat-om, analizom na protočnom citofluorimetru je određen broj ćelija sa aktivnim kaspazama.

Rezultati iz jednog, od 3 nezavisna eksperimenta, su prikazani u obliku histograma.

4.2.2. Uticaj arilpiperazina **6a** na potencijal mitohondrija i sadržaj adenozin trifosfata u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih natrijum nitroprusidom

S obzirom da aktivaciji kaspaza često prethodi pad potencijala mitohondrija (Ly i sar., 2003), sledeće smo ispitali uticaj donora NO i arilpiperazina **6a** na promene potencijala mitohondrijalne membrane. Ćelije su nakon tretmana bojene fluorescentnom bojom JC-1 koja detektuje promene mitohondrijalnog potencijala, a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Natrijum nitroprusid je izazvao smanjenje potencijala membrane mitohondrija, što se odražavalo padom odnosa crvene i zelene fluorescence boje JC-1 (FL2/FL1) u odnosu na netretirane ćelije (Slika 7A). Sa druge strane, arilpiperazin **6a** je, pored toga što je sprečio smanjenje potencijala izazvano SNP-om i stabilizovao membranu mitohondrija, izazvao i značajno povećanje potencijala mitohondrijalne membrane (porast FL2/FL1 odnosa) (Slika 7A). Sposobnost arilpiperazina **6a** da spreči pad potencijala, i samim tim delimično očuva funkciju mitohondrija u prisustvu SNP-a, potvrđena je i HPLC analizom sadržaja ATP-a u ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom i supstancom **6a**. Donor azot monoksida je izazvao drastično smanjenje koncentracije ATP-a u SH-SY5Y ćelijama, koje je delimično sprečeno arilpiperazinom **6a**. Sam arilpiperazin **6a** je, iako statistički neznačajno, blago povećao koncentraciju ATP-a u ćelijama neuroblastoma (Slika 7B).



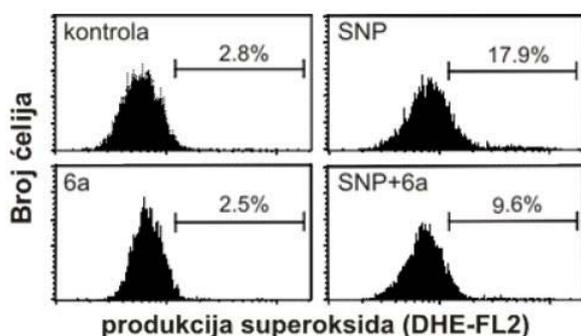
Slika 7. Uticaj arilpiperazina 6a na smanjenje potencijala mitohondrija i promenu sadržaja ATP-a izazvane natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija. (A, B) SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa arilpiperazinom **6a** (10 μM) i u kulturu je dodat SNP (2 mM). Nakon 24 časa ćelije su obojene fluorescentnom bojom JC-1 i promena potencijala mitohondrijalne membrane je analizirana na protočnom citofluorimetru (A), dok je unutarćelijski sadržaj ATP-a određen HPLC analizom (B). Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ iz 3 nezavisna eksperimenta. (* $p < 0.05$ i # $p < 0.05$ označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne, odnosno ćelije tretirane SNP-om).

Dakle, arilpiperazin **6a** sprečava pad potencijala mitohondrija uzrokovan natrijum nitroprusidom i smanjuje sledstvenu aktivaciju kaspaza i apoptozu u kulturi neuronima sličnih ćelija, uz istovremeni delimični oporavak funkcije mitohondrija.

4.2.3. Uticaj arilpiperazina 6a na oksidativni stres izazvan natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija

Azot monoksid i njegovi donori mogu povećati stvaranje RKV u ćeliji inhibicijom transportnog lanca elektrona. Stoga posrednici oštećenja izazvanih azot monoksidom u kulturi različitih neuronskih ćelijskih linija i primarnih neurona, mogu biti ne samo RAV, već i RKV (Bastianetto i sar., 2000; Mahesh i sar., 2012). Da bi utvrdili da li mehanizam zaštitnog dejstva arilpiperazina **6a** uključuje i neutralisanje

RKV i/ili RAV u kulturi neuroblastoma tretiranih SNP-om, praćena je produkcija O_2^- i NO, kao i uticaj liganda na nastanak ovih reaktivnih molekula u ćeliji. Protoćnim citofluorimetrom određivana je koncentracija O_2^- , koji se prevashodno detektuje redoks senzitivnom bojom dihidroetidijumom (DHE), kao i produkcija NO korišćenjem fluorescentne boje diaminofluoresceina (DAF). Pokazano je da je kolićina O_2^- , koji sa NO daje izuzetno toksićan peroksinitrit anjon, bila povišena u ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom. Tretman arilpiperazinom **6a** je donekle snižavao oslobađanje O_2^- izazvano SNP-om (Slika 8).

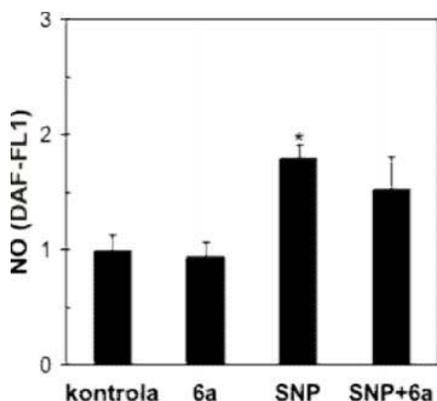


Slika 8. Uticaj arilpiperazina **6a** na stvaranje superoksida izazvano natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija.

Kulture su tretirane najpre arilpiperazinom **6a** (10 μ M), a zatim izložene dejstvu SNP-a (2 mM). Nakon 24 ćasa ćelije su bojene fluorescentnom bojom DHE i broj ćelija sa povećanim sadržajem superoksida je praćen

na protoćnom citofluorimetru. Rezultati su predstavljani u obliku histograma iz jednog reprezentativnog, od 3 nezavisna eksperimenta.

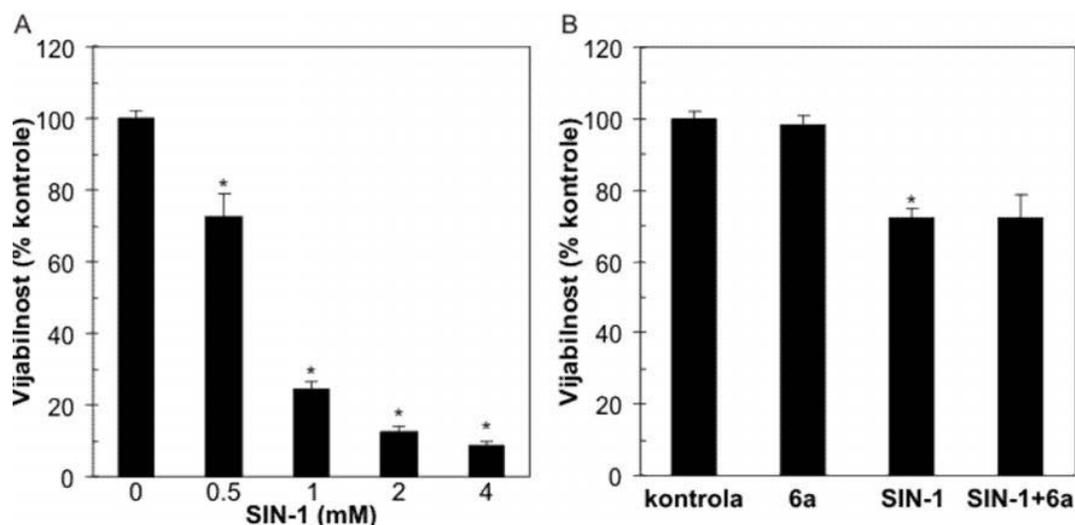
Sa druge strane, arilpiperazin **6a** nije imao znaćajnog uticaja na oslobađanje azot monoksida izazvano SNP-om u kulturi SH-SY5Y neuroblastoma (Slika 9). Ovi rezultati ukazuju na ćinjenicu da, iako smanjuje oksidativni stres u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih natrijum nitroprusidom, efekti arilpiperazina **6a** najverovatnije nisu posledica direktnog vezivanja NO.



Slika 9. Uticaj arilpiperazina 6a na stvaranje NO izazvano natrijum nitroprusidom u kulturi SH-SY5Y ćelija. Kulture su tretirane arilpiperazinom **6a** (10 μ M) i izložene dejstvu SNP-a (2 mM). Nakon 24 časa ćelije su bojene fluorescentnom bojom DAF i količina NO je određena na protočnom citofluorimetru. Rezultati su predstavljeni kao SV \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije).

4.2.4. Uticaj arilpiperazina 6a na toksičnost donora peroksinitrita u kulturi SH-SY5Y ćelija

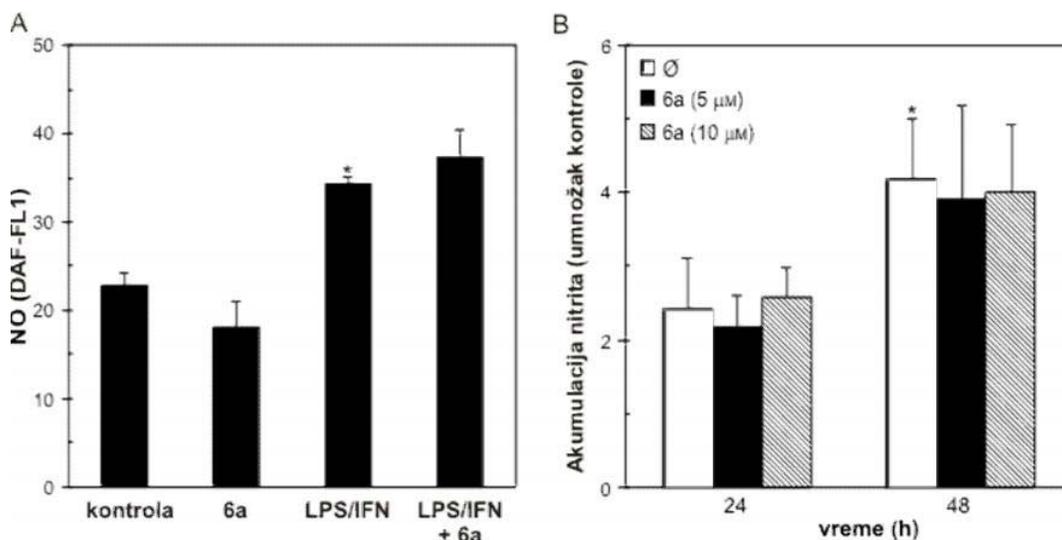
Sledeće smo ispitivali da li arilpiperazin **6a** svoje zaštitno dejstvo ispoljava sprečavanjem toksičnosti peroksinitrita, koji nastaje u reakciji NO i superoksid anjon radikala. Donor peroksinitrita 3-morfolinosidnonimin (SIN-1) je na dozno-zavisan način smanjivao vijabilnost SH-SY5Y ćelija (Slika 10A), dok supstanca **6a** nije uticala na njegov toksični potencijal (Slika 10B). Ovaj rezultat ukazuje da zabeleženo spašavanje SH-SY5Y ćelija od donora NO u kulturi neuroblastoma verovatno ne zavisi od interakcije arilpiperazina **6a** sa peroksinitritom koji može nastati u toku nitrozativnog stresa izazvanog natrijum nitroprusidom. Pored toga, činjenica da arilpiperazin **6a** ne sprečava efekte peroksinitrita u kulturi SH-SY5Y ćelija navodi na pretpostavku da su efekti liganda **6a** usmereni selektivno na zaštitu od azot monoksida.



Slika 10. Uticaj arilpiperazina 6a na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu 3-morfolinosidnoniminom. (A) Kulture SH-SY5Y neuroblastoma su tretirane različitim koncentracijama 3-morfolinosidnonimina (0.5-4 mM) ili (B) tretirane arilpiperazinom **6a** (10 μ M), pa izložene dejstvu SIN-1 (0.5 mM). Nakon 24 časa vijabilnost ćelija je određena testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz reprezentativnog, od 3 urađena eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije).

4.2.5. Efekat arilpiperazina 6a na toksičnost azot monoksida ćelijskog porekla u kulturi SH-SH5Y ćelija

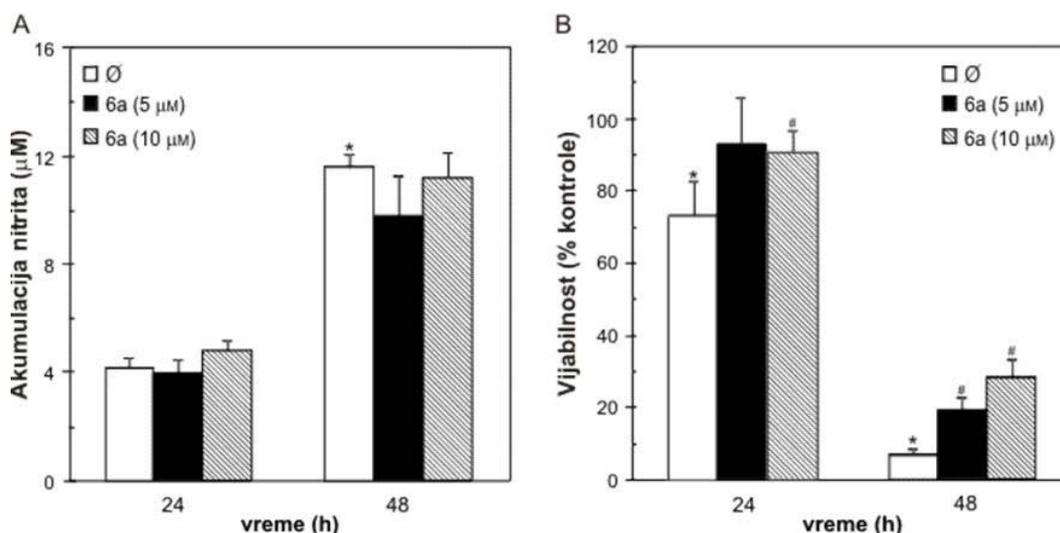
Da bismo utvrdili da li arilpiperazin **6a** utiče i na nivo azot monoksida koji je ćelijskog porekla, pacovski peritonealni makrofagi su stimulisani lipopolisaharidom (LPS) i pacovskim interferonom-gama (IFN- γ) da stvaraju NO u prisustvu ispitivane supstance. Očekivano, u kulturi stimulisanih makrofaga detektovana je povećana koncentracija ćelija obojenih DAF fluorescentnom bojom, ukazujući na povišen nivo unutarćelijskog sadržaja azot monoksida. Međutim, arilpiperazin **6a** nije uticao na produkciju NO od strane stimulisanih makrofaga (Slika 11A). Da arilpiperazin **6a** ne utiče na produkciju NO od strane stimulisanih makrofaga, potvrđeno je i praćenjem akumulacije nitrita, koja je odraz nastanka NO (Slika 11B).



Slika 11. Uticaj arilpiperazina 6a na sintezu NO od strane stimulisanih makrofaga. Pacovski peritonealni makrofagi su stimulisani LPS-om (5 μg/ml) i IFN-γ (10 ng/ml) (A, B) i inkubirani sa arilpiperazinom **6a** u jednoj (10 μM) (A) ili u dve koncentracije (5, 10 μM) (B). Nakon bojenja fluorescentnom bojom DAF, protočnom citofluorimetrijom je merena količina NO u stimulisanim makrofagima posle 24 časa (A), dok je akumulacija nitrita određena Grisovom metodom nakon 24 i 48 h (B). Rezultati su predstavljeni kao SV±SD iz 3 nezavisna eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne nestimulisane makrofage (A) ili makrofage stimulisane na produkciju NO u toku 24 časa (B)).

Poznato je da NO koga u CNS-u u velikim koncentracijama proizvode mikroglijalne ćelije ispoljava citotoksičan efekat u kulturi neurona (Bal-Price i Brown, 2001), pa je sledeće ispitivan potencijalni zaštitni efekat arilpiperazina **6a** na smrt neuroblastoma izazvanu ćelijskim NO *in vitro*. U tom cilju, ćelije humanog neuroblastoma su kokultivisane sa pacovskim peritonealnim makrofagima stimulisanim LPS-om i pacovskim IFN-γ. Istovremeno je praćena produkcija NO od strane stimulisanih makrofaga (Slika 12A) i vijabilnost SH-SY5Y ćelija (Slika 12B), u odsustvu i prisustvu ispitivanog arilpiperazina. U skladu sa prethodnim rezultatima (Slike 11A i 11B), praćenje akumulacije nitrita Grisovom metodom je pokazalo da arilpiperazin **6a** nije smanjio produkciju NO od strane kokultivisanih stimulisanih makrofaga (Slika 12A). Sa druge strane, test aktivnosti kisele fosfataze je pokazao da je NO sintetisan od strane stimulisanih makrofaga značajno smanjio vijabilnost kokultivisanih SH-SY5Y ćelija i nakon 24, i nakon 48 časova (Slika 12B). Supstanca **6a**

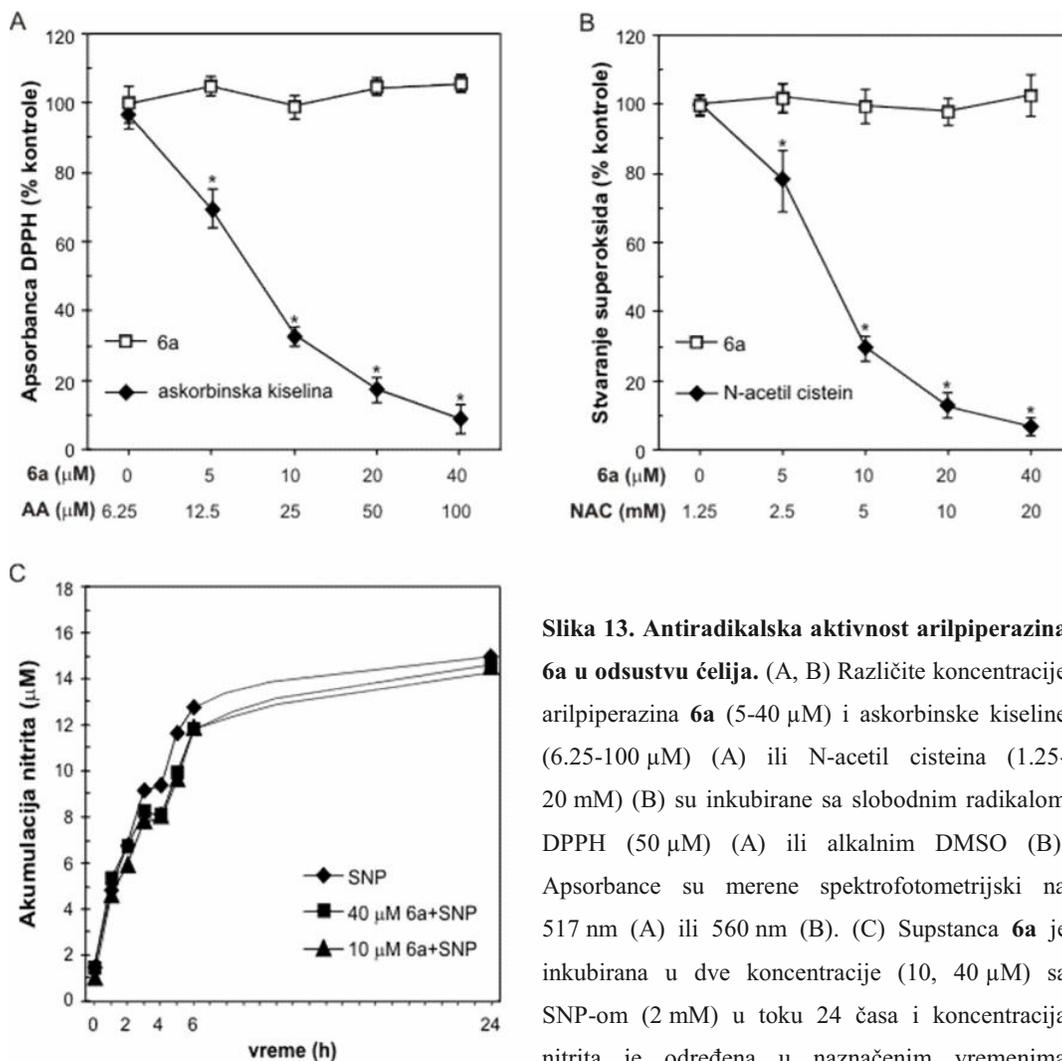
je delimično sprečila citotoksičnost ćelijskog NO u kulturi neuroblastoma (Slika 12B), što ukazuje na činjenicu da efekat ovog arilpiperazina nije ograničen samo na NO hemijskog porekla, već da štiti neuronima slične ćelije i od NO sintetisanog od strane stimulisanih makrofaga. Dakle, arilpiperazin **6a** svoje efekte ispoljava ne sprečavajući produkciju ćelijskog NO, već najverovatnije inhibicijom štetnih događaja koje izaziva NO u kulturi SH-SY5Y ćelija.



Slika 12. Uticaj arilpiperazina 6a na produkciju NO i vijabilnost SH-SY5Y ćelija u kokulturi SH-SY5Y ćelija i peritonealnih makrofaga stimulisanih lipopolisaharidom i interferonom- γ . (A, B) SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma su kokultivisane sa peritonealnim pacovskim makrofagima u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija arilpiperazina **6a** (5, 10 μ M). Pacovski makrofagi su pomoću LPS (5 μ g/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) stimulisani da stvaraju NO. U naznačenim vremenima je određena koncentracija akumuliranih nitrita Grisovom metodom (A) i vijabilnost neuroblastomskih ćelija testom aktivnosti kisele fosfataze (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta. (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na produkciju NO u kokulturama stimulisanim u toku 24 časa u odsustvu supstance **6a** (A) ili u odnosu na vijabilnost kontrolnih SH-SY5Y ćelija, koje su kokultivisane sa nestimulisanim makrofagima, pri čemu je kontroli dodeljena vrednost 100% (B), dok #p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na vijabilnost SH-SY5Y ćelija kultivisanih u prisustvu stimulisanih makrofaga (B)).

4.2.6. Antiradikalske osobine arilpiperazina 6a u sistemu bez ćelija

Prethodni rezultati (Slike 11A, 11B i 12A) su pokazali da protektivni efekti arilpiperazina **6a** najverovatnije nisu posredovani njegovom direktnom reakcijom sa NO. Da bismo detaljnije ispitali antiradikalni kapacitet supstance **6a**, urađen je niz eksperimenata sa ovim arilpiperazinom i dobro poznatim slobodnim radikalima bez prisustva ćelija. Za eksperimente su korišćeni slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Slika 13A), alkalni DMSO, kao izvor superoksid anjon radikala (Slika 13B), i natrijum nitroprusid, kao izvor NO (Slika 13C). DPPH je stabilan radikal sa jednim nesparenim elektronom, koji se koristi za procenu antiradikalnih osobina brojnih supstanci (Sharma i Bhat, 2009). Arilpiperazin **6a** nije pokazao značajnu sposobnost vezivanja sa DPPH, kao ni sa superoksid anjon radikalom. Očekivano, standardni antioksidansi askorbinska kiselina (*engl.* ascorbic acid, AA) i N-acetil cistein (NAC) su na dozno-zavisani način reagovali sa DPPH (IC_{50} (AA) = 21.7 μ M), odnosno superoksidom nastalim od alkalnog DMSO (IC_{50} (NAC) = 4.0 mM) (Slike 13A i 13B). Supstanca **6a** nije značajno smanjila količinu nitrita, kao mere azot monoksida koji stvara natrijum nitroprusid u odsustvu ćelija (Slika 13C), što je u skladu sa rezultatima dobijenim sa NO koga sintetišu ćelije (Slike 11B i 12A).



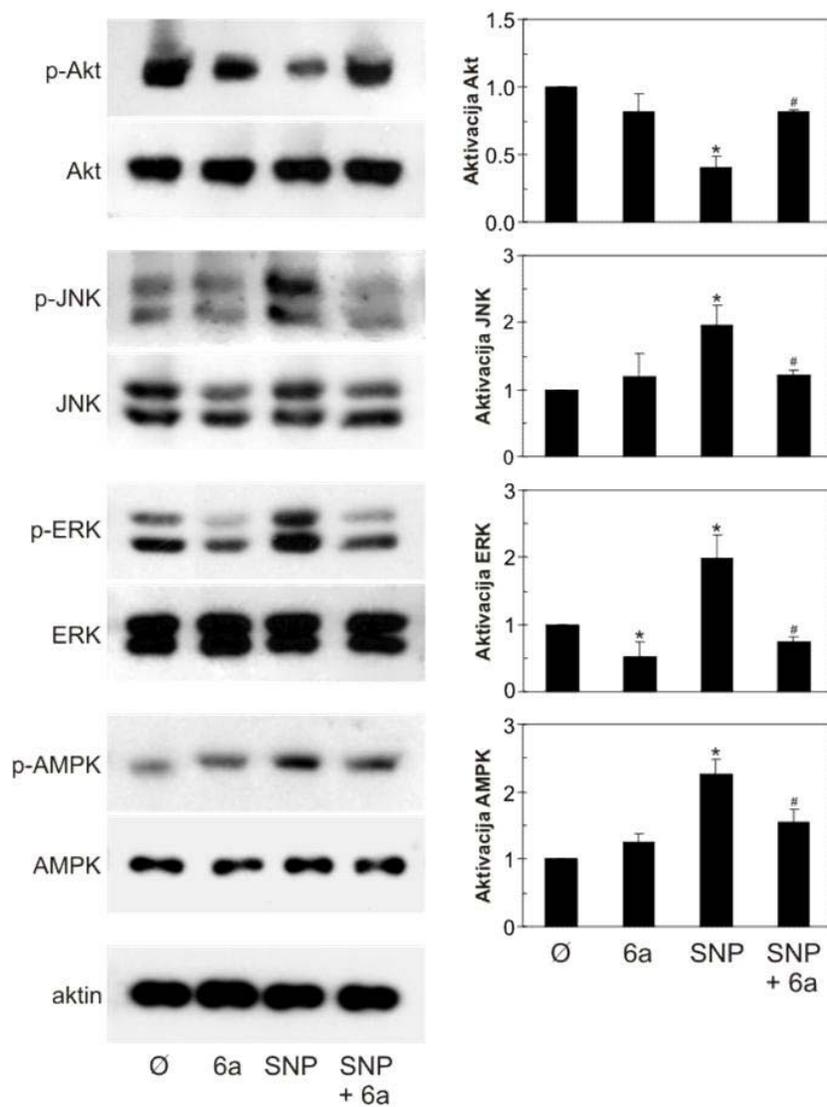
Slika 13. Antiradikalaska aktivnost arilpiperazina 6a u odsustvu ćelija. (A, B) Različite koncentracije arilpiperazina **6a** (5-40 μM) i askorbinske kiseline (6.25-100 μM) (A) ili N-acetil cisteina (1.25-20 mM) (B) su inkubirane sa slobodnim radikalom DPPH (50 μM) (A) ili alkalnim DMSO (B). Apsorbance su merene spektrofotometrijski na 517 nm (A) ili 560 nm (B). (C) Supstanca **6a** je inkubirana u dve koncentracije (10, 40 μM) sa SNP-om (2 mM) u toku 24 časa i koncentracija nitrita je određena u naznačenim vremenima

Grisovom metodom. Rezultati su prikazani kao SV±SD triplikata iz reprezentativnog od 3 nezavisna eksperimenta (A, B) ili kao SV iz dva nezavisna eksperimenta (C). (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da, pored toga što efekti supstance **6a** nisu posledica vezivanja NO, ni smanjenje unutarćelijskog sadržaja superoksid anjon radikala nije posledica direktnog vezivanja O₂⁻ od strane arilpiperazina **6a**.

4.2.7. Uticaj arilpiperazina **6a** na signalne puteve povezane sa apoptozom u SH-SY5Y ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom

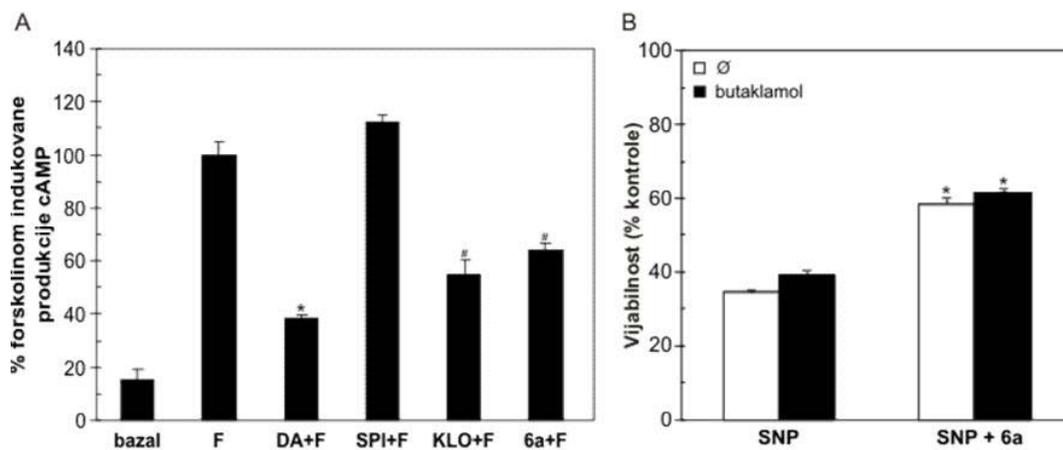
Oksidativni stres, uključujući i onaj izazvan NO-om, aktivira brojne unutarćelijske signalne puteve, koji na različite načine regulišu ćelijsku smrt. Zato smo sledeće ispitali uticaj arilpiperazina **6a** na aktivnost antiapoptotskog Akt signalnog puta (Virdee i sar., 1999), kao i na aktivnost proapoptotskih JNK, ERK i AMPK puteva u ćelijama tretiranim SNP-om (Li i sar., 2004; Ishikawa i sar., 2000; McCullough i sar., 2005). Imunoblot analiza fosforilacije (aktivacije) ovih enzima je pokazala da je tretman natrijum nitroprusidom u toku 8 h inhibirao Akt, a aktivirao JNK, ERK i AMPK signalne puteve u SH-SY5Y ćelijama (Slika 14). Pretretman neuroblastoma arilpiperazinom **6a** je sprečio promene u aktivnosti ovih signalnih molekula izazvane natrijum nitroprusidom i vratio na normalne nivoe aktivnost Akt, a smanjio aktivaciju JNK, ERK i AMPK proteina u SH-SY5Y ćelijama (Slika 14). Dakle, efekat arilpiperazina **6a** je posledica normalizacije aktivnosti Akt, JNK, ERK i AMPK signalnih puteva poremećenih SNP-om.



Slika 14. Uticaj arilpiperazina 6a na aktivnost signalnih puteva uključenih u regulaciju smrti SH-SY5Y ćelija tretiranih natrijum nitroprusidom. SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom 6a (10 μ M), a zatim u narednih 8 časova izložene dejstvu natrijum nitroprusida (2 mM). Fosforilisane i totalne forme Akt, JNK, ERK, AMPK proteina, kao i aktina su određene imunoblot analizom, a aktivnost ovih signalnih puteva je izražena kao odnos fosfo/total forme proteina, nakon kvantifikacije traka u ImageJ softveru. (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok # $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

4.2.8. Unutrašnja aktivnost arilpiperazina 6a na humanim dopaminskim D2 receptorima i uticaj blokade dopaminskih receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6a u SH-SY5Y ćelijama tretiranim natrijum nitroprusidom

Supstanca **6a** je ispoljila umereni afinitet prema hD2s receptorima (Tabela 1, $K_i = 183 \text{ nM}$). Da bismo ispitali da li je zabeležen neuroprotektivni efekat posledica vezivanja za dopaminske D2 receptore, najpre je određeno kakva je unutrašnja aktivnost arilpiperazina **6a** na ovim receptorima. Pod unutrašnjom aktivnošću podrazumeva se sposobnost neke supstance da nakon vezivanja potpuno aktivira (puni agonista), delimično aktivira (parcijalni agonista) ili blokira (antagonista) receptor. Merenje koncentracije cAMP u CHO ćelijama koje eksprimiraju humani D2s receptor je pokazalo da je u našem sistemu, prema očekivanju, puni agonista D2 receptora dopamin (DA) skoro potpuno inhibirao povećanje koncentracije cAMP-a izazvano aktivatorom adenilat ciklaze forskolinom (Slika 15A). Takođe, kao što je očekivano, parcijalni agonista D2 receptora klozapin (KLO) je delimično smanjivao, a blokator D2 receptora spiperon (SPI) nije uticao na stvaranje cAMP-a aktivirano forskolinom. Supstanca **6a** se ponašala slično kao klozapin, tj. kao parcijalni agonista ovih receptora (Slika 15A). Pošto je pokazano da arilpiperazin **6a** parcijalno aktivira D2 receptore nakon vezivanja za njih, sledeće smo ispitali da li je zaštitno dejstvo u stresu izazvanom SNP-om barem delimično posredovano aktivacijom D2 receptora. U tom cilju D2 receptori su blokirani (+)-butaklamolom, visokoafinitetnim ligandom za D1 i D2 receptore, a zatim su ćelije preinkubirane sa arilpiperazinom **6a** i izložene delovanju natrijum nitroprusida. Blokada dopaminskih receptora (+)-butaklamolom nije uticala ni na smanjenje vijabilnosti SH-SY5Y ćelija izazvano SNP-om, niti na neuroprotektivni efekat arilpiperazina **6a** (Slika 15B), ukazujući da uočena zaštita od citotoksičnosti izazvane azot monoksidom najverovatnije ne zavisi od vezivanja arilpiperazina za dopaminske receptore.



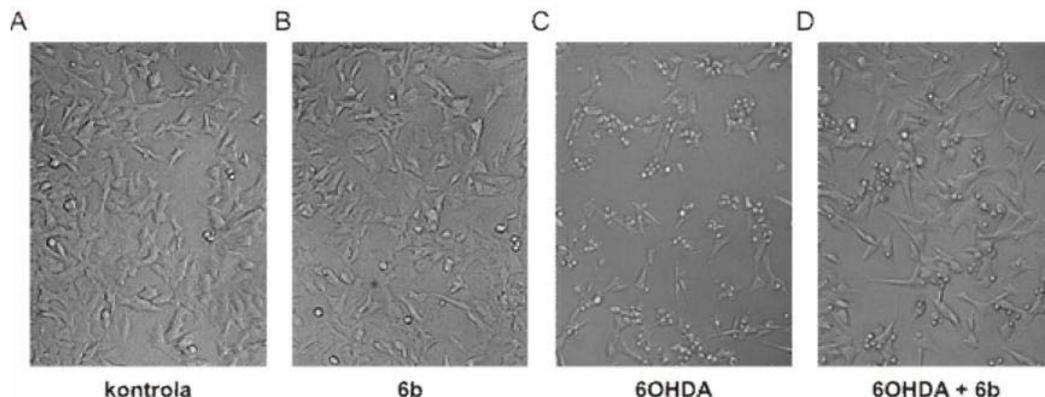
Slika 15. Ispitivanje unutrašnje aktivnosti arilpiperazina 6a na humanom D2s receptoru i uticaj blokade dopaminskih receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6a u kulturi SH-SY5Y ćelija koje su tretirane natrijum nitroprusidom. (A) CHO ćelije koje eksprimiraju hD2s receptor su inkubirane sa inhibitorom adenilat ciklaze forskolinom (10 μ M) u prisustvu dopamina (DA, 10 μ M), spiperona (SPI, 10 μ M), klozapina (KLO, 10 μ M) ili arilpiperazina **6a** (10 μ M). Nakon 10 minuta ćelije su lizirane, a iz supernatanta je određena koncentracija cAMP-a. (B) SH-SY5Y ćelije su najpre pretretirane (+)butaklamolom (10 μ M), a zatim izložene dejstvu supstance **6a** (10 μ M) i SNP-a (2 mM). Nakon 24 časa vijabilnost je određena testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata kultura iz jednog od dva izvedena eksperimenta. (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na koncentraciju cAMP u forskolinom stimulisanim kulturama (A) ili u odnosu na ćelije tretirane SNP-om (B), dok [#] $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane dopaminom (A)).

4.3. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA **6b** U KULTURI HUMANIH NEUROBLASTOMA TRETIRANIH 6-HIDROKSIDOPAMINOM

4.3.1. Uticaj arilpiperazina **6b** na smrt SH-SY5Y ćelija izazvanu 6-hidroksidopaminom

Nakon što su ispitani mehanizmi arilpiperazinske zaštite SH-SY5Y ćelija od toksičnog dejstva natrijum nitroprusida, detaljnije je proučen i mehanizam protektivnog uticaja arilpiperazina **6b** na citotoksičnost 6-hidroksidopamina u kulturi ćelija humanog neuroblastoma.

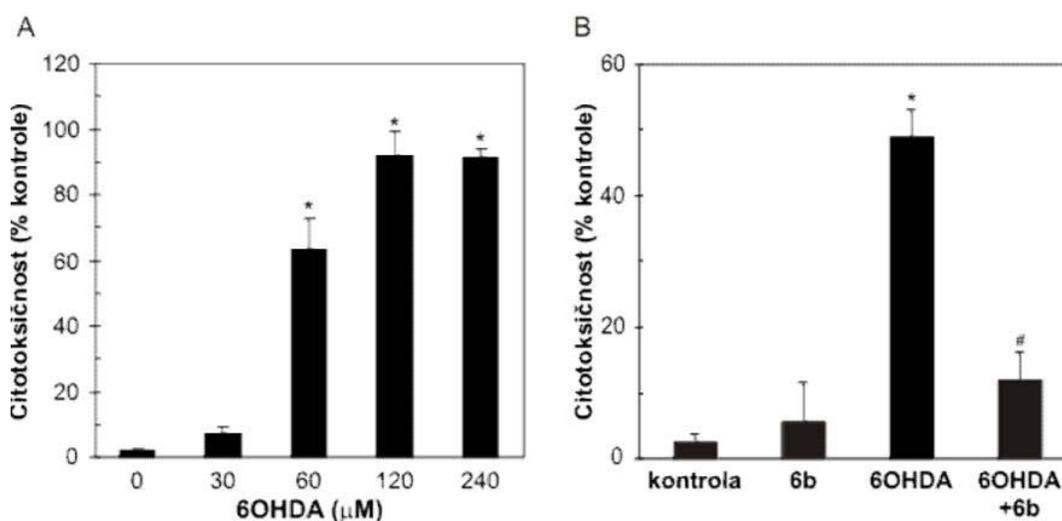
Fazno kontrastnom mikroskopijom je pokazano da arilpiperazin **6b** spašava ćelije humanog neuroblastoma od toksičnog efekta 6-OHDA (Slika 16). Kontrolne ćelije su rasle grupisane u klastere sa mnogobrojnim kratkim nastavcima (Slika 16A) i arilpiperazin **6b** nije značajno uticao na morfologiju SH-SY5Y ćelija (Slika 16B). Tretman sa 6-OHDA je izazvao smanjenje ćelijskog volumena i zaokrugljivanje ćelija (Slika 16C), dok je supstanca **6b** značajno sprečila promene morfologije izazvane 6-OHDA-om (Slika 16D).



Slika 16. Uticaj arilpiperazina **6b** na morfologiju humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y tretirane 6-hidroksidopaminom. Kulture neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y su gajene u

medijumu (A), prisustvu arilpiperazina **6b** (10 μ M) (B), 6-OHDA (60 μ M) (C) ili u kombinaciji **6b** i 6-OHDA (D). Čelije su fotografisane svetlosnim mikroskopom (uveličanje 20 puta).

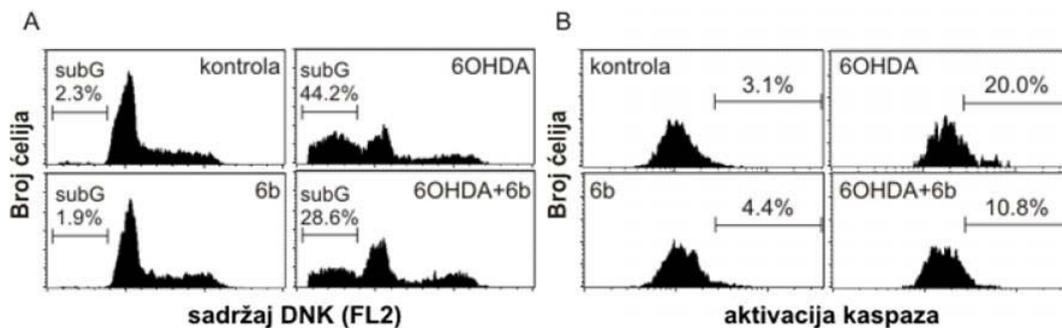
U skladu sa ranije prikazanim spašavanjem ćelija koje je zabeleženo testom aktivnosti kisele fosfataze (Slike 2B i 3B) i fazno kontrastnom mikroskopijom (Slika 16), bili su i rezultati testa aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH). 6-hidroksidopamin je na dozno zavisnan način smanjivao vijabilnost SH-SY5Y ćelije, što se odražavalo gubitkom integriteta membrane neuroblastoma i izlaskom LDH u supernatant kultura neuroblastoma (Slika 17A). Arilpiperazin **6b** je skoro u potpunosti sprečavao povećanje aktivnosti enzima LDH u medijumu, koje je izazivao 6-OHDA (Slika 17B).



Slika 17. Uticaj arilpiperazina **6b na citotoksičnost 6-hidroksidopamina u kulturi SH-SY5Y ćelija.** (A) Kulture SH-SY5Y ćelija su inkubirane u prisustvu različitih koncentracija 6-OHDA (30-240 μ M) ili (B) tretirane supstancom **6b** (10 μ M) i izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M). Nakon 24 časa određena je aktivnost LDH u supernatantu kultura. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ iz tri nezavisna eksperimenta. (* $p < 0.05$ i # $p < 0.05$ označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne i ćelije tretirane 6-OHDA-om, redom).

S obzirom da tip ćelijske smrti koju izaziva 6-OHDA zavisi od dužine izlaganja ćelija toksinu, kao i njegove koncentracije i tipa ćelija (Woodgate i sar., 1999), prvo smo ispitivali koji tip ćelijske smrti izazvane 6-OHDA-om u kulturi humanog neuroblastoma arilpiperazin **6b** sprečava. U tom cilju, ćelije su bojene propidijum

jodidom i analizirane na protočnom citofluorimetru. 6-OHDA je značajno povećao broj apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G₀/G₁ faza ćelijskog ciklusa). Sa druge strane, supstanca **6b** je delimično sprečila fragmentaciju DNK izazvanu 6-OHDA-om (Slika 18A). Takođe, obeležavanje ćelija pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om i analiza aktivnosti kaspaza na protočnom citofluorimetru je potvrdila antiapoptotsko delovanje arilpiperazina **6b**, jer je ta supstanca značajno smanjila aktivaciju kaspaza u ćelijama tretiranim 6-OHDA-om (Slika 18B).

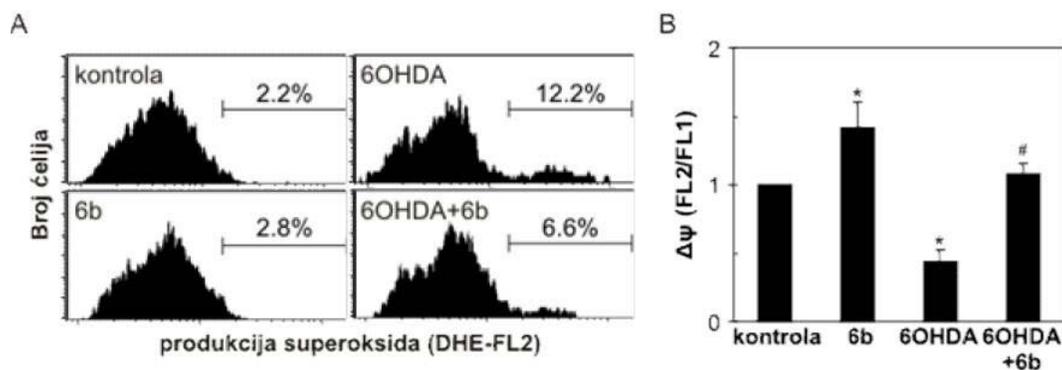


Slika 18. Uticaj arilpiperazina 6b na sadržaj DNK i aktivnost kaspaza u prisustvu 6-hidroksidopamina u kulturi SH-SY5Y ćelija. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 µM), a zatim su izložene dejstvu 6-OHDA (60 µM). Nakon 24 časa ćelije su bojene propidijum jodidom (A) ili ApoStat-om (B) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma iz reprezentativnog, od 3 izvedena eksperimenta.

4.3.2. Uticaj arilpiperazina **6b** na potencijal mitohondrija i oksidativni stres u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom

Nakon što je utvrđeno da arilpiperazin **6b** delimično sprečava apoptozu posredovanu kaspazama koju izaziva 6-OHDA, praćena je uloga oksidativnog stresa i mitohondrija u ovim procesima. Bojenje kultura fluoroforom DHE i analiza na protočnom citofluorimetru nakon 24-očasovnog tretmana je pokazala da 6-OHDA povećava koncentraciju O₂⁻ u tretiranim ćelijama (Slika 19A). Pretretman supstancom **6b** je smanjio povećanje unutarćelijskog O₂⁻ izazvano 6-OHDA-om (Slika 19A).

Takođe, bojenje ćelija bojom JC-1, koja reaguje na promene potencijala membrane mitohondrija, je pokazalo da 6-OHDA izaziva pad potencijala mitohondrija, a da supstanca **6b** potpuno sprečava smanjenje potencijala izazvano 6-OHDA-om (Slika 19B). Istovremeno je zabeleženo povećanje potencijala mitohondrijalne membrane u ćelijama tretiranim samo arilpiperazinom **6b** u odnosu na kontrolu (Slika 19B).

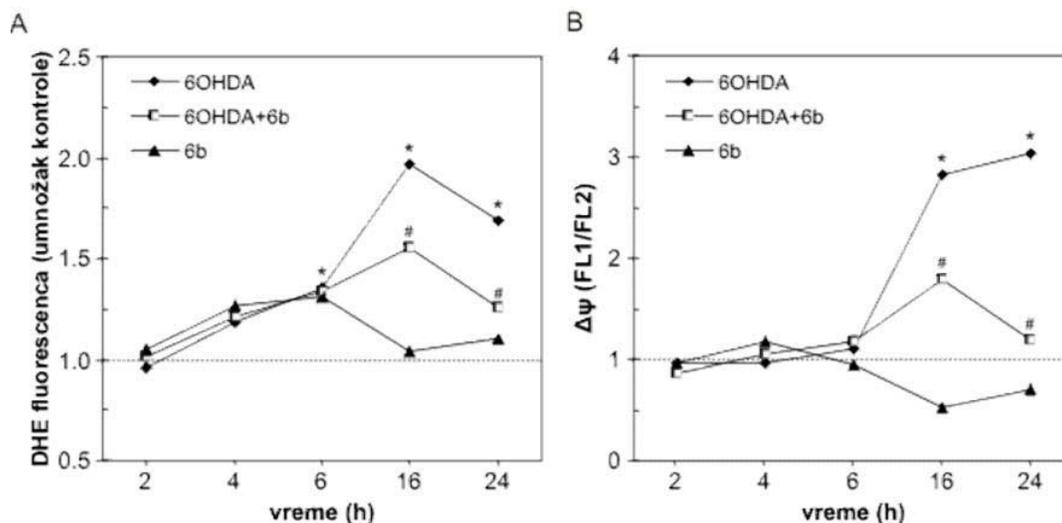


Slika 19. Uticaj arilpiperazina 6b na stvaranje superoksid anjon radikala i smanjenje potencijala mitohondrija u kulturi humanih SH-SY5Y neuroblastoma tretiranih 6-hidroksidopaminom. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 μ M) i izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M). Nakon 24 časa ćelije su bojene fluorescentnim bojama DHE (A) ili JC-1 (B) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma iz reprezentativnog od 3 urađena eksperimenta (A) ili kao $SV \pm SD$ iz tri eksperimenta (B). (* $p < 0.05$ i # $p < 0.05$ označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne, odnosno ćelije tretirane 6-OHDA-om).

4.3.3. Uticaj arilpiperazina 6b na kinetiku nastanka superoksid anjon radikala i smanjenje potencijala mitohondrija u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom

Kako superoksidni anjon može nastati u toku unutarćelijskog metabolizma 6-OHDA, ali i iz oštećenih mitohondrija, sledeće smo ispitivali poreklo zabeleženog O_2^- praćenjem njegove produkcije i potencijala mitohondrija u vremenu, kao i uticaj arilpiperazina **6b** na te procese. Cilj ovih eksperimenata je bio da se utvrdi da li povećanje unutarćelijske koncentracije superoksida izazvano 6-OHDA-om prethodi

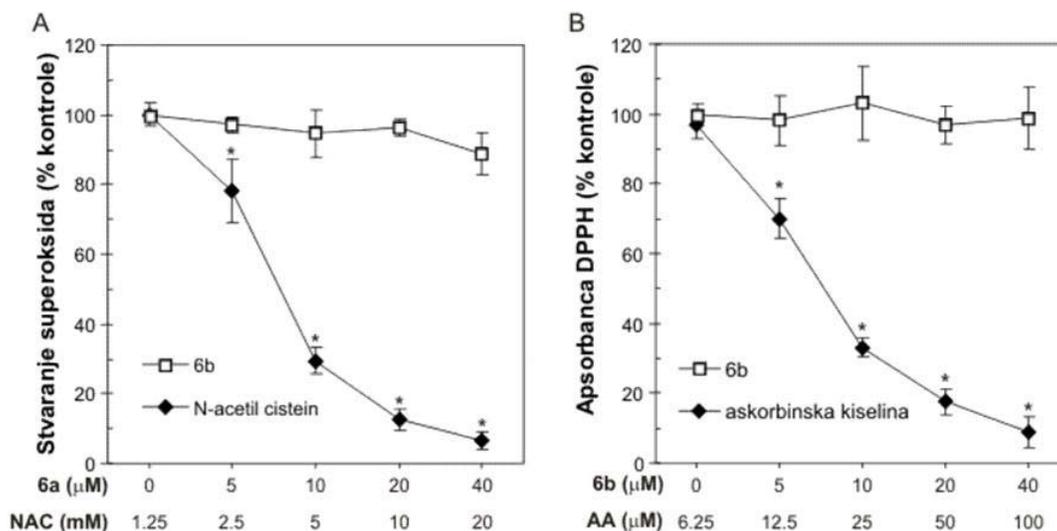
padu potencijala mitohondrija (tj. da li ga izaziva) ili nastaje kao posledica oštećenja mitohondrija, kao i na kom nivou arilpiperazin **6b** štiti od nastalog $O_2^{\cdot-}$. Smanjenje koncentracije $O_2^{\cdot-}$ bi moglo biti posledica direktne reakcije arilpiperazina **6b** sa superoksidom nastalim od 6-OHDA ili stabilizacije membrane mitohondrija. Rezultati ukazuju da 6-OHDA izaziva oslobađanje $O_2^{\cdot-}$ (Slika 20A), a za njim sledi pad potencijala mitohondrija (Slika 20B), što znači da oksidativni stres izazvan 6-OHDA-om verovatno oštećuje membranu mitohondrija. Međutim, čini se da supstanca **6b** ne smanjuje koncentraciju $O_2^{\cdot-}$ pre smanjenja potencijala mitohondrija, već da istovremeno sa stabilizacijom mitohondrija redukuje i koncentraciju superoksida nakon 16 h (Slike 20A i 20B), što sugeriše da smanjuje oksidativni stres stabilizacijom mitohondrija. Prema tome, 6-OHDA produkcijom superoksida oštećuje mitohondrije koje onda dodatno proizvode superoksid, a smanjenje superoksida od strane ispitivanog arilpiperazina je verovatno posledica stabilizacije mitohondrija, a ne direktne reakcije sa $O_2^{\cdot-}$.



Slika 20. Uticaj arilpiperazina 6b na kinetiku nastanka superoksid anjon radikala i pad potencijala mitohondrija u kulturi humanih SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 μ M) i izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M). U naznačenim vremenima ćelije su bojene fluorescentnim bojama DHE (A) ili JC-1 (B) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao SV iz jednog od 3 izvedena eksperimenta, pri čemu je kontroli dodeljena jedinična vrednost (isprekidana linija na graficima). (* $p < 0.05$ i # $p < 0.05$ označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne, odnosno ćelije tretirane 6-OHDA-om u odgovarajućem terminu).

4.3.4. Antiradikalske osobine arilpiperazina 6b u sistemu bez ćelija

Interakcija arilpiperazina **6b** i $O_2^{\cdot-}$ praćena je i u sistemu bez ćelija kako bi se proverila sposobnost arilpiperazina da direktno reaguje sa superoksid anjon radikalom. Kao izvor $O_2^{\cdot-}$ korišćen je alkalni DMSO, a kao standardni antioksidans N-acetil cistein (NAC). NAC je na dozno-zavisano način reagovao sa superoksidom (IC_{50} (NAC) = 4.0 mM), dok supstanca **6b** nije uticala na koncentraciju $O_2^{\cdot-}$ nastalog od alkalnog DMSO (Slika 21A). „Slabe“ direktne antiradikalske osobine arilpiperazina **6b** potvrđene su i u eksperimentu sa stabilnim slobodnim radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH), koji se koristi za procenu antiradikalnih osobina različitih supstanci (Sharma i Bhat, 2009). Naime, dok je askorbinska kiselina (AA), kao standardni antioksidans, dozno-zavisno reagovala sa DPPH (IC_{50} (AA) = 21.7 μ M), supstanca **6b** nije pokazala sposobnost neutralizacije ovog radikala (Slika 21B). Ovi eksperimenti su potvrdili da protektivni efekti arilpiperazina **6b** najverovatnije nisu posledica direktnih interakcija sa superoksid anjon radikalom koji nastaje kao posledica autooksidacije, unutarćelijskog metabolizma 6-OHDA ili iz oštećenih mitohondrija.

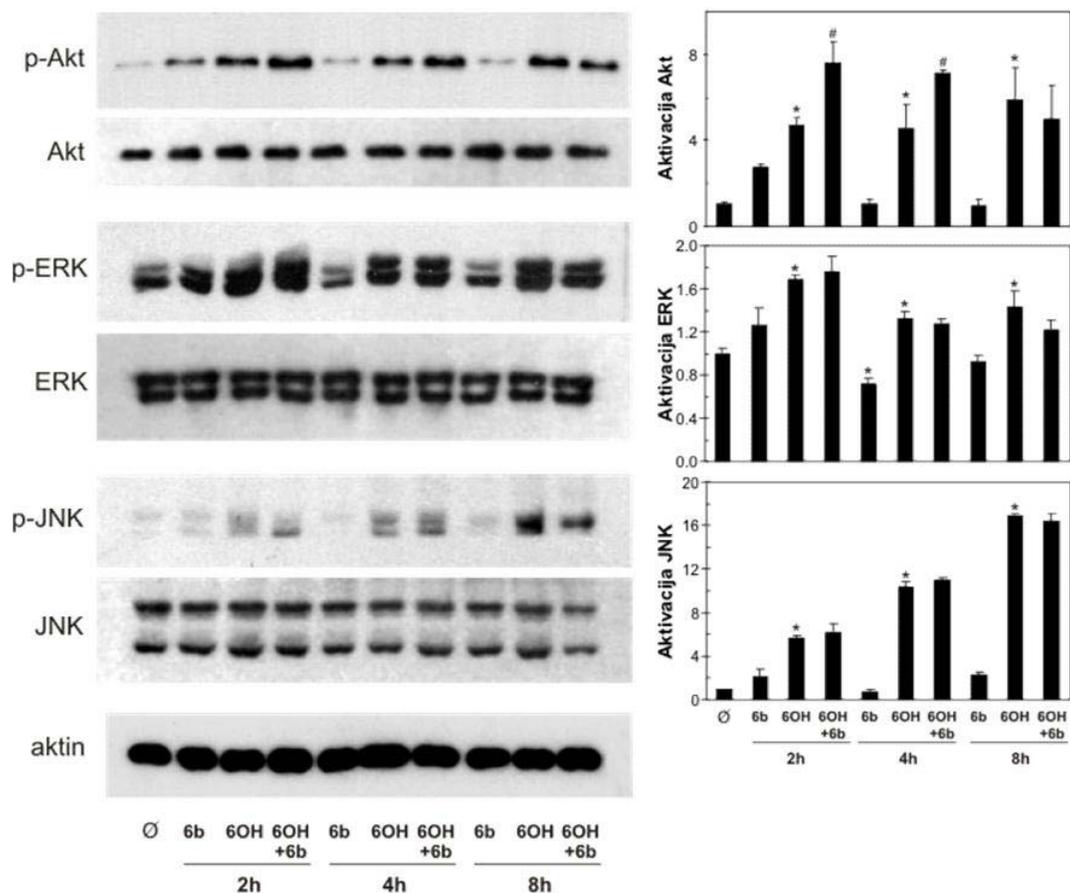


Slika 21. Antiradikalna aktivnost arilpiperazina **6b** u odsustvu ćelija. (A, B) Različite koncentracije arilpiperazina **6b** (5-40 μ M) ili standardnog antioksidansa N-acetil cisteina (1.25-20 mM) (A) i

askorbinske kiseline (6.25-100 μ M) (B) su inkubirane sa alkalnim DMSO (A) ili slobodnim radikalom DPPH (50 μ M) (B). ApSORBANCE su merene spektrofotometrijski na 560 nm (A) ili 517 nm (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz jednog, reprezentativnog, od 3 nezavisna eksperimenta. (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

4.3.5. Modulacija signalnih puteva uključenih u apoptozu SH-SY5Y ćelija izazvanu 6-hidroksidopaminom

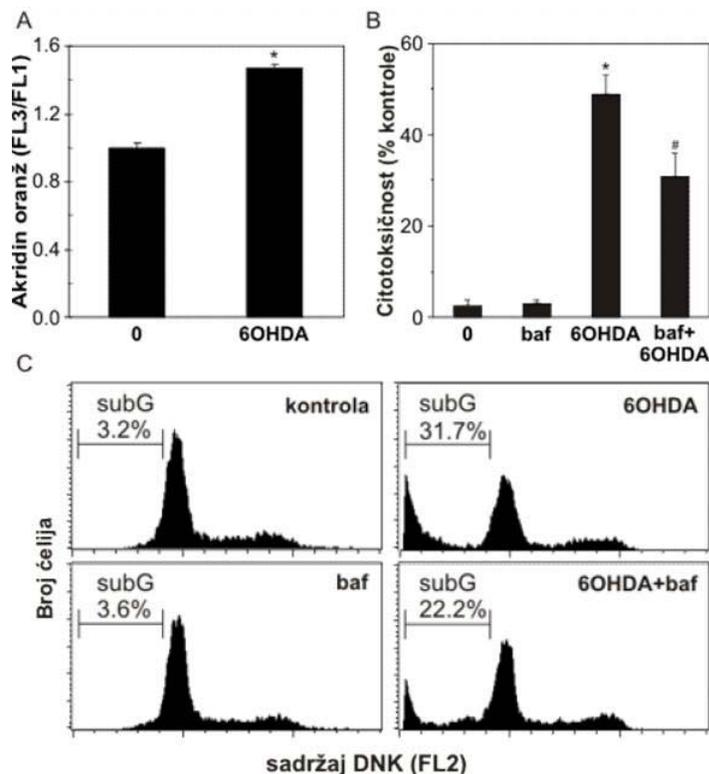
S obzirom da su rezultati prethodno prikazanih eksperimenata isključili ulogu direktne interakcije arilpiperazina **6b** i superoksid anjon radikala u zaštitnom dejstvu arilpiperazina, sledeće smo ispitali sposobnost supstance **6b** da moduliše signalne puteve Akt, ERK i JNK u kulturi neuroblastoma tretiranih 6-OHDA-om. Cilj ovih eksperimenata je bio da se utvrdi da li je zaštita SH-SY5Y ćelija od 6-OHDA posredovana uticajem arilpiperazina **6b** na signalne puteve povezane sa apoptozom. 6-OHDA je aktivirao Akt, ERK i JNK signalne puteve (Slika 22). Supstanca **6b** je izazvala prolaznu aktivaciju Akt-a i sama i u kombinaciji sa 6-OHDA (Slika 22). Prolazno povećanje aktivnosti Akt proteina u kombinaciji sa 6-OHDA je detektovano na 2 i 4 satu, dok se u kasnijem terminu gubi. Sa druge strane, supstanca **6b** nije značajno uticala na aktivaciju ERK i JNK proteina izazvanu 6-OHDA-om. Zaštitni efekat arilpiperazina **6b** je verovatno delimično posredovan aktivacijom preživljavajućeg Akt signalnog puta i ne zavisi od modulacije aktivnosti ERK-a i JNK-a.



Slika 22. Uticaj arilpiperazina **6b** na aktivnost signalnih puteva uključenih u regulaciju smrti **SH-SY5Y** ćelija izazvanu **6-hidroksidopaminom**. **SH-SY5Y** ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 μ M) i zatim je u kulturu dodat **6-OHDA** (60 μ M). Nakon 2, 4 i 8 h ćelije su lizirane, a fosforilisane i totalne forme Akt, JNK, ERK proteina, kao i aktina su određene imunoblot analizom. Aktivnost ovih signalnih puteva je izražena kao odnos fosfo/total formi proteina, nakon kvantifikacije traka u ImageJ softveru. (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok # $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane **6-OHDA**-om).

4.3.6. Uticaj arilpiperazina **6b** na autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija

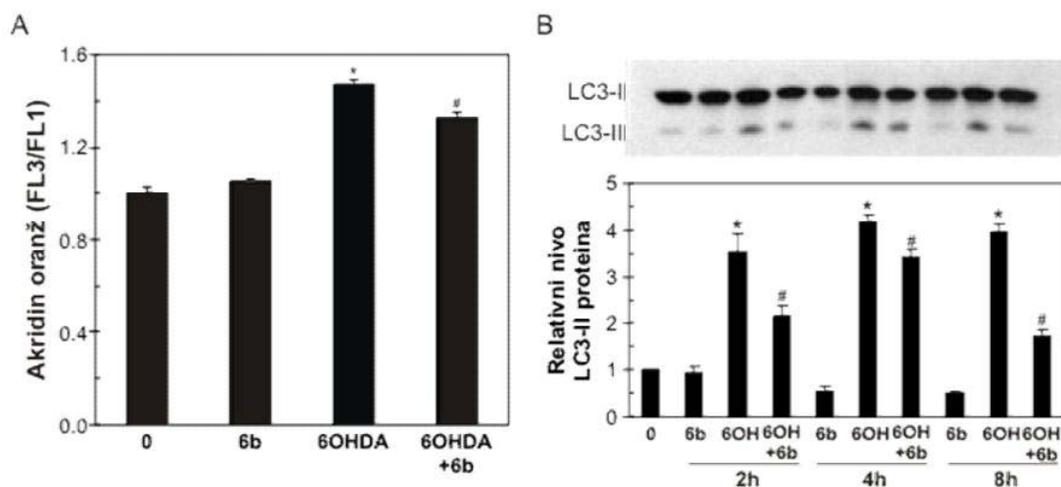
Sve veći broj istraživanja ukazuje na značajnu ulogu autofagije u procesu umiranja neurona tokom neurodegeneracije (Wong i Cuervo, 2010). Da bi ispitali potencijalnu ulogu autofagije u našem sistemu, ćelije smo obeležavali akridin oranžom, supravitalnom fluorescentnom bojom koja prelazi iz zelene u crveno-narandžastu u kiselim vezikulama u ćeliji, kakve su autofagolizozomi, i analizirali na protočnom citofluorimetru. Pokazano je da 6-OHDA u kulturi SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija izaziva autofagiju (Slika 23A). Autofagiju i apoptozu mogu aktivirati zajednički stimuli, što rezultira istovremenim prisustvom promena karakterističnih za oba tipa ćelijske smrti u ćeliji (Maiuri i sar., 2007). Kao što je već naglašeno, autofagija može predstavljati citoprotektivni ili citotoksični mehanizam koji toksini pokreću u ćeliji (Maiuri i sar., 2007). Da bismo utvrdili da li je u našim eksperimentalnim uslovima autofagija mehanizam ćelijske smrti ili doprinosi preživljavanju SH-SY5Y ćelija, citotoksičnost 6-OHDA je procenjena u prisustvu i odsustvu inhibitora zakišeljavanja lizozoma bafilomicina A1 (Slika 23B). Merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze u supernatantu tretiranih ćelija je pokazano da inhibicija autofagije sprečava oštećenja ćelijske membrane izazvana 6-OHDA-om (Slika 23B), što ukazuje na to da autofagija doprinosi smrti SH-SY5Y ćelija u našim eksperimentalnim uslovima. Ova pretpostavka je potvrđena i bojenjem ćelija sa propidijum jodidom i analizom na protočnom citofluorimetru. Naime, bafilomicin A1 je značajno smanjio povećanje broja apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G₀/G₁ faza ćelijskog ciklusa) izazvano 6-OHDA-om (Slika 23C), što sugerise da sprečavanjem autofagije i arilpiperazin **6b** inhibira apoptozu izazvanu 6-OHDA-om.



Slika 23. Uloga autofagije u smrti SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija izazvanoj 6-hidroksidopaminom. (A) SH-SY5Y kulture su tretirane 6-OHDA-om (60 μ M). Nakon 24 časa ćelije su bojene akridin oranžom i analizirane na protočnom citofluorimetru. (B, C) Neuroblastomske ćelije su najpre pretretirane bafilomicinom A1 (1 nM) 30 minuta, a zatim izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M). Nakon 24 časa merena je aktivnost laktat dehidrogenaze u supernatantima kultura (B), a broj apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK je određen bojenjem kultura sa propidijum jodidom i analizom na protočnom citofluorimetru (C). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz reprezentativnog, od tri nezavisna eksperimenta (A, B) ili u obliku reprezentativnih histograma iz jednog od tri izvedena eksperimenta (C). (* $p < 0.05$ i # $p < 0.05$ označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne, odnosno ćelije tretirane 6-OHDA-om).

Sledeće smo ispitivali da li je zaštitno dejstvo arilpiperazina **6b** posredovano inhibicijom autofagije izazvane 6-OHDA-om. Uticaj arilpiperazina **6b** na autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom je ispitivan bojenjem SH-SY5Y ćelija akridin oranžom i analizom na protočnom citofluorimetru (Slika 24A), kao i praćenjem konverzije markera autofagije LC3 proteina iz LC3-I u LC3-II formu imunoblotom (Slika 24B). LC3-II forma proteina je neophodna za formiranje autofagozoma, pa je široko korišćen

marker autofagije. Pojava ove forme LC3 proteina na blotu koreliše sa pojavom autofagije i smatra se da je količina LC3-II forme u ćelijama pokazatelj intenziteta autofagije. Arilpiperazin **6b** je inhibirao autofagiju izazvanu 6-OHDA-om (Slika 24A) i sprečavao rane faze formiranja autofagozoma (Slika 24B). Ovo ukazuje da arilpiperazin **6b** pored toga što delimično sprečava apoptozu (Slika 18), najverovatnije i dodatnom inhibicijom štetne autofagije ispoljava zaštitne efekte u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-OHDA-om.

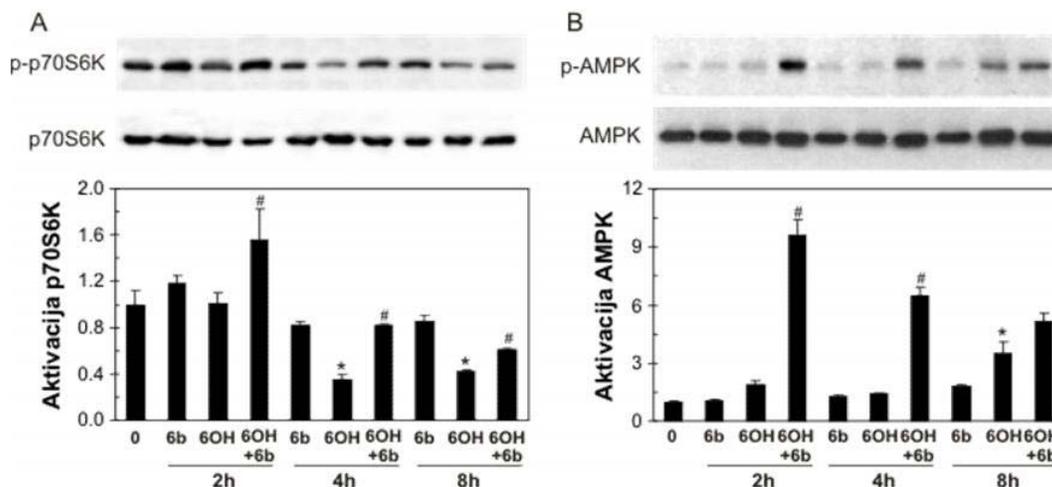


Slika 24. Uticaj arilpiperazina 6b na autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 μ M) i zatim izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M). (A) Nakon 24 časa, ćelije su bojene akridin oranžom i analizirane na protočnom citofluorimetru. (B) Za imunoblot analizu LC3 proteina ćelije su lizirane nakon 2-, 4- i 8-časovnog tretmana 6-OHDA-om. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz dva urađena eksperimenta (A), a relativni nivo LC3-II proteina je određen kvantifikacijom traka u ImageJ softveru (B, donji panel). (*p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok #p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane 6-OHDA-om u odgovarajućem terminu).

4.3.7. Uticaj arilpiperazina **6b** na signalne puteve koji modulišu autofagiju izazvanu 6-hidroksidopaminom u kulturi SH-SY5Y ćelija

Da bismo odredili koji signalni putevi su odgovorni za inhibiciju autofagije pod dejstvom arilpiperazina **6b**, imunoblotom je praćena aktivnost proteina zaduženih za regulaciju procesa autofagije – mTOR-a (inhibitor autofagije) i AMPK (inhibitor mTOR-a i aktivator autofagije) – u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih sa 6-OHDA, u prisustvu i odsustvu arilpiperazina **6b**. Aktivnost mTOR-a procenjena posredno, određivanjem nivoa fosforilisane i totalne forme mTOR supstrata – p70S6K proteina (Slika 25A), dok je funkcija AMPK proteina je praćena direktno, određivanjem nivoa fosforilisane (aktivne) i totalne forme proteina (Slika 25B). 6-hidroksidopamin je smanjivao fosforilaciju p70S6K, što znači da je smanjivao aktivnost mTOR-a i povećavao autofagiju, dok je supstanca **6b** u kombinaciji sa 6-OHDA sprećavala to smanjenje (Slika 25A). Prema tome, 6-OHDA je inhibirao aktivnost mTOR-a indukujući autofagiju, dok je arilpiperazin **6b** vraćao aktivnost mTOR-a na normalu i tako smanjivao autofagiju izazvanu 6-OHDA-om. Sa druge strane, aktivnost AMPK se značajno povećavala tek 8 h nakon tretmana sa 6-OHDA. Arilpiperazin **6b** nije smanjivao aktivaciju AMPK izazvanu 6-OHDA-om, naprotiv, nakon kraćih tretmana zapaženo je povećanje aktivnosti ovog signalnog molekula u kulturi neuroblastoma tretiranih kombinacijom ispitivanog arilpiperazina i 6-OHDA-om (Slika 25B). Ovi rezultati ukazuju na to da je inhibicija autofagije supstancom **6b** nezavisna od aktivnosti AMPK.

Dakle, efekat arilpiperazina **6b** ne zavisi od AMPK, već je najverovatnije posredovan AMPK-nezavisnom modulacijom mTOR proteina.

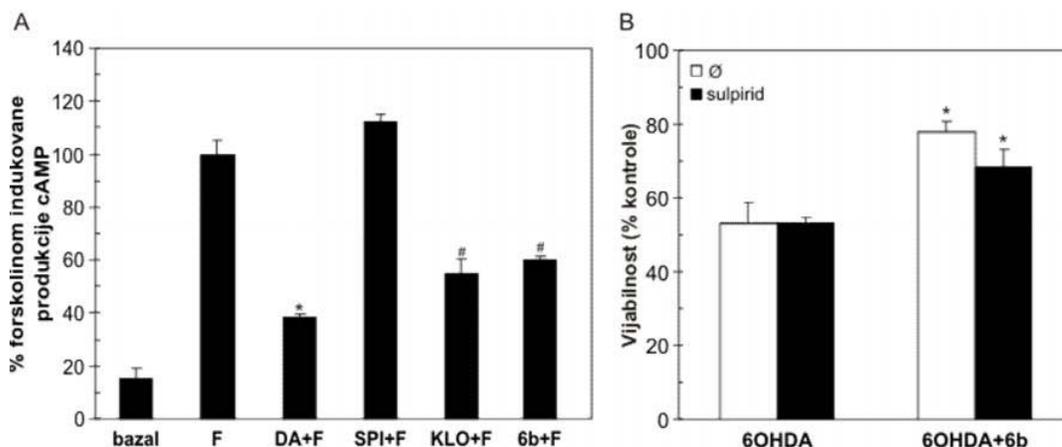


Slika 25. Uticaj arilpiperazina 6b na aktivnost AMPK i p70S6K proteina u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-hidroksidopaminom. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane arilpiperazinom **6b** (10 μ M) i zatim izložene dejstvu 6-OHDA (60 μ M) u toku 2, 4 i 8 časova. Fosforilisane i totalne forme AMPK i p70S6K proteina su određene imunoblot analizom, a njihova aktivnost je izražena kao odnos fosfo/total formi proteina, nakon kvantifikacije traka u ImageJ softveru (A, B, donji paneli). (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok [#] $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane 6-OHDA-om u odgovarajućem terminu).

4.3.8. Unutrašnja aktivnost arilpiperazina 6b na humanim dopaminskim D2 receptorima i uticaj blokade dopaminskih receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6b u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-hidroksidopaminom

Da bismo ustanovili da li je zabeleženi neuroprotektivni efekat posledica vezivanja arilpiperazina **6b** za dopaminske D2 receptore, najpre smo ispitali unutrašnju aktivnost supstance **6b** na ovim receptorima. Eksperiment je izveden kao što je prethodno već opisano (Odeljak 4.2.8., slika 15A) i rezultati su pokazali da se u našem sistemu arilpiperazin **6b**, kao i **6a**, ponaša kao parcijalni agonista D2 receptora (Slika 26A). Dalje je ispitivano da li specifični blokator D2 receptora sulpirid utiče na zaštitni efekat ispitivanog arilpiperazina u stresu izazvanom 6-OHDA-om. Iako je sulpirid delimično blokirao zaštitni potencijal arilpiperazina **6b**, ne postoji statistička značajnost zabeleženog fenomena (Slika 26B). Dakle, efekti arilpiperazina **6b** u kulturi SH-SY5Y

ćelija tretiranih 6-OHDA-om, najverovatnije ne zavise od njegovog vezivanja za D2 receptor.



Slika 26. Ispitivanje unutrašnje aktivnosti arilpiperazina 6b na humanom D2s receptoru i uticaj blokade dopaminskih D2 receptora na neuroprotektivni efekat arilpiperazina 6b u kulturi SH-SY5Y ćelija koje su tretirane 6-hidroksidopaminom. (A) CHO ćelije koje ekspimiraju hD2s receptor su inkubirane sa inhibitorom adenilat ciklaze forskolinom (10 μ M) u prisustvu ili odsustvu dopamina (DA, 10 μ M), spiperona (SPI, 10 μ M), klozapina (KLO, 10 μ M) ili arilpiperazina **6b** (10 μ M). Nakon 10 minuta ćelije su lizirane, a iz supernatanta je određena koncentracija cAMP-a. (B) SH-SY5Y ćelije su najpre pretretirane sulpiridom (5 μ M), a zatim izložene dejstvu supstance **6b** (10 μ M) i 6-OHDA (60 μ M). Nakon 24 časa vijabilnost je određena testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata kultura iz jednog od dva izvedena eksperimenta. (* $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na koncentraciju cAMP u kulturama stimulisanim forskolinom (A) ili u odnosu na ćelije tretirane 6-OHDA-om (B), dok # $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane dopaminom (A)).

5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji je ispitivana sposobnost 20 novosintetisanih arilpiperazina da štite SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma od citotoksičnog delovanja dopaminergičnog toksina 6-OHDA i azot monoksida poreklom od NO donora SNP ili stimulisanih pacovskih makrofaga. Pokazano je da čak 15 ispitivanih jedinjenja štiti od toksičnosti 6-OHDA, pri čemu je najizraženiji efekat pokazao arilpiperazin **6b**, dok je 12 arilpiperazina sprečilo toksično delovanje SNP-a, a najizraženiji protektivni efekat ispoljio je ligand **6a**. Mehanizam zaštitnog delovanja pomenutih arilpiperazina podrazumevao je inhibiciju pada potencijala mitohondrija, oksidativnog stresa, aktivacije kaspaza i sledstvene apoptoze izazvane SNP-om, odnosno 6-OHDA. Supstanca **6a** sprečavala je SNP-om stimulisanu aktivaciju proapoptotskih signalnih molekula AMPK i MAP kinaza ERK i JNK i inhibiciju antiapoptotske Akt kinaze, sugerišući da ovi molekuli igraju bitnu ulogu u zaštitnom delovanju arilpiperazina. Sa druge strane arilpiperazin **6b** nije imao uticaja na aktivaciju ERK i JNK izazvanu 6-OHDA-om, dok je dodatno stimulisao Akt, pa bi ova protektivna kinaza mogla učestvovati u zaštitnom efektu arilpiperazina **6b**. Osim što je sprečavao apoptozu, ligand **6b** je inhibirao i citotoksičnu autofagiju stimulisanu 6-OHDA-om. Sposobnost supstance **6b** da inhibira autofagiju verovatno je posledica njegovog stimulatornog efekta na represore autofagije Akt i mTOR u neuroblastomskim ćelijama tretiranim 6-hidroksidopaminom. Oba arilpiperazina su pokazala parcijalnu agonističku aktivnost na hD2 receptorima, ali njihov efekat u stresu izazvanom SNP-om i 6-OHDA-om najverovatnije nije posledica vezivanja za dopaminske receptore.

Arilpiperazini ispitivani u ovoj studiji su sintetisani u okviru projekta čiji je zadatak bio sinteza novih atipičnih antipsihotika. Nakon što su u standardnim testovima korišćenim radi njihove karakterizacije pokazali citoprotektivan potencijal, dalje je ispitivan njihov efekat na ćelijsku vijabilnost u stresu izazvanom azot monoksidom i 6-OHDA. Azot monoksid i RKV su poznati posrednici neurodegenerativnih oštećenja (Floyd, 1999; Andersen, 2004), naročito u CNS-u koji je zahvaćen inflamacijom. Mikroglialne ćelije aktivirane inflamatornim stimulusima stvaraju značajne količine NO i RKV (Bal-Price i Brown, 2001; Bian i sar., 2008), koji različitim mehanizmima

oštećuju neurone. S obzirom da je neuroinflamacija rani patološki događaj u neurodegeneraciji (Boje, 2004), jasna je potreba za sprečavanjem njenih posledica. Međutim, još uvek ne postoje dovoljno efikasni tretmani koji bi umanjili štetne efekte potencijalno neurotoksičnih molekula koji se stvaraju u toku patoloških stanja i starenja u CNS-u. Arilpiperazinski ligandi predstavljaju pogodne kandidate za detaljnija ispitivanja na polju neuroprotekcije, s obzirom da povećavaju neuroprotektivne kapacitete neuroblastomskih ćelija u kulturi (Park i sar., 2009) i pokazuju sposobnost da spašavaju kortikalne neurone pacova od ekscitatorne aminokiseline glutamata (Koprivica i sar., 2011).

Zaštitni efekat novosintetisanih arilpiperazina ispitivan je u kulturi humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y, koja se rutinski koristi za proučavanje neuroprotektivnih osobina potencijalnih lekova (Xie i sar., 2010). Ove, neuronima slične ćelije su subklonirane iz SK-N-SH neuroblastomske linije, lako se kultivišu, eksprimiraju brojne neuronske markere (tirozin-hidroksilaza, dopamin- β -hidroksilaza, dopaminski transporter i dopaminski D2 receptori) karakteristične za dopaminske neurone (Xie i sar., 2010; Ciccarone i sar., 1989; Deslauriers i sar., 2011), ali i neurofilamentne proteine, opioidne, muskarinske i receptore za faktore rasta nerava (Ciccarone i sar., 1989).

5.1. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA 6a U KULTURI SH-SY5Y ĆELIJA TRETIRANIH DONOROM AZOT MONOKSIDA

Kao donor NO u našoj studiji je korišćen natrijum nitroprusid, koji je na dozno-zavisan način u kulturi smanjivao vijabilnost SH-SY5Y ćelija. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije sprovedenim ispitivanjima toksičnosti SNP-a na neuronskim ćelijskim linijama, koja su pokazala da on smanjuje vijabilnost neuronima sličnih PC12 ćelija pacovskog feohromocitoma (Pytlowany i sar., 2008) i SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma (Lim i sar., 2009). Iako su koncentracije toksina korišćene u navedenim studijama bile znatno niže (0.2 mM i 0.5 mM) od koncentracije SNP-a u ovoj studiji (2 mM), treba imati u vidu da to može biti posledica razlike u osetljivosti metoda za procenu toksičnosti SNP-a koje su korišćene u navedenim (MTT) i u ovoj studiji (test aktivnosti kisele fosfataze). U prilog ovoj teoriji idu i slične IC₅₀ vrednosti za SNP

(1.5 mM i 2 mM) na SH-SY5Y ćelijama prijavljene u studijama drugih autora u kojima je vijabilnost merena drugim metodama (kristal violet test i bojenje ćelija tripan plavim) (Feng i sar., 2002) ili MTT testom (Zhang i Zhao, 2003), što govori da toksičnost SNP-a može jako varirati u zavisnosti od eksperimentalnih uslova. Ovakva pretpostavka je logična kada se uzme u obzir činjenica da se SNP van i unutar ćelije raspada na nekoliko toksičnih komponenti čiji doprinos ukupnom štetnom efektu nije jednostavno razgraničiti (Terwel i sar., 2000). Cardaci i saradnici (Cardaci i sar., 2008) sugerišu da pored NO, toksičnosti SNP-a u kulturi neuroblastomskih ćelija doprinose Fe^{2+} i navedene RKV koje nastaju njegovim raspadom i metabolizmom. Iako se ne može isključiti mogućnost da metaboliti SNP-a, pored NO, izazivaju oštećenja SH-SY5Y ćelija u našim eksperimentalnim uslovima, sposobnost arilpiperazina **6a** da štiti od NO potvrđuje činjenica da smanjuje toksičnost azot monoksida poreklom od stimulisanih makrofaga.

Naša studija je potvrdila da neuronima slične SH-SY5Y ćelije nakon izlaganja SNP-u umiru apoptozom, kao što su ranija istraživanja pokazala za ovu (Lim i sar., 2009) i ćelijsku liniju PC12 pacovskog feohromocitoma (Pytlowany i sar., 2008). Natrijum nitroprusid je izazvao morfološke promene karakteristične za apoptozu kao što su zaokrugljivanje tela, gubitak neurita i smanjenje volumena ćelija, a arilpiperazin **6a** je delimično sprečio ove događaje. Paralelno sa suprimiranjem vidljivih oštećenja, blokirani su i unutarćelijski procesi koji ukazuju na apoptozu. Premeštanje fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, aktivacija kaspaza i fragmentacija DNK izazvani natrijum nitroprusidom su bili smanjeni u prisustvu arilpiperazina **6a**. Supstanca **6a** je takođe sprečila i smanjenje potencijala membrane mitohondrija i povećanu produkciju superoksida koje je u SH-SY5Y ćelijama izazvao SNP. Sam ligand **6a** pri tome nije pokazivao značajnu sposobnost direktnog vezivanja azot monoksida i superoksid anjon radikala.

Smatra se da toksične efekte NO ispoljava inhibirajući komponente transportnog lanca elektrona u mitohondrijama, što dovodi do gubitka potencijala membrane mitohondrija i oslobađanja citohroma *c* u citosol (Heales i sar., 1999). Citohrom *c* zatim aktivira kaspaze, enzime koji u nizu katalitičkih reakcija razaraju ćelijski sadržaj, dovodeći do fragmentacije DNK i smrti neurona apoptozom (Uehara i sar., 1999).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da arilpiperazin **6a** sprečava pad potencijala mitohondrija koji izaziva donor NO stabilizujući membranu mitohondrija i tako, najverovatnije, inhibira apoptotski program koji se aktivira nakon izlaganja SH-SY5Y ćelija SNP-u. Arilpiperazini do sada nisu ispitivani u stresu izazvanom NO-om, ali je sposobnost normalizacije membranskog potencijala mitohondrija nakon delovanja drugih toksina zabeležena za neuroprotektivne lekove, parcijalne agoniste D2 i D3 receptora – pramipeksol i talipeksol. Oni stabilizacijom membrane mitohondrija sprečavaju apoptotska oštećenja SH-SY5Y ćelija izazvana MPP⁺-om (Abramova i sar., 2002; Kakimura i sar., 2001). Pored toga što utiče na stabilizaciju membrane mitohondrija, uočeno je da se pramipeksol selektivno akumulira u ovim organelama (Danzeisen i sar., 2006) i da najverovatnije direktnim putem neutrališe RKV koje se stvaraju u njima (Ferrari-Toninelli i sar., 2010). Iako nismo pratili unutarćelijsku distribuciju arilpiperazina **6a**, može se pretpostaviti da bi i u slučaju akumulacije u ili oko mitohondrija zbog slabih antiradikalnih osobina supstanca **6a** imala mali potencijal za direktno uklanjanje superoksid anjon radikala. Najverovatniji mehanizam zaštitnog dejstva arilpiperazina **6a** je stabilizacija potencijala membrane mitohondrija i smanjenje nivoa superoksida poreklom iz transportnog lanca elektrona oštećenog azot monoksidom. S obzirom da superoksidni anjon radikal oslobođen iz mitohondrija može dalje remetiti potencijal i funkciju mitohondrijalne membrane i učestvovati u reakcijama nastanka drugih reaktivnih vrsta u ćeliji (Szeto, 2006), supstanca **6a** najverovatnije smanjuje toksičnost primenjenog donora NO u kulturi SH-SY5Y ćelija posredno, slabljenjem daljih toksičnih efekata O₂⁻ mitohondrijalnog porekla.

Sposobnost arilpiperazina **6a** da spreči smanjenje koncentracije ATP-a u prisustvu donora NO je dodatno potvrdila njegov antiapoptotski potencijal u stresu izazvanom azot monoksidom. Ovde zabeleženi pad unutarćelijskih depoa ATP-a je u skladu sa istraživanjem Bal-Price i Brown-a (Bal-Price i Brown, 2001), koji su pokazali da visoke koncentracije NO, koje nastaju kako aktivacijom mikroglijalnog iNOS enzima tako i iz donora NO, direktnom kompeticijom sa kiseonikom inhibiraju citohrom *c* oksidazu i ćelijsko disanje neurona. Poremećaj energetskog balansa koji nastaje kao posledica oštećenja transportnog lanca elektrona azot monoksidom može pokrenuti apoptotski program u ćeliji. Pošto je arilpiperazin **6a** delimično sprečio smanjenje koncentracije ATP-a u SH-SY5Y ćelijama nakon tretmana donorom NO,

može se pretpostaviti da i na taj način doprinosi sprečavanju smrti neuroblastoma.

Zanimljivo je da zaštitna svojstva ovog liganda nisu zabeležena u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih donorom peroksinitrita 3-morfolinosidnoniminom. Peroksinitrit je kritična RAV koja nastaje reakcijom između NO i O_2^- i odgovorna je za oštećenja neurona u kombinovanom oksidativnom i nitrozativnom stresu. Znan broj studija ukazuje da RKV i RAV zajednički doprinose neurodegeneraciji (Floyd, 1999; Calabrese i sar., 2000). Kao moćan oksidans $ONOO^-$ direktno inhibira komplekse II, III i IV u transportnom lancu elektrona u mitohondrijama i izaziva dramatičan pad unutarćelijskih depoa glutaciona, što vodi daljem oštećenju mitohondrija i smrti neurona (Calabrese i sar., 2000). Imajući u vidu da peroksinitrit značajno doprinosi toksičnosti NO (Heales i sar., 1999), protektivan efekat supstance **6a** bi mogao biti delimično posredovan i inhibicijom toksičnih efekata peroksinitrita. Međutim, arilpiperazin **6a** nije spašavao SH-SY5Y ćelije od donora peroksinitrita, što govori u prilog činjenici da supstanca **6a** sprečava prvenstveno efekte NO. Zapažanje da arilpiperazin **6a** u našim eksperimentalnim uslovima sprečava efekte NO, pre nego $ONOO^-$, je u skladu sa rezultatima Meij-a i saradnika (Meij i sar., 2004), koji su pokazali da je u kulturi neuronima sličnih ćelija NO sam po sebi dovoljno ili čak i više toksičan od peroksinitrita.

U ovoj disertaciji dobro je dokumentovana sposobnost arilpiperazina **6a** da štiti SH-SY5Y ćelije od NO hemijskog porekla, ali je pokazano da spašava humani neuroblastom i od NO ćelijskog porekla. Azot monoksid poreklom od mikroglije u CNS-u može biti posrednik u smrti neurona. Aktivirane mikroglijalne ćelije su prisutne u *substantia nigra* i strijatumu životinja kod kojih je dopaminergičkim toksinima izazvana PB (Stone i sar., 2009) i kolokalizovane su sa telima oštećenih neurona u mozgovima obolelih od PB (Mirza i sar., 2000). Njihova prekomerna aktivacija, koja pored oslobađanja preteranih količina O_2^- i NO dovodi i do stvaranja proinflamatornih citokina i prostaglandina E2, je toksična za neurone (Stone i sar., 2009). Sposobnost supstance **6a** da spašava SH-SY5Y ćelije od aktiviranih pacovskih makrofaga ukazuje na mogući terapijski značaj ispitivanog arilpiperazina u neurodegeneraciji praćenoj inflamacijom, u kojoj su mikroglijalne ćelije glavni izvor neurotoksičnih medijatora inflamacije (Brown i Neher, 2010). Iako mehanizam zaštite od NO ćelijskog porekla u

uslovima kokultivacije makrofaga i SH-SY5Y ćelija nije detaljnije proučavan, može se pretpostaviti da arilpiperazin **6a** svoj efekat ostvaruje sličnim mehanizmima kao i kada se ćelije tretiraju donorom NO-a. Međutim, ne može se zanemariti ni mogućnost da arilpiperazin **6a** utiče na funkciju aktiviranih makrofaga. Skorašnji rezultati Kato-a i saradnika (Kato i sar., 2008) pokazuju da derivat arilpiperazina aripiprazol značajno smanjuje oslobađanje NO i proinflammatoryh citokina iz IFN- γ stimuliranih mikroglija ćelija glodara *in vitro*, kao i da inhibira stvaranje superoksid anjon radikala iz mikroglijalnih ćelija glodara aktiviranih forbol-miristat-acetatom (Kato i sar., 2011). U našim uslovima ispitivani arilpiperazin nije značajno uticao na količinu NO poreklom od makrofaga pacova, što je pokazano posredno preko određivanja količine nitrita Grisovom reakcijom, ali i direktnim merenjem unutarćelijske količine NO pomoću diaminofluoresceina. Međutim, mogući uticaj na oslobađanje proinflammatoryh citokina i/ili stvaranje superoksid anjon radikala iz aktiviranih makrofaga bi trebalo detaljnije istražiti.

Mehanizmi kojima NO izaziva smrt neurona uključuju promenu aktivnosti nekoliko protein kinaza u ćeliji. Tako JNK i ERK kinaze aktivirane mitogenom doprinose apoptozi koju u neuronima sličnim ćelijama i primarnim neuronima izaziva azot monoksid poreklom od natrijum nitroprusida, iNOS-a ili nNOS-a (Li i sar., 2004; Ishikawa i sar., 2000; Ishikawa i sar., 2003; Shibata i sar., 2006; Lam i sar., 2008; Chalimoniuk i sar., 2009). Ovde prikazani rezultati pokazuju pojačanu aktivnost JNK, ERK i AMPK proteina, a smanjenu aktivnost Akt-a u SH-SY5Y ćelijama koje su tretirane SNP-om. Zaštitni agens arilpiperazin **6a** je smanjio aktivaciju proapoptotskih JNK, ERK i AMPK signala izazvanu donorom NO, a normalizovao aktivnost antiapoptotskog Akt-a, što ukazuje da je neuroprotektivni efekat ove supstance u NO-izazvanom stresu verovatno JNK-, ERK-, Akt- i AMPK-zavisan.

Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim podacima koji govore da aktivacija ERK i JNK kinaza izazvana NO-om dovodi do pada potencijala mitohondrija, oslobađanja citohroma *c* i posledične apoptoze posredovane kaspazama. Naime, nakon aktivacije azot monoksidom, JNK i ERK fosforilišu i inaktiviraju antiapoptotske Bcl-2 i Bcl-x(L) članove Bcl-2 familije proteina i posledično aktiviraju proapoptotski Bax, izazivajući njegovu translokaciju iz citosola u mitohondrije (Lam i sar., 2008; Ishikawa

i sar., 2003). Translokacija Bax-a je praćena gubutkom potencijala membrane mitohondrija, oslobađanjem citohroma *c* u citosol i pokretanjem apoptotskih događaja.

U prilog činjenici da kinaze regulisane vanćelijskim signalima (ERK) imaju ulogu u smrti SH-SY5Y ćelija ide i u ovoj studiji zabeležena tzv. postojana aktivacija ERK proteina. Postoje dva obrasca aktivacije ERK-a u ćeliji – prolazna, koja pik dostiže 2 minuta nakon stimulacije, a zatim se aktivnost vraća na bazalni nivo i postojana, tokom koje je ERK fosforilisan nekoliko časova. Smatra se da od obrasca stimulacije ERK-a zavisi kakva će biti sudbina ćelije pod dejstvom određenog stimulusa (Marshall, 1995), pri čemu ranije studije ukazuju da postojana aktivacija ERK-a doprinosi smrti neuronskih ćelijskih linija i primarnih neurona pod dejstvom oksidativnog stresa (Stanciu i sar., 2000). Takođe, na modelu neurodegeneracije izazvane oksidativnim stresom Luo i DeFranco (Luo i DeFranco, 2006) su pokazali da je postojana aktivacija ERK proteina neophodan, ali ne i dovoljan signal koji doprinosi smrti neurona.

Signali koji bi zajedno sa aktivacijom ERK i JNK proteina mogli pospešivati oštećenja SH-SY5Y ćelija mogu biti aktivacija AMPK i inhibicija Akt-a, koje su detektovane u našim eksperimentalnim uslovima. Aktivacija AMPK signalnog puta je već zabeležena u oštećenjima neurona izazvanim NO-om i H₂O₂-om (McCullough i sar., 2005; Chen i sar., 2010). Mehanizam kojim AMPK doprinosi toksičnosti NO nije jasan, ali se može pretpostaviti da je neurotoksični efekat posledica nemogućnosti neurona da na preteranu aktivaciju AMPK odgovore pojačanom glikolizom. Naime, u uslovima smanjenja depoa ATP-a koja nastaje kao posledica inhibicije ćelijskog disanja pod dejstvom NO, a koje je pokazano i u ovoj studiji, neuroni ne mogu da aktiviraju glikolizu zbog nedostatka fosfofrukto-2-kinaze i smanjenog kapaciteta za oksidaciju masnih kiselina, što doprinosi njihovom propadanju (McCullough i sar., 2005). Pored toga, novija studija Ju-a i saradnika (Ju i sar., 2011) ukazuje da aktivacija AMPK može inhibirati transkripciju gena za antiapoptotski Bcl-2 protein i tako doprinositi smrti neurona na mišjem modelu HH. Sa druge strane, toksičnost NO je delimično pripisana i inhibiciji aktivnosti Akt-a, koji je jedan od najvažnijih preživljavajućih signalnih puteva u ćeliji. Pervin i saradnici (Pervin i sar., 2003) su pokazali da inhibicija Akt-a vodi olakšanoj integraciji Bax-a u membranu mitohondrija u stresu izazvanom NO-om na ćelijama kancera dojke, dok aktivacija Akt-a spašava hipokampalne neurone od

tosičnosti azot monoksida blokadom ekspresije i posledičnim smanjenjem aktivnosti Bax-a (Yamaguchi i sar., 2001). U našim eksperimentalnim uslovima je zabeležena aktivacija Akt-a povezana sa inhibicijom ERK-a i AMPK. Da upravo normalizacija aktivnosti Akt-a može imati važnu ulogu u neuroprotekciji, ukazuje činjenica da Akt može inhibirati postojanu aktivaciju ERK-a i tako pospešiti preživljavanje neurona (Subramaniam i sar., 2003). Pored toga zabeležena je i inhibicija AMPK pod dejstvom Akt-a na različitim tipovima ćelija (Kovacic i sar., 2003; Hahn-Windgassen i sar., 2005). Iako tačan mehanizam inhibicije postojane aktivacije ERK-a u neuronima pod dejstvom Akt-a još uvek nije razjašnjen, na drugim tipovima ćelija je pokazano da Akt fosforiliše i inhibira Raf kinazu, koja je deo signalnog puta odgovornog za aktivaciju ERK-a (Zimmermann i Moelling, 1999; Moelling i sar., 2002). Mehanizmi inhibicije AMPK posredovane Akt-om takođe još uvek nisu potpuno jasni, ali se pretpostavlja da taj efekat može biti posledica ili sposobnosti Akt-a da normalizuje nivoe ATP-a u ćeliji ili direktnog efekta Akt-a na LKB1 kinazu, koja aktivira AMPK (Hahn-Windgassen i sar., 2005).

5.2. MEHANIZAM ZAŠTITNOG DEJSTVA ARILPIPERAZINA **6b** U KULTURI SH-SY5Y ĆELIJA TRETIRANIH 6-HIDROKSIDOPAMINOM

S obzirom da su arilpiperazini pokazali značajan zaštitni efekat u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih NO-om, hteli smo da ispitamo i njihovu sposobnost da blokiraju toksično dejstvo 6-OHDA. 6-hidroksidopamin je važan uzročnik oksidativnog stresa i koristi se kao model Parkinsonove bolesti u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Od 20 ispitivanih supstanci, 15 je pokazalo zaštitni efekat u stresu izazvanom 6-OHDA-om, a detaljnije je proučavan najpotentniji arilpiperazin **6b**.

6-hidroksidopamin je molekul sličan dopaminu, koji izaziva smrt neurona i neuronima sličnih ćelija generisanjem vanćelijskog i unutarćelijskog oksidativnog stresa i direktnom inhibicijom transportnog lanca elektrona u mitohondrijama (Blum i sar., 2001). Vanćelijski oksidativni stres nastaje spontanom autooksidacijom 6-OHDA vrlo brzo nakon rastvaranja u medijumu, pri čemu kao finalni produkti reakcije nastaju H₂O₂ i *p*-hinon, uz veoma reaktivne intermedijere O₂⁻, OH i semihinonski radikal (Heikkila i Cohen, 1973). Unutar ćelije monoamino oksidaze metabolišu 6-OHDA do reaktivnih

hinona i H_2O_2 (Gomez-Lazaro i sar., 2008). Uzimajući u obzir navedeno, postavlja se pitanje da li su oštećenja SH-SY5Y ćelija u našim eksperimentalnim uslovima posledica vanćelijskog ili unutarćelijskog oksidativnog stresa ili možda poremećaja funkcije mitohondrija. Praćenje promena potencijala mitohondrija i produkcije superoksid anjon radikala u vremenu je pokazalo da se kolaps potencijala membrane mitohondrija javlja tek više sati nakon početka tretmana, što ukazuje na činjenicu da su RKV nastale unutarćelijskim metabolizmom 6-OHDA i/ili direktni uticaj 6-OHDA na rad mitohondrija odgovorni za njegove toksične efekte. Ovi rezultati su u skladu sa najnovijom studijom Dooley-a i saradnika (Dooley i sar., 2012) koja pokazuje da 6-OHDA u kulturi SH-SY5Y ćelija podleže najpre brzom oksidaciji, ali da drugi, odloženi talas oksidacije korelira sa smrću neuroblastoma. Pored toga što su verovatni medijatori toksičnosti 6-OHDA u kulturi neuroblastoma u našim uslovima unutarćelijske RKV, ne treba zanemariti ni doprinos vanćelijskih RKV nastalih autooksidacijom ove supstance. Međutim, kako je arilpiperazin **6b** sprečavao odloženi efekat 6-OHDA i nije pokazivao značajne antiradikalne osobine, može se pretpostaviti da je za njegov zaštitni potencijal odgovoran prevashodno uticaj na događaje koji slede nakon ulaska 6-OHDA u ćeliju.

Da 6-hidroksidopamin u našim eksperimentalnim uslovima izaziva apoptozu SH-SY5Y ćelija ukazuju uočene morfološke promene koje 6-OHDA pokreće, kao što su zaokrugljivanje tela, gubitak neurita i smanjenje volumena neuroblastoma. Takođe, i zapažena značajna fragmentacija jedarnog sadržaja i aktivacija kaspaza u prisustvu 6-OHDA dodatno potvrđuju da toksin dovodi do apoptoze SH-SY5Y neuroblastoma. Arilpiperazin **6b** je delimično sprečio morfološka oštećenja, fragmentaciju DNK i aktivaciju kaspaza i istovremeno smanjio oslobađanje LDH iz oštećenih neuroblastoma. Pored suprimiranja apoptotskih promena, ligand **6b** je sprečavao pad potencijala membrane mitohondrija i produkciju superoksid anjon radikala u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-OHDA-om.

U zavisnosti od primenjene koncentracije i ispitivanog tipa ćelija, 6-OHDA može izazvati kombinaciju više tipova ćelijske smrti u kulturi neuronima sličnih ćelija. Tako niže koncentracije 6-OHDA (30-100 μ M) nakon tretmana od 24 h izazivaju uglavnom apoptozu, a više (300 μ M) kombinaciju apoptoze i nekroze u kulturi

SH-SY5Y humanog neuroblastoma (Puttonen i sar., 2008). Sa druge strane, niske koncentracije 6-OHDA (20-75 μM) nakon 24 h indukuju uglavnom nekrozu PC12 ćelija pacovskog feohromocitoma (Woodgate i sar., 1999), što ukazuje da je tip smrti koji izaziva 6-OHDA specifičan i za tip ćelija. Takođe, ne sme se zaboraviti činjenica da 6-OHDA u koncentracijama u kojima izaziva apoptozu (85 μM), pokreće i autofagne procese u kulturi humanog neuroblastoma (Dagda i sar., 2008). Za razliku od apoptoze u kojoj ćelije nakon proteolitičke degradacije ćelijskog sadržaja i fragmentacije DNK na kraju bivaju fagocitovane, nekroza izaziva oštećenja ćelijske membrane i oslobađanje ćelijskog sadržaja u okolinu. Iako bi oštećenje ćelijske membrane koje uzrokuje izlazak LDH van ćelije moglo biti pokazatelj nekroze pod dejstvom 6-OHDA, moguće je da je u našim eksperimentalnim uslovima ovaj rezultat pokazatelj sekundarne apoptoze, do koje dolazi usled nepostojanja fagocitoze u ćelijskoj kulturi. Ranije studije su pokazale da oslobađanje LDH u supernatant može reflektovati i apoptozu ćelija (Lobner, 2000), tako da se može pretpostaviti da 6-OHDA izaziva apoptozu u kulturi SH-SY5Y ćelija, koju arilpiperazin **6b** delimično sprečava. Ovu pretpostavku dodatno potvrđuje i činjenica da 6-OHDA izaziva upadljivo smanjenje integriteta DNK neuroblastoma, koje arilpiperazin **6b** značajno smanjuje.

Oksidativni stres posredovan RKV nastalim od 6-OHDA, zajedno sa direktnim efektima 6-OHDA na transportni lanac elektrona, remete potencijal membrane mitohondrija (Lotharius i sar., 1999; Blum i sar., 2001) povećavajući njenu propustljivost, što dovodi do oslobađanja proapoptotskog citohroma *c* u citosol. Citohrom *c* aktivira kaspaze, koje dalje u kaskadi apoptotskih događaja dovode do fragmentacije DNK i smrti neuronima sličnih ćelija apoptozom (Hanrott i sar., 2006; Ochu i sar., 1998). Prisustvo arilpiperazina **6b** u kulturi neuroblastoma tretiranih 6-OHDA-om je uspeo da delimično spreči zapaženu fragmentaciju DNK i aktivaciju kaspaza, što navodi na zaključak da SH-SY5Y ćelije umiru kaspazno-zavisnom apoptozom, koju supstanca **6b** sprečava. Ovo opažanje je u skladu sa studijama drugih autora, koje su pokazale da 6-OHDA izaziva smrt kateholaminergičkih ćelijskih linija koja je posredovana kaspazama (Hanrott i sar., 2006; Ochu i sar., 1998). Iako zaštitni potencijal arilpiperazinskih liganada do sada nije ispitivan u smrti ćelija izazvanoj 6-OHDA-om, pokazana je sposobnost drugih dopaminergičkih liganada da spreče ovim toksinom izazvanu apoptozu neuroblastoma (Hara i sar., 2003). *In vitro* studije koje su

se bavile ispitivanjem neuroprotektivnih efekata dopaminergičkih liganada su pokazale da je njihov zaštitni potencijal najverovatnije posledica sprečavanja aktivacije proapototskih signala neutralisanjem RKV nastalih od 6-OHDA (Hara i sar., 2003) ili povećavanjem antioksidativnog kapaciteta neurona (Le i sar., 2000). Međutim, naši rezultati ukazuju da arilpiperazin **6b** nema značajnu direktnu antiradikalnu sposobnost, pa se može pretpostaviti da neutralisanje radikala nastalih autooksidacijom i/ili unutarćelijskim metabolizmom 6-OHDA verovatno nije mehanizam njegovog zaštitnog delovanja. Pretretman ligandom **6b** je izazvao snažnu inhibiciju smanjenja potencijala membrane mitohondrija indukovanog 6-OHDA-om i istovremeni pad unutarćelijske koncentracije superoksid anjon radikala. S obzirom da je pad potencijala membrane mitohondrija događaj koji prethodi aktivaciji apoptoze (Ly i sar., 2003) i oslobađanju superoksida iz mitohondrija (Düssmann i sar., 2003), može se pretpostaviti da je upravo stabilizacija potencijala mitohondrijalne membrane i posledično smanjenje oslobađanja superoksida uzrok zabeleženih zaštitnih efekata arilpiperazina **6b** u kulturi humanih neuroblastoma tretiranih 6-OHDA-om. Poremećaji funkcije mitohondrija predstavljaju bitan događaj u nastanku neurodegeneracije, pa bi ligandi koji stabilizuju ove ćelijske organele, kao što je arilpiperazin **6b**, predstavljali značajan pomak u terapijskom pristupu lečenju ovih poremećaja.

Oksidativni stres izaziva promenu aktivnosti niza signalnih molekula koji učestvuju u različitim procesima u ćeliji. Rezultati fosforilacije kinaza aktiviranih mitogenom prikazani ovde su u skladu sa studijama drugih autora, koje takođe pokazuju aktivaciju ERK-a i JNK-a u smrti neuronima sličnih ćelija i primarnih neurona izazvanoj 6-OHDA-om (Ikeda i sar., 2008; Jiang i Yu, 2005; Mnich i sar., 2010). Zna se da je aktivacija JNK puta povezana sa indukcijom proapototskih (p53, c-myc, kaspaze) i inhibicijom antiapoptotskih molekula u ćeliji (Bcl-2 i Bcl-x(L)) i da inhibicija JNK smanjuje smrt dopaminergičkih neurona pod dejstvom mitohondrijalnog neurotoksina MPP⁺/MPTP (Xia i sar., 2001). Slično, inhibicija JNK signalnog puta doprinosi protektivnom efektu kanabinoida anandamida u kulturi PC12 ćelija tretiranih 6-OHDA-om (Mnich i sar., 2010). U našim eksperimentalnim uslovima i postojana aktivacija ERK signalnog puta je najverovatnije doprinosila smrti neurona pod dejstvom oksidativnog stresa, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Kulich i Chu (Kulich i Chu, 2003). Njihova studija je pokazala da je postojana aktivacija ERK-a izazvana

6-OHDA-om u direktnoj vezi sa smrću B65 ćelija poreklom iz CNS-a jer inhibicija ERK-a blokira smanjenje vijabilnosti B65 ćelija (Kulich i Chu, 2003). Zapažena povećana fosforilacija JNK-a i ERK-a izazvana 6-OHDA-om nije bila značajno promenjena u prisustvu arilpiperazina **6b**, pa se može pretpostaviti da modulacija ovih signalnih puteva nije uključena u njegov zaštitni efekat.

Kako je Akt signalni put uključen u normalne procese razvoja i starenja mozga, ali i u neurodegenerativne poremećaje (Zheng i sar., 2012), i njegova uloga u odgovoru neurona na oksidativni stres je veoma bitna. U našim uslovima, 6-OHDA je doveo do povećanja aktivnosti Akt-a u kulturi humanih neuroblastoma. Ranija istraživanja su pokazala da izlaganje SH-SY5Y ćelija ovom toksinu može izazvati i aktivaciju (Jiang i Yu, 2005) i inhibiciju Akt-a (Chen i sar., 2004). Aktivacija Akt-a je povezana sa preživljavanjem (Jiang i Yu, 2005), dok inhibicija posreduje u smrti SH-SY5Y ćelija izazvanoj 6-OHDA-om (Chen i sar., 2004). Takvi podaci ukazuju na činjenicu da je povećana aktivacija Akt-a verovatno jedan od odbrambenih mehanizama neurona prema dejstvu 6-OHDA, dok njegova inhibicija povećava osetljivost neurona na prisustvo ovog toksina. U skladu sa tim je i podatak da inhibicija PI3K/Akt signalnog puta specifičnim inhibitorom LY294002 potencira smrt PC12 ćelija pacovskog feohromocitoma izazvanu 6-OHDA-om (Fujita i sar., 2006). Tretman ćelija supstancom **6b** u prisustvu 6-OHDA je dodatno povećavao aktivaciju Akt protein kinaze, a sam arilpiperazin **6b** je takođe izazivao prolazno povećanje aktivnosti Akt-a u kulturi SH-SY5Y neuroblastoma. Zabeležena stimulacija Akt-a bi mogla doprinosti neuroprotektivnom efektu arilpiperazina **6b**. Ovo zapažanje je u skladu sa rezultatima Jiang-a i Yu-a (Jiang i Yu, 2005), koji su predložili da slična prolazna dodatna aktivacija Akt-a nakon interakcije SH-SY5Y ćelija sa mišjim astrocitima doprinosi stečenoj otpornosti neuroblastoma prema 6-OHDA.

Dakle, protektivan efekat arilpiperazina **6b** u kulturi humanog neuroblastoma SH-SY5Y tretiranih 6-OHDA-om je najverovatnije ERK- i JNK-nezavisan, ali je delimično posredovan aktivacijom Akt signalnog puta.

Pored regulacije proliferacije i apoptoze, Akt ima važno mesto i u kontroli procesa autofagije, programirane ćelijske smrti tipa II (Ravikumar i sar., 2010), a rastući broj podataka ukazuje na značajnu ulogu autofagije u neurodegeneraciji (Wong i

Cuervo, 2010). *In vitro* studije ukazuju da autofagija izazvana 6-OHDA-om doprinosi smrti SH-SY5Y ćelija (Dagda i sar., 2008; Arsić i sar., 2012). Takođe aktivacija ovog procesa je izazivala propadanje neurona u *substantia nigra* pacova i miševa tretiranih 6-OHDA-om (Li i sar., 2011; Cheng i sar., 2011). Rezultati ove disertacije su u skladu sa pretpostavljenom oštećujućom funkcijom autofagije, jer je dobro poznati inhibitor autofagije bafilomicin A1 umanjio toksičnost 6-OHDA u našim eksperimentalnim uslovima. Primena drugog inhibitora autofagije 3-metiladenina takođe blokira toksičan efekat 6-OHDA na dopaminergičkim neuronima u pacovskom modelu PB, dodatno potvrđujući naše rezultate (Li i sar., 2011).

Unutarćelijski mehanizmi povezani sa regulacijom autofagije izazvane 6-OHDA-om nisu detaljno ispitivani u studijama drugih autora. Dagda i saradnici su pokazali da indukcija autofagije pod dejstvom 6-OHDA koreliše sa aktivnošću i mitohondrijalnom lokalizacijom ERK-a (Dagda i sar., 2008). U skladu sa tim su i naši rezultati koji pokazuju da je povećanje aktivnosti ERK signalnog puta, zapaženo u ćelijama tretiranim 6-OHDA-om, pratilo pojavu autofagije. Međutim, arilpiperazin **6b** nije menjao povećanje fosforilacije ERK-a, pa inhibicija autofagije izazvane 6-OHDA-om zabeležena u prisustvu liganda **6b** verovatno nije posredovana modulacijom aktivnosti te protein kinaze. Aktivnost još jednog važnog pozitivnog regulatora autofagije AMPK proteina u našoj studiji je bila značajno povećana, ali tek 8 h nakon početka tretmana 6-OHDA-om, dok su se markeri autofagije pojavili već 2 h nakon izlaganja ćelija toksinu. Iz ovoga se može izvesti zaključak da u našim eksperimentalnim uslovima 6-OHDA najverovatnije aktivacijom ERK kinaze indukuje autofagiju.

Pored toga, rezultati ove studije ukazuju da je autofagija posredovana 6-OHDA-om verovatno posledica smanjenja aktivnosti mTOR proteina, glavnog inhibitora autofagije u ćeliji. Imajući u vidu istraživanje Zhang i saradnika (Zhang i sar., 2010) koje ukazuje da O_2^- može negativno regulisati aktivnost mTOR-a u mišjim fibroblastima, zapažena inhibirana aktivnost mTOR proteina u ovoj disertaciji bi mogla biti posledica povećane unutarćelijske koncentracije O_2^- . Inhibicija aktivnosti mTOR-a bi mogla doprineti štetnim efektima 6-OHDA. Ovo opažanje je u skladu sa rezultatima Cheng-a i saradnika (Cheng i sar., 2011), koji su pokazali da ćelijski fenotip povezan sa

povećanom aktivnošću mTOR-a pokazuje otpornost prema dejstvu 6-OHDA na mišjem modelu neurodegeneracije. S obzirom da je arilpiperazin **6b** delimično sprečio smanjenje aktivnosti mTOR-a izazvano 6-OHDA-om, može se pretpostaviti da je ovde zabeležena neuroprotekcija delom posledica i efekta ispitivanog arilpiperazina na funkciju mTOR-a. Praćenje aktivnosti negativnog regulatora mTOR-a AMPK je pokazalo da arilpiperazin **6b** ne utiče na mTOR posredstvom AMPK. Zna se da Akt pozitivno reguliše mTOR (Navé i sar., 1999), pa se ne može isključiti mogućnost da je zabeleženi efekat arilpiperazina **6b** na aktivnost mTOR-a delimično posredovan i aktivacijom Akt-a. Međutim, i 6-OHDA je aktivirao Akt signalni put, ali je paradoksalno inhibirao mTOR i indukovao autofagiju. Indukcija autofagije bi mogla biti posledica pokazane aktivacije ERK proteina u ćelijama tretiranim 6-OHDA-om. Pošto supstanca **6b** ne inhibira na ERK, a dodatno aktivira Akt, može se pretpostaviti da je uticaj liganda **6b** na Akt razlog za reaktivaciju mTOR-a i inhibiciju autofagije u ćelijama tretiranim 6-OHDA-om.

5.3. ZAVISNOST ZAŠTITNOG EFEKTA ARILPIPERAZINA 6a I 6b OD VEZIVANJA ZA DOPAMINSKE D2 RECEPTORE

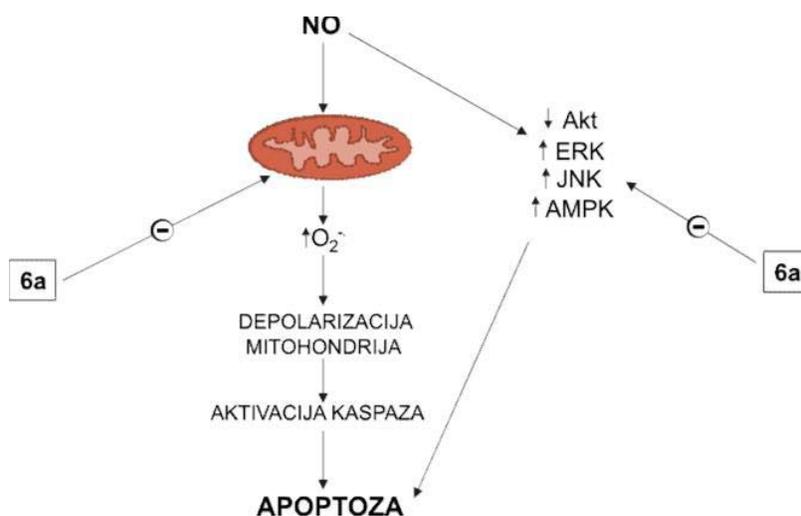
Svi ispitivani arilpiperazini imaju svojstvo vezivanja za dopaminske hD2s receptore, a supstance **6a** i **6b** su pokazale parcijalne agonističke sposobnosti na njima. Uloga dopaminskih receptora u neurotoksičnosti, ali i u neuroprotektivnim efektima liganada za dopaminske receptore je dobro opisana (Bozzi i Borrelli, 2006; Lebel i sar., 2007). Tako na primer, preterana aktivacija dopaminskih D1 i D2 receptora doprinosi neurotoksičnosti na više načina – povećava podložnost neurona efektima glutamata i posledičnoj ekscitotoksičnosti, vodi štetnoj aktivaciji ERK-a i proapoptotskog transkripcionog faktora c-Jun (Bozzi i Borrelli, 2006). Sa druge strane, mogući mehanizmi neuroprotekcije posredovane D2 receptorima su: inhibicija oslobađanja dopamina u sinaptičku pukotinu aktivacijom presinaptičkih D2s autoreceptora, zatim povećana otpornost neurona na efekte glutamata aktivacijom postsinaptičkih D2l receptora, kao i aktivacija PI3K-zavisnih preživljavajućih signala (Bozzi i Borrelli, 2006; Nair i Sealfon, 2003). Blokada dopaminskih receptora u ovoj disertaciji nije poništila efekte arilpiperazina **6a** i **6b** u stresu izazvanom SNP-om i 6-OHDA-om,

ukazujući da su njihove neuroprotektivne osobine najverovatnije nezavisne od aktivacije D2 receptora. Dosadašnja istraživanja su pokazala da postoje i dopamin-zavisni i dopamin-nezavisni mehanizmi neuroprotekcije posredovane dopaminergičkim ligandima (Gómez-Vargas i sar., 1998; Guo i sar., 2002; Kitamura i sar., 2003; Ferrari-Toninelli i sar., 2010). Dopamin-nezavisni mehanizmi uključuju antioksidativne efekte i stabilizaciju mitohondrija (Gómez-Vargas i sar., 1998; Kitamura i sar., 2003; Ferrari-Toninelli i sar., 2010), dok su dopamin-zavisni efekti povezani sa oslobađanjem trofičkih faktora koje je posredovano receptorima (Guo i sar., 2002). U ovoj studiji smo pokazali da arilpiperazini **6a** i **6b** imaju sposobnost da spreče smanjenje potencijala mitohondrija koje izazivaju primenjeni toksini, što sugeriše da stabilizacija funkcije ovih ćelijskih organela može igrati važnu ulogu u njihovom neuroprotektivnom dejstvu, nezavazano za afinitet supstanci **6a** i **6b** prema D2 receptorima. U prilog navedenoj tvrdnji o nezavisnosti efekta arilpiperazina od vezivanja za D2 receptore idu istraživanja koja su pokazala da i enantiomeri poznatih dopaminergičkih liganada apomorfina i pramipeksola, koji se ne vezuju za dopaminske receptore, ispoljavaju protektivne efekte *in vitro* u neurodegeneraciji izazvanoj oksidativnim stresom (Gassen i sar., 1998; Ferrari-Toninelli i sar., 2010). Naime, istraživanje Ferrari-Toninelli i saradnika (Ferrari-Toninelli i sar., 2010) je pokazalo da oba enantiomera poznatog antiparkinsonijskog leka pramipeksola, od kojih se jedan vezuje za D2 i D3 receptore a drugi ne, štite SH-SY5Y ćelije od oksidativnog stresa izazvanog vodonik peroksidom najverovatnije sprečavanjem stvaranja RKV u mitohondrijama. Takođe, Gassen i saradnici (Gassen i sar., 1998) su pokazali da i (+) i (-) enantiomer apomorfina štite PC12 ćelije pacovskog feohromocitoma od oksidativnog stresa izazvanog 6-OHDA-om i H₂O₂-om. Pored toga, pretpostavku o nezavisnosti efekta od vezivanja za D2 receptore indirektno potvrđuje i to, što nije uočena korelacija između afiniteta arilpiperazina za D2 receptore i njihovog neuroprotektivnog kapaciteta u stresu izazvanom NO-om, odnosno 6-OHDA-om.

Takođe, veza između strukture ispitivanih jedinjenja i zabeležene neuroprotekcije se ne može izvesti iz podataka dobijenih u ovoj studiji. Međutim, treba naglasiti da je 7 supstanci iz serije **a** spašavalo SH-SY5Y ćelije od donora NO, dok su 4 supstance iz serije **b** bile aktivne u stresu izazvanom SNP-om. Sa druge strane, u stresu izazvanom 6-OHDA-om 5 supstanci iz serije **a** su bile aktivne, u poređenju sa čak 8

supstanci iz serije **b**. Ovi podaci govore da bi jedinjenja sa arilpiperazinskom strukturom iz grupe **a** mogla biti dobra polazna osnova za razvoj potencijalnih lekova koji bi štitili neurone od stresa izazvanog NO-om, dok bi supstance iz grupe **b** mogle biti neuroprotektivne u uslovima kada preovlađuje oksidativni stres. Međutim, potrebna je pažljiva procena veze između strukture i neuroprotekcije da bi se utvrdilo koje arilpiperazine treba dalje razvijati za zaštitu od stresa izazvanog NO-om ili RKV.

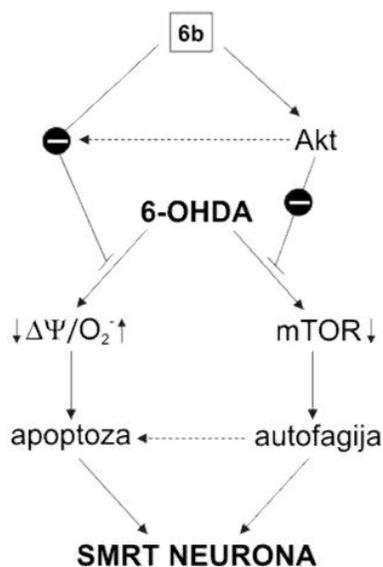
Predloženi mehanizam delovanja arilpiperazina **6a** u stresu posredovanom azot monoksidom, izveden iz prethodnih rezultata ove studije, je prikazan na shemi 1. Ukratko, azot monoksid najverovatnije remeti funkciju transportnog lanca elektrona povećavajući produkciju superoksida, koji dalje narušava potencijal i integritet mitohondrijalne membrane. Istovremeno se pod dejstvom NO-a aktiviraju unutarćelijski signali koji regulišu proces ćelijske smrti, vodeći ćeliju u apoptozu. Arilpiperazin **6a** sprečava apoptotske promene koje izaziva azot monoksid tako što stabilizuje membranu mitohondrija, aktivira antiapoptotsku Akt kinazu a inhibira proapoptotske ERK, JNK i AMPK puteve. Tačnu ulogu modulacije navedenih signalnih puteva u sprečavanju oštećenja SH-SY5Y ćelija izazvanih NO-om pod dejstvom arilpiperazina bi trebalo detaljnije ispitati.



Shema 1. Pretpostavljeni mehanizam dejstva arilpiperazina **6a**.

Pretpostavljeni mehanizam dejstva arilpiperazina **6b** u stresu izazvanom 6-OHDA-om je prikazan na shemi 2. Arilpiperazin sprečava pad potencijala

mitohondrija, oksidativni stres, aktivaciju kaspaza i sledstvenu apoptozu izazvane 6-OHDA-om. Takođe, pokazano je da supstanca **6b** aktivacijom mTOR-a inhibira citotoksičnu autofagiju indukovanu 6-OHDA-om, koja indirektno dovodi do apoptoze. Za protektivno delovanje arilpiperazina **6b** odgovorna je i aktivacija Akt kinaze, koja osim što direktno deluje antiapoptotski, najverovatnije i preko aktivacije mTOR-a dovodi do inhibicije citotoksične autofagije. Efekti arilpiperazina **6b** nisu posredovani uticajem na aktivnost ERK, JNK i AMPK kinaze.



Shema 2. Pretpostavljeni mehanizam dejstva arilpiperazina 6b.

Rezultati ove studije pokazuju da arilpiperazinski dopaminergički ligandi mogu sprečiti oštećenja mitohondrija posredovana NO-om i 6-OHDA-om, modulaciju signalnih puteva koji učestvuju u ćelijskoj smrti i posledičnu apoptozu i autofagiju u humanoj SH-SY5Y neuroblastomskoj ćelijskoj liniji. Podaci dobijeni sa stimulisanim makrofagima ukazuju na činjenicu da bi arilpiperazini mogli smanjivati neurotoksičnost NO poreklom od potentnih donora NO u CNS-u, kao što su mikroglijalne ćelije. Imajući u vidu ulogu aberacija mitohondrija, metaboličkog disbalansa i rezultujućeg oksidativnog stresa u razvoju AD i PB (Andersen, 2004; Halliwell, 2006; Sayre i sar., 2001), arilpiperazini bi mogli biti verovatni kandidati za terapiju ovih i drugih neurodegenerativnih oboljenja.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Od 20 novosintetisanih arilpiperazina čak 15 štiti od toksičnosti 6-OHDA, pri čemu najizraženiji efekat pokazuje supstanca **6b**, dok 12 arilpiperazina sprečava toksično delovanje SNP-a, a najizraženiji protektivni efekat ispoljava ligand **6a**. Arilpiperazin **6a** takođe štiti SH-SY5Y ćelije od toksičnosti NO-a poreklom od makrofaga stimulisanih IFN- γ i LPS-om.
- Protektivno delovanje arilpiperazina **6a** posredovano je njegovom sposobnošću da spreči SNP-om izazvan pad potencijala mitohondrija, oslobađanje superoksida, aktivaciju kaspaza i sledstvenu apoptozu, kao i sprečavanjem aktivacije proapoptotskih kinaza AMPK, JNK i ERK, odnosno inhibicije protektivne kinaze Akt.
Protektivno delovanje arilpiperazina **6b** posredovano je njegovom sposobnošću da spreči 6-OHDA-om izazvano smanjenje potencijala mitohondrija, oslobađanje superoksida, aktivaciju kaspaza i sledstvenu apoptozu, kao citotoksičnu autofagiju aktivacijom Akt/mTOR signalnog puta.
- Svi ispitivani arilpiperazini se vezuju za hD2s receptore. Vrednosti K_i se kreću od 15.4 nM do 722.7 nM. Arilpiperazini **6a** i **6b** se ponašaju kao parcijalni agonisti hD2s receptora, ali je njihov neuroprotektivni efekat u stresu izazvanom NO-om i 6-OHDA-om najverovatnije nezavisan od vezivanja za dopaminske D2 receptore.

7. LITERATURA

Abramova NA, Cassarino DS, Khan SM, Painter TW, Bennett JP Jr. Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. *J Neurosci Res.* 2002;67(4):494-500.

Ali SF, David SN, Newport GD, Cadet JL, Slikker W Jr. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. *Synapse.* 1994;18(1):27-34.

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S18-25.

Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, Ristic B, Tovilovic G, Zogovic N, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(11):1826-36.

Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 2009;16(3):368-77.

Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci.* 2001;21(17):6480-91.

Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol.* 2000;131(4):711-20.

Batlevi Y, La Spada AR. Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):46-51.

Besson VC. Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)polymerase pathway modulation. *Br J Pharmacol.* 2009;157(5):695-704.

Bian Q, Kato T, Monji A, Hashioka S, Mizoguchi Y, Horikawa H, Kanba S. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial

activation induced by interferon-gamma. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(1):42-8.

Bilsland J, Roy S, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Han Y, Grimm E, Hefti F, Harper SJ. Caspase inhibitors attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2002;22(7):2637-49.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001;65(2):135-72.

Blum D, Torch S, Nissou MF, Benabid AL, Verna JM. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci Lett*. 2000;283(3):193-6.

Boje KM. Nitric oxide neurotoxicity in neurodegenerative diseases. *Front Biosci*. 2004;9:763-76.

Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol*. 1999;46(5):787-90.

Borutaite V, Brown G. What else has to happen for nitric oxide to induce cell death? *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 6):1394-6.

Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem*. 2001;77(3):849-63.

Bozzi Y, Borrelli E. Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it? *Trends Neurosci*. 2006;29(3):167-74.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(5):233-42.

Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol*. 2003;27(3):325-55.

Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*. 2001;52(3-5):189-95.

Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol*. 2010;41(2-3):242-7.

Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*. 2010;23(3):153-65.

Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res*. 1989;476(1):10-5.

Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1315-41.

Cardaci S, Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*. 2008;74(5):1234-45.

Carvey PM, Ling Z. Pramipexole enhances Bcl-xl expression in mesencephalic cultures [abstract]. *Mov Dis* 2000; 15 Suppl. 3: 17.

Chalimoniuk M, Stolecka A, Ziemińska E, Stepień A, Langfort J, Strosznajder JB. Involvement of multiple protein kinases in cPLA2 phosphorylation, arachidonic acid release, and cell death in in vivo and in vitro models of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism--the possible key role of PKG. *J Neurochem*. 2009;110(1):307-17.

Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J*. 2004;18(10):1162-4.

Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Yin J, Zhou H, Chen W, Shen T, Han X, Huang S. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest*. 2010;90(5):762-73.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med*. 2000;6(7):797-801.

Chen S, Zhang X, Yang D, Du Y, Li L, Li X, Ming M, Le W. D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways. *FEBS Lett.* 2008;582(5):603-10.

Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):1040-52.

Cheng HC, Kim SR, Oo TF, Kareva T, Yarygina O, Rzhetskaya M, Wang C, During M, Talloczy Z, Tanaka K, Komatsu M, Kobayashi K, Okano H, Kholodilov N, Burke RE. Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *J Neurosci.* 2011;31(6):2125-35.

Cherra SJ, Chu CT. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol.* 2008;3(3):309-323.

Chou SM, Wang HS, Komai K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat.* 1996;10(3-4):249-58.

Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem.* 2004;271(11):2060-6.

Chung KC, Park JH, Kim CH, Ahn YS. Tumor necrosis factor-alpha and phorbol 12-myristate 13-acetate differentially modulate cytotoxic effect of nitric oxide generated by serum deprivation in neuronal PC12 cells. *J Neurochem.* 1999;72(4):1482-8.

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989;49(1):219-25.

Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem.* 1974;249(8):2447-52.

Colton CA, Brown CM, Czapiga M, Vitek MP. Apolipoprotein-E allele-specific regulation of nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:212-25.

Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem.* 1986;152(1):136-40.

Contestabile A. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(6):553-68.

Cooper CE. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem Sci*. 2002;27(1):33-9.

Cosi C, Waget A, Rollet K, Tesori V, Newman-Tancredi A. Clozapine, ziprasidone and aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: role of 5-HT1A receptor activation. *Brain Res*. 2005;1043(1-2):32-41.

Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(5):601-8.

Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. 2001;17(1):45-58.

Dagda RK, Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13843-55.

Dagda RK, Zhu J, Kulich SM, Chu CT. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy*. 2008;4(6):770-82.

Danzeisen R, Schwalenstoecker B, Gillardon F, Buerger E, Krzykalla V, Klinder K, Schild L, Hengerer B, Ludolph AC, Dorner-Ciossek C, Kussmaul L. Targeted antioxidative and neuroprotective properties of the dopamine agonist pramipexole and its nondopaminergic enantiomer SND919CL2x [(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-L-propylamino-benzothiazole dihydrochloride]. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(1):189-99.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239-52.

Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem.* 2000;74(5):2213-6.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene.* 2003;22(37):5885-96.

Deslauriers J, Lefrançois M, Larouche A, Sarret P, Grignon S. Antipsychotic-induced DRD2 upregulation and its prevention by α -lipoic acid in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Synapse.* 2011;65(4):321-31.

Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol.* 2001;24(1):43-9.

Dooley CT, Li L, Mislner JA, Thompson JH. Toxicity of 6-hydroxydopamine: live cell imaging of cytoplasmic redox flux. *Cell Biol Toxicol.* 2012;28(2):89-101.

Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14669-74.

Düssmann H, Kögel D, Rehm M, Prehn JH. Mitochondrial membrane permeabilization and superoxide production during apoptosis. A single-cell analysis. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12645-9.

Ewings KE, Wiggins CM, Cook SJ. Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle.* 2007;6(18):2236-40.

Feng Z, Li L, Ng PY, Porter AG. Neuronal differentiation and protection from nitric oxide-induced apoptosis require c-Jun-dependent expression of NCAM140. *Mol Cell Biol.* 2002;22(15):5357-66.

Ferrari-Toninelli G, Maccarinelli G, Uberti D, Buerger E, Memo M. Mitochondria-targeted antioxidant effects of S(-) and R(+) pramipexole. *BMC Pharmacol.* 2010;10:2.

Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1346-55.

Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003;348(14):1365-75.

Fujita H, Ogino T, Kobuchi H, Fujiwara T, Yano H, Akiyama J, Utsumi K, Sasaki J. Cell-permeable cAMP analog suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through the activation of the Akt pathway. *Brain Res.* 2006;1113(1):10-23.

Gassen M, Gross A, Youdim MB. Apomorphine enantiomers protect cultured pheochromocytoma (PC12) cells from oxidative stress induced by H₂O₂ and 6-hydroxydopamine. *Mov Disord.* 1998;13(2):242-8.

Gille G, Rausch WD, Hung ST, Moldzio R, Janetzky B, Hundemer HP, Kolter T, Reichmann H. Pergolide protects dopaminergic neurons in primary culture under stress conditions. *J Neural Transm.* 2002;109(5-6):633-43.

Gille G, Reichmann H. Iron-dependent functions of mitochondria--relation to neurodegeneration. *J Neural Transm.* 2011;118(3):349-59.

Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol.* 2004;61(5):641-4.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11038-43.

Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol.* 1995;292(3-4):329-32.

Gomez-Lazaro M, Bonekamp NA, Galindo MF, Jordán J, Schrader M. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(11):1960-9.

Gómez-Vargas M, Nishibayashi-Asanuma S, Asanuma M, Kondo Y, Iwata E, Ogawa N. Pergolide scavenges both hydroxyl and nitric oxide free radicals in vitro and inhibits lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Brain Res.* 1998;790(1-2):202-8.

Greco SJ, Sarkar S, Johnston JM, Tezapsidis N. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(1):98-104.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(15):1899-911.

Gu Z, Nakamura T, Lipton SA. Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2010;41(2-3):55-72.

Guo H, Tang Z, Yu Y, Xu L, Jin G, Zhou J. Apomorphine induces trophic factors that support fetal rat mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *Eur J Neurosci.* 2002;16(10):1861-70.

Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem.* 2005;280(37):32081-9.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.

Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill M J, Wonnacott S. 6-Hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2006;281(9):5373-82.

Hara H, Ohta M, Adachi T. Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res.* 2006;84(4):860-6.

Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S, Adachi T. Apomorphine attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptotic cell death in SH-SY5Y cells. *Redox Rep.* 2003;8(4):193-7.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2875-80.

Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):215-28.

Heikkila RE, Cohen G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science*. 1973;181(4098):456-7.

Hwang CK, Chun HS. Isoliquiritigenin Isolated from Licorice *Glycyrrhiza uralensis* Prevents 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in Dopaminergic Neurons. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(3):536-43.

Iglesias-González J, Sánchez-Iglesias S, Méndez-Álvarez E, Rose S, Hikima A, Jenner P, Soto-Otero R. Differential Toxicity of 6-Hydroxydopamine in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells and Rat Brain Mitochondria: Protective Role of Catalase and Superoxide Dismutase. *Neurochem Res*. 2012. [Epub ahead of print].

Ikeda Y, Tsuji S, Satoh A, Ishikura M, Shirasawa T, Shimizu T. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2008;107(6):1730-40.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(2):431-7.

Ishikawa Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor accelerates nitric oxide donor-induced apoptosis of cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 2000;75(2):494-502.

Ishikawa Y, Kusaka E, Enokido Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. Regulation of Bax translocation through phosphorylation at Ser-70 of Bcl-2 by MAP kinase in NO-induced neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(2):451-9.

Jiang Z, Yu PH. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and (phosphoinositide 3-kinase)/Akt signal pathways in acquired resistance against neurotoxin of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y cells following cell-cell interaction with astrocytes. *Neuroscience*. 2005;133(2):405-11.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911-2.

Ju TC, Chen HM, Lin JT, Chang CP, Chang WC, Kang JJ, Sun CP, Tao MH, Tu PH, Chang C, Dickson DW, Chern Y. Nuclear translocation of AMPK- α 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Cell Biol*. 2011;194(2):209-27.

Jung JE, Lee J, Ha J, Kim SS, Cho YH, Baik HH, Kang I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in mouse Neuro 2a neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2004;354(3):197-200.

Kabuto H, Tada M, Kohno M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(3):423-7.

Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. Release and aggregation of cytochrome c and alpha-synuclein are inhibited by the antiparkinsonian drugs, talipexole and pramipexole. *Eur J Pharmacol.* 2001;417(1-2):59-67.

Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Akt1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity. *J Neurosci Res.* 2003a;74(1):37-51.

Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol Pharmacol.* 2003b;64(3):557-69.

Kato T, Mizoguchi Y, Monji A, Horikawa H, Suzuki SO, Seki Y, Iwaki T, Hashioka S, Kanba S. Inhibitory effects of aripiprazole on interferon-gamma-induced microglial activation via intracellular Ca²⁺ regulation in vitro. *J Neurochem.* 2008;106(2):815-25.

Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inoguchi T, Utsumi H, Kanba S. Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia. *Schizophr Res.* 2011;129(2-3):172-82.

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castaño JG, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci.* 2000;20(19):7268-78.

Kenessey A, Ojamaa K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(30):20666-72.

Kiechle T, Dedeoglu A, Kubilus J, Kowall NW, Beal MF, Friedlander RM, Hersch SM, Ferrante RJ. Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* 2002;1(3):183-95.

Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res.* 2009;196(2):168-79.

Kimura H, Sawada T, Oshima S, Kozawa K, Ishioka T, Kato M. Toxicity and roles of reactive oxygen species. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):489-95.

Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(6):449-57.

Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S, Akaike A, Nomura Y. Neuroprotective mechanisms of antiparkinsonian dopamine D2-receptor subfamily agonists. *Neurochem Res.* 2003;28(7):1035-40.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 2002;419(6905):367-74.

Knoll J. The pharmacology of (-)deprenyl. *J Neural Transm Suppl.* 1986;22:75-89.

Koprivica V, Regardie K, Wolff C, Fernald R, Murphy JJ, Kambayashi J, Kikuchi T, Jordan S. Aripiprazole protects cortical neurons from glutamate toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2011;651(1-3):73-6.

Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39422-7.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):280-93.

Kulic L, Wollmer MA, Rhein V, Pagani L, Kuehnle K, Cattapoel S, Tracy J, Eckert A, Nitsch RM. Combined expression of tau and the Harlequin mouse mutation leads to increased mitochondrial dysfunction, tau pathology and neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* 2011;32(10):1827-38.

Kulich SM, Chu CT. Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *J Biosci.*

2003;28(1):83-9.

Lam PY, Cadenas E. Compromised proteasome degradation elevates neuronal nitric oxide synthase levels and induces apoptotic cell death. *Arch Biochem Biophys.* 2008;478(2):181-6.

Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH. Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm.* 2000;107(10):1165-73.

Lebel M, Robinson P, Cyr M. Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci.* 2007;34(1):18-29.

Lee JA, Gao FB. Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J Neurosci.* 2009;29(26):8506-11.

Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2432-7.

Li J, Benashski SE, Venna VR, McCullough LD. Effects of metformin in experimental stroke. *Stroke.* 2010;41(11):2645-52.

Li L, Feng Z, Porter AG. JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4058-65.

Li L, Wang X, Fei X, Xia L, Qin Z, Liang Z. Parkinson's disease involves autophagy and abnormal distribution of cathepsin L. *Neurosci Lett.* 2011;489(1):62-7.

Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 2000;288(5464):335-9.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8516-25.

Liang D, Dawson TM, Dawson VL. What have genetically engineered mice taught us about ischemic injury? *Curr Mol Med.* 2004;4(2):207-25.

Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C, Zipursky R, Sharma T, Kahn RS, Keefe RS, Green AI, Gur RE, McEvoy J, Perkins D, Hamer RM, Gu H, Tohen M; HGDH Study Group. Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(4):361-70.

Lim W, Kim JH, Gook E, Kim J, Ko Y, Kim I, Kwon H, Lim H, Jung B, Yang K, Choi N, Kim M, Kim S, Choi H, Kim O. Inhibition of mitochondria-dependent apoptosis by 635-nm irradiation in sodium nitroprusside-treated SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(6):850-7.

Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*. 2000;96(2):147-52.

Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 1999;19(4):1284-93.

Luo Y, DeFranco DB. Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16436-42.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.

Mahesh R, Jung HW, Kim GW, Kim YS, Park YK. Cryptotanshinone from *Salviae Miltiorrhizae Radix* Inhibits Sodium-nitroprusside-induced Apoptosis in Neuro-2a Cells. *Phytother Res*. 2012;26(8):1211-9.

Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bähr M, Diem R. Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis*. 2007;25(3):514-25.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):741-52.

Mander P, Borutaite V, Moncada S, Brown GC. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):208-15.

Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;827(1):65-75.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978;87(1):206-10.

Maroney AC, Finn JP, Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Neff NT, Tolkovsky AM, Park DS, Yan CY, Troy CM, Greene LA. CEP-1347 (KT7515), an inhibitor of JNK activation, rescues sympathetic neurons and neuronally differentiated PC12 cells from death evoked by three distinct insults. *J Neurochem.* 1999;73(5):1901-12.

Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 1995;80(2):179-85.

Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol.* 2007;500(1):20-46.

Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 2007;6(4):352-61.

Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Hansen LA. Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(11):1041-52.

Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1999;73(5):2037-46.

McCullough LD, Zeng Z, Li H, Landree LE, McFadden J, Ronnett GV. Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20493-502.

Meij JT, Haselton CL, Hillman KL, Muralikrishnan D, Ebadi M, Yu L. Differential mechanisms of nitric oxide- and peroxynitrite-induced cell death. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):1043-53.

Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2009;34(1):55-65.

Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience.*

2000;95(2):425-32.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998;78(1):189-225.

Mnich K, Finn DP, Dowd E, Gorman AM. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol.* 2010;2010:818497.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.

Moreira PI, Siedlak SL, Aliev G, Zhu X, Cash AD, Smith MA, Perry G. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J Neural Transm.* 2005;112(7):921-32.

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1994;63(6):2179-84.

Nair VD, Sealton SC. Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(47):47053-61.

Nakamura T, Wang L, Wong CC, Scott FL, Eckelman BP, Han X, Tzitzilonis C, Meng F, Gu Z, Holland EA, Clemente AT, Okamoto S, Salvesen GS, Riek R, Yates JR 3rd, Lipton SA. Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death. *Mol Cell.* 2010;39(2):184-95.

Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* 1999;344(2):427-31.

Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(2):113-22.

Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem.* 1998;70(6):2637-40.

Pannu R, Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int.* 2006;49(2):170-82.

Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK. Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1992;140(3):621-8.

Park SW, Lee CH, Lee JG, Kim LW, Shin BS, Lee BJ, Kim YH. Protective effects of atypical antipsychotic drugs against MPP(+)-induced oxidative stress in PC12 cells. *Neurosci Res.* 2011;69(4):283-90.

Park SW, Lee JG, Ha EK, Choi SM, Cho HY, Seo MK, Kim YH. Differential effects of aripiprazole and haloperidol on BDNF-mediated signal changes in SH-SY5Y cells. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009;19(5):356-62.

Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1989;26(6):719-23.

Parkinson Study Group. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA.* 2002;287(13):1653-61.

Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull.* 1992;29(5):699-701.

Pervin S, Singh R, Chaudhuri G. Nitric-oxide-induced Bax integration into the mitochondrial membrane commits MDA-MB-468 cells to apoptosis: essential role of Akt. *Cancer Res.* 2003;63(17):5470-9.

Puttonen KA, Lehtonen S, Lampela P, Männistö PT, Raasmaja A. Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(1):182-9.

Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol.* 2009;66(3):378-89.

Pytlowany M, Strosznajder JB, Ješko H, Cakała M, Strosznajder RP. Molecular mechanism of PC12 cell death evoked by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(2):339-47.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991;266(7):4244-50.

Raicevic N, Mladenovic A, Perovic M, Harhaji L, Miljkovic D, Trajkovic V. Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology*. 2005;48(5):720-31.

Ramamurthy S, Ronnett GV. Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. *J Physiol*. 2006;574(Pt 1):85-93.

Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Pharmacology*, Churchill Livingstone, Oxford, 2003.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1383-435.

Ries V, Henchcliffe C, Kareva T, Rzhetskaya M, Bland R, During MJ, Kholodilov N, Burke RE. Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18757-62.

Ries V, Silva RM, Oo TF, Cheng HC, Rzhetskaya M, Kholodilov N, Flavell RA, Kuan CY, Rakic P, Burke RE. JNK2 and JNK3 combined are essential for apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra, but are not required for axon degeneration. *J Neurochem*. 2008;107(6):1578-88.

Roberts DJ, Lin H, Strange PG. Mechanisms of agonist action at D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol*. 2004;66(6):1573-9.

Romero M, Harrak Y, Basset J, Ginet L, Constans P, Pujol MD. Preparation of N-arylpiperazines and other N-aryl compounds from aryl bromides as scaffolds of bioactive compounds. *Tetrahedron*. 2006;62:9010-6.

Ronnett GV, Ramamurthy S, Kleman AM, Landree LE, Aja S. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J Neurochem*. 2009;109 Suppl 1:17-23.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006;443(7113):780-6.

Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo H, Saeki K, Isemura M, Yuo A. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38

mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J.* 2002;368(Pt 3):705-20.

Salinas M, Martín D, Alvarez A, Cuadrado A. Akt1/PKBalpha protects PC12 cells against the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium and reduces the levels of oxygen-free radicals. *Mol Cell Neurosci.* 2001;17(1):67-77.

Sánchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron.* 1999;22(3):623-33.

Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(2):421-7.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(1):172-88.

Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):721-38.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990;54(3):823-7.

Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):159-70.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007;26(7):1749-60.

Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron.* 2011;70(6):1033-53.

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(13):7772-7.

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.; Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(10):1230-54.

Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited *Food Chem.*, 2009;113(4):1202-5.

Shibata H, Katsuki H, Okawara M, Kume T, Akaike A. c-Jun N-terminal kinase inhibition and alpha-tocopherol protect midbrain dopaminergic neurons from interferon-gamma/lipopolysaccharide-induced injury without affecting nitric oxide production. *J Neurosci Res.* 2006;83(1):102-9.

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5(5):415-8.

Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1992;142(2):128-30.

Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW, DeFranco DB. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem.* 2000;275(16):12200-6.

Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(9):2151-66.

Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, Schwarz J. 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *J Neural Transm.* 2000;107(3):281-93.

Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J Biol Chem.* 2003;278(11):8904-12.

Szeto HH. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *AAPS J.* 2006;8(3):E521-31.

Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2000;166(1):29-43.

Terman A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. *Gerontology*. 1995;41 Suppl 2:319-26.

Terwel D, Nieland LJ, Schutte B, Reutelingsperger CP, Ramaekers FC, Steinbusch HW. S-nitroso-N-acetylpenicillamine and nitroprusside induce apoptosis in a neuronal cell line by the production of different reactive molecules. *Eur J Pharmacol*. 2000;400(1):19-33.

Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(10):1230-54.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000;288(5467):870-4.

Tovilovic G, Zogovic N, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Janjetovic K, Vucicevic L, Kostic-Rajacic S, Schrattenholz A, Isakovic A, Soskic V, Trajkovic V. Arylpiperazine dopaminergic ligands protect neuroblastoma cells from nitric oxide (NO)-induced mitochondrial damage and apoptosis. *ChemMedChem*. 2012;7(3):495-508.

Trumbull KA, Beckman JS. A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(7):1627-39.

Tseng YT, Hsu YY, Shih YT, Lo YC. Paeonol attenuates microglia-mediated inflammation and oxidative stress-induced neurotoxicity in rat primary microglia and cortical neurons. *Shock*. 2012;37(3):312-8.

Uchiyama Y, Koike M, Shibata M, Sasaki M. Autophagic neuron death. *Methods Enzymol*. 2009;453:33-51.

Uehara T, Kikuchi Y, Nomura Y. Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 1999;72(1):196-205.

Virdee K, Xue L, Hemmings BA, Goemans C, Heumann R, Tolkovsky AM. Nerve growth factor-induced PKB/Akt activity is sustained by phosphoinositide 3-kinase dependent and independent signals in sympathetic neurons. *Brain Res*. 1999;837(1-2):127-42.

Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G, Masini M, Gori Z, Pollera M, Bergamini E. The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999;54(8):B318-23.

Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 1996;184(4):1425-33.

Wang H, Xu H, Dyck LE, Li XM. Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from beta-amyloid peptide(25-35)-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis. *J Neurosci Res*. 2005;81(4):572-80.

Wang J, Du XX, Jiang H, Xie JX. Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappa B modulation in MES23.5 cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(2):178-83.

Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 1991;254(5034):1001-3.

Wink DA, Miranda KM, Espey MG. Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(7):621-3.

Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2010;13(7):805-11.

Woodgate A, MacGibbon G, Walton M, Dragunow M. The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;69(1):84-92.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.

Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB, Schulz JB. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10433-8.

Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(8):1086-92.

Xilouri M, Stefanis L. Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(6):701-19.

Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5256-64.

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8469-78

Yang TT, Wang SJ. Aripiprazole and its human metabolite OPC14857 reduce, through a presynaptic mechanism, glutamate release in rat prefrontal cortex: possible relevance to neuroprotective interventions in schizophrenia. *Synapse*. 2008;62(11):804-18.

Yun HY, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(10):5773-8.

Zeng XW, Li MW, Pan J, Ji TL, Yang B, Zhang B, Wang XQ. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1/2 regulated by nitric oxide is associated with neuronal survival in hippocampal neurons in a rat model of ischemia. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(20):3367-72.

Zhang Y, Zhang HM, Shi Y, Lustgarten M, Li Y, Qi W, Zhang BX, Van Remmen H. Loss of manganese superoxide dismutase leads to abnormal growth and signal transduction in mouse embryonic fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(8):1255-62.

Zhang Y, Zhao B. Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2003;86(5):1189-200.

Zheng W, Wang H, Zeng Z, Lin J, Little PJ, Srivastava LK, Quirion R. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Brain Res*. 2012;1470:145-58.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*. 2000;151(3):483-94.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002;417(6884):74-8.

Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 1999;286(5445):1741-4.; Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schweneker M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*. 2002;277(34):31099-106.

Zou MH, Hou XY, Shi CM, Kirkpatrick S, Liu F, Goldman MH, Cohen RA. Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34003-10.

Zou MH, Hou XY, Shi CM, Nagata D, Walsh K, Cohen RA. Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002;277(36):32552-7.

BIOGRAFIJA

Gordana I. Tovilović je rođena 19.01.1978. godine u Šapcu. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, 2002. godine sa prosečnom ocenom 8,94. Posle studija završila je obavezan pripravnički staž u apoteci. Od oktobra 2003. godine radi u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" na Odeljenju za biohemiju, pod rukovodstvom dr Mirka Tomića. Magistarski rad pod nazivom "Biohemijska i neurofarmakološka ispitivanja ekstrakta biljne vrste *Gentiana kochiana*" je odbranila 31.08.2007. godine.

Naučno istraživački rad Gordane Tovilović realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2003. do 2005. godine učestvovala je u realizaciji projekta "Karakterizacija potencijalnog psihotropnog dejstva nekih novosintetisanih i prirodnih neuroaktivnih supstanci" (evidencioni broj 1704, rukovodilac dr Mirko Tomić). Istraživački rad nastavila je u periodu od 2005. do 2010. godine na realizaciji projekta "Biomedicinska ispitivanja i razvoj nekih novih psihotropnih supstanci" (evidencioni broj 143032, rukovodilac dr Mirko Tomić). Od 2011. godine učesnik je 2 projekta "Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija" (evidencioni broj 173053, rukovodilac dr Ljubica Harhaji-Trajković) i "Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje israne u Srbiji" (evidencioni broj 41030, rukovodilac dr Marija Glibetić).

Koautor je 15 radova u međunarodnim časopisima.