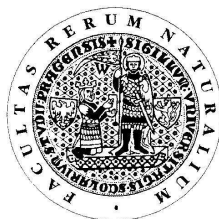


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Mikulášková

Vliv různých druhů antidiabetických intervencí na vývoj
neurodegenerativních změn *in vitro* a *in vivo*

Influence of various antidiabetic interventions
on the development of *in vitro* and *in vivo*
neurodegenerative changes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, RVO:61388963 a grantu GAČR P303/12/0576.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova nemoc

neuroprotektivita

inzulínová signální kaskáda

fa/fa potkani

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. a Mgr. Andree Špolcové za výborné vedení této práce, za jejich čas a podnětné rady k mé práci. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Blance Železné CSc. za obětavou pomoc při experimentální činnosti i při psaní mé bakalářské práce.

Také chci poděkovat Bc. Veronice Nagelové a Mgr. Martině Holubové za cenné rady při práci v laboratoři a pomoc při experimentální činnosti a celému pracovnímu kolektivu Dr. Jiřího Jiráčka za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za motivaci a trpělivost při mých studiích.

OBSAH

OBSAH	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1. ÚVOD:	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Alzheimerova nemoc	10
2.2 Amyloidní beta peptid (A β).....	11
2.3 Protein tau.....	12
2.4 Posttranslační modifikace.....	13
2.4.1 Fosforylace	13
2.4.2 O-GlcNAcylation (O-GlcNAc).....	14
2.4.3 Patologická fosforylace tau	14
2.5 Diabetes mellitus 2.typu	15
2.5.1 Diabetes mellitus 3.typu	15
2.6. Látky ovlivňující funkci inzulínu a jejich neuroprotektivní účinky	15
2.6.1 Leptin.....	15
2.6.2 Inzulín a inzulínový růstový faktor-1 (IGF-1).....	16
2.6.3 Ghrelin	16
2.6.4 [DLys ³]GHRP-6	17
2.6.5 Metformin.....	17
2.6.6 Glukagonu podobný peptid (GLP-1).....	17
2.6.7 Peptid CART (<i>cocaine-and amphetamine-regulated transcript</i>).....	18
2.7 Feochromocytální buňky PC12	18
2.8 Myší modely inzulínové a leptinové rezistence	19
2.8.1 Diabetické myši - db/db myši.....	19
2.8.2 „Zucker“ obézní potkani - fa/fa potkani	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Materiál.....	21
3.1.1 Chemikálie.....	21
3.1.2 Protilátky	22
3.1.3 Přístroje.....	23
3.2 Pěstování buněčné linie PC12	23
3.3 Agregace A β (25-35).....	23

3.4 Vliv A β (25-35) a látek ovlivňujících funkci inzulínu na buňky PC12 diferencované na neurony	24
3.5 Zpracování hipokampů fa/fa potkanů	25
3.6 Metoda Western blot	25
3.6.1 SDS-PAGE	25
3.6.2 Přenos proteinů na PVDF membránu nebo nitrocelulosovou membránu	26
3.6.3 Detekce fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů na PVDF membráně a nitrocelulosové membráně	26
3.6.4 Detekce aktinu	26
3.7 Statistické vyhodnocení výsledků	27
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1 Pěstování buněčné linie PC12	28
4.2 Toxický účinek A β (25-35) na buněčnou linii PC12	29
4.3 Neuroprotektivní účinky látek ovlivňujících funkci inzulínu proti toxickému působení A β (25-35) peptidu	30
4.4 Základní metabolické parametry fa/fa potkanů	31
4.5 Western blot monitorující signalizaci inzulínové kaskády	34
4.6 Detekce proteinu tau v hipokampech fa/fa potkanů	37
5. ZÁVĚR	40
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- A β – amyloidní beta peptid
Akt – protein kinasa B
AN – Alzheimerova nemoc
APP – prekurzorový amyloidní protein
APS – persíran amonný
BSA - hovězí sérový albumin
CART - *cocaine-and amphetamine-regulated transcript*
CNS – centrální nervová soustava
db/db myši – obézní diabetické myši
DM2 – diabetes mellitus 2.typu
fa/fa potkani - „Zucker“ obézní potkani
GLP – glukagonu podobný peptid
GSK3 - glykogen syntasa kinasa 3
IGF-1 – inzulínový růstový faktor-1
IRS – inzulín-receptor-substrát
MAP - mitogeny aktivovaný protein
NGF – nervový růstový faktor
O-GlcNAc - O-glukosyl – N-acetyl
PBS – solný fosfátový pufr
PDK1 - fosfoinositid-dependentní proteinkina 1
PEI - polyethylenimin
PI3K - fosfatidyl-inositol-3-kinasa
PIP2 - fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfát
PIP3 - fosfatidyl-inositol-3, 4,5-trisfosfát
PVDF – polyvinylidene difluorid
SDS - dodecylsulfát sodný
S.E.M. – střední chyba průměru
TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TBS – fyziologický roztok NaCl pufrovaný Tris

1. ÚVOD:

Alzheimerova nemoc (AN) je celosvětovým zdravotním problémem. V současné době trpí touto nemocí každý 20. člověk ve věku nad 65 let. V roce 2008 bylo na světě 37 milionů nemocných a odhaduje se, že do roku 2050, pokud nebude zavedena účinná léčba, vzroste tento počet v celém světě minimálně na 115 milionů případů. Nemoc prozatím není možné vyléčit [1, 2]. Při včasné stanovení diagnózy je možné pouze zpomalit její rozvoj. Hlavním problémem při hledání účinné terapie je fakt, že dosud nejsou známy mechanismy, které vedou k rozvoji AN [1].

Alzheimerova nemoc se projevuje dvěma patologickými změnami neuronů v mozku – nadměrnou fosforylací intracelulárního cytoskeletálního proteinu tau (tau) a tvorbou nerozpustných extracelulárních plaků amyloidního beta peptidu (A β) [2].

V rozsáhlých epidemiologických studiích bylo prokázáno, že změny při Alzheimerově chorobě souvisejí s rezistencí k inzulínu v centrální nervové soustavě (CNS), a byl pro ní navržen nový termín diabetes 3. typu [3].

Cílem této práce je zkoumat neurodegeneraci způsobenou účinkem amyloidního beta peptidu u feochromocytomálních buněk PC12 diferencovaných na neurony a možnost jejího potlačení látkami s antidiabetickým účinkem (leptin, inzulín, glukagonu podobný peptid-1, antagonisté ghrelinu, peptid CART). Dále jsme se zaměřili na patologickou fosforylací proteinu tau a centrální inzulínovou signalizaci v hipokampech fa/fa potkanů, kteří reprezentují zvířecí model diabetu 2. typu.

Zkoumání inzulínové signální dráhy v mozku a fosforylace tau pomůže objasnit souvislost mezi diabetem 2. typu a Alzheimerovou nemocí. Látky používané k léčbě diabetu 2. typu by mohly zabránit patologické fosforylací proteinu tau a/nebo tvorbě plaků amyloidního beta peptidu.

Cíle práce:

1. Prokázat toxický účinek amyloidního beta peptidu ($A\beta$ (25-35)) na buňky PC12 diferencované na neurony z hlediska viability.
2. Charakterizovat ovlivnění účinku $A\beta$ (25-35) antidiabetickými látkami v buňkách PC12 diferencovaných na neurony z hlediska viability.
3. Studovat patologickou fosforylaci proteinu tau a centrální inzulínovou signalizaci v hipokampech obézních fa/fa potkanů, kteří slouží jako model inzulínové rezistence s následkem diabetu 2. typu.

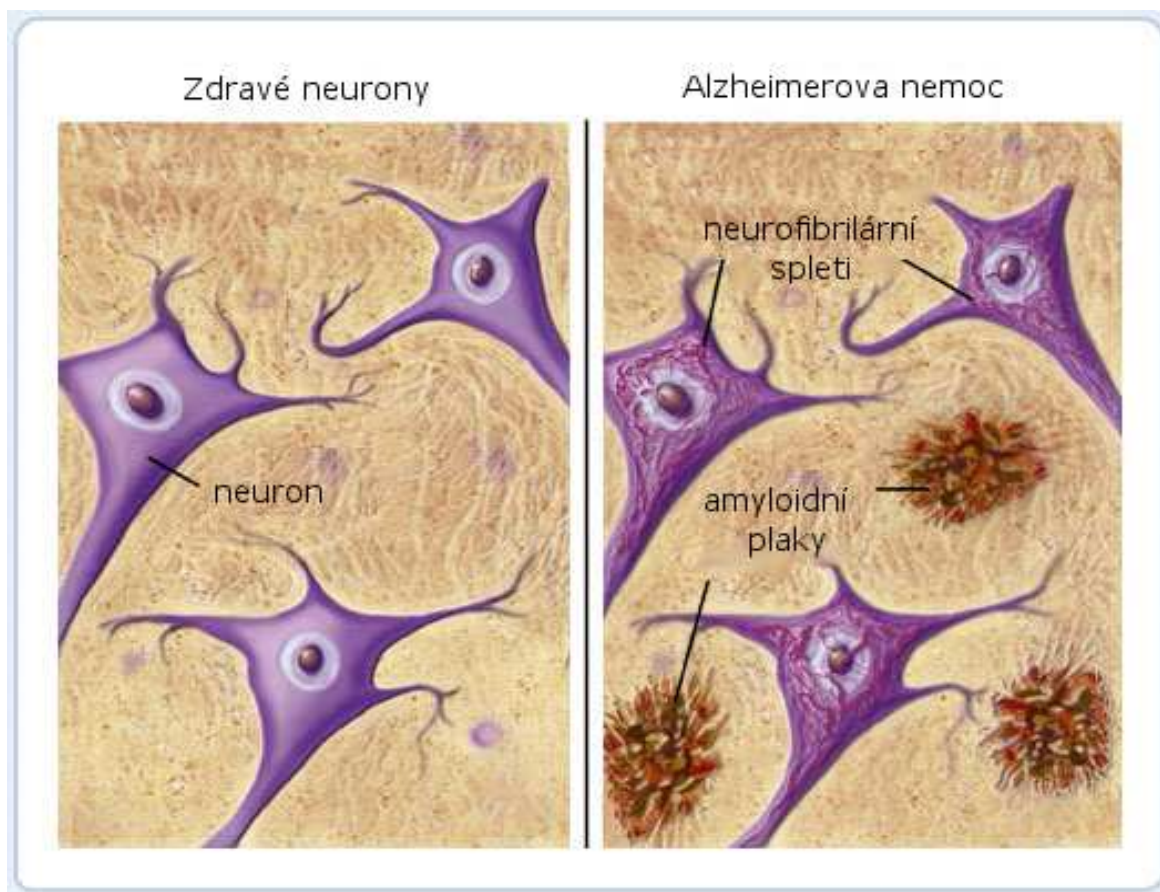
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc je neurodegenerativní onemocnění mozku, které souvisí s věkem. Prvními příznaky nemoci jsou zhoršení paměti, poruchy učení, dále ztráta poznávacích schopností, zhoršená orientace v čase a prostoru, změny v osobnosti, chování, nálady, a ztráta autonomních funkcí. Stav se postupně zhoršuje, dochází k postupné demenci a nakonec dochází k úmrtí, průměrně 9 let po diagnóze [4, 5].

První částí mozku, která je poškozená při Alzheimerově nemoci, je hipokampus. Ten je součástí velkého mozku a je centrem krátkodobé paměti. Zpracovává informace z mozkové kůry a z limbického systému a předává je do předního talamu, hypotalamu a dalších částí mozku. Tyto aktivity hipokampu jsou základem ukládání informací do dlouhodobé paměti [6].

Z neuropatologického hlediska je Alzheimerova nemoc charakterizována dvěma změnami. Je to tvorba neurofibrilárních spleť a senilních plaků. Neurofibrilární spleti jsou intracelulární agregáty tvořené hyper- a abnormálně fosforylovaným proteinem tau, který při fyziologických podmínkách podporuje strukturu shluků mikrotubulů. Senilní plaky jsou extracelulární agregáty tvořené shlukováním oligomerů nerozpustného amyloidního beta peptidu (obr.1). V mozku pacientů s AN dochází také k postupné ztrátě acetylcholinergních receptorů. Acetylcholin je neurotransmitter, který se významně podílí na procesech paměti a učení [4, 5].



Obrázek 1 Neurodegenerativní změny při Alzheimerově nemoci [7]

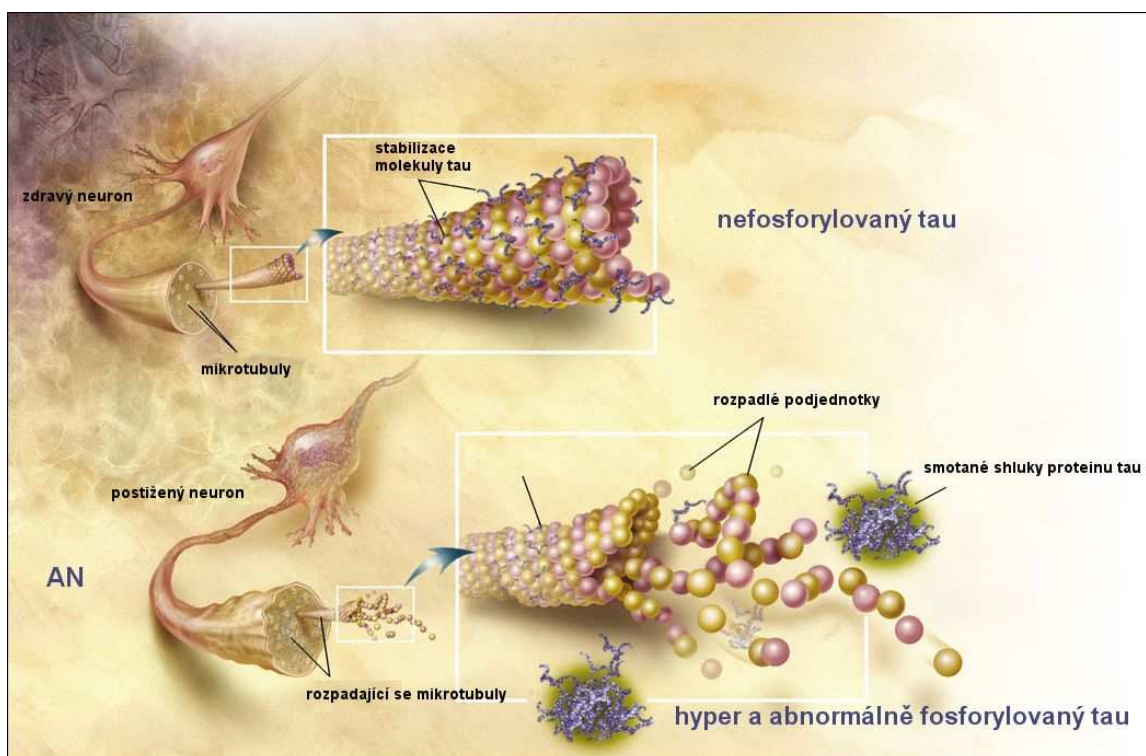
2.2 Amyloidní beta peptid (A β)

A β vzniká z prekursorového amyloidního proteinu (APP). APP je membránový protein přirozeně se vyskytující v buňkách centrální nervové soustavy a na periférii. Primární funkce APP není známa, ale víme, že se jako regulátor účastní tvorby synapsí a transportu železa. APP může být štěpen α -, β -, nebo γ -sekretasou. Za fyziologických podmínek je štěpen α -sekretasou. Při patologických stavech převažuje štěpení APP pomocí β - a γ -sekretasy, čímž dochází k tvorbě A β . Po rozštěpení APP γ -sekretasou vznikne A β , který je tvořen 36-43 aminokyselinami. Tvoří-li se nadměrné množství A β , dochází k jeho polymerizaci a ukládání v podobě extracelulárních plaků.

A β také vyvolává oxidativní poškození a zánět. Navíc zvyšuje patologickou fosforylaci tau proteinu a následně způsobuje vznik neurofibrilárních spleť, agregátů fosforylovaného proteinu tau [8, 9]. K experimentům se často používá syntetický fragment A β (25-35) jehož sekvence je: Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met. Účinky A β (25-35) na neurony jsou ve srovnání s účinky A β (1-41) stejné, nebo dokonce vyšší [9].

2.3 Protein tau

Protein tau patří do skupiny proteinů spojených s mikrotubuly. Jeho funkcí je podpora spojování tubulinu do mikrotubulů v mozku. Je to tedy protein, který zpevňuje mikrotubulární struktury axonů. Mikrotubuly udržují tvar buňky a tvoří dráhy pro axonální transport nervového vzruchu. Tau také tvoří některé vazby mezi mikrotubuly a jinými cytoskeletárními prvky nebo proteiny. Protein tau je v mozku zdravého člověka fosforylovaný třikrát až čtyřikrát méně než v mozku Alzheimerického. Analýzy odhalily, že jeho nadměrná fosforylace je jedním z důležitých procesů, který vede k jeho agregaci a neschopnosti podpory mikrotubulárních struktur (obr. 2) [10, 11].



Obrázek 2 Nefosforylovaný a fosforylovaný protein tau [12]

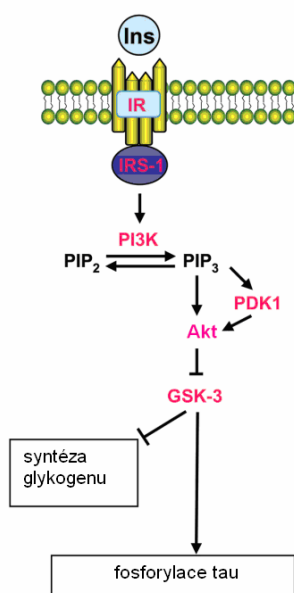
2.4 Posttranslační modifikace

Intracelulární proteiny mohou být buď O-glukosyl-N-acetyl (O-GlcNAc) glykosylovány nebo fosforylovány [13].

2.4.1 Fosforylace

Do procesu fosforylace proteinu tau jsou zapojeny kinasy, například mitogeny aktivované proteiny (MAP), glykogen syntasa kinasa 3 (GSK3), tau tubulin kinasy a další. Procesu defosforylace proteinu tau se účastní endogenní fosfatasy, např. fosfatasa 2A [11].

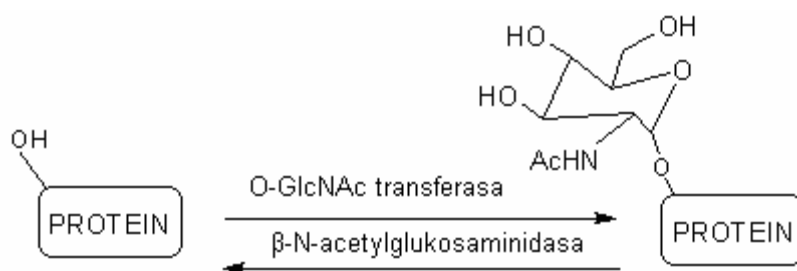
Procesy fosforylace jsou zahrnuty také v inzulínové signální kaskádě. Inzulín v mozku, podobně jako v periferních tkáních, po vazbě na receptory stimuluje jejich autofosforylaci a aktivuje signální kaskádu (obr.3). Je aktivována, tedy fosforylována, regulační podjednotka p85 fosfatidyl-inositol-3-kinasy (PI3K) s následnou fosforylací fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) na fosfatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃). PIP₃ dále fosforylací aktivuje proteinkinasu B (Akt) přes fosfoinositid-dependentní proteinkinasu 1 (PDK1). Akt fosforyluje serin v N-koncové části GSK-3. Za těchto podmínek dochází k fyziologické syntéze glykogenu, tudíž nedochází k patologické fosforylaci tau [13, 14, 15]. Porušení inzulínové signální kaskády vede ke snížení fosfosforylace GSK-3 β , které má za následek její aktivaci. Tato aktivace má za následek zvýšenou fosforylaci proteinu tau.



Obrázek 3 Inzulínová signalizační kaskáda s návazností na fosforylaci proteinu tau [15]

2.4.2 O-GlcNAcylation (O-GlcNAc)

O-glycosylation of intracellular proteins is characterized by the addition of O-glucosyl-N-acetylglucosamine residue to serines and threonines in proximity of prolines, that is, serines and threonines, which can be phosphorylated (fig. 4). The function of O-GlcNAc is not fully known, we know that it is involved in transcriptional regulation, cell activation, regulation of cell cycle and exposure of protein complexes.



Obrázek 4 O-GlcNAc glycosylation β -N-acetylglucosamine on serine or threonine [13]

O-glycosylation is regulated by glucose metabolism and has an opposite effect to phosphorylation. O-GlcNAc negatively influences O-phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS), PI3 kinases and protein kinase Akt. Reduced activation of Akt leads to reduced expression of transporters of glucose in the brain – GLUT1 and GLUT3. Paradoxically, O-GlcNAcylation reduces phosphorylation and thus increases the activity of kinase GSK-3, which is considered the main kinase in the process of phosphorylation of tau. The result is hyperphosphorylation of tau protein, which is a decisive neurodegenerative change in AD [14, 15, 16].

2.4.3 Pathological phosphorylation of tau

In the brain isoform of tau protein, there are 79 potential and at least 30 described sites of serine and threonine phosphorylation [11].

2.5 Diabetes mellitus 2.typu

Diabetes mellitus 2. typu je metabolická porucha související se zvyšujícím se věkem, genetickými dispozicemi, obezitou, nedostatkem pohybu a špatným zdravotním stylem.

Podstatou této poruchy je inzulínová rezistence, která je způsobena nerovnováhou mezi sekrecí inzulínu a jeho účinkem v metabolismu glukosy. Slinivka břišní u diabetiků 2. typu produkuje dostatečné, dokonce nadbytečné množství inzulínu, ale tělo je na něj rezistentní. Důsledkem této nemoci je hyperinzulinémie a hyperglykémie, což vede k mnoha zdravotním komplikacím jako jsou infarkt myokardu, cévní mozkové příhody, periferní onemocnění cév, nefropatie, neuropatie, retinopatie a jiné [18].

2.5.1 Diabetes mellitus 3.typu

Četné studie dospěly k závěru, že diabetes mellitus 2. typu je spojen nejen s kardiovaskulárním onemocněním a ischemickou cévní mozkovou příhodou, ale také s rozvojem neurodegenerativních změn a s rozvojem demence. Pacienti s diabetem mají vyšší pravděpodobnost vzniku AN. V mozku pacientů s AN byla prokázána porucha inzulínové signalizace související s inzulínovou rezistencí [15], dále snížení využití glukosy a energetického metabolismu. Alzheimerova nemoc tudíž není pouze neurologické onemocnění, ale také onemocnění neuroendokrinní, proto byl navržen nový název diabetes mellitus 3. typu [3, 18].

2.6. Látky ovlivňující funkci inzulínu a jejich neuroprotektivní účinky

2.6.1 Leptin

Leptin patří mezi peptidy ovlivňující příjem potravy. Je vylučován buňkami tukové tkáně, a jeho koncentrace v krevní plazmě závisí na množství tukové tkáně. U obézních pacientů je velmi vysoká hladina leptinu, která vede k rozvoji leptinové rezistence.

V organismu je hlavním úkolem leptinu adaptace na hladovění. Energetickou bilanci leptin reguluje pomocí negativní zpětné vazby. Do CNS proniká přes hematoencefalitickou bariéru do hypotalamu, kde potlačuje expresi a sekreci orexigenních neuropeptidů, které zvyšují příjem potravy, a stimuluje expresi a sekreci anorexigenních neuropeptidů, což má za následek snižování příjmu potravy [19, 20].

Předešlé studie prokázaly sníženou hladinu leptinu u pacientů s AN. Účinky leptinu jsou popsány jako neuroprotektivní. Snižuje tvorbu A β jak *in vitro*, tak *in vivo* a snižuje fosforylaci tau proteinu *in vitro* [5, 21].

2.6.2 Inzulín a inzulínový růstový faktor-1 (IGF-1)

Inzulín je hormon, který mimo jiné hraje důležitou roli v metabolismu glukosy. Je vylučován z beta buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. V periférii ovlivňuje vstřebávání glukosy do tukových (adipocytů) a svalových (myocytů) buněk [22]. Podle současných studií inzulín reguluje metabolismus glukosy v mozku. Hraje důležitou roli ve vývoji neuronální aktivity a ovlivňuje učení a paměť [23]. Inzulín řadíme mezi anorexigenní peptidy dlouhodobě působící na příjem potravy. Do mozku inzulín prostupuje přes hematoencefalitickou bariéru pomocí receptoru.

Inzulínový růstový faktor-1 (IGF-1) je hormon zajišťující normální růst a funkci centrální nervové soustavy. Zároveň bylo zjištěno, že inzulín a IGF-1 snižují patologickou fosforylaci tau proteinu [24]. Tento účinek byl dokázán *in vitro* i *in vivo*.

Inzulín a IGF-1 dále zlepšují signalizaci, učení a paměť a přispívají k ovlivnění neurotransmiterů v CNS [25]. Problémem je, že pacienti s AN jsou k účinkům inzulínu rezistentní.

Receptory pro IGF-1 a inzulín jsou v neuronech a astrocytech. Vysokou koncentraci receptorů pro inzulín a IGF-1 obsahují hipokampus a hypotalamus.

2.6.3 Ghrelin

Dalším peptidem dlouhodobě působícím na příjem potravy je ghrelin. Je jedinou periferní orexigenní látkou. Plazmatické hodnoty ghreluinu se zvyšují před jídlem a během hladovění a klesají na nejnižší hodnotu během jedné hodiny po jídle.

V organismu má ghrelin řadu fyziologických funkcí, jako například zvyšování příjmu potravy, stimulace uvolnění růstového hormonu, zvyšování motility žaludku a žaludeční sekrece, dále ovlivňuje funkci slinivky břišní a metabolismus glukosy, má vliv na metabolismus kostí a má kardioprotektivní účinky [26].

Neuroprotektivita ghreluinu je doposud otázkou. Účinky ghreluinu sice byly označeny jako neuroprotektivní, ale na druhou stranu ghrelin při příjmu potravy a zánětu působí jako fyziologický antagonist neuroprotektivního leptinu, tudíž je možná i hypotéza, že neuroprotektivně působí antagonisté ghreluinu.

2.6.4 [DLys³]GHRP-6

Peptid [DLys³]GHRP-6 (His-DTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂) má anorexigenní účinky a je dosud jediným známým peptidovým antagonistou ghrelinu. Váže se specificky k receptoru pro ghrelin. Po periferním podání snižuje příjem potravy jak u štíhlých, tak u obézních myší [35].

2.6.5 Metformin

Metformin patří do skupiny biguanidů. Používá se jako orální lék na DM2, zejména u lidí s nadváhou a obezitou. Metformin zvyšuje citlivost jater, svalů, a jiných tkání na inzulín a snižuje hladinu glukosy v krvi. Hladinu glukosy v krvi reguluje tím, že potlačuje produkci glukosy v játrech a zvyšuje vychytávání glukosy v periferních částech, jako například v kosterních svalech. Mechanismus činnosti v kosterních svalech zůstává nejasný.

U metforminu bylo prokázáno, že aktivuje jeden z hlavních enzymů defosforylujících tau – fosfatasu 2A a tím snižuje patologickou fosforylaci proteinu tau [27].

2.6.6 Glukagonu podobný peptid (GLP-1)

GLP-1 je inkretinový hormon produkovaný ve střevě, který významně ovlivňuje metabolismus glukosy. Inkretiny stimulují schopnosti organismu uvolňovat dostatečné množství inzulínu při zvýšené hladině glukosy v krvi a inhibovat uvolňování glukagonu. *In vitro* i *in vivo* studie ukázaly, že GLP-1 má protektivní účinky [28].

GLP-1 hraje důležitou roli v mozku. Jeho receptory jsou lokalizovány v neuronech, a má vlastnosti jako růstový faktor. Chrání neurony před neurotoxicitou a snižuje indukci apoptózy neuronů. GLP-1 ovlivňuje formování paměti. Po intravenózním podání GLP-1 agonistů myším modelům AN bylo pozorováno zlepšení prostorového a asociativního učení [29].

Mnoho analogů GLP-1 je na konci etapy klinických zkoušek pro léčbu DM2. Syntetičtí agonisté GLP-1 exenatid a liraglutid jsou v současné době schváleni pro léčbu DM2 [30].

2.6.7 Peptid CART (*cocaine-and amphetamine-regulated transcript*)

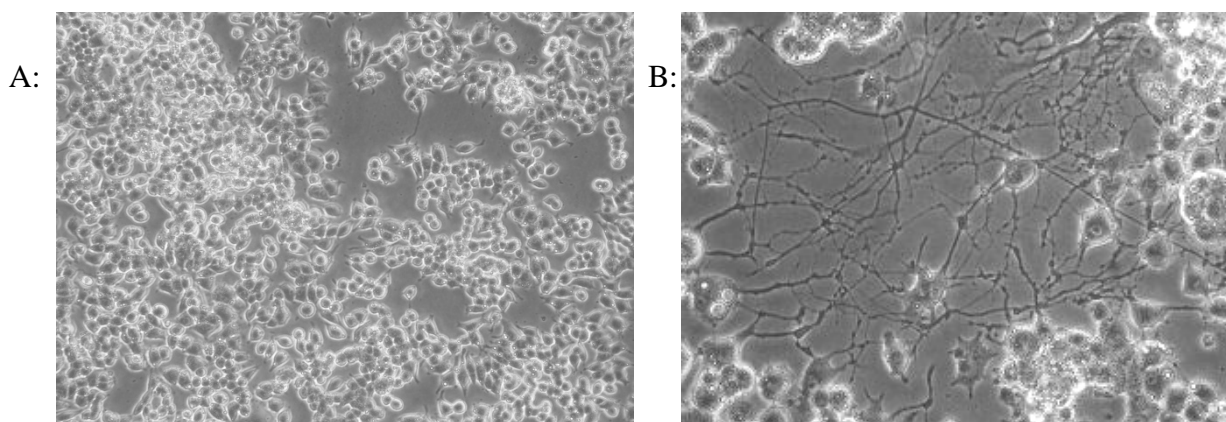
Peptid CART byl poprvé izolován z ovčího hypotalamu [31]. Podáním kokainu a amfetaminu dochází ke zvýšené expresi mRNA pro tento peptid. Odtud pochází název CART, neboli *cocaine-and amphetamine-regulated transcript* [32]. Peptid CART se vyskytuje v centrální nervové soustavě ve všech částech mozku a to pouze v neuronech, kde plní funkci neurotransmiterů. Nachází se také v periférii - v dřeni nadledvin, Langerhansových ostrůvcích, pankreatu a v trávicím traktu. Z fyziologických procesů snižuje příjem potravy a to anorexigenně, dále ovlivňuje pocit sytosti, stres, neuroendokrinní regulaci, srdeční funkce, bolest a pohyblivost střev a ovlivňuje funkci pankreatu [33].

Sekrece peptidu CART je řízena leptinem. *In vitro* i *in vivo* pokusy ukázaly, že peptidy CART mají neuroprotektivní účinky a chrání mozek před ischemií [34].

2.7 Feochromocytální buňky PC12

Linie PC12 byla odvozena z neuroendokrinního potkaního nádoru (feochromocytomu) dřene nadledvin. Buňky PC12 mají kulatý nebo polygonální tvar a rostou v malých shlucích (obr. 5A). Pokud jsou buňky pěstovány v přítomnosti nervového růstového faktoru (NGF), přestávají se dělit a růst a vytvářejí nervovou síť (obr. 5B). Diferenciace je reverzibilní. Pokud je odstraněn NGF, buňky do 24 hodin ukončují proces diferenciace a do 72 hodin se začínají opět dělit a vracet se ke svým původním vlastnostem [36].

Působení toxického A β (25-35) na buňky PC12 diferencované na neurony buňky oslabí, vyvolá neurotoxicitu, apoptózu a fosforylaci tau proteinu [37].



Obrázek 5 Buněčná linie PC12.

(A) Nediferencované PC12, hustota buněk $8 \cdot 10^5$ buněk/ml média. (B) Buňky PC12 diferencované na neurony účinkem NGF, hustota buněk $5 \cdot 10^5$ buněk/ml média.

2.8 Myší modely inzulinové a leptinové rezistence

2.8.1 Diabetické myši - db/db myši

Diabetické myši db/db (viz obr. 6) jsou genetickým modelem DM2. Mají zvýšené hladiny leptinu kvůli mutaci na diabetes genu (db) kódujícího receptor pro leptin. V raném věku slouží db/db myši jako typický model DM2. Objevuje se u nich hyperinzulinémie a progresivní hyperglykémie. Se zvyšujícím se věkem sledujeme ztrátu funkce pankreatu, tudíž snížení hladiny inzulinu a extrémně vysoké hladiny glukosy. Jsou to podobné projevy nemoci jako u lidí, kdy první stadium nemoci je inzulinová rezistence a poté se objevuje i onemocnění slinivky břišní, která se vyčerpává nadměrnou sekrecí inzulinu [38].

V kortexu a hipokampu těchto myších modelů byla prokázána s věkem související zvýšená fosforylace tau. Tyto výsledky zvýšené fosforylace tau by mohly být klíčovým faktorem pro zvýšený výskyt AN u diabetiků [39].



Obrázek 6 db/db myš a její kontrola [40]

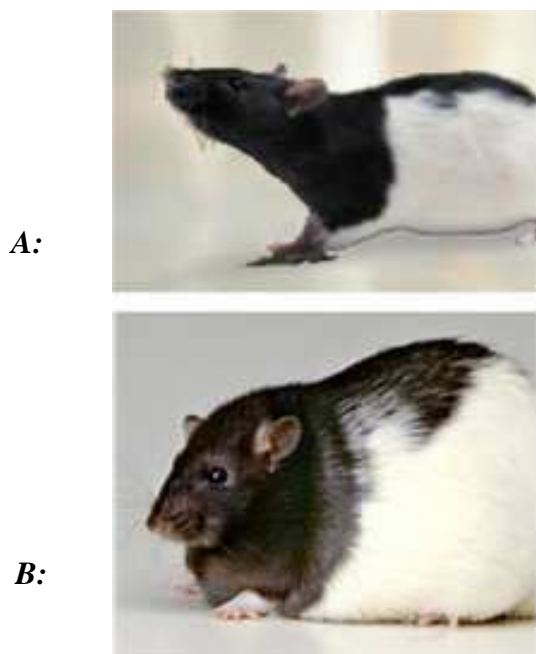
2.8.2 „Zucker“ obézní potkani - fa/fa potkani

„Zucker“ obézní potkani (fa/fa) jsou genetický model potkanů, využívaný k výzkumu obezity a hypertenze a jsou považováni za model prediabetu [41]. Pojmenování „Zucker“ získali po průkopnících ve studii o genetice obezity - Lois M. Zuckerovi a Theodore F. Zuckerovi [42].

Fa/fa potkani dědí mutaci receptoru leptinu, což má za následek předčasný nástup obezity [41].

Během prvních 22 dní života rostou stejně rychle jako potkani štíhlí ze stejného vrhu a nejsou viditelně obézní. Po 22. dni života se fa/fa potkani viditelně odlišují od svých štíhlých kontrol rozšířením břicha a nárůstem tukové hmoty. Výrazné zvýšení růstu fa/fa potkanů je doprovázeno hyperfágií (zvýšením příjmu potravy, přejídáním) a snížením energetického výdeje, což je důsledek poruchy leptinové signalizace, díky porušenému leptinovému receptoru (obr. 7).

Fa/fa potkani trpí hyperleptinémií a hyperinzulinémií, a jsou rezistentní k účinkům obou těchto hormonů [43].



Obrázek 7 Zuckerových potkan [44]

A: kontrolní potkan

B: obézní fa/fa potkan

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

A β (25-35)- Amyloidní beta peptid (25-35)	Polypeptide Laboratories France SAS, Strasbourg, Francie
Akrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Complete (směs inhibitorů proteas)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo
Deoxycholát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fetální telecí sérum	Biochrom AG, Berlin, Německo
Glycerol	PENTA, Chrudim, ČR
Glycin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Koňské sérum tepelně inaktivované	Invitrogen Grand, Island, NY, USA
L-glutamin 200 mmol/dm ³	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Methanol	PENTA, Chrudim, ČR
NaCl	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaF	PENTA, Chrudim, ČR
Na ₃ VO ₄	Sigma, St. Louis, MO, USA
Nervový růstový faktor (NGF)	Sigma, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Persíran amonný (APS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 (růstové médium)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, Velká Británie
Trizma base (Tris)	Sigma, St. Louis, MO, USA

Tween-20	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
West Femto SuperSignal	Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA. Všechny pufrы byly připravovány v deionizované vodě.

3.1.2 Protilátky

Fosfo-Akt (Ser473) (D9E) XP™ rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo -Akt (Thr308) (C31E5) rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Akt (pan) (C67E7) rabbit mAb	Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo -GSK-3β (Ser9) (5B3) rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo -PDK1 (ser241) (C49H2) rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Rabbit (polyclonal) Anti-Tau [pS ³⁹⁶]	Invitrogen, NY, USA
Anti-Tau Cter	dar od Dr. M.-C.Galas, INSERM, Lille, Francie
Monoclonal Anti-β-Actin mouse mAb	Sigma, St. Louis, MO, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

3.1.3 Přístroje

Biohazardní box, EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí

Centrifuga HETTICH Universal 320, Tuttlingen, Německo

CO₂ inkubátor MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko

Mikroskop Stand Axiovert 40 CFL, Weiss, Oberkochen, Německo

Digitální fotoaparát Canon Powershot G9 M52, Tokio, Japonsko

CCD kamera LAS-3000, Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Germany

Centrifuga Jouan C3i/CR 3, Jouan, Saint-Herblain, Francie

Mini-Protean 3, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Spektrometr UV/VIS Jenway 6105, Richmond scientific LTD., Velká Británie

3.2 Pěstování buněčné linie PC12

Buněčná linie PC12 byla zakoupena od firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Kultivace byla prováděna ve sterilním prostředí v inkubátoru v atmosféře 95% vzduchu a 5% oxidu uhličitého při 37 °C. Pěstována byla v růstovém médiu RPMI1640 s přídatkem 10% koňského séra a 5% fetálního telecího séra, L-glutaminu o finální koncentraci 2 mmol dm⁻³ a penicilinu/streptomycinu ve finální koncentraci 2 mmol dm⁻³. Pro optimální růst buněčné linie bylo jedenkrát týdně prováděno pasážování.

3.3 Agregace A β (25-35)

A β (25-35) byl naředěn deionizovanou vodou na koncentraci 1 mg ml⁻¹. Poté probíhala 24 hodinová inkubace v CO₂ inkubátoru při 37 °C, během které došlo k tvorbě neurotoxických fibril peptidu. Po inkubaci byl peptid uchováván při -80 °C.

3.4 Vliv A β (25-35) a látek ovlivňujících funkci inzulinu na buňky PC12 diferencované na neurony

K pokusům byly použity buňky PC12 pěstované na 24-jamkových destičkách (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), potažené polyethyleniminem (PEI) s průměrem jamky 15 mm. Diferenciace na neurony bylo dosaženo pěstováním buněčné linie v přítomnosti NGF ve finální koncentraci 50 ng ml⁻¹. Buňky byly pěstovány 5 dní, přičemž každé 2 dny probíhala výměna starého média za nové médium s NGF. Optimální hustota byla 5 · 10⁵ buněk na jamku.

Pátý den byly do jednotlivých jamek ve sterilním prostředí pipetovány A β (25-35), samotné potenciálně neuroprotektivní látky (finální koncentrace viz Tabulka 1) nebo současně potenciálně neuroprotektivní látky a A β (25-35). Při kombinaci byla pipetována nejprve samotná látka, 30 minut po ní A β (25-35). Poté byly buňky inkubovány s přidanými látky 24 hodin při 37 °C. Samotné látky či kombinace byly vždy pipetovány v duplikátech.

Po 24 hodinové inkubaci bylo ze všech jamek odsáto médium a buňky byly třikrát promyty pufrům PBS. Ze dna jamek, na které byly přisedlé, byly buňky odebrány pomocí trypsinu a jejich počet byl stanoven na mikroskopu pomocí Bürkerovy počítací komůrky.

Tabulka 1 Koncentrace A β (25-35) a potenciálně neuroprotektivních látek použitých v experimentech s diferencovanými buňkami PC12

Přidané látky	c [mol dm ⁻³]	Dodavatel
A β (25-35)	10 ⁻⁵	Polypeptide Laboratories France SAS, Strasbourg, Francie
CART	10 ⁻⁵	dar od Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko
[Dlys ³]GHRP-6	10 ⁻⁴	syntetizováno v ÚOCHB AV ČR, Praha, Česká republika
Inzulín	10 ⁻⁵	Sigma, St. Louis, MO, USA
Leptin	5 · 10 ⁻⁶	Sigma, St. Louis, MO, USA
Liraglutid	2 · 10 ⁻⁴	Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko

3.5 Zpracování hipokampů fa/fa potkanů

Potkaní hipokampy byly dar od Dr. Rafała Olszanieckého (Jagelonská Univerzita v Krakově, katedra farmakologie) a Ing. Š. Zórada, CSc. z Ústavu Experimentální Endokrinologie SAV v Bratislavě z jejich společného experimentu. Potkani byly získány z firmy Harlan Laboratories, Teklad, Itálie. Po dekapitaci byly hipokampy izolovány a zamraženy v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mladí fa/fa potkani byly ve věku 12-ti týdnů a staří fa/fa potkani ve věku 33 týdnů.

Zvážené potkaní hipokampy byly homogenizovány pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým tloučkem. Podle hmotnosti hipokampu byl přidán lyzační pufr ($62,5\text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl $\text{pH}=6,8$ s přidavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Triton X-100, Complete (1 tableta na 50 ml pufru), 50 mmol dm^{-3} NaF, 1 mmol dm^{-3} Na_3VO_4). Přidáno bylo vždy takové množství lyzačního pufru, aby odpovídalo 10-ti násobku hmotnosti hipokampu. Zhomogenizované vzorky byly 10 minut sonikovány a poté 10 minut zahřívány při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla stanovena koncentrace bílkovin podle Bradfordové [45]. Odpovídající koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky hovězího sérového albuminu (BSA). Vzorky byly naředěny lyzačním vzorkovým pufrem ($62,5\text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl $\text{pH}=6,8$ s přidavkem 2% SDS, 10% glycerolu, 1% bromfenolové modře, 0,5% β -merkaptoethanolu, 50 mmol dm^{-3} NaF, 1 mmol dm^{-3} Na_3VO_4) tak, aby výsledná koncentrace proteinu byla $1\text{ }\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$. Alikvoty zpracovaných potkaních hipokampů byly skladovány v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Metoda Western blot

3.6.1 SDS-PAGE

Elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Homogenizované potkaní hipokampy byly nejprve sonikovány 2 minuty, poté byly zahřívány při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minuty a naposled byly centrifugovány 5 minut při 500 x g a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do každé jamky v gelu bylo nanášeno vždy 15 μg proteinu. Následně byla prováděna elektroforéza v elektrodovém pufru (25 mmol dm^{-3} Tris, 192 mmol dm^{-3} glycin, 1% SDS), která probíhala při konstantním napětí ve dvou krocích, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté při 175 V po dobu 50-60 minut.

3.6.2 Přenos proteinů na PVDF membránu nebo nitroceluloseovou membránu

Pro stanovení fosforylace signalizačních proteinů byly proteiny přeneseny z gelu na membránu PVDF-Immobilon^{TM-P} (Sigma-Aldrich, USA), nebo na nitroceluloseovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru (25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glycin, 20% methanol) při konstantním napětí 30 V v 6 °C přes noc.

3.6.3 Detekce fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů na PVDF membráně a nitroceluloseové membráně

Po přenosu proteinů byly membrány promyty v promývacím pufru TBS/Tween (20 mmol dm⁻³ Tris, 136 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1% Tween-20) 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly membrány blokovány v blokovacím pufru (TBS/Tween s přidavkem 5% netučného sušeného mléka, resp. 5% BSA, 1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄, 50 mmol dm⁻³ NaF) 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly třikrát promyty promývacím pufrem TBS/Tween po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány 1 nebo 2 hodiny s primární protilátkou zředěnou blokovacím pufrem (protilátky proti Akt, GSK-3β, PDK1 a tau fosforylovanému na Ser396 byly ředěny 1:1000, protilátka proti celkovému proteinu tau 1:10000). Poté byly membrány třikrát promyty promývacím pufrem po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány se sekundární protilátkou značenou peroxidasou ředěnou blokovacím pufrem 1:2000. Následně byly membrány opět promyty třikrát po 5 minutách v promývacím pufru TBS/Tween. Chemiluminiscence po aplikaci činidla Femto Pierce SuperSignal, byla detekována v CCD kameře.

3.6.4 Detekce aktinu

Po detekci fosforylace signalizačních proteinů na membráně byl detekován aktin, který ukazuje celkové množství proteinů. Membrány byly nejdříve pětkrát promyty promývacím pufrem TBS/Tween po dobu 5 minut. Poté byly inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě s protilátkou proti aktinu. Tato protilátka byla naředěna v blokovacím pufru 1:2000 (TBS/Tween, 5% netučného sušeného mléka, 1 mmol dm⁻³ Na₃VO₄, 50 mmol dm⁻³ NaF). Po inkubaci byly membrány promyty třikrát promývacím pufrem

TBS/Tween. Byla aplikována sekundární protilátka proti myšímu IgG ředěná blokovacím pufrem 1:2000 a 1 hodinu probíhala inkubace. Poté byly opět membrány promyty třikrát promývacím pufrem TBS/Tween.

Detekce chemiluminiscence po aplikaci Femto Pierce SuperSignal byla provedena na CCD kameře.

3.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení toxického účinku A β (25-35) a neuroprotektivních účinků antidiabetických intervencí byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), metoda one-way ANOVA (Analysis of variance) s následným Dunnettovým post-hoc testem.

Pro vyhodnocení hladiny fosforylace jednotlivých proteinů při metodě Western blot bylo využito denzitometrické stanovení pomocí programu Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA). Pro statistické vyhodnocení stanovení fosforylace proteinů v hipokampech byla použita metoda one-way ANOVA s následným Bonferroniho testem.

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm S.E.M (střední chyba průměru). Data byla statisticky významná pokud $P < 0,05$ %.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Pěstování buněčné linie PC12

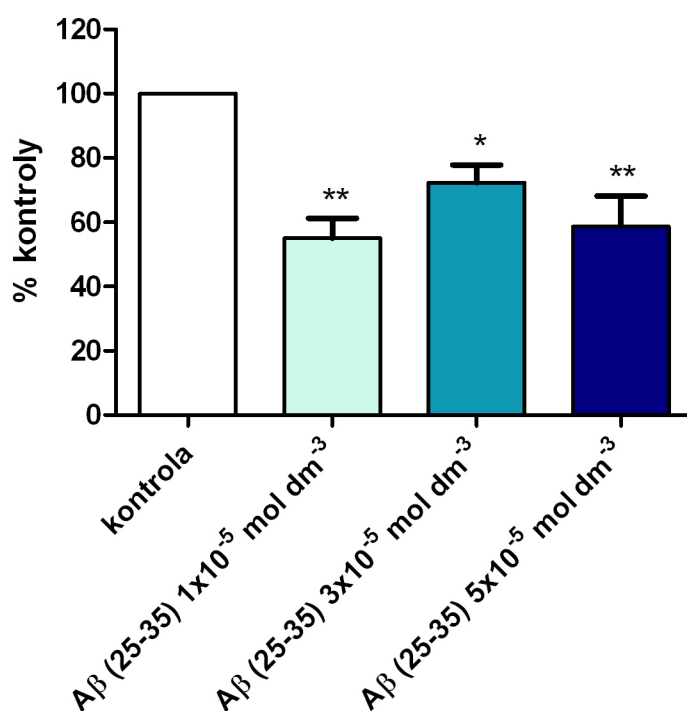
Feochromocytální buňky PC12 se dobře rozrůstaly na destičkách potažených PEI, které zajistilo na dně jamky homogenní rozložení buněk a vyšší přilnavost buněk při pokusech. Pro správný průběh pokusů a zachování buněčných linií bylo zajištěno sterilní prostředí při pěstování buněk. Buňky byly diferencovány na neurony pomocí NGF.

4.2 Toxický účinek A β (25-35) na buněčnou linii PC12

Toxický účinek A β (25-35) na viabilitu buněk PC12 diferencovaných na neurony byl zkoumán po 24 hodinovém působení tohoto peptidu přidaného do růstového média. Při prvních experimentech byla zjišťována nejnižší koncentrace, která způsobí statisticky významné snížení viability buněk. Proto byly prováděny experimenty s různou koncentrací A β (25-35) v médiu. Pro tyto pokusy byly buňky pěstovány na 24-jamkových destičkách potažených PEI.

Při 24 hodinové inkubaci A β (25-35) při 37 °C v deionizované vodě docházelo k její agregaci. Teprve agregovaný peptid, který tvoří nerozpustné fibrily, má toxický účinek na růst buněk [46].

Jak je patrné z grafu na obrázku 8, po 24 hodinové inkubaci diferencovaných PC12 buněk s agregovaným A β (25-35) docházelo ke statisticky významnému snižování počtu buněk už při koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm $^{-3}$. Proto další pokusy na buněčné linii PC12 byly prováděny s touto koncentrací A β (25-35). Tyto výsledky potvrzující účinek A β (25-35) již při této koncentraci jsou ve shodě s pokusy prováděnými Liu a kol. [47].



Obrázek 8 Graf znázorňující toxický účinek A β (25-35) v různých koncentracích
Diferencované buňky PC12 byly inkubovány s různými koncentracemi A β (25-35) po dobu 24 hod. Po inkubaci byla monitorována viabilita. Jako kontrola jsou brány buňky, na které se nepůsobilo A β (25-35). Jejich počet je definován jako 100%. Data jsou průměr \pm SEM. $n = 3$ pokusy.
Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

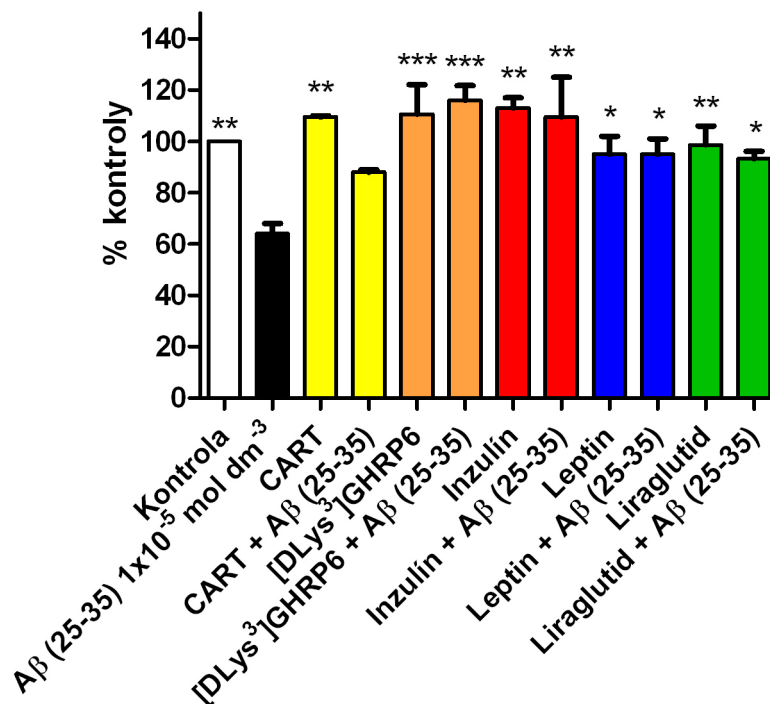
4.3 Neuroprotektivní účinky látek ovlivňujících funkci inzulinu proti toxickému působení A β (25-35) peptidu

Pro zkoumání neuroprotektivního působení látek ovlivňujících inzulin byly opět používány buňky PC12 diferencované na neurony pomocí NGF, pěstované na 24-jamkových destičkách potažených PEI. Po 24 hodinové inkubaci buněk s A β (25-35), potenciálně neuroprotektivními látkami a s kombinací neuroprotektivní látky a A β (25-35) byla spočítána viabilita. Pokusy byly prováděny v duplikátech a alespoň třikrát zopakovány. Koncentrace jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Při experimentech bylo prokázáno, že [DLys³]GHRP6, inzulin, leptin a liraglutid mají neuroprotektivní účinky, jelikož při současné inkubaci s A β (25-35) neklesala viabilita buněk (obr. 9). Naopak viabilita byla signifikantně zvýšená oproti buňkám, na které se působilo pouze samotným A β (25-35). Neuroprotektivní působení leptinu a inzulinu je v souladu se studiemi prováděnými *in vivo* Jolivatem a kol. [23] a Grecem a kol [48, 49]. Neuroprotektivní účinek [DLys³]GHRP6 v našem experimentu nasvědčuje hypotéze, že antagonisté ghrelinu by mohly mít neuroprotektivní účinky. To by bylo v rozporu s teorií, že ghrelin má neuroprotektivní účinky, ale naopak v souladu s faktem, že fyziologický antagonist ghrelinu, leptin, má jednoznačně účinky neuroprotektivní [48, 49].

Prozatím nebyly prokázány neuroprotektivní účinky peptidu CART, jelikož při inkubaci peptidu CART s A β (25-35) docházelo ke snižování počtu buněk. Tento počet není signifikantně zvýšen oproti buňkám, na které se působilo pouze samotným A β (25-35). V pokusech s peptidem CART budeme dále pokračovat.

Tyto prvotní studie látek ovlivňujících působení inzulinu slouží k vybrání nejvhodnějších kandidátů pro zkoumání neuroprotektivních účinků *in vivo* na myších modelech diabetu 2. typu. Mimo popsané experimenty, při kterých je zjišťována viabilita buněk po působení potenciálně neuroprotektivních látek, bude v dalších studiích prokazován vliv těchto intervencí na snižování hyperfosforylace proteinu tau.



Obrázek 9 Graf znázorňující účinek Aβ (25-35) a potenciálně neuroprotektivních látek na viabilitu diferencovných buněk PC12

K buňkám linie PC12 diferencovaným na neurony pomocí NGF byly přidány potenciálně neuroprotektivní látky (koncentrace jednotlivých látek viz tabulka 1) a po 30 minutách byl přidán Aβ (25-35) na 24 hodin. Poté byla monitorována viabilita. Jako kontrola jsou brány buňky, na které se nepůsobilo ani Aβ (25-35) ani žádnou potenciálně neuroprotektivní látkou. Jejich počet je definován jako 100%.

Data jsou průměr ± SEM. n = 3 pokusy. Signifikance je * P < 0,05, ** P < 0,01 a *** P < 0,001 oproti buňkám, na které se působilo pouze Aβ (25-35).

4.4 Základní metabolické parametry fa/fa potkanů

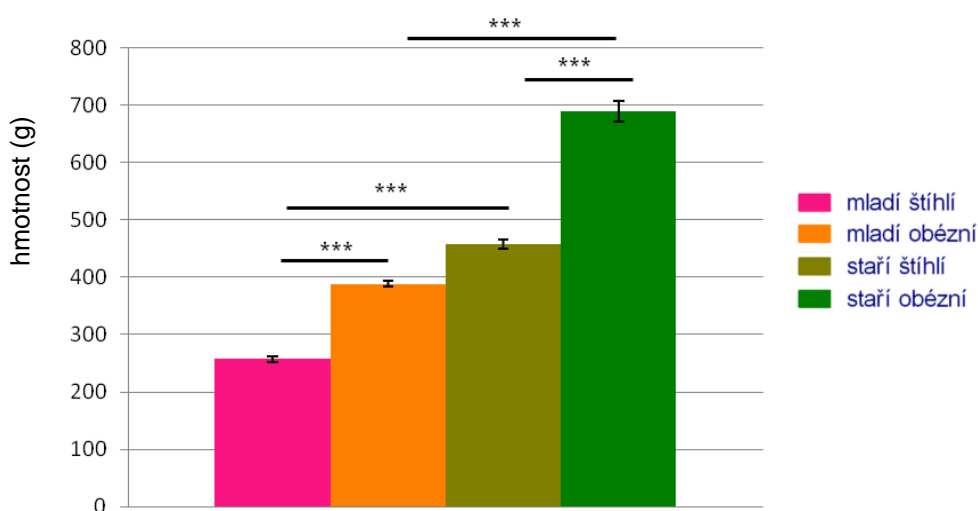
Hipokampy fa/fa potkanů pocházejí ze společného experimentu Katedry farmakologie Jagelonské univerzity v Krakově (Dr Rafał Olszaniecki) a z Ústavu experimentální endokrinologie Slovenské Akademie Věd v Bratislavě (Ing. Š. Zórada, CSc.). Se svolením Š. Zórada jsou zde uvedeny základní metabolické parametry potkanů naměřené v laboratoři v Bratislavě. Jak je patrné z následujících grafů na obr. 10, u fa/fa potkanů sledujeme jak u mladých, tak u starých statisticky významné zvýšení hmotnosti oproti štíhlým potkanům ze stejného vrhu. Dále mají obézní fa/fa potkani zvýšenou hladinu glukosy, která se navíc zvyšuje s věkem. U obézních fa/fa

potkanů jsou také oproti štíhlým potkanům stejného vrhu signifikantně zvýšené hladiny leptinu a inzulínu. Zvýšená hladina inzulínu a glukosy u fa/fa potkanů svědčí o rozvoji inzulínové rezistence, kterou při svých studiích pozoroval i Durham a Truett [43]. Ostatní data jsou ve shodě s daty stanovenými v laboratoři Henriksena a kol. [50].

Tyto výsledky potvrzují, že fa/fa potkani jsou vhodným modelem pro zkoumání neurodegenerativních změn v mozku vedoucích k rozvoji AN u pacientů s DM2, zvláště pak pro zjišťování ovlivnění spouštění inzulínové signalizační kaskády a hyperfosforylace tau proteinu.

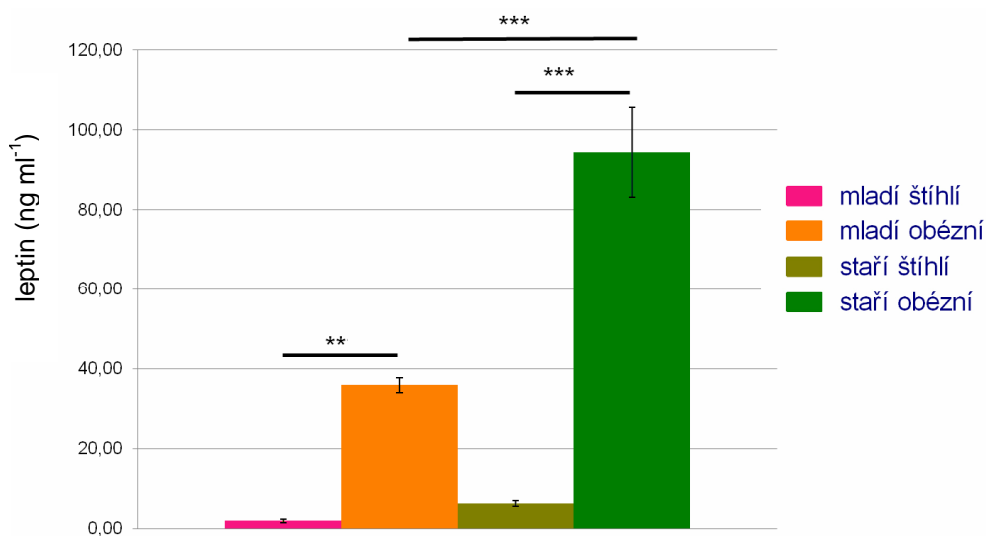
Tělesná hmotnost

A:

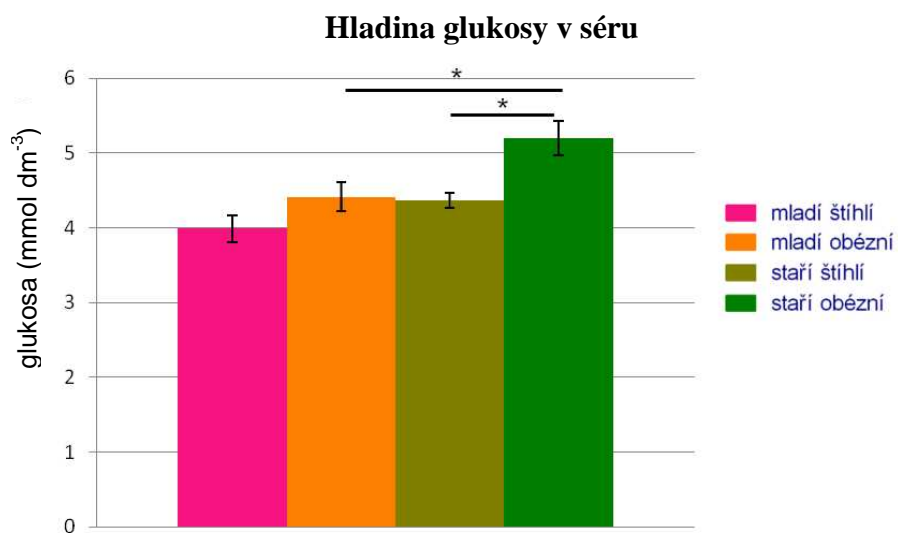


Hladina leptinu v séru

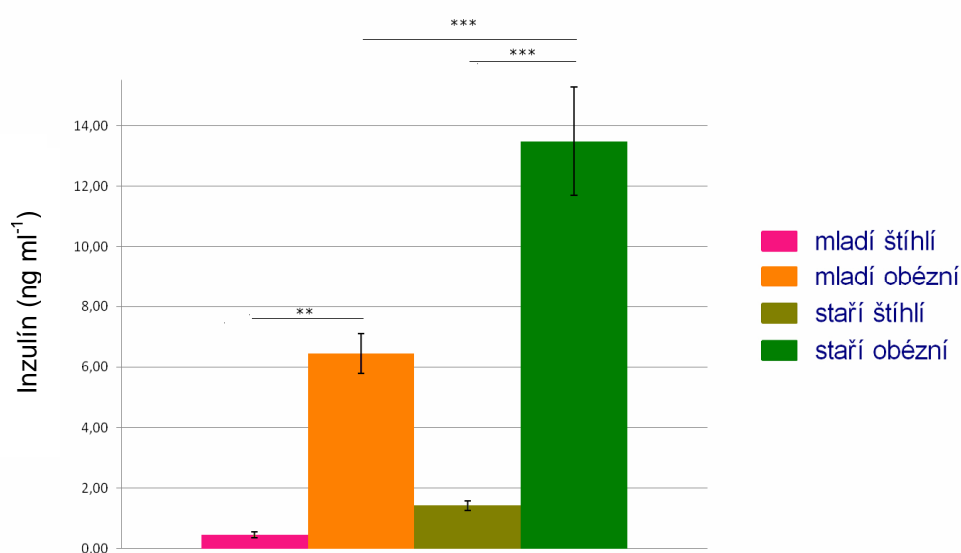
B:



C:



D:



Obrázek 10 Grafy základních metabolických parametrů fa/fa potkanů

Měření byla prováděna v laboratořích v Bratislavě. Glukosa byla měřena pomocí glukometru.

Hladina inzulínu a leptinu byla měřena v séru RIA kitem (Merck, Darmstadt, Germany). Data jsou průměr ± SEM. n = 6-8 potkanů. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

4.5 Western blot monitorující signalizaci inzulínové kaskády

Aktivace signalizace inzulínové kaskády v hipokampech fa/fa potkanů byla prokazována pomocí metody Western blot. Již u PDK1 (viz obr. 11, 12A), která je první z námi detekovaných kinas, dochází k významnému poklesu fosforylace tohoto proteinu u starých potkanů a to jak u fa/fa, tak u jejich kontrol. Méně fosforylována je PDK1 už i u mladých, 12 týdnů starých, fa/fa potkanů. Významné snížení fosforylace u starých jedinců (fa/fa i jejich kontrol), které poukazuje na sníženou aktivaci inzulínové signální kaskády, je patrné i u fosforylace proteinu Akt na serinu 473 (viz obr. 11, 12B). Fosforylace Akt na threoninu 308 nebyla významně snížena ani u mladých, ani u starých jedinců (viz obr. 11, 12C). Jak je patrné z obrázku 11 a 12D, u starých jedinců, fa/fa potkanů i kontrol, došlo k významnému poklesu celkového množství kinasy Akt. Všechny výše uvedené výsledky jsou ve shodě s daty zjištěnými Ying Liu a kol., kteří detekovali hladiny výše zmíněných kinas v kortexu pacientů s AN a/nebo DM2 [15], či s daty E. Steena a kol., kteří pozorovali obdobné změny u pacientů s AN [3]. Podobné změny pozorovali i M. Schubert a kol. při experimentech na NIRKO myších a jejich kontrolách, což jsou myši, které nemají funkční inzulínový receptor [51].

Snížení fosforylace Akt mělo za následek snížení fosforylace GSK-3 β , které je opět významně sníženo jak u starých fa/fa potkanů, tak u jejich kontrol (viz obr. 11, 12E). Zjištěné výsledky jsou opět ve shodě s literaturou [3, 15, 51].

Prezentované výsledky slouží jako prvotní studie prokazující sníženou aktivaci inzulínové signální kaskády u jedinců s DM2. V dalších studiích budou detekována množství a fosforylace dalších kinas zahrnutých v této kaskádě a to nejen u fa/fa potkanů, ale i u myších modelů inzulínové rezistence. Na těchto modelech bude prokazován i vliv krátkodobé a dlouhodobé léčby potenciálně neuroprotektivními látkami, které budou vybírány na základě *in vitro* experimentů.

Č. potkana	Mladí štíhlí							Mladí obézní							Stáří štíhlí							Stáří obézní						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
PDK1 (58-68 kDa)																												
Akt Ser473 (60 kDa)																												
Akt Thr308 (60 kDa)																												
Akt celkový (60 kDa)																												
GSK-3β (46 kDa)																												
Aktin (42 kDa)																												

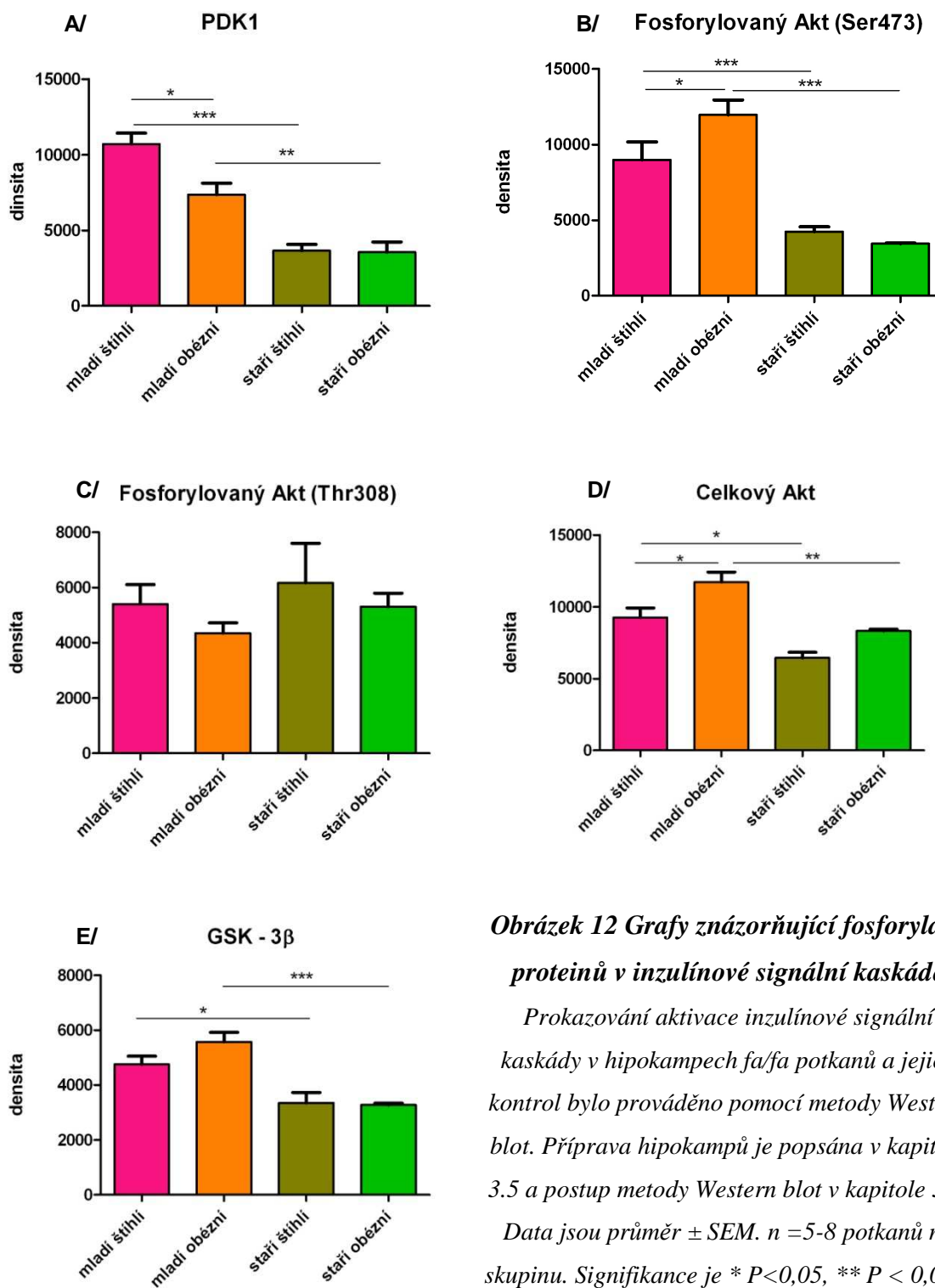
Obrázek 11 Stanovení fosforylace proteinů v inzulinové kaskádě

Prokazování aktivity inzulinové signální kaskády v hipokampech fa/fa potkanů a jejich kontrol bylo prováděno pomocí metody

Western blot. Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.5 a postup metody Western blot v kapitole 3.6.

Data jsou průměr ± SEM. $n = 5-8$ potkanů na skupinu. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

Mladí jedinci: 12 týdnů staří, staří jedinci: 33 týdnů staří.



Obrázek 12 Grafy znázorňující fosforylace proteinů v inzulínové signální kaskádě

Prokazování aktivace inzulínové signální kaskády v hipokampech fa/fa potkanů a jejich kontrol bylo prováděno pomocí metody Western blot. Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.5 a postup metody Western blot v kapitole 3.6.

Data jsou průměr \pm SEM. $n = 5-8$ potkanů na skupinu. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a

*** $P < 0,001$.

4.6 Detekce proteinu tau v hipokampech fa/fa potkanů

Metodou Western blot bylo v hipokampech fa/fa potkanů a jejich kontrol detekováno množství proteinu tau. Ve shodě s výsledky prezentovanými v kapitole 4.5 bylo prokázáno, že snížení fosforylace GSK-3 β způsobilo zvýšení fosforylace proteinu tau na serinu 396. Ke zvýšení došlo nejen u starých fa/fa potkanů a jejich kontrol, ale už i u mladých fa/fa potkanů, u kterých byla detekována zvýšená fosforylace tau oproti štíhlým kontrolám (viz obr. 13, 14A). Dochází-li ke snížení fosforylace GSK-3 β , dochází k aktivaci této kinasy, která je hlavní kinasou způsobující abnormální fosforylace proteinu tau [15]. Obdobné výsledky získali při svých experimentech i Kim a kol [39], Jolivat a kol [23] a E. Planel a kol. [25]. Hyperfosforylace proteinu tau vede k jeho agregaci. Agregovaný protein pak tvoří neurofibrilární spleti v těle neuronů, které jsou jedním z hlavních znaků AN. Hyperfosforylovaný agregovaný protein tau už zároveň není schopen udržovat mikrotubulární struktury axonů, což je jeho fyziologickou funkcí. Dochází tak k neurodegenerativním změnám v CNS.

Celkové množství proteinu tau se významně neliší ani u starých, ani u mladých potkanů (viz obr. 13, 14B).

V dalších studiích bude detekována hyperfosforylace tau proteinu i na dalších epitopech proteinu pomocí specifických protilátek. Dále bude zkoumán vliv potenciálně neuroprotektivních látek na vývoj neurodegenerativních změn v mozku u myších modelů inzulinové rezistence.

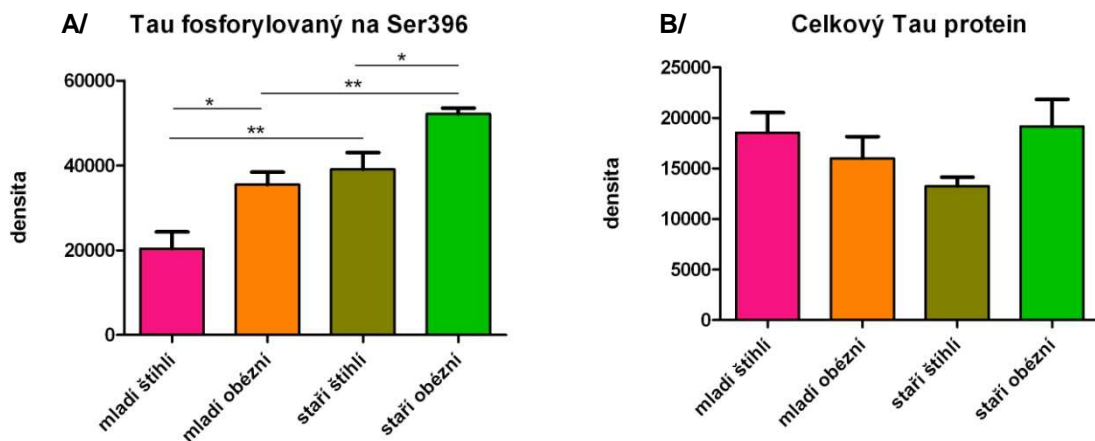
Č. potkana	Mladí štíhlí							Mladí obézní					Stará štíhlí					Stará obézní									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28
Tau celkový (50 kDa)																											
Tau Ser396 (50 kDa)																											
Aktin (42 kDa)																											

Obrázek 13 Stanovení fosforylace celkového proteinu tau pomocí specifických protilátek

Detekce proteinu tau v hipokampech *fá/fá* potkanů a jejich kontrol bylo prováděno pomocí metody Western blot. Celkový tau protein představuje celkové množství jak fosforylovaného, tak nefosforylovaného proteinu. Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.5 a postup metody Western blot v kapitole 3.6. Data jsou průměr \pm S.E.M. $n = 5-8$ potkanů na skupinu.

Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

Mladí jedinci: 12 týdnů starí, starí jedinci: 33 týdnů starí.



Obrázek 14 Grafy znázorňující detekci proteinu tau

Detekce proteinu tau v hipokampech fa/fa potkanů a jejich kontrol bylo prováděno pomocí metody Western blot. Celkový tau protein představuje celkové množství jak fosforylovaného, tak nefosforylovaného proteinu. Příprava hipokampů je popsána v kapitole 3.5 a postup metody Western blot v kapitole 3.6. Data jsou průměr \pm S.E.M. $n = 5-8$ potkanů na skupinu. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

5. ZÁVĚR

Na buněčné linii PC12 byl **prokázán toxický účinek A β (25-35)**. Po 24 hodinové inkubaci s toxickým A β (25-35) byl pozorován signifikantní pokles počtu buněk v médiu již při koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³.

Byl prokázán **neuroprotektivní účinek** inzulínu, leptinu, liraglutidu a antagonisty ghrelinu [DLys³]GHRP6 na buňkách PC12 diferencovaných na neurony pomocí NGF. Tyto látky byly inkubovány společně s toxickým A β (25-35). Po 24 hodinové inkubaci nebyla pozorována snížená viabilita buněk, která byla pozorována u buněk inkubovaných pouze se samotným A β (25-35). Neuroprotektivní účinek peptidu CART, který popisuje literatura, zatím nebyl našimi pokusy potvrzen [34].

Fa/fa potkani, jak staří, tak mladí, měli zvýšenou hladinu glukosy, leptinu a inzulínu a zvýšenou tělesnou hmotnost proti kontrolám, což je ve shodě s literaturou [43, 50]. U těchto potkanů byla zjišťována aktivita **inzulínové signální kaskády** v CNS, přesněji v hipokampech. Pomocí metody Western blot byla prokázána snížená aktivace inzulínové kaskády u starých fa/fa potkanů. Snížená aktivace inzulínové signální kaskády aktivovala činnost GSK-3 β , která způsobila hyperfosforylaci proteinu tau. Ten byl významně více fosforylován jak u mladých, tak u starých fa/fa potkanů. Hladina celkového proteinu tau, fosforylovaného i nefosforylovaného, nebyla významně ovlivněna.

Cíle práce byly splněny, výsledky budou použity pro další studie. Antidiabetické látky pomůžou při léčbě AN.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] C./X. Gong, K. Iqbal: **Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease.** *Curr Med Chem*, **15** (2008) 2321.
- [2] V. Frisardi, V. Solfrizzi, D. Seripa, C. Capurso, A. Santamato, D. Sancarlo, G. Vendemiale, A. Pilotto, F. Panza: **Metabolit-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease.** *Ageing Res Rev*, **9** (2010) 399.
- [3] E. Steen, B.M. Terry, E.J. Rivera, J.L. Canon, T.R. Neely, R. Tavares, X.J. Xu, J.R. Wands, S.M. de la Monte: **Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is type 3 diabetes?.** *J Alzheimers Dis*, **7** (2005) 63.
- [4] J.A. Luchsinger: **Insulin resistance, type 2 diabetes, and AD: cerebrovascular disease or neurodegeneration?.** *Neurology*, **75** (2010) 758.
- [5] V. Giordano, G. Peluso, M. Iannuccelli, P. Benatti, R. Nicolai, M. Calvani: **Systemic and Brain Metabolic Dysfunction as a New Paradigm for Approaching Alzheimer's Dementia.** *Neurochem Res*, **32** (2007) 555.
- [6] G. Burgos, D.A.V. Zamora, C.B. Zárate: **Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity.** *Int J Devl Neurosci*, **27** (2009) 741.
- [7] Dostupné z URL < <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html> > [cit. 3.5.2012]
- [8] H. S. Kim, D. Sul, J.Y. Lim, D. Lee, S.S. Joo, K. W. Hwang, S.Y. Park: **Delphinidin Ameliorates Beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity by Inhibiting Calcium Influx and Tau Hyperphosphorylation.** *Biosci Biotechnik Biochem*, **73** (2009) 1685.
- [9] Y.G. Kaminsky, M.W. Marlatt, M.A. Smith, E.A. Kosenko: **Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A β ₂₅₋₃₅.** *Exp Neurol*, **221** (2010) 26.
- [10] J. Zhang, G.V.W. Johnson: **Tau Protein Is Hyperphosphorylated in a Site-Specific Manner in Apoptotic Neuronal PC12 Cells.** *J Neurochem*, **75** (2000) 2346.
- [11] L. Buée, T. Bussiére, V. B. Scherrer, A. Delacourte, P.R. Hof: **Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.** *BRR*, **33** (2000) 95.
- [12] Dostupné z URL: <<http://www.highschoolbioethics.org/briefs/head-head-nfl-brain-injury/>> [cit. 3.5.2012]

- [13] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C.X. Gong: **Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease.** *J Neurochem*, **111** (2009) 242.
- [14] Y. Deng, B. Li, Y. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C.X. Gong: **Dysregulation of Insulin Signaling, Glucose Transporters, O-GlcNAcylation, and Phosphorylation of Tau and Neurofilaments in the Brain.** *Am J Pathol*, **175** (2009) 2089.
- [15] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Ch. X. Gong: **Deficient brain insulin signaling pathway in Alzheimer's disease and diabetes.** *J Pathol*, **225** (2011) 54.
- [16] T. Lefebvre, V. Dehennaut, C. Guinez, S. Olivier, L. Drougat, A.M. Mir, M. Mortuaire, A.S. Vercoutter-Edouart, J.C. Michalski: **Dysregulation of the nutrient / stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease.** *Biochim Biophys Acta*, **1800** (2010) 67.
- [17] J. E Rexach, P. M Clark, L. C Hsieh-Wilson: **Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain.** *Nature chem biol*, **4** (2008) 97.
- [18] L. Li, C. Hölscher: **Common Pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review.** *Brain Res Rev*, **56** (2007) 384.
- [19] K. Walder, A. de Silva: **Leptin and the treatment of obesity.** *Drug Develop Res*, **60** (2000) 66.
- [20] D.J. Porte, D. Baskin, M. Schwartz: **Leptin and insulin action in the central nervous system.** *Nutr Rev*, **60** (2002) 20.
- [21] N. Tezapsidis, J.M. Johnston, M.A. Smith, J.W. Ashford, G. Casadesus, N.K. Robakis, B. Wolozin, G. Perry, X. Zhu, S.J. Greco, S. Sarkar: **Leptin: A Novel Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease.** *J Alzheimers Dis*, **16** (2009) 731.
- [22] S. Cardovo, S. Correia, R.X. Santos, C. Carvalho, M.S. Santos, C.R. Oliveira, G. Perry, M.A. Smith, X. Zhu, P.I. Morreia: **Insulin is a Two-Edged Knife on he Brain.** *J Alz Dis*, **18** (2009) 483.
- [23] C.G. Jolivald, C.A. Lee, K.K. Beiswenger, J.L. Smith, M. Orlov, M.A. Torrance, E. Masliah: **Defective Insulin Signaling Pathway and Increased Glycogen Synthase Kinase-3 Activity in the Brain of Diabetic Mice: Parallels With Alzheimer's Disease and Correction by Insulin.** *J Neurosci Res*, **86** (2008) 3265.
- [24] E.J. Rivera, A. Goldin, N. Fulmer, R. Tavares, J.R. Wands, S.M. de la Monte: **Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine.** *J Alz Dis*, **8** (2005) 247.

- [25] E. Planel, Y. Tatebayashi, T. Miyasaka, L. Liu, L. Wang, M. Herman, W. Hang Yu, J.A. Luchsinger, B. Wadzinski, K.E. Surf, A. Takashima: **Insulin Dysfunction Induced In Vivo Tau Hyperphosphorylation through Distinct Mechanisms.** *J of Neurosci*, **27** (2007) 13635.
- [26] M. Kojima , K. Kangawa : **Ghrelin: structure and function.** *Physiol Rev*, **85** (2005) 495.
- [27] E. Kickstein, S. Krauss, P. Thornhill, D. Rutschow, R. Zeller, J. Sharkey, R. Williamson, M. Fuchs, A. Köhler, H. Glossmann, R. Schneider, C. Sutherland, S. Schweiger: **Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling.** *Proc Natl Acad Sci*, (2010).
- [28] C. Hölscher, L. Li: **New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: New hopes for novel treatments of Alzheimer´s disease?.** *Neurobiol Aging*, **31** (2010) 1495.
- [29] T. Abbas, E. Faivre, C. Hölscher: **Impairment of synaptic plasticity ond memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer´s disease.** *Behav Brain Res*, **205** (2009) 265.
- [30] M. D'Amico, C. Di Filippo, R. Marfella, A.M. Abbatecola, F. Ferraraccio, F. Rossi, G. Paolisso: **Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 Alzheimer´s prone mice.** *Exp Gerontol*, **45** (2010) 202.
- [31] J. Spiess, J. Villarreal, W. Vale: **Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus.** *Biochemistry*, **20(7)** (1981) 1982.
- [32] J. Douglass, A. McKinzie, P. Couceyro: **PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine.** *J Neurosci*, **15** (1995) 2471.
- [33] E. Ekblad: **CART in the enteric nervous system.** *Peptides*, **27** (2006) 2024.
- [34] J. Jia, X. Chen, W. Zhu, Y. Luo, Z. Hua, Y. Xu: **CART protects brain from damage through ERK activation in ischemic stroke.** *Neuropeptides*, **42** (2008) 653.
- [35] L. Maletínská, R. Matyšková, J. Maixnerová, D. Sýkora, M. Pýchová, A. Špolcová, M. Blechová, J. Drápalová, Z. Lacinová, M. Haluzík, B. Železná: **The peptidic GHS-R antagonist [Dlys3]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal abesity.** *Molec and Cell Endocrin* **343** (2011) 55.

- [36] L. Greene, A. Tischler: **Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci*, **73** (1976) 2424.
- [37] J-F. Hu, S-F. Chu, N. Ning, Y-H. Yuan, W. Xue, N-H. Chen, J-T. Zhang: **Protective effect of (-) clausenamide against A β -induced neurotoxicity in differentiated PC12 cells.** *Neurosci Let*, **483** (2010) 78
- [38] D. Senador, K. Kanakamedala, M.C. Irigoyen, M. Morris, Khalid M. Elased1: **Cardiovascular and autonomic phenotype of db/db diabetic mice.** *Exp Physiol*, **94** (2009) 648.
- [39] B. Kim, C. Backus, S. Oh, J.M. Hayes, E.L. Feldman: **Increased Tau Phosphorylation and Cleavage in Mouse Models of Type 1 and Type 2 Diabetes.** *Endocrin*, **150** (2009) 5294.
- [40] Dostupné z URL <<http://www.rmca.org/Articles/diabetestype2.htm>> [cit.25.4.2012]
- [41] T.W. Kurtz, R.C. Morris, H.A. Pershadsingh: **The Zucker Fatty Rat as a Genetic Model of Obesity and Hypertension.** *Hypertension* **13** (1989) 896.
- [42] Dostupné z URL <<http://obesityandscience.blogspot.com/>> [cit.20.5.2012]
- [43] A.H. Durham, G.E. Truett: **Development of insulin resistance and hyperphagia on Zucker fatty rats.** *Am J Phzsiol Regul Integr Comp Phzsiol*, **290** (2006) 652.
- [44] Dostupné z URL <<http://www.atkinsdietbulletinboard.com/forums/main-atkins-diet-forum/101630-weight-gain-after-calorie-restriction-diet-3.html>> [cit. 3.5.2012]
- [45] M. Bradford: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, **72** (1976) 248.
- [46] M. Hashimoto, M. Katakura, S. Hossain, A. Rahman, T. Shimada, O. Shido: **Docosahexaenoic acid withstands the A β 25-35-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells.** *The J of Nut Biochem*, **22** (2011) 22.
- [47] Z. Liu, B.S. Ji: **The protective effect of trihexyphenidyl on the beta-amyloid peptide (25-35)-induced cytotoxicity in PC12 cells.** *Clin Exp Med*, **10** (2010) 237.
- [48] S.J. Greco, S. Sarkar, J.M. Johnston, N. Tezapsidis: **Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells.** *Biochem and Biophy Res Comm*, **380** (2009) 98.
- [49] S.J. Greco, S. Sarkar, J.M. Johnston, X. Zhu, B. Su, G. Casadesus, J.W. Ashford, M.A. Smith, N. Tezapsidis: **Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells.** *Biochem and Biophy Res Comm*, **376** (2008) 536.

- [50] E.J. Henriksen, M.K. Teachey, K.A. Lindborg, C.J Diehl, A.N. Beneze: **The high-fat-fed lean Zucker rat: a spontaneous isocaloric model of fat-induced insulin resistance associated with muscle GSK-3 overactivity.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **294** (2008) 1813.
- [51] M. Schubert, D. Gautam, D. Surjo, K. Ueki, S. Baudler, D. Schubert, T. Kondo, J. Alber, N. Galldiks, E. Kustermann, S. Arndt, A.H. Jacobs, W. Krone, C.R. Kahn, J.C. Bruning: **Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases.** *PNAS*, **101** (2004) 3100.