

ROZPRAWA DOKTORSKA – STRESZCZENIE

mgr inż. Benita Wiatrak

Neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne działanie wybranych polifenoli w hodowlach komórkowych w modelu neurodegeneracji typu Alzheimer

promotor: prof. dr hab. Kazimierz Gąsiorowski

Wstęp

Według danych WHO aktualnie chorobę Alzheimer'a zdiagnozowano u 44 mln ludzi na świecie (dane z 2015 roku). Wraz ze starzeniem się społeczeństw przewidywany jest znaczny wzrost liczby nowych zachorowań – szacuje się, że w roku 2050 liczba ta wyniesie ok. 114-135 mln. Choroba Alzheimer'a (AD) prowadzi do utraty prawidłowego funkcjonowania neuronów i połączeń synaptycznych, a w konsekwencji do pogorszenia funkcji psychicznych (m.in. myślenia, zapamiętywania, postrzegania czy wykonywania rutynowych czynności dnia codziennego). W patomechanizmie AD istotną rolę odgrywiają neurotoksyczność oligomerów β -amyloidu ($A\beta$) oraz nieprawidłowa funkcja i toksyczność hiperfosforylowanego białka tau. Aktualnie nie ma skutecznej strategii terapeutycznej w tej chorobie neurodegeneracyjnej; do roku 2018 tylko cztery leki zostały dopuszczone przez FDA i EMA do stosowania w AD. Leki te pomagają ograniczyć symptomy choroby – wpływają na poprawę jakości życia chorych, jednak nie hamują postępujących zmian neurodegeneracyjnych. W ostatnich latach dużą wagę przywiązuje się do rozpoznania możliwości zastosowania w terapii AD związków pochodzenia naturalnego, w tym roślinnych polifenoli.

Cel pracy

Celem pracy była ocena działania neuroprotektoryjnego oraz neuroregeneracyjnego wybranych polifenoli roślinnych (kurkuminy, *trans*-resweratrolu i wogoniny) na hodowle komórek PC12. Poddano weryfikacji doświadczalnej hipotezę, że zestawy badanych polifenoli o potencjalnie różnych, udokumentowanych w piśmiennictwie, mechanizmach działania na komórki neuronalne będą okazywać silniejsze działanie neuroprotektoryjne i regeneracyjne w porównaniu do polifenoli zastosowanych osobno.

Material i metody

Badania wykonywano na zróżnicowanych komórkach linii PC12, wyprowadzonej z guza chromochłonnego nadnercza szczura. Po inkubacji z czynnikiem wzrostu nerwów NGF

w komórkach PC12 zachodzą zmiany morfologiczne i biochemiczne, które upodabniają je do neuronów. Komórki PC12 są często stosowane przy ocenie wpływu badanych związków na toksyczność, genotoksyczność i wstępne etapy różnicowania neuronalnego.

W badaniach wstępnych oceniono cytotoksyczność $A\beta_{25-35}$ oraz badanych polifenoli. Do kolejnego etapu badań wybrano stężenie $0,5 \mu\text{M}$ β -amyloidu oraz po sześć stężeń kurkuminy, *trans-resweratrolu* oraz wogoniny.

Badania aktywności polifenoli i ich zestawów przeprowadzono w dwóch układach doświadczalnych, w których oceniano działanie neuroprotektcyjne bądź neuroregeneracyjne. W układzie badania neuroprotekcji hodowle PC12 były inkubowane z polifenolami (24 godz.), a następnie z $A\beta_{25-35}$ [$0,5 \mu\text{M}$, 24 godz.]. Natomiast w układzie neuroregeneracji hodowle PC12 były najpierw inkubowane z $A\beta_{25-35}$ i następnie z polifenolami. Hodowle komórek prowadzono w inkubatorze CO_2 (5% CO_2 , temp. 37°C) warunkach normoksji (20% O_2) bądź fizjoksji (5% O_2). Przyjmuje się, że warunki fizjoksji są zbliżone do warunków fizjologicznej prężności tlenu w tkance nerwowej mózgowia.

W pracy zastosowano 11 metod badawczych, które można podzielić na 3 grupy:

- 1) testy oceniające żywotność hodowli: a) aktywność mitochondrialna (test MTT); b) aktywność dehydrogenazy mleczanowej (test LDH); c) całkowita zawartość białka komórkowego (test SRB); d) ocena mikroskopowa częstości apoptozy i nekrozy;
- 2) ocena poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (test DCF-DA) oraz liczebności pęknięć nici DNA (test FHA – *fast-halo assay*);
- 3) testy oceniające różnicowanie komórek PC12: a) średnia długość neurytów; b) zagęszczenie neurytów (średnia ilość neurytów przypadająca na pojedynczą komórkę); c) ekspresja białka DCX; d) ekspresja białka NeuN; e) porastanie neurytów (ilość neurytów w całej hodowli oceniana metodą spektrofлуorymetryczną).

Wyniki były porównywane do kontroli negatywnych – hodowli komórek inkubowanych z $A\beta$, bez polifenoli.

Wyniki i wnioski

Inkubacja komórek PC12 z $A\beta_{25-35}$ [$0,5 \mu\text{M}$] prowadziła do znacznego wzrostu liczebności uszkodzeń (pęknięć) nici DNA. W tych samych hodowlach nie obserwowano wpływu $A\beta_{25-35}$ w zastosowanym stężeniu na poziom stresu oksydacyjnego komórek PC12. Należy przyjąć, że w tym układzie doświadczalnym uszkodzenia DNA powstały głównie w bezpośrednim genotoksycznym oddziaływaniu $A\beta$ z kwasem nukleinowym. Na podstawie wyników uzyskanych w panelu 5 testów oceniających cechy różnicowania stwierdzono, że

A β ₂₅₋₃₅ [0,5 μ M] znacząco hamował różnicowanie neuronalne komórek PC12 (indukowane dodaniem NGF).

Badane polifenole (kurkumina, *trans*-resweratrol i wogonina) znacząco obniżały liczebność uszkodzeń DNA i zahamowanie różnicowania neuronalnego komórek PC12 indukowane przez A β ₂₅₋₃₅ (działanie neuroprotektoryjne). Polifenole dodane do hodowli komórek PC12 inkubowanych wcześniej z A β ₂₅₋₃₅ wzmacniały reparację uszkodzeń nici DNA i zwiększały tempo różnicowania neuronalnego komórek (działanie neuroregeneracyjne).

Działanie polifenoli w układzie badania neuroregeneracji było znacząco silniejsze od działania neuroprotektoryjnego, zarówno w warunkach normoksji jak i w fizjoksji, chociaż w obu układach obserwowano większą siłę działania badanych związków w warunkach fizjoksji niż w normoksji.

Na podstawie wyników badań własnych dla każdego z polifenoli wybrane zostały optymalne stężenia, w których obserwowano największą aktywność neuroprotektoryjną lub neuroregeneracyjną. Najsilniejsze działanie neuroprotektoryjne kurkuminy stwierdzono w stężeniu 2,5 μ M, *trans*-resweratrolu – 1,0 μ M, a wogoniny – 0,5 μ M. Najsilniejszy efekt w układzie badania neuroregeneracji wykazano dla kurkuminy w stężeniu 5,0 μ M, *trans*-resweratrolu – 10,0 μ M, a wogoniny – 0,5 μ M. Te optymalne stężenia posłużyły do sporządzenia zestawów polifenoli.

W porównaniu do pojedynczych polifenoli, ich zestawy okazywały silniejsze działanie zarówno neuroprotektoryjne, jak i neuroregeneracyjne. Spośród przebadanych zestawów największą aktywność neuroprotektoryjną i neuroregeneracyjną okazywał zestaw KR (kurkumina + *trans*-resweratrol). Natomiast w układzie badania neuroregeneracji (ale nie w układzie neuroprotekcji) silne działanie wywierał także zestaw trzech polifenoli KRW (kurkumina + *trans*-resweratrol + wogonina). Na podstawie wyników niniejszej pracy do dalszych badań wybrane zostały dwa zestawy polifenoli: KR i KRW.

ABSTRACT

Introduction

According to the WHO, currently Alzheimer's disease is diagnosed in 44 million people in the world (data from 2015). With the aging of societies, a significant increase in the number of new cases is expected – it is estimated that in 2050 this number will be around 114-135 million. Alzheimer's disease (AD) leads to the loss of proper functioning of neurons and synaptic connections, and as a consequence, to deterioration of mental functions (including thinking, remembering, perceiving or performing routine activities of everyday life). The neurotoxicity of β -amyloid ($A\beta$) oligomers and the aberrant function and toxicity of hyperphosphorylated tau protein play an important role in the pathomechanism of AD. Currently, there is no effective therapeutic strategy in this neurodegenerative disease; until 2018, only four drugs have been approved by the FDA and EMA for use in AD. These drugs reduce the symptoms of the disease – they improve the quality of life of patients, but do not inhibit the progressive neurodegenerative changes. In recent years, great importance is attached to the study of the use of natural compounds in the therapy of AD, including plant polyphenols.

The aim of the study

The aim of the study was to evaluate the neuroprotective and neuroregenerative effects of selected plant polyphenols (curcumin, *trans*-resveratrol, and wogonin) on PC12 cell cultures. According to the literature, the studied polyphenols have potentially different mechanisms of action on neuronal cells. It has been experimentally verified whether combinations of these polyphenols will show a stronger neuroprotective and regenerative effect as compared to the polyphenols used alone.

Material and methods

The research was carried out on the differentiated cells of the PC12 cell line, derived from the rat adrenal pheochromocytoma. After incubation with nerve growth factor (NGF), PC12 cells undergo morphological and biochemical changes that make them similar to neurons. PC12 cells are often used to assess the effect of tested compounds on toxicity, genotoxicity and initial stages of neuronal differentiation.

In preliminary studies, the cytotoxicity of A β ₂₅₋₃₅ and the tested polyphenols were evaluated. The 0.5 μ M concentration of the β -amyloid and six concentrations of curcumin, *trans*-resveratrol, and wogonin were chosen for the next stage of the study.

Research on the activity of polyphenols and their combinations was carried out in two experimental models, in which the neuroprotective or neuroregenerative effects were assessed. In the neuroprotection model, PC12 cell cultures were incubated with polyphenols (24 h) and later with A β ₂₅₋₃₅ [0.5 μ M, 24 h]. In contrast, in the neuroregeneration model PC12 cultures were first incubated with A β ₂₅₋₃₅ and then with polyphenols. The cell cultures were carried out in a CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C) under normoxia (20% O₂) or physioxia (5% O₂) conditions. It is assumed that in the physioxia, the oxygen tension is similar to the physiological oxygen tension in the nervous tissue of the brain.

The study included 11 research methods that can be divided into three groups of assays:

- 1) assessment of the viability of cell cultures: a) mitochondrial activity (MTT assay); b) lactate dehydrogenase activity (LDH assay); c) total cellular protein content (SRB assay); d) microscopic assessment of the frequency of apoptosis and necrosis;
- 2) assessment of the level of intracellular reactive oxygen species (DCF-DA assay) and the number of DNA strand breaks (FHA – fast-halo assay);
- 3) assessment of differentiation of PC12 cells: a) average neurite length; b) average number of neurites per single cell; c) expression of the DCX protein; d) expression of NeuN protein; e) neurite outgrowth (amount of neurites in the whole culture evaluated by spectrofluorimetric method).

The results were compared to negative control – cell cultures incubated with A β , without polyphenols.

Results and conclusions

Incubation of PC12 cells with A β ₂₅₋₃₅ [0.5 μ M] led to a significant increase in the number of DNA strand breaks. In the same cultures, the effect of A β ₂₅₋₃₅ (at the concentration used) on the oxidative stress level in PC12 cells was not observed. It should be assumed that in this experimental model, DNA damage was mainly due to the direct genotoxic interaction of A β with nucleic acid. Based on the results obtained in the panel of 5 assays of differentiation characteristics, it was found that A β ₂₅₋₃₅ [0.5 μ M] significantly inhibited neuronal differentiation of PC12 cells (induced by the addition of NGF).

Tested polyphenols (curcumin, *trans*-resveratrol and wogonin) significantly reduced the number of DNA damage and inhibition of neuronal differentiation of PC12 cells induced by

A β ₂₅₋₃₅ (neuroprotective effect). Polyphenols added to PC12 cell cultures previously incubated with A β ₂₅₋₃₅ increased the repair of DNA strand damage and increased the rate of neuronal differentiation of cells (neuroregenerative effect).

The effect of polyphenols in the neuroregeneration model was significantly stronger than the neuroprotective effect, both under normoxia and physioxia conditions, although in both experimental models the greater potency of the tested compounds was observed under physioxia conditions than in normoxia.

Based on the assay results, optimal concentrations were chosen for each of the polyphenols in which the greatest neuroprotective or neuroregenerative activity was observed. The strongest neuroprotective effect of curcumin was found at a concentration of 2.5 μ M, *trans*-resveratrol – 1.0 μ M, and wogonin – 0.5 μ M. The strongest effect in the neuroregeneration model was demonstrated for the curcumin concentration of 5.0 μ M, *trans*-resveratrol – 10.0 μ M, and wogonin – 0.5 μ M. These optimal concentrations were used to prepare polyphenol combinations.

Compared to individual polyphenols, their combinations showed a stronger effect both neuroprotective and neuroregenerative. Among the examined combinations the highest neuroprotective and neuroregenerative activity was demonstrated by the KR combination (curcumin + *trans*-resveratrol). However, in the neuroregeneration model (but not in the neuroprotection model), a combination of three polyphenols – KRW (curcumin + *trans*-resveratrol + wogonin) also had a strong effect. Based on the results of the study, two combinations of polyphenols were selected for further studies: KR and KRW.