UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠA POPOVIĆ (POLJANEC)

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠA POPOVIĆ (POLJANEC)

PRIMERJAVA VPLIVA NEKROSTATINA-1 IN NEKROSTATINA-7 NA REGULIRANO SMRT ASTROCITOV PODGAN

COMPARISON OF THE EFFECT OF NECROSTATIN-1 AND NECROSTATIN-7 ON REGULATED CELL DEATH OF RAT ASTROCYTES

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom red. prof. dr. Metode Lipnik Štangelj, dr. med., mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Metodi Lipnik Štangelj, za strokovno vodstvo in potrpežljivost pri nastajanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki, gospe Cvetki Blažek, za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela. Čas, preživet v laboratoriju, je bil prijeten in sproščen.

Hvaležna sem kolegu, možu in najboljšemu prijatelju Nikiju, ki mi je nudil vsakršno potrebno pomoč in psihološko podporo pri opravljanju izpitov ter pisanju diplomske naloge.

Najlepša hvala prijateljici Maši, da je diplomsko nalogo prebrala in jo lektorirala.

Želim se zahvaliti tudi staršem, Vandi in Andreju, za vse dobro, kar sta mi za življenje dala in mi je predstavljalo oporo v vseh trenutkih, tudi pri študiju. Hvala jima tudi za nemalo ur varstva otrok, brez katerih še ne bi bila na koncu te poti. Prav tako se za pomoč pri skrbi za otroke zahvaljujem ostalim članom moje družine in Nikijevi družini. Veliko so pomenile tudi vzpodbudne besede in zaupanje v to, da bom študij dokončala.

Nenazadnje hvala tudi mojima čudovitima in pridnima otrokoma, Timonu in Lukasu, ki dajeta življenju pravi smisel.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice red. prof. dr. Metode Lipnik Štangelj, dr. med, mag. farm.

Urša Popović

Ljubljana, junija 2014

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Rok Frlan, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

I. UVOD 1

1. Astrociti 1

1.1. Vloga astrocitov v centralnem živčnem sistemu 1

2. Regulirana celična smrt 3

2.1. Apoptoza 4

2.1.1. Morfološke značilnosti apoptoze 4

2.1.2. Mehanizmi apoptoze 5

2.1.2.1. Kaspaze 5

2.1.2.2. Ekstrinzična pot 6

2.1.2.3. Intrinzična pot 6

2.1.2.4. Izvedba apoptoze 7

2.2. Nekroptoza 7

2.2.1. Mehanizmi nekroptoze 8

2.2.1.1. Iniciacija nekroptoze 8

2.2.1.2. Izvedba nekroptoze 9

3. Stavrosporin 10

4. Nekrostatini 10

II. NAMEN DELA 12

III. MATERIALI IN METODE 13

1. Materiali 13

1.1. Kemikalije za pripravo celičnih kultur 13

1.2. Kemikalije za poskuse na celičnih kulturah 13

1.3. Oprema 14

2. Metode dela 14

2.1. Poskusne živali 14

2.2. Priprava celičnih kultur 14

2.3. Obdelava celic za preučevanje celične smrti 15

2.3.1. Sprožitev celične smrti s stavrosporinom 15

2.3.2. Vpliv nekrostatina-7 na celično smrt, sproženo s stavrosporinom 15

2.3.3. Vpliv nekrostatina-1 na celično smrt, sproženo s stavrosporinom 15

2.4. Analiza celične smrti s pretočnim citometrom 16

2.4.1. Barvanje celic z aneksinom V in 7-aminoaktinomicinom D 16

2.4.2. Merjenje s pretočnim citometrom 16
2.5. Statistična analiza 16

IV. REZULTATI 18

1. Analiza celic s pretočnim citometrom 18
2. Sprožitev celične smrti s stavrosporinom 19
3. Vpliv nekrostatina-7 na regulirano celično smrt, sproženo s stavrosporinom..... 21
4. Primerjava vpliva nekrostatina-7 in nekrostatina-1 na regulirano celično smrt, sproženo s stavrosporinom..... 23

V. RAZPRAVA 26

VI. SKLEP.....31

VII. LITERATURA 32

SEZNAM SLIK

Slika 1: Prikaz signalnih poti apoptoze 7

Slika 2: Prikaz signalne poti nekroptoze, sprožene s TNF-α..... 9

Slika 3: Nativni posnetek kulture astrocitov (10-kratna povečava) 18

Slika 4: Grafična predstavitev analize kontrolnih celic 1 s pretočnim citometrom..... 19

Slika 5: Primerjava fotografije kulture astrocitov, ki smo jo izpostavili stavrosporinu, in fotografije neizpostavljene kulture astrocitov (20-kratna povečava) 19

Slika 6: Delež zgodnje apoptoze in nekroptoze po izpostavitvi stavrosporinu v odvisnosti od časa izpostavljenosti 20

Slika 7: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili stavrosporinu in neizpostavljenih celic) 21

Slika 8: Delež nekroptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-7 v odvisnosti od časa izpostavljenosti 22

Slika 9: Delež zgodnje apoptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-7 v odvisnosti od časa izpostavljenosti 23

Slika 10: Primerjava deleža zgodnje apoptoze in nekroptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-1 in po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-724

Slika 11: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili samo stavrosporinu in celic, ki smo jih za 3 ure hkrati izpostavili stavrosporinu in nekrostatinu-7) 25

Slika 12: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili samo stavrosporinu in celic, ki smo jih za 3 ure hkrati izpostavili stavrosporinu in nekrostatinu-1) 25

POVZETEK

Regulirana celična smrt je fiziološko pomembna za vzdrževanje homeostaze celic in tkiv, poleg tega pa je vpletena pri različnih patoloških stanjih. Njena glavna in najbolj raziskana oblika je apoptoza. Nedavne študije so razkrile tudi obstoj nekroptoze, ki velja za regulirano, od kaspaz neodvisno obliko celične smrti in je morfološko podobna nekrozi. Njeno preučevanje nam omogoča identifikacijo novih molekul, s katerimi bi lahko vplivali na preživetje celic. Primer tovrstnih spojin predstavlja skupina različnih molekul, ki so inhibitorji nekroptoze in jih imenujemo nekrostatini. Naš cilj je bil ugotoviti vpliv nekrostatina-7 na celično smrt, sproženo s stavrosporinom, in ga v nadaljevanju primerjati z vplivom nekrostatina-1, ki je prvi odkrit in dobro raziskan inhibitor nekroptoze. Kot eksperimentalni model smo uporabili kulture astrocitov možganskih skorij novorojenih podgan. Celice smo analizirali z uporabo pretočne citometrije v povezavi z metodo simultanega barvanja z aneksinom V in 7-aminoaktinomicinom D. Ugotovili smo, da nekrostatin-7, ki ni inhibitor z receptorjem interreagirajoče protein-kinaze 1 (RIPK1) in ima zaenkrat nepoznan mehanizem delovanja, zavira nekroptozo astrocitov podgan, sproženo s stavrosporinom. Inhibicija nekroptoze z nekrostatinom-7 je bila približno 36-odstotna, medtem ko je bila le-ta z nekrostatinom-1, ki je inhibitor RIPK1, približno 40-odstotna. Nekrostatin-7 in nekrostatin-1 sta se torej v našem eksperimentalnem modelu izkazala kot primerljivo učinkovita inhibitorja nekroptoze, nobeden od njiju pa je ni popolnoma zavrl. Nekrostatini izkazujejo pozitivne učinke v eksperimentalnih modelih ishemične možganske okvare, travmatične poškodbe možganov, miokardnega infarkta in nevrodegenerativnih bolezni. Zaradi različnega mehanizma delovanja bi prav nekrostatin-7 in nekrostatin-1 lahko v prihodnosti pomagala pri razjasnjevanju od kaspaze neodvisnega modela celične smrti in privedla do odkritja spojin vodnic za uporabo v terapiji omenjenih in drugih bolezni, kjer so vpleteni procesi regulirane celične smrti.

ABSTRACT

Regulated cell death is physiologically important for cell and tissue homeostasis, while also being involved in various pathological conditions. Apoptosis is the main and most researched type of regulated cell death. Recent studies have revealed the existence of necroptosis, which is regarded as a regulated, caspase independent type of cell death, morphologically resembling necrosis. Studying necroptosis allows researchers to identify new molecules with the ability to influence cell survival as illustrated by a diverse group of necroptosis inhibitors called necrostatins. The goal of our research was to compare the influence of necrostatin-7 on staurosporine induced cell death with that of necrostatin-1, known as the first discovered and extensively researched necroptosis inhibitor. Our experimental model consisted of a culture of astrocytes from newborn rats' cerebral cortex. We analysed the cells using flow cytometry in conjunction with simultaneous annexin V and 7-amino-actinomycin D staining. We discovered that necrostatin-7, which is not a receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) inhibitor and has a hitherto unknown mechanism of action, inhibits staurosporine induced necroptosis in rat astrocytes. This inhibition of necroptosis by necrostatin-7 amounted to approximately 36 percent. Similarly, the degree of necroptosis inhibition by necrostatin-1, which is a known RIPK1 inhibitor, was approximately 40 percent. We therefore conclude that necrostatin-7 and necrostatin-1 demonstrate comparable efficacy as necroptosis inhibitors in our experimental model. Neither one of them, however, was capable of completely inhibiting necroptosis. Necrostatins are becoming ever more promising candidates for use in therapeutics because they exhibit positive effects in experimental models of ischemic brain damage, traumatic brain injury and neurodegenerative disease. In particular, necrostatin-7 and necrostatin-1 could, due to differences in their mode of action, prove invaluable in clarifying the signalling pathways of the caspase independent cell death model. This could consequentially result in the discovery of new lead compounds with potential therapeutic applications in aforementioned diseases and other medical conditions associated with regulated cell death.

SEZNAM OKRAJŠAV

Bcl-2	B-celični limfom 2
cIAP1	celični inhibitor apoptotičnega proteina-1 (angl. *cellular inhibitor of apoptosis protein-1*)
CŽS	centralni živčni sistem
DD	domena smrti (angl. *death domain*)
DISC	smrt inducirajoči signalni kompleks (angl. *death inducing signaling complex*)
DMEM/F12	Dulbeccov modificirani medij Eagle: Hamova mešanica nutritientov F-12 (angl. *Dulbecco's modified Eagle medium: nutritient mixture F-12*)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
FADD	protein, ki se veže na Fas in vsebuje DD (angl. *Fas-associating protein with DD*)
FBS	goveji fetusni serum (angl. *fetal bovine serum*)
FITC	fluorescein izotiocianat
FLICE	FADD-ju podobni interlevkin-1 beta konvertirajoči encim (angl. *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme*)
FLIP	FLICE-ju podobni inhibitorni protein (angl. *FLICE-like inhibitory protein*)
L-15	Leibowitzev medij
PBS	fosfatni pufer (angl. *phosphate buffered saline*)
RCS	regulirana celična smrt
RIPK	z receptorjem interreagirajoča serinsko/treoninska protein-kinaza
RKS	reaktivne kisikove spojine
TNF	tumorje-nekrotizirajoči faktor
TNFR	TNF receptor
TRADD	s TNF receptorjem povezan protein z DD (angl. *TNF receptor associated protein with DD*)
TRAIL	s TNF povezan ligand, ki inducira apoptozo (angl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)
7-AAD	7-aminoaktinomicin D

I. UVOD

1. Astrociti

Možgani so pri vseh živalskih vrstah sestavljeni iz dveh tipov celic: približno stotih milijard nevronov in vsaj enega bilijona opornih celic, imenovanih glija (1, 2). V centralnem živčnem sistemu (CŽS) obstajajo tri glavne vrste glijalnih celic: mikroglija, astrociti in oligodendrociti (3). Astrociti spadajo med makroglijalne celice, so povsod prisotni in so delno definirani glede na razlike v primerjavi z nevroni; nimajo namreč aksonov ter akcijskega in sinaptičnega potenciala (4). Astrociti so najštevilčnejše celice glije (5) in zavzemajo od 25 do 50 % možganskega volumna (4). Imajo heterogeno morfologijo in jih največkrat opisujejo kot zvezdaste. Vsak astrocit zaseda svoje anatomsko področje, med seboj pa se lahko prekrivajo. Imajo sposobnost interakcij z mikrovaskulaturo in tisočimi okoliškimi sinapsami (3). Astrociti sodelujejo pri vseh esencialnih funkcijah CŽS in zato ni presenetljivo, da sta njihova funkcija in morfologija odvisni od regije možganov, kjer se nahajajo, ter da obstajajo različni podtipi astrocitov znotraj istega predela možganov (6). Poznavanje funkcijske raznolikosti astrocitov je ključno, saj so astrociti vpleteni v skoraj vse bolezni CŽS (7).

1.1. Vloga astrocitov v centralnem živčnem sistemu

Celice glije so bile od odkritja pred več kot 150 leti dolgo obravnavane zgolj kot neke vrste možgansko lepilo, ki naj bi nudilo le strukturno oporo nevronom. Z novimi znanstvenimi odkritji pa se celice glije uveljavljajo kot pomemben dejavnik delovanja možganov s širokim spektrom različnih funkcij (5, 8). Izkazalo se je, da imajo astrociti edinstveno vlogo, saj lahko ob spremembah v neposrednem okolju spreminjajo svojo obliko in funkcijo ter imajo zato popolnoma različne vloge v posameznih življenjskih obdobjih. Še posebej različno obliko in funkcijo zavzemajo v obdobju med razvojem, v odraslem obdobju pri zdravem človeku ter v primeru bolezni in poškodb CŽS, ko aktivno vplivajo na procese regeneracije in degeneracije (9).

Astrociti sodelujejo pri:

- **razvoju CŽS**

Astrociti imajo ključno vlogo pri razvoju možganov. Kot radialna glija usmerjajo migracijo nevroblastov, nevronov in rast aksonov (9, 10). Pomagajo pri nastanku živčnih jeder, živčnih poti in stikov med posameznimi živčnimi celicami ter kontrolirajo razvojno nevrogenezo s sintezo in sproščanjem nevrotrofičnih dejavnikov (9, 11). Sodelujejo tudi pri razvoju sinaps (11).

- **krvno-možganski pregradi in nadzoru pretoka krvi**

Astrociti so eden od ključnih gradnikov krvno-možganske pregrade, ki je pri višjih organizmih sestavljena iz endotelijskih celic, astrocitov in pericitov. Odgovorni so za ustvarjanje in vzdrževanje tesnih stikov (angl. tight-junctions) med endotelijskimi celicami (9). Poleg tega naj bi astrociti ob spremembah nevronske aktivnosti vplivali na spremembe v lokalnem pretoku krvi CŽS. Tako naj bi igrali pomembno vlogo na nivojih arteriol, kjer se regulira pretok krvi, in kapilar, kjer je locirana krvno-možganska pregrada (8).

- **metabolizmu in sinaptični homeostazi**

Astrociti aktivno vplivajo na aktivnost sinaps in tako sodelujejo pri sinaptičnem prenosu. Zagotavljajo vir energije za nevrone, saj predstavljajo glavno mesto skladiščenja glikogena v CŽS, in vzdržujejo homeostazo glukoze. Kot dinamični partnerji nevronov koordinirajo metabolične reakcije v sinapsah in nadzorujejo sinaptični prenos z zaznavanjem nivoja sinaptične aktivnosti in posledičnim vplivanjem na le-to preko sproščanja nevromodulatorjev. S svojim vplivom predstavljajo sestavni del 'tridelne sinapse', ki predpostavlja, da astrociti igrajo direktno, interaktivno in enakopravno vlogo nevronom med sinaptično aktivnostjo, in to na način, ki je ključen za obdelavo informacij v nevronskih mrežah kot tudi pri sinaptični plastičnosti (8, 9, 11). Izrastki astrocitov obdajajo skoraj vse sinapse in imajo pomembno vlogo pri ohranjanju tekočinske, ionske, pH in transmiterske homeostaze v sinaptični intersticijski tekočini, kar je ključno za zdrav sinaptični prenos (10). Astrociti sodelujejo pri recikliranju nevrotransmiterjev, ki se sprostijo med sinaptičnim prenosom. Pri njih je izražen visok nivo transporterjev za nevrotransmiterje (kot so glutamat, gama-aminobutirna kislina, histamin in glicin), kar služi odstranjevanju nevrotransmiterjev iz sinaptičnega prostora (8). Ena glavnih nalog astrocitov v CŽS je privzem glutamata preko transportnih proteinov, kar preprečuje ekscitotoksičnost (6, 9, 10). Poleg privzema nekaterih nevrotransmiterjev, astrociti

privzemajo tudi amonijak in prebitek zunajceličnega K^+ (9). Predstavljajo tudi glavno mesto detoksifikacije in bioaktivacije nevrotoksinov in odstranjevanja odpadnih snovi (8, 12).

- **imunosti**

Astrociti sodelujejo tudi pri imunskem odzivu v CŽS. Izražene imajo različne vrste receptorjev, ki so vanj vpletene, hkrati pa so sposobni sinteze in sproščanja številnih signalnih molekul, ki vplivajo tako na prirojeni kot na pridobljeni imunski odziv (13).

- **patoloških procesih**

Ob boleznih ali poškodbah možganov se astrociti spremenijo v reaktivne celice, ki aktivno posredujejo pri procesih regeneracije v CŽS kot tudi pri brazgotinjenju, kadar pride do večje izgube živčnih celic. Možganska okvara sproži proces reaktivne glioze (9). Reaktivna astroglioza je povezana s celično hipertrofijo, proliferacijo astrocitov, podaljševanjem izrastkov in interdigitacijo (11). Na vprašanje, ali je reaktivna glioza koristen ali škodljiv proces, še nimamo odgovora. Sposobnost reaktivnih astrocitov, da sintetizirajo različne molekule, ki pospešujejo regeneracijo poškodovanih nevronov, je nedvomno koristna. Takšne molekule so na primer rastni dejavniki, citokini in molekule zunajceličnega matriksa. Vendar po drugi strani tvorba trajne brazgotine in sproščanje inhibitornih substanc, npr. heparan sulfata, hondroitin sulfata, keratina in drugih proteoglikanov, onemogoča regeneracijo nevronov (9). V patoloških razmerah lahko astrociti reagirajo še na drug način - z nabrekanjem. To se pojavi v primerih, ko je CŽS izpostavljen ishemiji, mehanski poškodbi ali pri epileptičnemu stanju (9).

2. Regulirana celična smrt

Celice večceličnega organizma sestavljajo kompleksno organizirano celoto. Število celic je skrbno regulirano tako z nadzorovanjem hitrosti deljenja celic kot tudi z nadzorovanjem stopnje njihovega umiranja. Ko celice niso več potrebne ali predstavljajo nevarnost za organizem, izvedejo samomor z aktivacijo znotrajceličnega programa smrti. Ta proces se zato imenuje programirana celična smrt (RCS) (14). V nasprotju z nekrozo RCS vključuje stereotipno izgubo posameznih celic v določenih fazah razvoja. Od nekroze se loči tudi po tem, da je slednja pasiven proces, medtem ko RCS zahteva “de novo” ekspresijo genov (15). RCS igra veliko pomembnih vlog v živalskem razvoju in homeostazi, kot so na primer oblikovanje telesnih in uničenje nepotrebnih struktur, prilagajanje števila celic ter

odstranitev nenormalnih, nedelujočih ali škodljivih celic. Patogeneza mnogih bolezni, kot so na primer neoplastične in nevrodegenerativne bolezni, je posledica nepravilnosti v delovanju RCS (16).

Apoptoza oziroma RCS tipa 1 (17) je najpogostejša oblika RCS, ki jo izvršuje posebna skupina proteaz, imenovanih kaspaze. RCS lahko poteka tudi v njihovi odsotnosti in sicer preko alternativnih poti (16). V zadnjih letih je prišlo do odkritja presenetljivega števila morfologij in mehanizmov ne-apoptotične RCS, med katerimi so avtofagna oziroma citoplazemska celična smrt (RCS tipa 2), programirana nekroza oz. nekroptoza (RCS tipa 3), mitotska katastrofa, entoza (celični kanibalizem) in druge (18, 19). Omenjene vrste celične smrti so pogosto definirane glede na morfološke kriterije (20).

2.1. Apoptoza

Apoptoza se normalno odvija med razvojem in staranjem kot homeostatski mehanizem, ki nadzoruje populacijo celic v tkivih. Poleg tega se pojavlja tudi kot obrambni mehanizem, na primer pri imunskih reakcijah ali ko bolezen oziroma toksini poškodujejo celice (21). Je energetsko zahteven, neusklajen in genetsko kontroliran proces, pri katerem se posamezne nepotrebne ali poškodovane celice samouničijo, ko so aktivirani geni za apoptozo (22). Nastopi kot posledica propada celične infrastrukture zaradi interne proteolitične razgradnje, ki vodi do razpada citoskeleta, sprememb metabolizma in degradacije deoksiribonukleinske kisline (DNK) (23). Kaspazna kaskada je verjetno glavna pot, ki regulira apoptozo (24).

2.1.1. Morfološke značilnosti apoptoze

Značilne morfološke spremembe apoptotičnih celic so postale standard definiranja in opisovanja tega procesa. Sodeč po raziskavah, opravljenih z elektronskim mikroskopom, je za začetek apoptoze značilno skrčenje celice in jedra ob hkratni kondenzaciji jedrnega kromatina v ostro definirane enote, ki mejijo na jedrno membrano. Nato pride do razpada jedra (kariorekse), čemur sledi odcepitev celice od okoliškega tkiva, njen oris pa postane zvit in tvori izrastke. Angleški izraz »budding« so uvedli za opis procesa, ko se izrastki ločijo in se plazemska membrana združi na način, da tvori ločeno membrano okoli samostojnega trdnega celičnega materiala. Takšne tvorbe imenujemo apoptotična telesca. Le-ta so polna celičnih organelov in ostankov jedra, znotraj njih pa so tudi finejše strukture, kot so membrane in mitohondriji, ki so dobro ohranjene. Apoptotična telesca so nato hitro fagocitirana s strani sosednjih celic, med katerimi so tudi makrofagi in

parenhimske celice, v katerih se sčasoma razgradijo. Če druge celice ne fagocitirajo razpadle celice, se le-ta razgradi na način, ki spominja na nekrozo in se imenuje sekundarna nekroza. Apoptotično skrčenje, razgrajevanje v apoptotična telesca in zajetje posameznih celic se tipično odvija brez pridruženega vnetja, ki bi bilo posledica sproščanja znotrajcelične vsebine v tkiva (25, 26).

2.1.2. Mehanizmi apoptoze

Mehanizmi apoptoze so zelo kompleksni in vključujejo energetsko zahtevno kaskado molekulskih dogodkov (21). Komponente mreže apoptotičnega signaliziranja so genetsko zapisane v celicah z jedrom in pripravljene na aktivacijo preko signala za smrt celice (27). V mreži apoptotičnega signaliziranja so bistvenega pomena kaspaze (27). Raziskave kažejo, da se aktivirajo preko dveh glavnih apoptotičnih poti: ekstrinzična pot (pot preko receptorja smrti) in intrinzična pot (mitohondrijska pot). Obstajajo tudi dokazi, da sta ti dve poti povezani in da lahko ena vpliva na drugo. Dodatni poti sta s T-celicami povzročena citotoksičnost in od perforina/grancima odvisno ubijanje celice (20, 21).

2.1.2.1. Kaspaze

Apoptozo običajno spremlja aktivacija proteaz smrti; to so proteaze, ki vsebujejo ostanke cisteina in jim s skupnim imenom pravimo kaspaze (28, 29, 30). Njihova aktivacija zahteva cepitev prokaspaz, ponavadi za ostankom aspartata, kar vodi do tvorbe aktivnega encima (24). Do danes je bilo pri človeku identificiranih 14 kaspaz (31). Poznamo dve vrsti: iniciatorske in efektorske (32, 33). Iniciatorske kaspaze, med katere sodita tudi kaspaza-8 in kaspaza-9, vsebujejo dolgo proverigo, ki jim omogoča interakcijo s specifičnimi adapterskimi proteini. Takšne interakcije jih privedejo v bližino ene drugi in omogočajo aktivacijo enega proencima z drugim (34). Preko teh proverig se iniciatorske kaspaze aktivirajo ob smrt inducirajočih signalnih kompleksih ali kot odziv na vezavo na celične receptorje smrti (ekstrinzična pot apoptoze). Lahko se aktivirajo tudi kot odziv na signale, ki izvirajo iz notranjosti celice (intrinzična pot apoptoze) (27). Efektorske prokaspaze so pogosto aktivirane s strani drugih proteaz, največkrat preko iniciatorskih kaspaz, lahko pa tudi preko drugih proteaz (transaktivacija) (31). Proteolitična kaskada, pri kateri ena kaspaza aktivira druge kaspaze, ojača signalno pot apoptoze in tako vodi v hitro celično smrt (21).

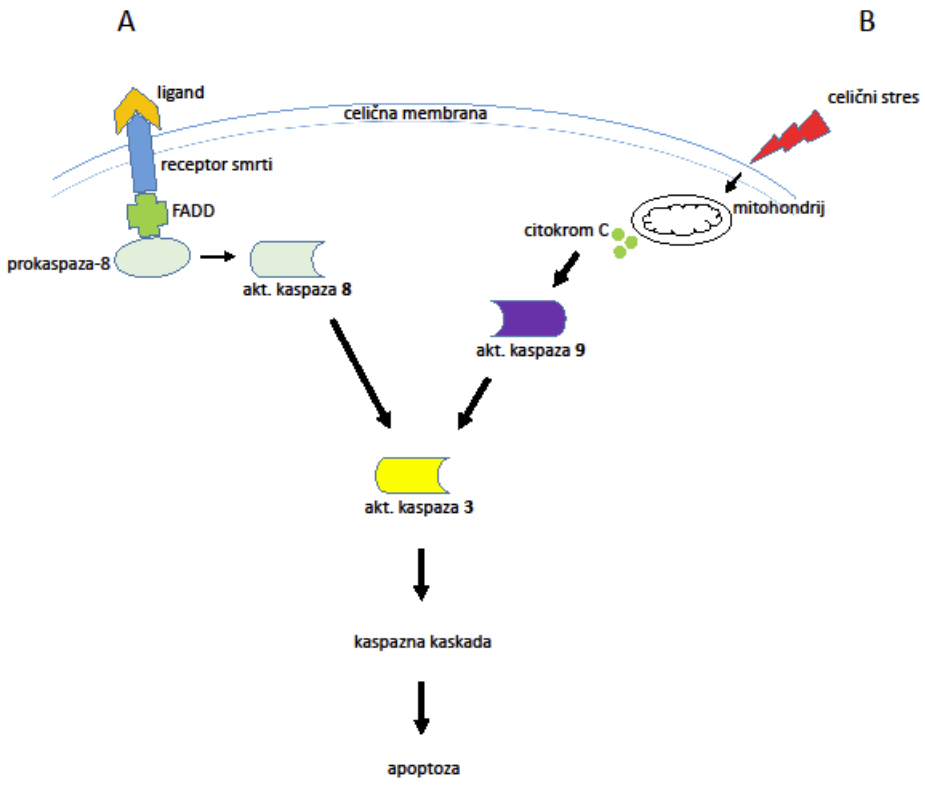
2.1.2.2. Ekstrinzična pot

Apoptozo lahko sproži vezava ligandov na receptorje smrti. To je skupina znotraj družine receptorjev tumorje-nekrotizirajočega faktorja (TNF). Dva najbolj raziskana receptorja smrti sta Fas in TNF receptor 1 (35).

Receptorji smrti imajo na notranji strani celice na karboksilnem koncu receptorja aminokislinsko zaporedje, ki se imenuje domena smrti (DD). Po vezavi liganda na receptor se na področje DD veže adapterska beljakovina kot na primer protein, ki se veže na Fas in vsebuje DD (FADD) ali s TNF receptorjem povezan protein z DD (TRADD) (35, 27). Adapterska beljakovina sama vsebuje DD, s katero se poveže z DD aktiviranih receptorjev smrti in na ta način tvori smrt inducirajoči signalni kompleks (DISC). FADD ima poleg DD tudi efektorsko DD, ki preko homotipične interakcije cepi prokaspazo-8 v DISC (27). Aktivna kaspaza-8 lahko nato sproži apoptotično kaspazno kaskado, kar vodi v izvedbo apoptoze (36, 37). Opisana signalna pot je predstavljena na Sliki 1A.

2.1.2.3. Intrinzična pot

Celice brez kaspaze-8 ali FADD se ne odzovejo na ligande smrti, temveč so podvržene apoptozi, ki jo sprožijo drugi dejavniki, kot je na primer celični stres (36). Signali smrti, ki nastanejo kot posledica celičnega stresa (npr. obsevanje ali kemoterapevtiki), aktivirajo intrinzični apoptotični program, katerega glavni nosilci so mitohondriji (23). Serijo celičnih dogodkov omogoča družina proteinov B-celičnega limfoma 2 (Bcl-2), ki vključuje pro- in anti-apoptotične dejavnike. Zato se to apoptozno pot pogosto imenuje z Bcl-2 oz. mitohondrijsko regulirana pot apoptoze (27, 38). Ta pot preko sproščanja citokroma c iz mitohondrija v citosol povzroči aktivacijo kaspaze-9, kar posledično sproži kaspazno kaskado, ki vodi v izvedbo apoptoze (20, 27, 37). Opisana signalna pot je predstavljena na Sliki 1B.



Slika 1: Prikaz signalnih poti apoptoze

Legenda: A – ekstrinzična pot, B – intrinzična pot

2.1.2.4. Izvedba apoptoze

Ekstrinzična in intrinzična pot se združita v skupni končni poti. Ta se začne s cepitvijo kaspaze-3. To vodi do kaskadne reakcije, ki ima za posledico fragmentacijo DNK, razpadanje citoskeletnih in nuklearnih proteinov, povezovanje proteinov, tvorbo apoptotičnih telesc, ekspresijo ligandov za receptorje fagocitov in na koncu privzem s strani fagocitov (21, 39). Medtem ko je veliko kaspaz lociranih v citosolu, je mnogo njihovih substratov prisotnih v jedru drugih celičnih predelov. Zato lahko pride do zamika med aktivacijo kaspaz in posledičnim proteolitskim napadom posameznega substrata (39).

2.2. Nekroptoza

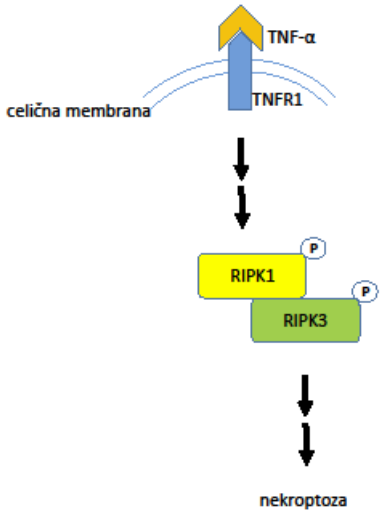
Nekroza je bila dolgo časa obravnavana kot naključna celična smrt, ki naj ne bi bila regulirana. Njene morfološke značilnosti vključujejo povečan celični volumen, nabrekanje organelov, trganje plazemske membrane in izgubo znotrajcelične vsebine (18).

Neregulirana narava nekroze je bila prvič postavljena pod vprašaj leta 1988, ko so odkrili, da pod vplivom TNF različni tipi celic umrejo, pri tem pa še vedno kažejo klasične značilnosti apoptoze ali pa 'balonu podobno' morfologijo brez jedrnega razpada. Od takrat je bilo zbranih veliko dokazov, ki kažejo na obstoj programirane nekroze. Zato je od leta 2005 v uporabi nov termin; nekroptoza, ki opisuje enega od načinov regulirane nekrotične celične smrti (40). Nekroptoza morfološko izraža znake nekroze, vendar pa je zanjo značilna edinstvena signalna pot, ki zahteva sodelovanje med z receptorjem interreagirajočo serinsko/treoninsko protein-kinazo 1 (RIPK1) in RIPK 3 ter jo lahko specifično inhibiramo z nekrostatini (41). V nasprotju z apoptozo je malo raziskav, ki bi nakazovale na vlogo nekroptoze pri zdravem razvoju in homeostazi sesalcev, je pa pogosto omenjena pri patoloških stanjih (37).

2.2.1. Mehanizmi nekroptoze

2.2.1.1. Iniciacija nekroptoze

Regulirano nekrozo lahko povzročijo različni dejavniki, med katerimi so alkilirajoče poškodbe DNK in ekscitotoksini (42). Tako kot apoptozo jo sproži tudi vezava ligandov, na primer TNF-α, Fas liganda in s TNF povezanega liganda, ki inducira apoptozo (TRAIL), na receptorje smrti (43). Nekroptoza, sprožena preko TNF receptorja 1 (TNFR1), je najbolj raziskana oblika programirane nekroze. Aktivacija receptorja TNFR1 lahko v odvisnosti od celične vrste, stanja celične aktivacije in mikrookoljskih dejavnikov vodi v preživetje celice, apoptozo ali nekroptozo (40). Vezava TNF-α na TNFR1 povzroči konformacijsko spremembo, ki vodi v tvorbo znotrajceličnega kompleksa na citoplazemski membrani (kompleks I), ki vključuje TRADD, s TNF receptorjem povezan faktor 2, RIPK1 in celični inhibitor apoptotičnega proteina-1 (cIAP1) (43). Internalizacijo TNFR1 spremlja sprememba vezavnih partnerjev v citosolu. RIPK1 skupaj s FADD in kaspazo-8 tvori kompleks IIa, ki aktivira kaspazno kaskado in tako povzroči apoptozo. Kadar pogoji niso primerni za nastanek apoptoze zaradi okužbe z virusom, farmakološkega vpliva ali genetske manipulacije, se RIPK1 in RIPK3 fosforilirata, povežeta in tvorita kompleks IIb, ki je vključen pri nastanku nekroptoze (40, 43). Opisana signalna pot je predstavljena na Sliki 2.



Slika 2: Prikaz signalne poti nekroptoze, sprožene s TNF-α

2.2.1.2. Izvedba nekroptoze

Kljub obsežnim raziskavam so podatki o molekulskih mehanizmih izvršitve nekroptoze še vedno skopi (37). Kaspaze so sicer izvajalci apoptoze, vendar te proteaze nimajo pozitivnega učinka na nekroptozo. Do sedaj še niso odkrili analognega razreda proteinov, ki bi bili udeleženi v nekroptozi (43). Interakcija med RIPK1 in RIPK3 preko njunih domen RIPK homotipičnega interakcijskega motiva igra ključno vlogo pri posredovanju izvršitve nekroptotičnega dogajanja (18). Mogoče je, da ta kompleks fosforilira nekatere specifične celične tarče nekroptotične poti (44).

Dokazano je, da ima nekroptoza nekatere skupne biokemijske značilnosti z nekrozo. To so na primer oksidativni izbruh, hiperpolarizacija mitohondrijske membrane ter prepustnost lizosomske in plazemske membrane, vendar pa obstaja možnost, da so mehanizmi teh procesov drugačni kot pri nekrozi (41). Pomembni posredniki, ki sodelujejo pri izvršitvi nekroptotične celične smrti, so reaktivne kisikove spojine (RKS), Ca^{2+}, fosfolipaze, lipoksigenaze, proteaze in ceramid. Ca^{2+} in RKS so glavni akterji, pri čemer neposredno ali posredno povzročajo škodo na proteinih, lipidih in DNK, kar se kaže v motenem delovanju organelov in okrnjeni celični integriteti. Celice, ki so podvržene nekroptozi, sprožijo proinflamatorne signalne kaskade z aktivnim sproščanjem vnetnih citokinov in razlitjem celične vsebine ob razpadu celice (45). Znano je tudi, da naj bi bilo nastajanje RKS odgovorno za nekroptozo le pri določenih tipih celic in zato verjetno ne predstavlja

splošnega mehanizma (18). Pri nekroptotičnih celicah so pogosto prisotne avtofagne vakuole, zato nekateri raziskovalci domnevajo, da je lahko tudi avtofagija eden od mehanizmov izvršitve nekroptoze (43).

3. Stavrosporin

Stavrosporin je naravni alkaloid, izoliran iz kultur Streptomyces staurosporesa (46). Znan je kot neselektivni inhibitor širokega spektra kinaz, med katerimi so: protein-kinaza C, od cikličnega adenozin monofosfata odvisna protein-kinaza (protein-kinaza A), protein-tirozin-kinaza, fosforilaza-kinaza in od Ca^{2+}/kalmodulina odvisna protein-kinaza (47-53). Mehanizem inhibicije kinaz poteka preko vezave na adenozin-vezajoče področje njene katalitične podenote (54). Stavrosporin je najmočnejši inhibitor protein-kinaz, kar jih do sedaj poznamo. Večino protein-kinaz inhibira v nanomolarnih koncentracijah (54).

Na celico ima raznolike učinke, ki vključujejo tudi indukcijo celične diferenciacije in indukcijo apoptoze (53, 54, 55). Edinstvena lastnost stavrosporina je njegova sposobnost, da praktično vse sesalske celice hitro in popolnoma privede v apoptozo (53). Kljub njegovi pogosti uporabi pri preučevanju procesov apoptoze mehanizem delovanja ni popolnoma razjasnjen in je odvisen od vrste celic, na katere deluje, in njegove koncentracije (56). Apoptoza, sprožena s stavrosporinom, lahko poteka preko hitrega, od kaspaz odvisnega, ali počasnega, od kaspaz neodvisnega mehanizma (57, 58, 59). V kulturi astrocitov podgan prevladuje od kaspaze-3 odvisna zakasnjena oblika. Poleg tega lahko stavrosporin pri višji koncentraciji v takšni kulturi sproži nekroptozo. Mehanizem, preko katerega deluje na proces nekroptoze, prav tako še ni povsem raziskan (58, 59).

4. Nekrostatini

Leta 2005 je raziskovalec procesov nekroptoze Degterev s sodelavci preiskal kemično bazo 15000 spojin, da bi našel inhibitorje nekroptoze, povzročene s TNF-α in pankaspaznim inhibitorjem zVAD.fmk. Izbrali so jih nekaj, ki so jih kolektivno poimenovali nekrostatini (60, 61). To so molekule, ki so specifični in učinkoviti inhibitorji regulirane nekrotične celične smrti v različnih celičnih modelih nekroptoze (62).

Prvi odkriti inhibitor nekroptoze je nekrostatin-1, ki je njen zelo močan in selektiven inhibitor. V različnih vrstah učinkovito zavre nekroptotično celično smrt, povzročeno z vezavo na receptorje smrti (63). Za nekrostatin-1 je značilno, da preko alosterične

inhibicije selektivno vpliva na kinazno aktivnost RIPK1, ki je ključen posrednik nekroptoze (64, 65), nima pa vpliva na kinazno aktivnost RIPK3 (66). Ugotovili so tudi, da nekrostatin-1 močno vpliva na različne značilnosti, povezane z nekrozo. Preprečuje izgubo znotrajcelične vsebine, trganje plazemske membrane in razvoj nekrotične morfologije, kar vključuje nabrekanje celice in organelov (67).

Poleg nekrostatina-1 so identificirali tudi druge, strukturno drugačne nekrostatine, kot so nekrostatin-3, nekrostatin-4 in nekrostatin-5, ki prav tako delujejo preko kinazne aktivnosti RIPK1 (68, 69). Vse omenjene vrste nekrostatinov najverjetneje vplivajo na podobna, vendar ne ista aktivna mesta RIPK1 (62). Raziskovalci so odkrili tudi nekrostatin-7, za katerega je značilno, da ne inhibira RIPK1. Zato je verjetno, da nekrostatin-7 vpliva na dodatno regulatorno molekulo nekroptotične signalne poti. Optimizacija kemične strukture nekrostatina-7 je občutno izboljšala njegovo biološko aktivnost, poleg tega pa so derivati nekrostatina-7 uporabni pri nadaljnjem raziskovanju nekroptotične celične smrti (69).

II. NAMEN DELA

Preučevanje procesov regulirane celične smrti je pomembno zaradi njihove vpletenosti pri vrsti različnih patoloških stanj. Mednje sodijo imunološke, razvojne, nevrodegenerativne in rakave bolezni.

Nekroptoza je oblika regulirane celične smrti, ki je bila najpozneje odkrita, zato so njene signalne poti še slabo raziskane. Med inhibitorji nekroptoze, s katerimi lahko te signalne poti preučujemo, je najbolj poznan nekrostatin-1. Zaradi njegovih biokemijskih lastnosti je zanj značilna nepopolna inhibicija nekroptoze, zato poteka iskanje novih inhibitorjev. Med te sodi tudi nekrostatin-7, ki ima drugačen mehanizem delovanja kot nekrostatin-1.

V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali nekrostatin-7 vpliva na smrt astrocitov možganske skorje novorojenih podgan, sproženo s stavrosporinom. Poleg tega nas je zanimalo, kakšen je njegov učinek v primerjavi z nekrostatinom-1.

Delovni hipotezi

- Nekrostatin-7 zavira nekroptozo, sproženo s stavrosporinom, v kulturi astrocitov možganske skorje novorojenih podgan.
- Nekrostatin-7 je v primerjavi z nekrostatinom-1 močnejši inhibitor nekroptoze, sprožene s stavrosporinom, v kulturi astrocitov možganske skorje novorojenih podgan.

III. MATERIALI IN METODE

1. Materiali

1.1. Kemikalije za pripravo celičnih kultur

- Leibowitzev medij (L-15)
- goveji fetusni serum (FBS)
- Dulbeccov modificirani medij Eagle: Hamova mešanica nutritientov F-12 (DMEM/F-12) v razmerju 1:1
- penicilin-streptomicin (10,000 U Pen/ml, 10,000 µg Strep/ml)
- fosfatni pufer (PBS)
- 0,05 % tripsin-etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)

  (vse od proizvajalca Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Škotska)
- 7,5 % raztopina $NaHCO_3$, sterilno filtrirana, primerna za celične kulture (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- visoko prečiščena voda (pridobljena z lastnim sistemom)

1.2. Kemikalije za poskuse na celičnih kulturah

- stavrosporin, ≥ 95 % (HPLC)
- nekrostatin-1, ≥ 98 % (HPLC)
- nekrostatin-7, ≥ 98 % (HPLC)

  (vse od proizvajalca Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- aneksin V-fluorescein izotiocianat (FITC)/7-aminoaktinomicin D (7-AAD) kit za pretočno citometrijo (Beckman Coulter – Immunotech, Marseille, Francija), ki vsebuje:
  - raztopino aneksina V-FITC, > 99 % (FPLC)
  - raztopino 7-AAD, > 85 % (HPLC)
  - 10-kratni koncentrirani vezavni pufer

1.3. Oprema

- pretočni citometer Quanta SC MPL; Beckman Coulter, Inc (Brea, Kalifornija, ZDA)
- fazno-kontrastni mikroskop Eclipse TS 100 s pripadajočim fotoaparatom Coolpix 995; Nikon Corp. (Tokio, Japonska)

2. Metode dela

2.1. Poskusne živali

Za izvedbo poskusov smo uporabili novorojene (1-2 dni stare) podgane obeh spolov, vrste Rattus Norvegicus, seva Wistar. Živali so bile iz lastne gojitvene kolonije, vzrejene v stabilnih pogojih s temperaturo 22 °C, relativno vlažnostjo 55 % in naravnim ciklusom svetlobe in teme. Živele so v kletkah Ehret tip IV (Ehret, Emmendingen, Nemčija). Material v kletkah je bil Lignocel 3-4, živali pa so dobivale standardno dieto za glodavce Altromin (oboje Altromin, Lage, Nemčija). Omogočen jim je bil prost dostop do hrane in vode.

Poskuse na živalih smo izvedli na podlagi dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih številka 34401-7/2012/3, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije. Postopke smo izvedli v skladu z Evropsko konvencijo št. 123 za zaščito vretenčarjev, ki se uporabljajo v poskusne in druge znanstvene namene.

2.2. Priprava celičnih kultur

Novorojene podgane smo dekapitirali. Izolacijo astrocitov smo izvedli v aseptičnih pogojih po modificiranem postopku, opisanem v viru številka (58). Najprej smo odvzeli možgane in z njih odstranili možganske ovojnice. Nato smo ločili možganske skorje velikih možganov in jih zbrali v mediju L-15. Zbrane možganske skorje smo mehansko disociirali in jih suspendirali v mediju za gojenje celičnih kultur. Medij za gojenje celičnih kultur je vseboval: DMEM/F-12 (1:1; pH 7,0), FBS (10 % vol/vol), penicilin (100 U/ml) in streptomicin (100 µg/ml). Pripravljeno suspenzijo celic smo prenesli v plastenke za gojenje in jih inkubirali pri 37 °C, 10 % CO_2 in v z vlago nasičeni atmosferi. Vsake tri do štiri dni smo medij zamenjali z 10 ml svežega medija za gojenje celičnih kultur. Celice smo na opisan način gojili do konfluentnosti, ki smo jo optično določili pod fazno kontrastnim mikroskopom. Potem smo plastenko za 18 ur dali na stresalnik pri 150 obratih na minuto in

37 °C. Nato smo zamenjali medij za gojenje celičnih kultur, celice 6 ur inkubirali v zgoraj opisanih razmerah in na enak način ponovno stresali 18 ur. Zatem smo celice tripsinizirali (dodali 4 ml 0,05 % raztopine tripsin-EDTA), da so astrociti odstopili od podlage, in 20 minut inkubirali v enakih razmerah. Zatem smo dodali 16 ml medija za gojenje celičnih kultur, celice triturirali in jih prenesli v dve novi plastenki za gojenje. Kulture smo nato v enakih razmerah en dan inkubirali, potem smo zamenjali medij za gojenje celičnih kultur in nadaljevali z gojenjem celic do stanja konfluence. Zatem smo jih ponovno tripsinizirali, jih prenesli v petrijevke s premerom 35 mm ter jih v enakih razmerah gojili do stanja konfluence. Potem smo celicam zamenjali medij za gojenje celičnih kultur z 1 ml medija enake sestave, le da je bil brez dodatka FBS, in jih uporabili za obdelavo z različnimi spojinami z namenom preučevanja njihovega vpliva na celično smrt.

2.3. Obdelava celic za preučevanje celične smrti

2.3.1. Sprožitev celične smrti s stavrosporinom

Celice smo za 1, 3 ali 5 ur izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu in jih nato 22 ur regenerirali v mediju brez stavrosporina. *

Kontrolne celice 1 so rasle v enakih razmerah, vendar niso bile izpostavljene stavrosporinu oziroma katerikoli drugi spojini.

2.3.2. Vpliv nekrostatina-7 na celično smrt, sproženo s stavrosporinom

Celicam smo dodali 10 µM nekrostatin-7 in jih inkubirali 1 uro. Nato smo zamenjali medij, dodali 10^{-6} M stavrosporin in 10 µM nekrostatin-7 ter celice inkubirali 1, 3 oziroma 5 ur. Zatem smo celice 22 ur regenerirali v mediju z nekrostatinom-7, brez stavrosporina. *

Kontrolne celice 2 so bile tretirane v enakih razmerah, vendar zgolj z nekrostatinom-7, brez stavrosporina. Uporabljena koncentracija nekrostatina-7 je bila izbrana skladno z navodili proizvajalca.

2.3.3. Vpliv nekrostatina-1 na celično smrt, sproženo s stavrosporinom

Celicam smo dodali 100 µM nekrostatin-1 in jih inkubirali 1 uro. Nato smo zamenjali medij, dodali 10^{-6} M stavrosporin in 100 µM nekrostatin-1 ter celice inkubirali 3 ure. Zatem smo celice 22 ur regenerirali v mediju z nekrostatinom, brez stavrosporina. *

Kontrolne celice 3 so bile tretirane v enakih razmerah, vendar zgolj z nekrostatinom-1, brez stavrosporina. Uporabljena koncentracija nekrostatina-1 je bila izbrana skladno z navodili proizvajalca.

* Po končani regeneraciji smo iz petrijevk odstranili medij, dodali 500 µl tripsina in celice 20 minut inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo petrijevke pretresli, da so se astrociti ločili od površine. S pipeto smo celice triturirali in nato suspenzijo celic v tripsinu prenesli v 1,5 ml plastične epruvete. Tako smo jih pripravili za nadaljnji postopek.

2.4. Analiza celične smrti s pretočnim citometrom

2.4.1. Barvanje celic z aneksinom V in 7-aminoaktinomicinom D

Za barvanje celic smo uporabili kit Beckman Coulter IM3614 in postopek barvanja celic izvedli v skladu s priloženimi navodili. Za analizo enega vzorca smo uporabili 500 µl suspenzije z gostoto celic okoli 5 x 10^6 celic/ml.

Suspenzijo celic smo centrifugirali pri 400x G, tri minute pri 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo s pipetiranjem odstranili supernatant in celice sprali s 500 µl ledeno hladnega PBS. Po ponovnem centrifugiranju, ki smo ga izvedli na enak način kot v prejšnji fazi, in odstranitvi supernatanta, smo celice resuspendirali v 100 µl ledeno hladnega vezavnega pufra in epruvete postavili na led. Vzorcem smo nato dodali barvili aneksin V in 7-AAD ter jih 15 minut inkubirali pri 4 °C in v temi. Po inkubaciji smo dodali še 400 µl ledeno hladnega vezavnega pufra. Celice, pobarvane z aneksinom V in 7-AAD, smo nato v roku 30 minut analizirali s pretočnim citometrom. Do analize smo vzorce hranili na ledu.

2.4.2. Merjenje s pretočnim citometrom

S pretočnim citometrom smo analizirali 10 000 celic iz vsakega vzorca. Izvor svetlobe je predstavljal 22 mW argonski laser, ki deluje pri 488 nm. Izmerili smo elektronski volumen celic, stransko sipanje, fluorescenco fluorokroma FITC in fluorescenco 7-AAD. Za detekcijo fluorokroma FITC smo uporabili filter 525 BP (FL1), za detekcijo 7-AAD pa filter 670 LP (FL3). Te meritve so nam omogočile ločitev populacij živih, zgodnje apoptotičnih, sekundarno nekrotičnih in nekroptotičnih celic. Rezultate smo zajeli in prikazali s pomočjo programske opreme Quanta SC MPL.

2.5. Statistična analiza

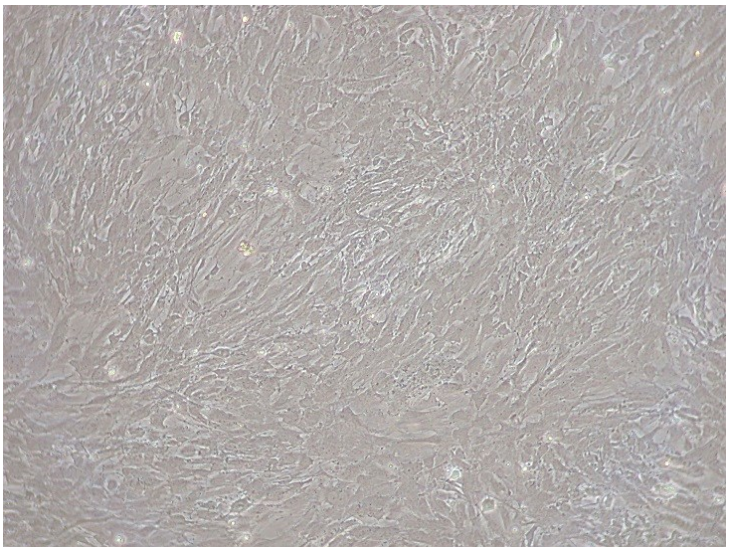
Rezultati so meritve štirih do petih ponovitev poskusov, ki smo jih opravili v dveh ali treh paralelnih vzorcih. Rezultati so izraženi kot aritmetična sredina ± njena standardna napaka. Razliko med aritmetičnima sredinama dveh vzorcev smo dokazovali z enosmernim ali dvosmernim Studentovim t-testom. Statistično značilno razliko je predstavljala vrednost

stopnje tveganja $p \leq 0{,}05$. Za statistično analizo in grafični prikaz podatkov smo uporabili računalniški program GraphPad Prism 5.

IV. REZULTATI

1. Analiza celic s pretočnim citometrom

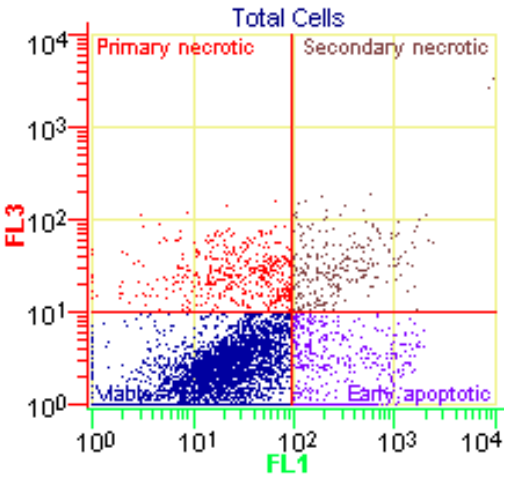
Za določitev celične smrti smo uporabili konfluentne kulture astrocitov možganskih skorij novorojenih podgan. Najprej smo postopek izvedli na kulturi celic, ki je nismo izpostavili nobeni spojini (kontrolne celice 1). Na sliki 1 je prikazan nativni posnetek kulture astrocitov.



Slika 3: Nativni posnetek kulture astrocitov (10-kratna povečava)

Analiza celic je pokazala, da so največji delež izmed štirih populacij predstavljale žive celice. Povprečen delež le-teh je bil 81,71 %, nekroptotičnih celic 7,28 %, zgodnje apoptotičnih celic 6,58 % in sekundarno nekrotičnih 4,43 %.

Slika 2 predstavlja grafični prikaz analize celic s pretočnim citometrom po simultanem barvanju z aneksinom V in 7-AAD, ki jih nismo izpostavili nobeni spojini. Na njem je opazen velik delež živih celic v spodnjem levem kvadrantu.

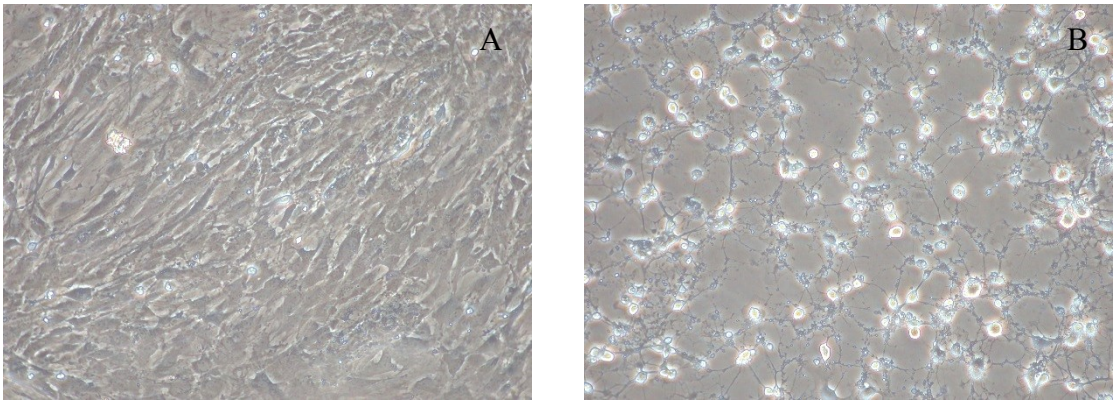


Slika 4: Grafična predstavitev analize kontrolnih celic 1 s pretočnim citometrom

Legenda: žive celice (spodnji levi kvadrant), zgodnje apoptotične celice (spodnji desni kvadrant), nekroptotične celice (zgornji levi kvadrant), sekundarno nekrotične celice (zgornji desni kvadrant); FL1 – fluorescenčni detektor za detekcijo fluorokroma FITC, FL3 – fluorescenčni detektor za detekcijo 7-AAD

2. Sprožitev celične smrti s stavrosporinom

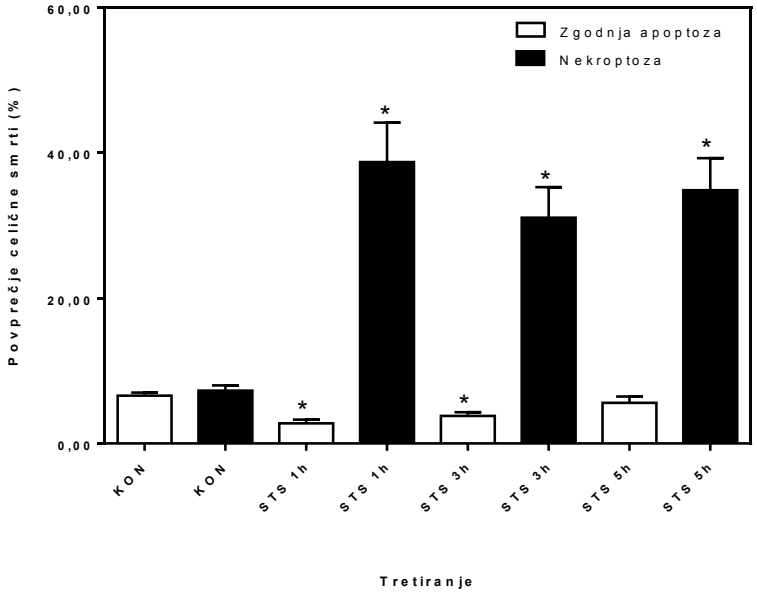
Kulture astrocitov smo za 1, 3 ali 5 ur izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu, kot je opisano v Materiali in metode (III). Rezultati so pokazali, da 10^{-6} M stavrosporin poveča delež nekroptotičnih celic v primerjavi s celicami, ki niso bile izpostavljene stavrosporinu (kontrolne celice 1), kar je skladno z ugotovitvijo predhodne študije (70). Celice so bile po inkubaciji s stavrosporinom tudi morfološko vidno spremenjene (Slika 3).



Slika 5: Primerjava fotografije kulture astrocitov, ki smo jo izpostavili stavrosporinu, in fotografije neizpostavljene kulture astrocitov (20-kratna povečava)

Legenda: *A – neizpostavljena kultura astrocitov, B – kultura astrocitov, ki smo jo za tri ure izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu*

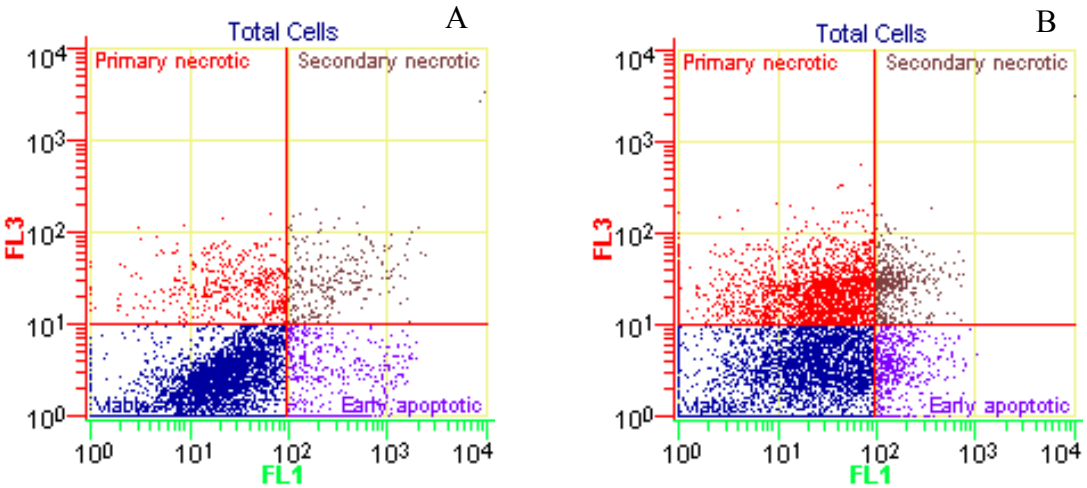
Delež nekroptotičnih celic se je povečal že po eni uri izpostavljenosti stavrosporinu. Po treh in po petih urah inkubacije celic s stavrosporinom delež nekroptotičnih celic ni več naraščal. Nasprotno je 10^{-6} M stavrosporin pri eni in treh urah izpostavitve zmanjšal delež zgodnje apoptoze v primerjavi s kontrolnimi celicami 1, medtem ko pri 5 urah tega učinka nismo opazili (Slika 4).



Slika 6: Delež zgodnje apoptoze in nekroptoze po izpostavitvi stavrosporinu v odvisnosti od časa izpostavljenosti

Legenda: *(KON) Kontrolne celice, ki jih nismo izpostavili nobeni spojini. (STS) Celice, ki smo jih izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu. Rezultati so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka. * $p < 0,05$ v primerjavi z zgodnjo apoptozo oziroma nekroptozo v kontrolnih celicah 1 (dvosmerni Studentov t-test za neenake variance)*

Slika 5 predstavlja grafični prikaz analize celic s pretočnim citometrom, ki smo jih za tri ure izpostavili stavrosporinu (B). V primerjavi s kontrolnimi celicami 1 (A) je vidno povečan delež nekroptotičnih celic v zgornjem levem kvadrantu.

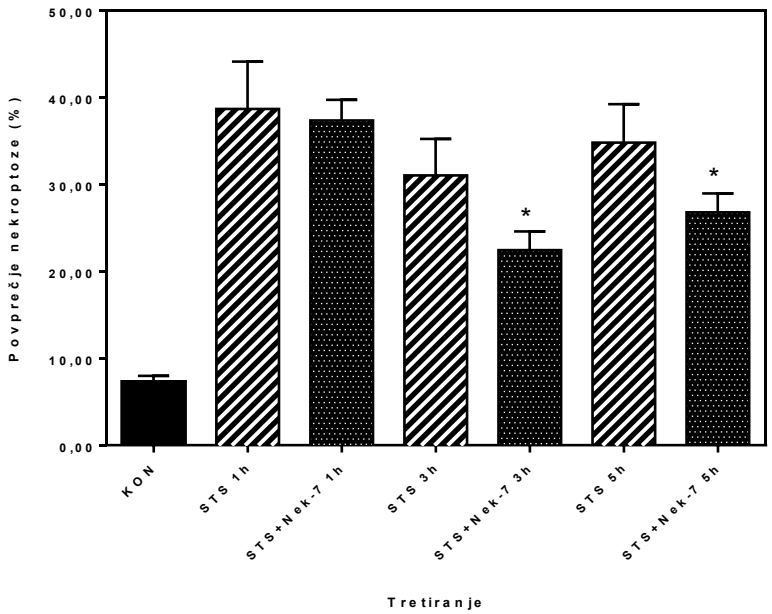


Slika 7: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili stavrosporinu in neizpostavljenih celic)

Legenda: *A – neizpostavljena kultura astrocitov, B – kultura astrocitov, ki smo jo izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu; žive celice (spodnji levi kvadrant), zgodnje apoptotične celice (spodnji desni kvadrant), nekroptotične celice (zgornji levi kvadrant), sekundarno nekrotične celice (zgornji desni kvadrant); FL1 – fluorescenčni detektor za detekcijo fluorokroma FITC, FL3 – fluorescenčni detektor za detekcijo 7-AAD*

3. Vpliv nekrostatina-7 na regulirano celično smrt, sproženo s stavrosporinom

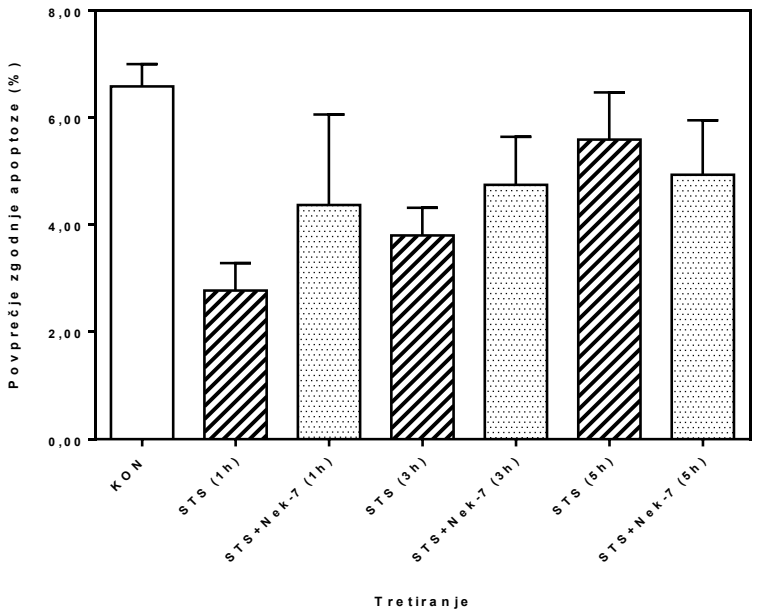
Z namenom preučevanja inhibicije regulirane celične smrti smo kulture astrocitov izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 10 µM nekrostatina-7. To smo naredili v različnih časovnih obdobjih, kot je opisano v Materiali in metode (III). Rezultati so pokazali, da nekrostatin-7 zavira nekroptozo, sproženo s stavrosporinom. Učinek nekrostatina-7 je odvisen od časa izpostavljenosti. Največja inhibicija nekroptoze je bila dosežena po treh urah inkubacije celic s stavrosporinom in nekrostatinom-7. Znašala je približno 36 %. Pri podaljšanju inkubacijskega časa na 5 ur se obseg inhibicije ni povečal (Slika 6).



Slika 8: Delež nekroptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-7 v odvisnosti od časa izpostavljenosti

Legenda: *(KON) Kontrolne celice, ki jih nismo izpostavili nobeni spojini. (STS) Celice, ki smo jih izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu. (STS + Nek-7) Celice, ki smo jih izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 10 µM nekrostatina-7. Rezultati so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka. * $p < 0,05$ v primerjavi s celicami, ki so bile enak čas izpostavljene samo stavrosporinu (enosmerni Studentov t-test za neenake variance)*

Nasprotno vpliva nekrostatina-7 na zgodnjo apoptozo, sproženo s stavrosporinom, nismo dokazali. Enosmerni Studentov t-test za namreč ni pokazal značilnih razlik pri primerjavi celic, ki so bile tretirane samo s stavrosporinom, s celicami, ki so bile tretirane s stavrosporinom, v prisotnosti nekrostatina-7, v enakih časovnih obdobjih. Pri treh urah se je sicer nakazovalo povišanje deleža celic v zgodnji apoptozi, vendar le-to ni bilo statistično značilno (Slika 7).



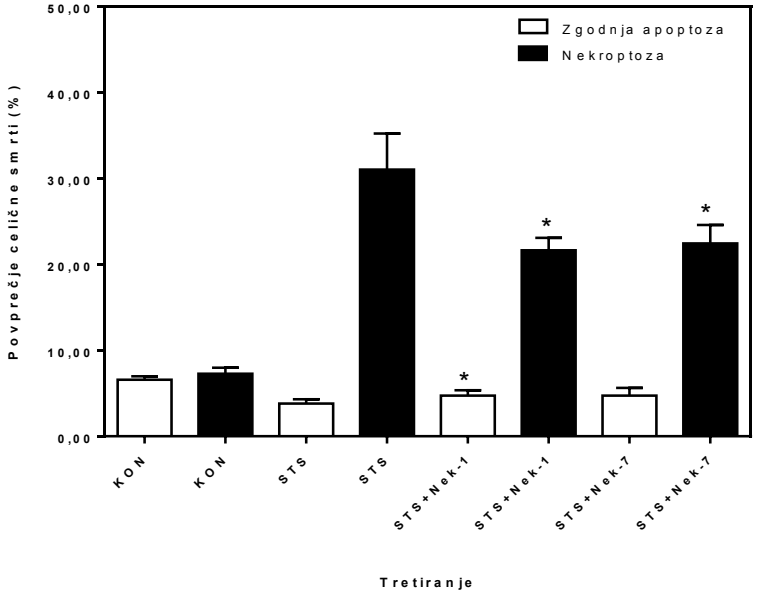
Slika 9: Delež zgodnje apoptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-7 v odvisnosti od časa izpostavljenosti

Legenda: *(KON) Kontrolne celice, ki jih nismo izpostavili nobeni spojini. (STS) Celice, ki smo jih izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu. (STS + Nek-7) Celice, ki smo jih izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 10 µM nekrostatina-7. Rezultati so predstavljeni kot aritmetična sredina ± standardna napaka.*

4. Primerjava vpliva nekrostatina-7 in nekrostatina-1 na regulirano celično smrt, sproženo s stavrosporinom

V nadaljevanju raziskave smo primerjali vpliv nekrostatina-7 z vplivom nekrostatina-1, za katerega je bilo že predhodno ugotovljeno, da lahko inhibira regulirano celično smrt, sproženo s stavrosporinom (70). Primerjali smo vpliv prisotnosti 100 µM nekrostatina-1 in 10 µM nekrostatina-7 na celice, ki so bile 3 ure hkrati z eno ali drugo spojino izpostavljene 10^{-6} M stavrosporinu. Rezultati so pokazali, da v našem eksperimentalnem modelu obe spojini zavirata nekroptozo, sproženo s stavrosporinom, in sicer v približno enakem obsegu. Z nobeno učinkovino nismo dosegli popolne inhibicije nekroptoze. Delež inhibicije nekroptoze je pri inkubaciji z nekrostatinom-1 znašal približno 40 % in je bil nekoliko višji kot pri inkubaciji z nekrostatinom-7, kjer je znašal približno 36 %. Razlika med njima ni bila statistično značilna (dvosmerni Studentov t-test). Pri izpostavitvi celic

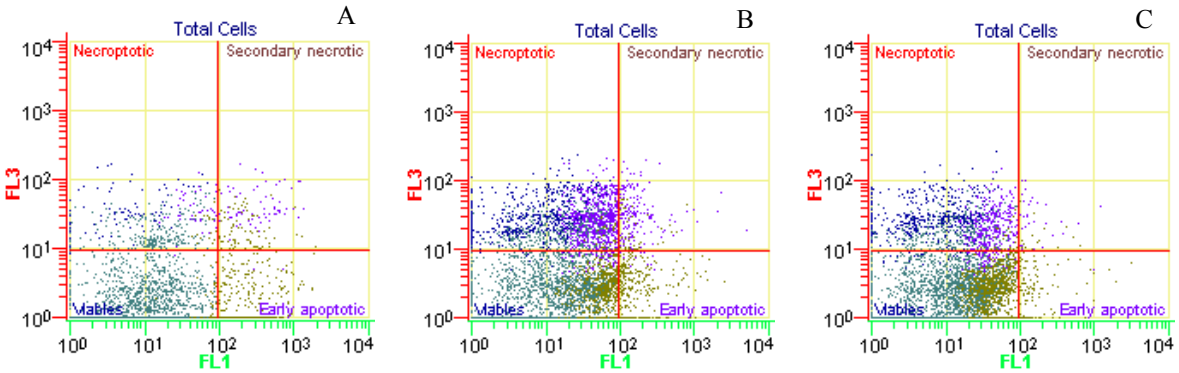
stavrosporinu se je v prisotnosti nekrostatina-1 značilno povečal delež zgodnje apoptoze, česar pri nekrostatinu-7 nismo opazili (Slika 8).



Slika 10: Primerjava deleža zgodnje apoptoze in nekroptoze po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-1 in po hkratni izpostavitvi stavrosporinu in nekrostatinu-7

Legenda: *(KON) Kontrolne celice, ki jih nismo izpostavili nobeni spojini. (STS) Celice, ki smo jih za 3 h izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu. (STS + Nek-1) Celice, ki smo jih za 3 h izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 100 µM nekrostatina-1. (STS + Nek-7) Celice, ki smo jih za 3 h izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 10 µM nekrostatina-7. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost ± standardna napaka. * $p < 0,05$ v primerjavi z zgodnjo nekroptozo pri celicah, tretiranih samo s stavrosporinom (enosmerni Studentov t-test za neenake variance)*

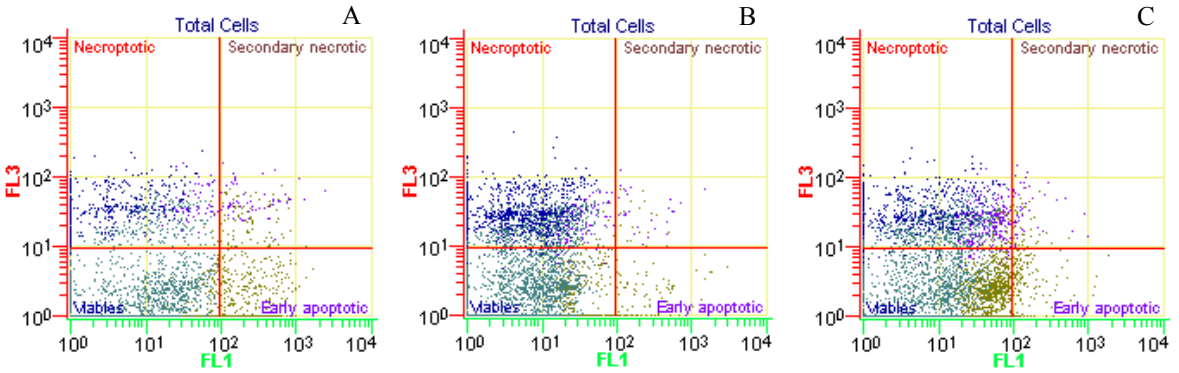
Na Sliki 9 je grafični prikaz analize celic s pretočnim citometrom, ki smo jih za tri ure izpostavili stavrosporinu ob prisotnosti nekrostatina-7 (C). V primerjavi s celicami, izpostavljenimi izključno stavrosporinu (B), je v tem primeru populacija nekroptotičnih celic v zgornjem levem kvadrantu vidno zmanjšana.



Slika 11: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili samo stavrosporinu in celic, ki smo jih za 3 ure hkrati izpostavili stavrosporinu in nekrostatinu-7)

Legenda: *A – neizpostavljena kultura astrocitov, B – kultura astrocitov, ki smo jo izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu, C – kultura astrocitov, ki smo jo izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 10 µM nekrostatina-7; žive celice (spodnji levi kvadrant), zgodnje apoptotične celice (spodnji desni kvadrant), nekroptotične celice (zgornji levi kvadrant), sekundarno nekrotične celice (zgornji desni kvadrant); FL1 – fluorescenčni detektor za detekcijo fluorokroma FITC, FL3 – fluorescenčni detektor za detekcijo 7-AAD*

Slika 10 grafično prikazuje analizo celic s pretočnim citometrom, ki smo jih za tri ure izpostavili stavrosporinu ob prisotnosti nekrostatina-1 (C). Tudi v tem primeru je populacija nekroptotičnih celic, v primerjavi s celicami izpostavljenimi izključno stavrosporinu (B), vidno zmanjšana.



Slika 12: Grafična predstavitev analize s pretočnim citometrom (primerjava celic, ki smo jih za 3 ure izpostavili samo stavrosporinu in celic, ki smo jih za 3 ure hkrati izpostavili stavrosporinu in nekrostatinu-1)

Legenda: *A – neizpostavljena kultura astrocitov, B – kultura astrocitov, ki smo jo izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu, C – kultura astrocitov, ki smo jo izpostavili 10^{-6} M stavrosporinu v prisotnosti 100 µM nekrostatina-1; žive celice (spodnji levi kvadrant), zgodnje apoptotične celice (spodnji desni kvadrant), nekroptotične celice (zgornji levi kvadrant), sekundarno nekrotične celice (zgornji desni kvadrant); FL1 – fluorescenčni detektor za detekcijo fluorokroma FITC, FL3 – fluorescenčni detektor za detekcijo 7-AAD*

V. RAZPRAVA

RCS je eno najbolj obširno preiskovanih področij celične biologije. Razumevanje molekularnih mehanizmov njenih različnih vrst v fizioloških in patoloških razmerah je daleč od popolnega, hkrati pa predmet intenzivnega preučevanja. Znanje o teh procesih bi namreč lahko pretvorili v nove terapevtske možnosti zdravljenja bolezni, za katere je značilna vpletenost celične smrti. Ena od novejših odkritih oblik RCS je nekroptoza, ki je bila predmet obravnave naše diplomske naloge. V njej smo se osredotočili na preučevanje nekroptoze astrocitov, povzročene s stavrosporinom. Astrocite smo izbrali, ker so odporne celice, relativno rezistentne za apoptozo, hkrati pa je znano, da lahko propadajo tudi z nekroptozo (70) in so tako primerne za preučevanje njenih signalnih poti.

Poznamo različne metode opisnega in številčnega določanja celic, kot so na primer optično in elektronsko mikroskopiranje, gelska elektroforeza in pretočna citometrija (71). V naši raziskavi smo uporabili metodo pretočne citometrije v povezavi z metodo simultanega barvanja z aneksinom V in 7-AAD, kar nam je omogočilo ločevanje živih, zgodnje apoptotičnih, nekroptotičnih in sekundarno nekrotičnih celic (pozno apoptotičnih ter nekrotičnih) (70, 72). Žive celice imajo asimetrično razporeditev različnih fosfolipidov med notranjim in zunanjim delom plazemske membrane. Eden od teh fosfolipidov je fosfatidilserin, ki je pri živih celicah prisoten na notranjem delu membrane, med apoptozo pa se prenese na zunanjo stran membrane (72). Aktivacija translokaze fosfatidilserina je zgoden in pogost dogodek pri apoptozi različnih mišjih in človeških celičnih vrst, ne glede na sprožitveni mehanizem. Časovno se odvija pred mnogimi drugimi dogodki, normalno povezanimi s tem tipom celične smrti (73). Aneksin V je od Ca^{2+} odvisen protein, ki veže fosfolipide in ima visoko afiniteto do fosfatidilserina (74). Vezava aneksina V tako specifično označuje aktiviranost kaspaz in s tem apoptoze (70). Pozno apoptotične in nekrotične celice izgubijo celovitost membrane (72). Tretiranje s 7-AAD nam omogoča, da ločimo celice, ki imajo poškodovano membrano, od apoptotičnih in živih celic (75). 7-AAD je fluorescentno barvilo, sposobno vezave na DNK, ki ga pogosto uporabljajo pri preučevanju apoptotičnih celic (73). Dokler ima celica neokrnjeno membrano, 7-AAD ne more prodreti skoznjo in se posledično ne more interkalirati v DNK. Ko pa je membrana poškodovana, lahko 7-AAD dostopa do DNK v celicah in se veže nanjo med citozinom in gvaninom (72, 76, 77). 7-AAD vzbujamo z argonskim laserjem pri 488 nm (76, 77). Zaradi omenjene karakteristike lahko 7-AAD uporabljamo v kombinaciji z drugimi fluorokromi,

ki jih vzbujamo pri isti valovni dolžini; za potrebe naše raziskave smo uporabili FITC (77). Uporaba kombinacije aneksina V in 7-AAD torej omogoči identifikacijo štirih celičnih populacij. Celice s fenotipom 7-AAD$^-$ / aneksin V-FITC$^-$ so intaktne, žive celice, fenotip 7-AAD$^-$ / aneksin V-FITC$^+$ predstavljajo zgodnje apoptotične celice, fenotip 7-AAD$^+$ / aneksin V-FITC$^-$ nekroptotične (primarno nekrotične) ter fenotip 7-AAD$^+$ / aneksin V-FITC$^+$ sekundarno nekrotične celice (70).

Za sprožanje celične smrti smo uporabili stavrosporin, za katerega velja, da lahko v kulturi astrocitov, v odvisnosti od koncentracije, sproži vsaj dve vrsti celične smrti; apoptozo in nekroptozo. Pri nižjih koncentracijah (10^{-7} M) je prevladujoča oblika celične smrti apoptoza, pri višjih koncentracijah (10^{-6} M) pa je prevladujoča oblika nekroptoza (59). V naši raziskavi smo uporabili 10^{-6} M stavrosporin. Že po eni uri izpostavljenosti je bil delež nekroptoze približno petkrat večji (38,72 ± 5,43) kot pri neizpostavljenih celicah (7,28 ± 0,70). Delež nekroptoze je ostal visok tudi po treh in petih urah izpostavitve stavrosporinu (Slika 4). Način, na katerega stavrosporin sproži nekroptozo, zaenkrat še ni povsem pojasnjen. Najverjetneje gre za mehanizem, ki je neodvisen od vezave na receptorje smrti (70). Hkrati je bil pri eni in treh urah izpostavitve stavrosporinu značilno zmanjšan delež apoptoze v primerjavi z neizpostavljenimi celicami, kar je lahko posledica dejstva, da apoptoza in nekroptoza nista povsem neodvisni obliki celične smrti (58, 59).

Nekroptoza izraža enake morfološke značilnosti kot nekroza, vendar pa signalna pot nekroptoze zahteva vpletenost RIPK1 in RIPK3 in jo lahko specifično inhibiramo z nekrostatini (41). V našem poskusu smo ugotavljali vpliv nekrostatina-7 na inducirano celično smrt astrocitov in ga primerjali z vplivom nekrostatina-1. Ugotovili smo, da nekrostatin-7 v našem eksperimentalnem modelu zmanjša delež nekroptoze, sprožene s stavrosporinom. Največji učinek smo opazili pri treh urah izpostavitve, daljši čas izpostavitve pa ni dodatno zmanjšal deleža nekroptotičnih celic.

Primerjava učinkov nekrostatina-7 in nekrostatina-1 na s stavrosporinom inducirano celično smrt je pokazala, da noben nekrostatin popolnoma ne zavre nekroptoze. Poleg tega se delež inhibicije nekroptoze med njima ni značilno razlikoval; pri nekrostatinu-7 je znašal približno 36 % in pri nekrostatinu-1 približno 40 %. Ker imata uporabljena nekrostatina različen mehanizem delovanja, lahko zaključimo, da sta pri nekroptozi astrocitov novorojenih podgan, sproženi s stavrosporinom, vpleteni vsaj dve različni signalni poti. Nekrostatin-1 je namreč dobro znan kot alosterični inhibitor RIPK1. Je specifičen in močan inhibitor nekroptoze pri različnih celičnih vrstah in kot tak pogosto

uporabljan pri preiskovanju različnih bolezni (63, 68). Po drugi strani je nekrostatin-7 novejši inhibitor nekroptoze, ki zaenkrat še ni tako dobro raziskan. Strukturno se razlikuje od ostalih nekrostatinov in ne inhibira RIPK1, kar nakazuje na možnost, da nekrostatin-7 vpliva na dodatno regulatorno molekulo signalne poti nekroptoze (68). Zaradi razlik v mehanizmu delovanja bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno preveriti, kakšen vpliv bi na potek nekroptoze, sprožene s stavrosporinom, imela kombinacija obeh nekrostatinov.

V naših poskusih se je torej izkazalo, da bi nekrostatin-7 morda lahko bil primeren za preučevanje tistih signalnih poti nekroptoze, ki so neodvisne od RIPK1. Kljub temu to še ne pomeni, da lahko naše ugotovitve posplošimo na nekroptozo pri drugih vrstah celic, ker je znano, da so nekatere signalne poti odvisne od vrste celic (78). V različici Jurkat celic, ki imajo pomanjkanje FADD, lahko več derivatov nekrostatina-7 inhibira nekroptozo, sproženo s TNFα (69). Za aktivacijo nekroptotične signalne poti je potrebna kinazna aktivnost RIPK1 in RIPK3 ter interakcija med njima. Ker nekrostatin-7 ne deluje na RIPK1, je mogoče, da je mehanizem delovanja vezan na RIPK3 oziroma na interakcijo med RIPK1 in RIPK3. Za RIPK3 so namreč ugotovili, da je ključen člen signalne poti nekroptoze. Pri tem je najbolj pomembna ugotovitev, da so celice, ki izražajo RIPK3, lahko podvržene nekroptozi, pri celicah, ki RIPK3 ne izražajo, pa nekroptoza ne poteče. Za izvedbo nekroptoze je potrebno, da pride ob nekrotičnem dražljaju do privzema RIPK3 v signalni kompleks, ki vsebuje RIPK1, FADD in kaspazo-8. Zaenkrat še ni znano, če so pri fosforilaciji RIPK1/RIPK3 in aktivaciji nekrosoma vpletene tudi druge kinaze, na katere bi lahko deloval nekrostatin-7 (79).

V naši raziskavi smo opazili povečanje deleža apoptoze pri celicah, tretiranih s stavrosporinom in nekrostatinom-1, in tudi povečanje (vendar ne statistično značilno) deleža apoptoze pri celicah, tretiranih s stavrosporinom in nekrostatinom-7. Ti rezultati potrjujejo medsebojno povezanost apoptoze in nekroptoze. Celice so namreč sposobne preklapljati med obema vrstama celične smrti, če so prvotno aktivirani mehanizmi genetsko, farmakološko ali fiziološko onemogočeni (65). V mnogih študijah so dokazali, da je nekroptoza alternativni mehanizem regulirane smrti, ki zagotavlja odstranitev celic, kadar apoptoza ni mogoča (63). Obstaja pa tudi študija, kjer so preiskovali in potrdili apoptozo kot alternativni mehanizem nekroptozi ob prisotnosti nekrostatina-1. Mehanizem preklopa iz nekroptoze v apoptozo naj bi bil vsaj delno povzročen s pretvorbo permeabilnosti z notranje na zunanjo mitohondrijsko membrano, kar je povezano s translokacijo proteina Bax. Omenjena raziskava, podobno kot naši rezultati, nakazuje na

recipročnost rezervnega mehanizma celične smrti (80). Pri miših apoptotični DISC kompleks, kamor sodijo FLICE-u (FADD-u podobni interlevkin-1 beta konvertirajoči encim) podobni inhibitorni protein (FLIP), FADD in kaspaza-8, cepi komponenti nekrosoma RIPK1 in RIPK3 in ter spodbuja apoptozo (81). Po drugi strani pa lahko TNF, ligand Fas in TRAIL povzročijo nekrotično celično smrt ob prisotnosti inhibitorjev kaspaz oziroma v odsotnosti FADD (68). Novejše raziskave kažejo, da pri miših, ki nimajo nobenega od treh DISC proteinov, niti nimajo RIPK1 oziroma RIPK3, ne pride niti do apoptoze niti do nekroptoze (81). Poleg tega je RIPK1 vpletena v aktivaciji apoptoze preko kaspaze-8, kar dodatno poveča kompleksnost prepletanja apoptoze in nekroptoze (82). Tudi ob preučevanju vpliva nekrostatina-1 na nekroptozo pri Huntingtonovi bolezni so odkrili, da le-ta usmeri celice v izvedbo apoptoze, zaradi česar bi sočasna terapija z inhibitorjem apoptoze in inhibitorjem nekroptoze morda imela ugoden vpliv na potek bolezni (83). Poleg tega je iz literature znano, da nekroptoza lahko sproži avtofagijo, vendar v naši diplomski nalogi te oblike celične smrti nismo preučevali. Vsekakor pa avtofagija dodatno ilustrira kompleksnost prepletanja poti različnih oblik celične smrti z namenom doseganja želenega učinka na usodo celice (67).

Astrociti igrajo pomembno vlogo pri travmatski poškodbi možganov in možganski kapi, saj ima njihovo delovanje velik vpliv na preživetje nevronov (84, 85). Poleg tega je celična smrt astrocitov vpletena tudi pri patogenezi mnogih akutnih in kroničnih nevrodegenerativnih bolezni, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen in Wernickejeva encefalopatija (84, 85). Pri teh boleznih pride do kompleksnih morfoloških in funkcionalnih sprememb, ki so v pozni fazi povezane z astrogliozo in aktivacijo mikroglije. Astrociti so torej pomembni za zaščito nevronov, poznavanje mehanizmov njihove nekroptoze pa bi lahko vodilo v nove terapevtske strategije za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (86). Čeprav smo v naših poskusih raziskovali vlogo nekroptoze v kulturi astrocitov novorojenih podgan, pa prikaz intrinzičnih nekroptotičnih mehanizmov nakazuje na širšo možnost terapevtskega vplivanja na nekrotično celično smrt. Znano je, da inhibicija RIPK1 z nekrostatini izboljša stanje poškodovanih tkiv v živalskih modelih ishemičnih možganskih okvar, travmatičnih poškodb možganov in miokardnega infarkta (86).

Medtem ko je pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni bistvo preprečevanje celične smrti, je pri rakavih boleznih ključno odstranjevanje neoplastično spemenjenih celic. Pri razvoju mnogih vrst primarnega raka možganov igrajo pomembno vlogo astrociti, za

katere je značilna visoka odpornost za apoptozo (59). Maligni tumorji astrocitov, kot je na primer glioblastom, so eni najbolj pogostih in najbolj nevarnih možganskih tumorjev (10). Eden ključnih mehanizmov odpornosti glioblastomov za apoptozo je zmanjšana ekspresija različnih receptorjev smrti. Ta je lahko posledica mutacije signalne poti p53, ki je največkrat spremenjena pri tumorogenezi in je močno povezana tako z apoptozo kot z nekroptozo. Lahko pa je tudi posledica mutacije drugih genov, ki so prav tako povezani s tumorogenezo glioblastomov in regulirajo izvedbo signalne poti proteinske kinaze, ki jo aktivira mitogen (59).

Odpornost tumorskih celic na apoptozo je privedla do razvoja več različnih sprožiteljev apoptoze, vendar se le-ti v klinični praksi niso obnesli zaradi povečane ekspresije transporterja za adenozin trifosfat vezavni kompleks v rakavih celicah. Ker je nekroptoza rezervni mehanizem apoptoze, bi odkritje njenega sprožilca, odpornega na omenjeni transporter, odpiralo nove možnosti kemoterapije (70). Pomen nekroptoze v okviru kliničnega zdravljenja so uspeli dokazati pri otrocih z akutno limfoblastno levkemijo, rezistentnih na učinkovine, ki se uporabljajo pri kemoterapiji te bolezni, vključno glukokortikoide. Za limfoblastno levkemijo je namreč značilna blokada mitohondrijske apoptoze. Z aktivacijo nekroptoze so to blokado obšli in uspeli povrniti dovzetnost celic za terapijo z glukokortikoidi (67). Poleg vpletenosti nekroptoze pri rakavih boleznih lahko igra nekroptoza vidno vlogo tudi pri odstranjevanju celic, okuženih z virusom. Domnevajo namreč, da bi lahko bila nekroptoza odgovor evolucije na inhibicijo apoptoze, povzročeno s patogeni. Ta opažanja nakazujejo na potencialno možnost induciranja nekroptoze kot terapije virusnih okužb (70).

Razumevanje različnih mehanizmov celične smrti je nujno za poznavanje patofiziologije človeških bolezni, raziskovanje področja pa razkriva tarčne molekule, ki osvetljujejo nove terapevtske možnosti. Pred odkritjem nekroptoze je bilo zelo malo poskusov razvoja učinkovin, ki bi vplivale na proces nekroze, saj je veljalo, da je le-ta nereguliran odziv na prekomeren stres (78). Upamo, da bosta nekrostatin-7 in nekrostatin-1, kot inhibitorja različnih signalnih poti nekroptoze, v prihodnosti pomagala pri razjasnjevanju od kaspaze neodvisnega modela celične smrti. Na ta način bi lahko privedla do odkritja spojin vodnic za uporabo v terapiji akutnih in kroničnih nevrodegenerativnih obolenj, miokardnega infarkta, malignih tumorjev, virusnih okužb in ostalih bolezni, pri katerih je vpletena RCS.

VI. SKLEP

- Ugotovili smo, da nekrostatin-7 zavira nekroptozo, sproženo s stavrosoprinom, v kulturi astrocitov možganske skorje novorojenih podgan. Inhibicija nekroptoze ni bila popolna. Odvisna je bila od časa izpostavljenosti stavrosporinu; največja je bila po treh urah inkubacije astrocitov z 10^{-6} M stavrosporinom in je znaša 36 %.
- Ugotovili smo, da nekrostatin-7, v primerjavi z nekrostatinom-1, ni močnejši inhibitor nekroptoze sprožene s stavrosporinom. Učinek nekrostatina-1 je znašal 40 % in se ni statistično razlikoval od tistega pri nekrostatinu-7.
- Opazili smo tudi, da prisotnost nekrostatinov poveča delež celic, ki propadajo z apoptozo, sproženo s stavrosporinom. Delež zgodnje apoptotičnih celic se je značilno povečal pri nekrostatinu-1, medtem ko pri nekrostatinu-7 povečanje ni bilo statistično značilno.
- Zaradi različnih mehanizmov delovanja nekrostatina-1 in nekrostatina-7 bi bilo smiselno preveriti, kakšen vpliv na inducirano smrt astrocitov bi imela kombinacija obeh nekrostatinov.

VII. LITERATURA

1. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: Principles of neural science, 4th edition, McGraw-Hill, New York, 2000: 20-21
2. The other brain cell. Dostopno na: http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/reward/cells.html; julij 2013
3. Svensson CI, Brodin E: Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. Mol Interv 2010; 10 (1): 25-38
4. Davis KL, Charney D, Coyle JT, et al: Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2002: 133-45
5. Astrociti – spregledane zvezde nevrobiologije. Dostopno na: http://www.sinapsa.org/eSinapsa/clanki/20/astrociti-spregledane-zvezde-nevrobiologije; julij 2013
6. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M: Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol 2012; 814: 23-45
7. The role of astrocytes in stroke, brain plasticity and neurogenesis. Dostopno na: https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/32390/1/gupea_2077_32390_1.pdf; julij 2013
8. Lipnik-Štangelj M: Ethanol toxicity in the brain: Alteration of astroglial cell function. Pharmacology, Dr. Luca Gallelli (Ed.), InTech, Croatia, 2012: 607-24
9. Kržan M: Funkcija astrocitov. Farm Vestn 2001; 70:553-9
10. Sofroniew MV, Vinters HV: Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 2010; 119 (1): 7-35
11. Markiewicz I, Lukomska B: The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2006; 66 (4): 343-58
12. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E: Role of astrocytes in brain function and disease. Toxicol Pathol 2011; 39 (1): 115-23
13. Farina C, Aloisi F, Meinl E: Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol 2007; 28 (3): 138-45
14. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al: Essential cell biology, 2nd edition, Garland Science, New York, 2003: 625

15. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, et al: Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (3): 980-84
16. European Molecular Biology Organization, Programmed cell death in model organisms. Dostopno na: http://events.embo.org/12-cell-death/; avgust 2013
17. Kroemer G, Levine B: Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9 (12): 1004-10
18. Yuan J, Kroemer G: Alternative cell death mechanisms in development and beyond. Genes Dev 2010; 24 (23): 2592-602
19. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ 2009; 16 (1): 3-11
20. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, et al: Major cell death pathways at a glance. Microbes Infect 2009; 11 (13): 1050-62
21. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35 (4): 495-516
22. Kam PC, Ferch NI: Apoptosis: mechanisms and clinical implications. Anaesthesia 2000; 55 (11): 1081-93
23. Fisher U, Schulze-Osthoff K: New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. Pharmacol Rev 2005; 57 (2): 187-215
24. Zimmermann KC, Green DR: How cells die: apoptosis pathways. J Allergy Clin Immunol 2001; 108 (4 Suppl): S99-103
25. Compton MM: A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. Cancer Metastasis Rev 1992; 11 (2): 105-19
26. Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 2000; 45 (3): 528-37
27. Introduction to apoptosis. Dostopno na: http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm; maj 2013
28. Ramírez Chamond R, Carracedo Añón J, Moreno Aguilar C, et al: Apoptosis and disease. Alergol Inmunol Clin 1999; 14 (6): 367-74
29. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, et al: Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem 1998; 273 (16): 9357-60

30. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ: Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surg Oncol 1997; 6 (3): 133-42
31. Chang HY, Yang X: Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64 (4): 821-46
32. Caspase/Apoptosis. Dostopno na: http://www.biotrend.com/archive/file/content/research-area-guides/14Caspase_Apoptosis.pdf; avgust 2013
33. Why caspases are the executioners of apoptosis? Dostopno na: http://info.agscientific.com/blog/bid/145090/Why-Caspases-are-the-executioners-of-apoptosis; avgust 2013
34. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, et al: Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. Exp Cell Res 2000; 256 (1): 27-33
35. Pižem J, Cör A: Kaspaze. Med razgl 2001; 40 (3): 283-91
36. Zimmerman KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 2001; 92 (1): 57-70
37. Tsuda H, Ning Z, Yamaguchi Y, et al: Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. J Oral Sci 2012; 54 (2): 137-49
38. Apoptosis: Mechanisms and relevance in liver disease Dostopno na: www.gastrohep.com/theliver/apoptosis_chapter.pdf; maj 2014
39. Slee EA, Adrain C, Martin SJ: Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. Cell Death Differ 1999; 6 (11): 1067-74
40. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, et al: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11 (10): 700-7142
41. Wu W, Liu P, Li J: Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. Crit Rev Oncol 2012; 82 (3): 249-58
42. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ 2012; 19 (1): 107-120
43. Christofferson DE, Yuan J: Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. Curr Opin Cell Biol 2010; 22 (2): 263-68

44. He S, Wang L, Miao L, et al: Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. Cell 2009; 137 (6): 1100-11
45. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta 2006; 1757 (9-10): 1371-87
46. Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, et al: Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. Mol Cell Neurosci 2003; 23 (4): 669-80
47. Wiesner DA, Dawson G: Staurosporine Induces Programmed Cell Death in Embryonic Neurons and Activation of the Ceramide Pathway. J Neurochem 1996; 6 (4): 1418-25
48. Prehn JH, Jordán J, Ghadge GD, et al: Ca^{2+} and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. J Neurochem 1997; 68 (4): 1679-85
49. Krohn AJ, Preis E, Prehn JH: Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. J Neurosci 1998; 18 (29): 8186-97
50. Staurosporine product data sheet. Dostopno na: http://www.biogenesis.com.tw/DataBank/1011120Apoptosis%20Research/cytotoxicity%20kit/inducing%20reagents/Staurosporine_Product_Insert.pdf; september 2013
51. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, et al: Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. Exp Cell Res 1994; 211 (2): 314-21
52. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC: Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. J Cell Biol 1996; 133 (5): 1041-51
53. Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, et al: Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. Oncogene 2001; 20 (10): 1193-202
54. Yue TL, Wang C, Romanic AM, et al: Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. J Mol Cell Cardiol 1998; 30 (3): 495-507

55. Meggio F, Donella Deana A, Ruzzene M, et al: Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. Eur J Biochem 1995; 234 (1): 317-22
56. Deshmukh M, Johnson EM Jr: Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. Cell Death Differ 2000; 7 (3): 250-261
57. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al: Cell death: apoptosis versus necrosis (review). Int J Oncol 2002; 21 (1): 165-70
58. Šimenc J, Lipnik-Štanglej M: Staurosporine induces apoptosis and necroptosis in cultured rat astrocytes. Drug Chem Toxicol 2012; 35 (4): 399-405
59. Šimenc J, Lipnik-Štangelj M: Staurosporine induces different cell death forms in cultured rat astrocytes. Radiol Oncol 2012; 46 (4): 312-20
60. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat Chem Biol 2005; 1 (2): 112-9
61. Wang K, Li J, Degterev A, et al: Structure-activity relationship analysis of a novel necroptosis inhibitor, Necrostatin-5. Bioorg Med Chem Lett 2007; 17 (5): 1455-65
62. Maki JL, Teng X, Smith EE: Abstract SY27-03: Development of necrostatins, small molecule inhibitors of RIP1-kinase signaling and necroptosis. Cancer Res 2012; 72 (8): SY27-03
63. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, et al: Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Nat Chem Biol 2008; 4 (5): 313-21
64. Degterev A, Maki JL, Yuan J: Activity and specificity of necrostatin-1, small-molecule inhibitor of RIP1 kinase. Cell Death Differ 2013; 20 (2): 366
65. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Graham EM, et al: Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. J Cereb Blood Flow Metab 2011; 31 (1): 178-89
66. Cho Y, McQuade T, Zhang H, et al: RIP1-dependent and independent effect of Necrostatin-1 in necrosis and T cell activation. PLoS ONE 2011; 6 (8): e23209
67. Smith CC, Wellon DM: Necroptosis, necrostatins and tissue injury. J Cell Mol Med 2011; 15 (9): 1797-806

68. Vandenabeele P, Declercq W, Vanden Berghe T: Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. Trends Biochem Sci 2008; 33 (8): 352-5
69. Zheng W, Degterev A, Hsu E, et al: Structure-activity relationship study of a novel necroptosis inhibitor, necrostatin-7. Bioorg Med Chem Lett 2008; 18 (18): 4932-5
70. Šimenc J: Stavrosporin sproži apoptozo in nekroptozo v kulturi astrocitov podgan. Dostopno na: http://dkum.uni-mb.si/IzpisGradiva.php?id=39263; september 2013
71. Zamai L, Canonico B, Luchetti F, et al: Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. Cytometry 2001; 44 (1): 57-64
72. Zimmermann M, Meyer N: Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. Mammalian cell viability: Methods and protocols, Stoddart MJ (ed.), Humana Press, New York, 2011: 57-8
73. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med 1995; 182 (5): 1545-56
74. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995; 184 (1): 39-51
75. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV: Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. Cytometry 1994; 15 (1): 12-20
76. Gaforio JJ, Serrano MJ, Algarra I, et al: Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D. Cytometry 2002; 49 (1): 8-11
77. R&D Systems technical information: Flow cytometry protocol for analysis of cell viability using 7-amino actinomycin D (7-AAD). Dostopno na: http://www.rndsystems.com/literature_flow_cytometry_analysis_7_amino_actinomycin_d_7aad.aspx; december 2013
78. Jagtap PG, Degterev A, Choi S, et al: Structure-activity relationship study of tricyclic necroptosis inhibitors. J Med Chem 2007; 50 (8): 1886-95
79. Lee EW, Seo J, Jeong M, et al: The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. BMB Rep 2012; 45 (9): 496-508

80. Han W, Xie J, Li L, et al: Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. Apoptosis 2009; 14 (5): 674-86
81. Peter ME: Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. Nature 2011; 471 (7338): 310-2
82. Zhu S, Zhang Y, Bai G, et al: Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. Cell Death Dis 2011; 2 (1): e115
83. Lee HO, Byun YJ, Cho KO, et al: GS28 Protects Neuronal Cell Death Induced by Hydrogen Peroxide under Glutathione-Depleted Condition. Korean J Physiol Pharmacol 2011; 15 (3): 149-56
84. Takuma K, Baba A, Matsuda T: Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. Prog Neurobiol 2004; 72 (2): 111-27
85. Rodríguez JJ, Verkharatsky A: Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? Mol Neurobiol 2011; 43 (2): 87-96
86. Xie T, Peng W, Liu Y, et al: Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. Structure 2013; 21 (3): 493-9