

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilište u Dubrovniku**  
**Institut Ruđer Bošković**

**Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij**  
**Molekularne bioznanosti**

**Marina Cindrić**

**Biomodulacija propusnosti krvno – mozgovne barijere**  
**4-hidroksinonenalom *in vitro***

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2014.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski  
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** Biologija i Temeljene medicinske znanosti

**Biomodulacija propusnosti krvno – mozgovne barijere 4-hidroksinonenalom *in vitro***

**Marina Cindrić**

**Rad je izrađen u:** Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i  
Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković

**Mentor/i:** Prof.dr.sc. Kamelija Žarković, redovita profesorica

### **Kratki sažetak doktorskog rada:**

Poremećaj u funkciji krvno – mozgovne barijere (BBB) karakterističan je događaj u razvoju bolesti središnjeg živčanog sustava. Otkrivanje uloge 4-hidroksinonenala (HNE) u biomodulaciji propusnosti BBB-a otvara nove mogućnosti u liječenju ovih bolesti. U svrhu istraživanja uloge HNE-a u promjeni svojstava i funkcije BBB-a, razvijena su dva modela BBB-a: model BBB koji reflektira BBB u fiziološkim uvjetima, te model BBB-H koji predstavlja BBB u patološkim uvjetima kada je HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu. Ovo istraživanje je pokazalo da HNE neovisno o izvoru može modulirati propusnosti BBB-a. Ukoliko je prisutan u izvanstaničnom matriksu, HNE utječe na integritet i propusnost BBB-a kroz promjene u sastavu masnih kiselina i blokadom metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina endotelnih stanica te jačanjem antioksidacijskog statusa astrocita. Izravno izlaganje BBB-a HNE-u, u fiziološkom modelu uzrokuje jačanje integriteta kroz jačanje čvrstih spojeva, dok u patološkom modelu isti učinak postiže povećanjem razine  $\omega$ -3 masnih kiselina. Linolna kiselina, kao esencijalna masna kiselina i potencijalni izvor HNE-a, u obliku micela također može modulirati propusnost BBB-a izravno ili u kombinaciji s HNE-om. Dobiveni rezultati ukazuju da HNE može modulirati propusnost BBB izravno utječući na sintezu okludina u čvrstim spojevima i/ili promjene u sastavu masnih kiselina endotelnih stanica.

**Broj stranica:** 103

**Broj slika:** 40

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 157

**Jezik izvornika:** Hrvatski jezik

**Ključne riječi:** krvno-mozgovna barijera, BBB, propusnost, 4-hidroksinonenal, PUFA, lipidna peroksidacija, antioksidacijska zaštita

**Datum obrane:** 22.12.2014.

### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. **Prof. dr. sc. Jerko Barbić**, redoviti profesor
2. **Prof. dr. sc. Kamelija Žarković**, redovita profesorica (mentor)
3. **Prof. dr. sc. Neven Žarković**, izvanredni profesor, znanstveni savjetnik, trajno zvanje
4. **Prof. dr. sc. Vera Cesar**, redovita profesorica (zamjena)

**Rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute  
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of  
Molecular biosciences

PhD thesis

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science

**Scientific Fields:** Biology and Basic Medical Sciences

### *In vitro* biomodulation of blood – brain barrier permeability by 4-hydroxynonenal

Marina Cindrić

**Thesis performed at:** Department of Pathology, School of Medicine, University of Zagreb  
Laboratory for Oxidative Stress of the Ruđer Bošković Institute

**Supervisor/s:** Prof. Kamelija Žarković, PhD, MD, Full professor

#### **Short abstract:**

Blood-brain barrier (BBB) dysfunction is a characteristic of numerous central nervous system diseases. Revealing new insights in biomodulation of BBB permeability by 4-hydroxynonenal (HNE) could assure new approaches in the treatment of these diseases. For this purpose, two BBB models were developed: BBB that reflects physiological conditions, and BBB-H representing pathological conditions where HNE is present in extracellular matrix. This study reveals that HNE can modulate BBB permeability independently on source. If present in extracellular matrix, HNE affects integrity and permeability of BBB through fatty acid composition changes and block in  $\omega$ -3 fatty acid metabolism of endothelial cells, with boosting of antioxidant status of astrocytes. Direct exposure of BBB to HNE in physiological model causes increase in integrity through tight junctions, while in pathological model same effect is achieved through increase in  $\omega$ -3 fatty acids. Linoleic acid, as an essential fatty acid and potential source of HNE, in the form of micelles also modulates BBB permeability directly or in combination with HNE. Obtained results suggest that HNE can modulate BBB permeability directly influencing the occluding synthesis in tight junctions and/or causing changes in fatty acid composition of endothelial cells.

**Number of pages:** 103

**Number of figures:** 40

**Number of tables:** 6

**Number of references:** 157

**Original in:** Croatian

**Key words:** blood-brain barrier, BBB, permeability, 4-hydroxynonenal, PUFA, lipid peroxidation, antioxidative defence

**Date of the thesis defence:** 22.12.2014.

#### **Reviewers:**

1. Prof Jerko Barbić, PhD, MD, Full professor
2. Prof Kamelija Žarković, PhD, MD, Full professor (supervisor)
3. Prof Neven Žarković, PhD, MD, Senior scientist, Associate professor
4. Prof Vera Cesar, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv.Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Analize elektronske mikroskopije napravljene su u sklopu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Lipidne analize učinjene su u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Disertacija je izrađena u sklopu dva znanstvena projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta Republike Hrvatske: „Oksidacijski stres i tumori središnjeg živčanog sustava“ (108-0000000-0028) voditeljice prof. dr. sc. Kamelije Žarković te „Lipidi, slobodni radikali i njihovi glasnici u integrativnoj onkologiji“ (098-0982464-2519) voditelja prof. dr. sc. Nevena Žarkovića.

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Kameliji Žarković na iskazanom povjerenju, pruženoj slobodi istraživanja i iskrenoj potpori tijekom izrade doktorske disertacije.*

*Iskreno hvala prof. dr. sc. Nevenu Žarkoviću, mom studijskom voditelju, ali i voditelju LabOS-a na pruženom povjerenju i podršci u korištenju laboratorijskog prostora, uređaja i kemikalija prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Neizmjereno hvala čitavoj ekipi LabOS-a! Lidiji i Ani što su me bodrile na svakom koraku i pomagale u pokusima, Neni i Teama (velikoj i maloj =)) na praktičnoj pomoći, Morani koja je sada u sunčanoj Dohi, Luki na iskrenosti i ležernosti, Suzani koja mi je usadila početna znanja rada u LabOS-u... Hvala vam na smijehu, druženjima, feštama, ali i podršci u onim ružnim i teškim trenucima!*

*Zahvaljujem se dr. sc. Branki Mihaljević i njezinoj novakinji Ivani Tartaro Bujak na divnoj suradnji prilikom izrade doktorske disertacije. Znam da sam vas namučila brojnim uzorcima i njihovim malim količinama! Ivana, hvala na izdvojenom vremenu u razdoblju pisanja tvog doktorata!*

*Mojim Ruđerovkama – Emi, Angie i Jelki! Hvala vam na sunčanim ručkovima za jadicovanja o neuspješnim pokusima i problemima koji su znali nicati na svakom koraku! Lakše se dođe na cilj uz bodrenje prijatelja =)*

*Curke, nisam vas zaboravila! Ani, Mariji i Ivani, hvala vam na razbibrizi, smijehu i 'možeš ti to' u najtežim trenucima! Hvala vam što ste bile uz mene!*

*Mojoj obitelji, mami, tati i braci, hvala vam na ljubavi i neiscrpnj podršci!!!*

*Suprugu Davoru i sinu Davidu vitezu Robin Hood Ceneru – DVRH-u, bez vaše neizmjerne ljubavi i hrabrenja, ali i strpljenja s mojim beskrajnim ispitima, pokusima, pisanjima do sitnih sati, ne bih daleko stigla. Volim vas najviše na svijetu – do neba i još više =)=)=)*

**Recept za ostvarenje snova:**

***puno ljubavi i osmijeh u najtežim trenucima začinjeni s 'možeš ti to'***

***In memoriam***

*Mojoj dragoj baki...*

*Tvoj neiscrpna ljubav, nadljudska snaga i neviđena strpljivost bit će mi vječni uzor!*

# SADRŽAJ

I. POPIS KRATICA.....	1
1. UVOD .....	1
1.1. Krvno – mozgovna barijera .....	2
1.1.1. Endotelne stanice.....	3
1.1.2. Bazalna membrana .....	4
1.1.3. Astrociti .....	4
1.1.4. Periciti i neuroni .....	5
1.1.5. Mikroglija i perivaskularni makrofazi .....	5
1.1.6. Strukturni integritet BBB-a .....	6
1.2. Oksidacijski stres.....	8
1.3. Lipidna peroksidacija i 4-hidroksinonenal .....	10
1.4. Masne kiseline mozga .....	14
1.5. BBB u bolestima središnjeg živčanog sustava.....	18
1.5.1. BBB i neurodegenerativni poremećaji .....	18
1.5.2. BBB i tumori CNS-a.....	19
2. CILJ RADA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Uzgoj staničnih kultura i linija .....	21
3.1.1. Uzgoj astrocita .....	21
3.1.2. Uzgoj stanica RbE4 .....	21
3.2. Imunocitokemija na GFAP .....	22
3.3. Priprema HNE-a .....	22
3.4. Priprema micela linolne kiseline.....	23
3.5. Analiza proteina .....	23
3.6. Izolacija lipida .....	23
3.7. Izrada modela BBB .....	24
3.7.1. Elektronska mikroskopija modela BBB .....	26
3.8. Vijabilnost i proliferacija stanica.....	27
3.8.1. MTT test.....	27
3.8.2. Test ugradnje radioaktivno obilježenog timidina .....	28

3.9.	Lumineks analiza .....	28
3.10.	Oksidacijski status stanica.....	29
3.10.1.	Određivanje unutarstaničnog ROS-a .....	29
3.10.2.	Određivanje lipidnih hidroperoksida.....	30
3.11.	Antioksidacijski status stanica.....	30
3.11.1.	Određivanje GSH.....	30
3.11.2.	Određivanje aktivnosti katalaze .....	30
3.12.	Kapljične analize proteina (Dot – blot analize).....	31
3.13.	Određivanje lipidnog profila .....	32
3.14.	Statistička obrada podataka .....	33
4.	REZULTATI .....	34
4.1.	Imunocitokemija na GFAP .....	34
4.2.	Utjecaj HNE-a na stanice .....	34
4.2.1.	Utjecaj HNE-a na vijabilnost i proliferaciju stanica .....	34
4.2.2.	Utjecaj HNE-a na oksidacijski status stanica .....	36
4.3.	Utjecaj micela LA na stanice .....	39
4.3.1.	Utjecaj micela LA na vijabilnost i proliferaciju stanica .....	39
4.3.2.	Utjecaj micela LA na oksidacijski status stanica .....	40
4.4.	Učinci HNE-a na BBB.....	41
4.4.1.	Rezultati analize na lumineksu .....	41
4.4.2.	Integritet i propusnost BBB-a.....	42
4.4.3.	HNE-proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a.....	44
4.4.4.	Antioksidacijski status BBB-a.....	45
4.4.5.	Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a.....	47
4.4.6.	Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a .....	51
4.5.	Učinci micela LA na BBB.....	52
4.5.1.	Integritet i propusnost BBB-a.....	52
4.5.2.	HNE-proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a.....	53
4.5.3.	Antioksidacijski status BBB-a.....	54
4.5.4.	Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a.....	57
4.5.5.	Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a .....	59



4.6.	Učinci kombiniranog tretmana HNE-a i micela LA na BBB.....	60
4.6.1.	Integritet i propusnost BBB-a.....	60
4.6.2.	HNE-proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a.....	61
4.6.3.	Antioksidacijski status BBB-a.....	62
4.6.4.	Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a.....	65
4.6.5.	Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a .....	68
5.	RASPRAVA .....	70
6.	ZAKLJUČCI.....	82
7.	LITERATURA.....	84
8.	SAŽETAK .....	94
9.	SUMMARY .....	96
10.	ŽIVOTOPIS .....	98

## I. POPIS KRATICA

- AA** – arahidonska kiselina (engl. Arachidonic acid)
- ACM** – kondicionirani medij astrocita (engl. Astrocyte conditioned media)
- AJ** – adhezijski spojevi (engl. Adhesion junctions)
- ALA** –  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl.  $\alpha$ -Linolenic acid)
- ARE** – element antioksidacijskog odgovora (engl. Antioxidans response element)
- BBB** – krvno mozgovna barijera (engl. Blood brain barrier)
- BBB-H** - krvno mozgovna barijera (engl. Blood brain barrier) uzgojena na kolagenu modificiranom 4-hidroksinonenalom
- BEC** – endotelne stanice mozga (engl. Brain endothelial cells)
- BSA** – albumin seruma goveda (engl. Bovine serum albumine)
- CAM** –molekule stanične adhezije (engl. Cell adhesion molecule)
- CINC-2 $\alpha\beta$**  – kemokinom izazvan kemoatraktant neutrofila 2 $\alpha\beta$  (engl. Chemokine induced neutrophil chemoattractant 2 $\alpha\beta$ )
- CNS** – središnji živčani sustav (engl. Central nervous system)
- DAB** - diaminobenzidin
- DCFH-DA** - 2',7'-diklorodihidrofluoresceinovog diacetata
- DHA** – dokosaheksaenska kiselina (engl. Docosahexaenoic acid)
- DMEM** – Dulbeccova modifikacija Eaglovog medija
- DTNB** – 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina
- EDTA** – etilendiaminotetraoctena kiselina
- EKODE** – 12,13-epoksi-9-keto-10(trans)-oktadecenska kiselina
- FAK** – kinaza fokalne adhezije (engl. Focal adhesion kinase)
- GABA** –  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl.  $\gamma$ -amiobutiric acid)
- GFAP** – glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. Glial fibrilar acidic protein)
- GLA** –  $\gamma$ -linolenska kiselina (engl.  $\gamma$ -Linolenic acid)
- GSH** – glutation
- HNE** – 4-hidroksinonenal
- HRP** – peroksidaza iz hrena (engl. Horseradish peroxidase)
- ICAM-1** – međustanična adhezijska molekula 1 (engl. Intercellular adhesion molecule 1)
- IFN- $\gamma$**  – interferon -  $\gamma$
- IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$
- IL-6** – interleukin 6
- JAM** – adhezijske molekule spojeva (engl. Junctional adhesion molecules)
- LA** – linolna kiselina (engl. Linoleic acid)
- MAGUK** – kinaza nalik membranski združenom gvanilatu (engl. Membrane associates guanylate kinase like)

**MAPK** – mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. Mitogen activated protein kinase)

**MRP1** – protein višestruke rezistencije 1 (engl. Multidrug resistance protein 1)

**MUFA** – jednostruko nezasićene masne kiseline (engl. Monounsaturated fatty acids)

**NFκB** – nuklearni faktor κB

**NOS** – sintaza dušikovog oksida (engl. Nitric oxide syntase)

**NOX** – NADPH oksidaza (engl. NADPH oxidase)

**Nrf2** – nuklearni faktor 2

**OXLAM** – metaboliti oksidirane linolne kiseline (engl. Oxidized linoleic acid metabolites)

**PBS** – otopina fosfatnog pufera (engl. Phosphate buffer soline)

**PI3K** – fosfatidil-inozitol 3 kinaza (engl. Phosphatidyl-inositol-3-kinase)

**PPAR** – receptor aktivacije proliferacije peroksisoma (engl. Peroxisome proliferator acitvated receptor)

**PUFA** – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. Polyunsaturated fatty acids)

**RNS** – reaktivne dušikove vrste (engl. Reacitve nitrogen species)

**ROS** – reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive oxygen species)

**SFA** – zasićene masne kiseline (engl. Saturated fatty acids)

**TBS** – otopina Tris-fosfatnog pufera (engl. Tris-phosphate buffer soline)

**TEER** – transendotelni električni otpor (engl. Transendothelial electrical resistance)

**TGF-β** – faktor rasta tumora β (engl. Tumor growth factor β)

**TJ** – čvrsti spojevi (engl. Tight junctions)

**TNB** - 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

**TNF-α** – faktor nekroze tumora α (engl. Tumor necrosis factor α)

**UCP** – mitohondrijski proteini razdvajanja (engl. Uncoupling protein)

**VCAM-1** – vaskularna adhezijska molekula 1 (engl. Vascular adhesion molecule 1)

**VEGF** – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. Vascular endothelial growth factor)

## ***UVOD***

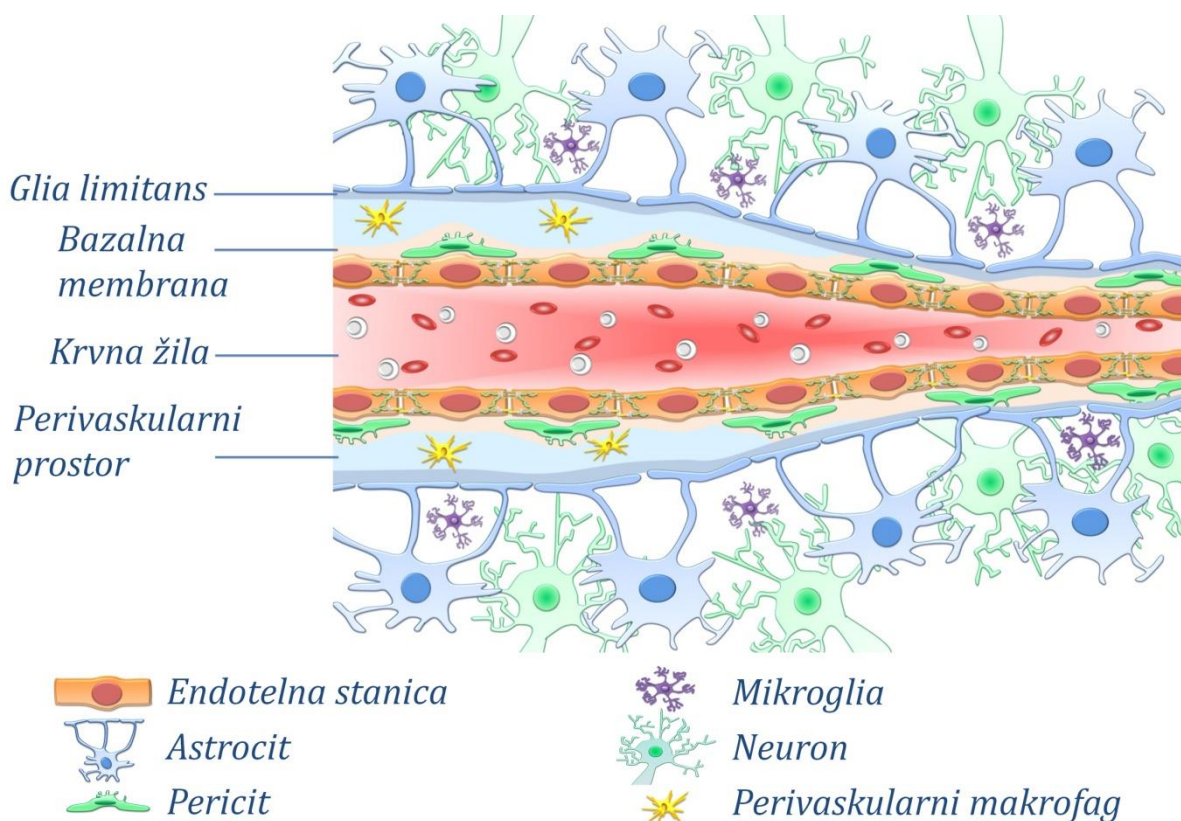
## 1. UVOD

Krvno – mozgovna barijera (BBB, engl. Blood brain barrier) se vrlo često zamišlja kao ovojnica koja štiti mozak od štetnih tvari. Međutim, BBB je zapravo vrlo profinjen sustav krvnih žila mozga koje uz pomoć okolnih stanica te aktivnih tvari koje one luče, dobivaju svojstva barijere, ali i dinamičkog sučelja koje osigurava pravilan rad mozga. U slučaju poremećaja homeostaze mozga, dolazi do narušavanja integriteta BBB. Iako narušeni integritet može biti samo prolaznog karaktera, vrlo često zbog težine poremećaja u radu mozga, on može prijeći u trajno stanje. Pri tome mozak više nije privilegirano mjesto s unutarnjim nadzorom i kontrolom rada, već se suočava s direktnim kontaktom s ostatkom organizma putem krvi. U ovakvim stanjima razina oksidacijskog stresa raste, a u nedostatku primjerenog antioksidacijskog sustava zaštite, raste i razina oštećenja uslijed oksidacijskog stresa. Iako su reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. Reactive oxygen species) i reaktivne dušikove vrste (RNS, engl. Reactive nitrogen species) koje pritom nastaju kratkoživuće, one mogu izazvati lančanu reakciju lipidne peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. Polyunsaturated fatty acids). Krajnji produkti ove reakcije su reaktivni aldehidi koji mogu širiti nastalu štetu te uzrokovati oštećenja daleko od početnog mjesta nastanka. Jedan od najpoznatijih i najbolje opisanih aldehida je 4-hidroksinonenal (HNE). HNE nastaje kao produkt lipidne peroksidacije omega ( $\omega$ ) 6 masnih kiselina te može imati brojne štetne utjecaje na stanicu. Međutim, HNE je prepoznat i kao signalna molekula. Stvarajući stabilne konjugate s proteinima, HNE utječe na signalne putove koji kontroliraju rast, diferencijaciju i apoptozu stanica. Glavni izvor HNE-a u ljudskom organizmu je linolna kiselina. Riječ je o esencijalnoj masnoj kiselini koja čini svega 1-2% ukupnih PUFA mozga, ali je prekursor za nastanak najzastupljenije masne kiseline u mozgu - arahidonske kiseline. Osim što štiti mozak od oksidacijskog stresa, arahidonska kiselina je glavna signalna molekula mozga koja modulira upalni odgovor, ali i vaskularni tonus. Osim toga, masne kiseline uključene su u nastanak i regulaciju čvrstih međustaničnih spojeva (TJ, engl. Tight junction). Iako su bitna sastavnica BBB-a koja osigurava njezinu nepropusnost, TJ-i su podložni oštećenjima uslijed oksidacijskog stresa. Pri tome dolazi do konformacijskih promjena proteina koji grade TJ-e i posljedično do povećanja propusnosti BBB-a. Poznato je da visoke razine ROS-a i HNE-a uzrokuju trenutno narušavanje integriteta BBB-a i njezinu povećanu propusnost. Međutim, nije poznato djelovanje niske količine ovih tvari, pogotovo u okolini već izloženoj određenim razinama oksidacijskog stresa. Stoga je cilj ove disertacije ispitati utjecaj niskih koncentracija HNE-a na promjene svojstava i funkcije BBB-a kroz promjene lipidnog sastava i antioksidacijske zaštite endotelnih stanica mozga. Također će se ispitati i utjecaj linolne kiseline na promjenu propusnosti i svojstava BBB.

## 1.1. Krvno – mozgovna barijera

Iako se ideja o postojanju BBB-a obično veže uz davnu 1885. godinu i Paula Erlicha koji je u svojim pokusima ustanovio da mozak nakon injiciranja intravitalnih boja u krvotok ostaje 'bijel poput snijega' [1], postojanje barijere prvi su ustanovili Bield i Kraus 1898. godine te Lewandowsky 1900. godine [2]. Ovi znanstvenici su uočili da natrijev ferocijanid i kolatna kiselina nemaju farmakoloških učinaka na središnji živčani sustav (CNS, engl. Central nervous system) ukoliko su intravenski aplicirane. Međutim, uslijed intraventrikularne aplikacije istih spojeva dolazi do pojave neuroloških simptoma [2]. Erlichov student Goldmann je 1913. godine istražujući mentorova opažanja učinio suprotno – injicirao je tripansko modriilo direktno u cerebrospinalnu tekućinu. Tako je opazio da se pritom oboji kompletan mozak, međutim periferni organi ostaju neobojani što je potvrđivalo pretpostavku o postojanju barijere između mozga i ostatka tijela [3]. Međutim, Erlich je uočio da se neki dijelovi mozga ipak oboje [1]. Riječ je o području koroidnog pleksusa, gdje dolazi do stvaranja cerebrospinalne tekućine, te području leptomeningi, odnosno tvrde i paučinaste moždane ovojnice. Ove strukture, naime imaju vlastite barijere. Tako epitelne stanice koroidnog pleksusa, međusobno čvrsto povezane TJ-ima, čine barijeru između krvi i cerebrospinalne tekućine, dok avaskularni višeslojni epitel paučinaste ovojnice čije stanice su također povezane TJ-ima čini treću barijeru mozga, takozvanu paučinastu barijeru. Iako ova posljednja barijera jedina u potpunosti obavija mozak i čini stvarnu fizičku prepreku između mozga i ostatka organizma, zbog relativno male površine te odsutnosti krvnih žila, paučinasta barijera ne predstavlja značajnu površinu za razmjenu tvari između krvi i CNS-a [4]. Površina BBB-a čini daleko najveću površinu za razmjenu tvari između krvi i mozga. Ova površina, ovisno o anatomskoj regiji iznosi između 150 i 200  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  tkiva što u prosječnog odraslog čovjeka rezultira ukupnom površinom od 12 – 18  $\text{m}^2$  [5].

Mikrovaskularne endotelne stanice glavna su građevna komponenta BBB-a, međutim svojstvo nepropusnosti BBB-a određuje i interakcija ovih stanica s bazalnom membranom, ali i drugim stanicama mozga. Tako mikroglija, astrociti, periciti i neuroni zajedno s endotelnim stanicama i njihovom bazalnom membranom čine neurovaskularnu jedinicu (Slika 1) koja je odgovorna za održavanje homeostaze CNS-a [6]. Ova neurovaskularna jedinica čini BBB fizičkom, transportnom i metaboličkom barijerom [7]. BBB ima svojstva fizičke barijere zbog brojnih TJ-a između endotelnih stanica koji sprječavaju paracelularni prolaz većine molekula [8]. Stoga je većina molekula prisiljena na transcelularni prolaz BBB-a putem brojnih transportnih sustava koji karakteriziraju BBB kao transportnu barijeru osiguravajući prolaz nutrijenata, a onemogućujući prolaz potencijalno štetnih tvari [4]. BBB djeluje i kao metabolička barijera zbog unutar- i van-staničnih enzima koji metaboliziraju peptide i ATP, ali i inaktiviraju brojne neurotoksine [9].



Slika 1. BBB kao neurovaskularna jedinica odgovorna za održavanje homeostaze potrebne za normalno funkcioniranje CNS-a. Na slici je vidljivo područje kapilare u kojem *glia limitans* usko priliježe uz bazalnu membranu endotelnih stanica, te područje postkapilarne venule gdje su ove dvije bazalne membrane odvojene perivaskularnim prostorom koji ima bitnu ulogu u upalnim procesima.

### 1.1.1. Endotelne stanice

Mikrovaskularne endotelne stanice mozga (BEC, engl. Brain endothelial cells) bitno se razlikuju od endotelnih stanica ostatka organizma. Najveća razlika javlja se u njihovoj sposobnosti regulacije prolaza molekula i stanica u moždani parenhim, odnosno izrazitog ograničavanja paracelularnog prolaza hidrofilnih molekula. Razlog tome je 50 – 100 puta čvršća povezanost BEC-a od perifernih endotelnih stanica [10]. Karakteristike BEC-a koje im osiguravaju ova svojstva su, uz kontinuirani pojas TJ-a, nedostatak fenestracija, niska pinocitička aktivnost, bazalna membrana te veći broj i volumen mitohondrija, ali i negativno nabijena površina zbog koje odbijaju negativno nabijene molekule [11–13]. Zbog čak 5-6 puta većeg broja mitohondrija nego primjerice mišićni endotel, BEC imaju veći energetske potencijal koji im osigurava dovoljno energije za aktivni transport nutrijenata i ostalih tvari u/iz mozga [6,14]. Također, postoji funkcionalna polarnost luminalne i abluminalne membrane BEC-a u prisutnosti receptora, enzima, transportnih sustava i ionskih kanala zbog koje

se BBB smatra aktivnim i izrazito dinamičkim sučeljem nužnim za održavanje homeostaze mozga [6,15].

### 1.1.2. Bazalna membrana

U strukturi BBB-a postoje dvije bazalne membrane. Prva je bazalna membrana BEC-a, a druga je astroglijalna ili parenhimalna bazalna membrana.

Bazalna membrana BEC-a sudjeluje u regulaciji propusnosti BBB-a te oštećenja bazalne membrane kroz degradaciju njezinih građevnih proteina metaloproteinazama dovode do povećanja propusnosti BBB-a [16]. Tri su glavne strukturne komponente bazalne membrane BEC-a: strukturni proteini (kolagen i elastin), specijalizirani proteini (fibronektin i laminin) te proteoglikani (perlekan) [12]. Uz to, veliki broj proteina izvanstaničnog matriksa, stanične adhezijske molekule (CAM, engl. Cell adhesion molecules) te signalni proteini doprinose kompleksnosti bazalne membrane [17]. Laminin bazalne membrane BEC-a izgrađen je od  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$  lanaca laminina koji s lancima  $\beta 1$  i  $\gamma 1$  formiraju laminin 411 i 511 [18]. Osim što okružuje BEC, u bazalnoj membrani nalaze se i periciti te ona služi kao sidrište ovim stanicama, ali ujedno i regulira funkciju BEC-a putem brojnih signalnih molekula na abluminalnoj strani BEC-a [17].

Astroglijalna bazalna membrana (*glia limitans*) izgrađena je od fibronektina, agrina i lanaca  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  laminina koji s lancima  $\beta 1$  i  $\gamma 1$  formiraju laminin 111 i 211 [18]. *Glia limitans* je još jedna barijera prema moždanom parenhimu koju sačinjavaju bazalna membrana parenhima i završne nožice astrocita. U području većih krvnih žila, ove dvije bazalne membrane razdvojene su perivaskularnim ili tzv. Robin-Virchowovim prostorom [19]. Perivaskularni prostor je mikrokoliš u kojem se tijekom upalnih procesa nakupljaju stanice imunološkog sustava prije konačnog prolaska u moždani parenhim [20].

### 1.1.3. Astrociti

Astrociti su glijalne stanice čije završne nožice usko prijanjaju uz BEC. Procjenjuje se da je čak 99% površine BEC-a prekriveno završnim nožicama astrocita [21]. Zahvaljujući ovom bliskom kontaktu s BEC-om, astrociti osiguravaju nutritivnu i metaboličku potporu neuronima. Također, završne nožice astrocita reguliraju transport vode putem akvaporina 4 smještenog isključivo u području završnih nožica astrocita [17]. Astrociti imaju važnu ulogu u poticanju sinteze proteoglikana što za posljedicu ima porast selektivnosti BEC-a prema nabijenim molekulama. Uz to, astrociti luče niz čimbenika, zasad još nedefiniranih, koji potiču stvaranje TJ-a u BEC-u i time pridonose jačanju integriteta BBB-a [12].



#### 1.1.4. Periciti i neuroni

Periciti ili vaskularne glatke mišićne stanice su bitna stanična komponenta kapilara i postkapilarnih venula. Nalaze se u bazalnoj membrani BEC-a i prekrivaju oko 30% kapilara CNS-a [22]. Periciti sintetiziraju većinu elemenata bazalne membrane BEC-a uključujući i nekoliko proteoglikana, a uz to kontroliraju ekspresiju proteina TJ-a lučenjem angiopoetina i čimbenika rasta tumora beta (TGF- $\beta$ , engl. Tumor growth factor- $\beta$ ) [12,13]. Međutim, periciti ne reguliraju propusnost BBB-a utječući samo na TJ-e. Nedavna istraživanja su pokazala da sam nedostatak pericita uzrokuje povećanu BBB propusnost. Razlog tome je pojačana endotelna transcitoza, ali i promjene polarizacije završnih nožica astrocita [22]. Također, fizički kontakt pericita s interendotelnim spojevima zajedno sa visokim udjelom  $\alpha$ -aktina glatkih mišića upućuju na funkcionalnu ulogu pericita u nadzoru krvnog protoka i regulaciji propusnosti endotela [12].

Zasada još uvijek nije poznato da li neuroni imaju ključnu ulogu u razvoju BBB-a, ali pokazano je da mogu regulirati funkciju BBB-a kao odgovor na metaboličke zahtjeve CNS-a [6]. Dokazano je da su endotel i završne nožice astrocita direktno inervirani noradrenergičkim, serotonergičkim, kolinergičkim i GABA-ergičkim neuronima te manjak ovih inervacija dovodi do oštećenja BBB-a i neurodegenerativnih bolesti [11].

#### 1.1.5. Mikroglija i perivaskularni makrofazi

Mikroglija i perivaskularni makrofazi su imunološke stanice mozga koje predstavljaju prvu liniju obrane od potencijalnih patogena [23]. U zdravom CNS-u, mikroglija ima razgranatu strukturu s malim tijelom i finim staničnim ograncima. Ova struktura povezuje se sa stanjem mirovanja mikroglije. U ovom stanju, suprotno njegovom nazivu, mikroglija zapravo aktivno vrši nadzor okoline i osigurava održavanje homeostaze. Svojim finim ograncima, mikroglija pretražuje okolinu i prikuplja informacije iz izvanstaničnog matriksa kako bi pravovremeno mogla reagirati [24]. Bilo koja trauma, infekcija, neurodegenerativni poremećaj ili promjena u homeostazi mozga izazivaju brze i temeljite promjene mikroglije. One uključuju promjene oblika stanica (ameboidni izgled), genske ekspresije i ponašanja stanica. Ovakvo stanje mikroglije naziva se aktivacijom mikroglije [24]. Aktivna mikroglija luči glutamat, kvinolinat, D-serin te ROS i RNS kojima modulira upalni odgovor [25].

Perivaskularni makrofazi su mala populacija antigen prezentirajućih stanica u CNS-u koje se aktiviraju uslijed upalnih procesa u CNS-u. Imaju sposobnost fagocitoze kojom uklanjaju stanični debris koji se nakuplja u perivaskularnom prostoru [19].

### 1.1.6. Strukturni integritet BBB-a

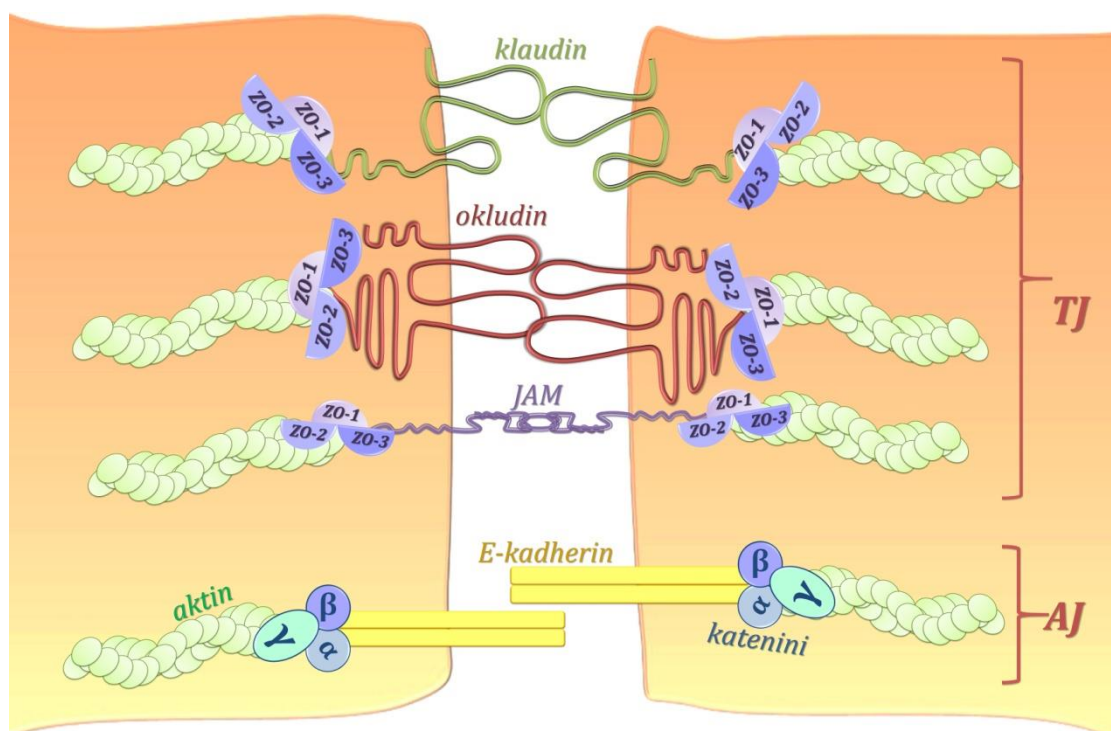
Glavne strukture odgovorne za svojstva i integritet BBB-a su TJ-i. Smješteni u apikalnom dijelu BEC-a, TJ-i imaju dvojak ulogu. Djeluju kao brtvilo između dviju stanica koje regulira lateralnu difuziju između apikalne i bazolateralne membrane čime se osigurava asimetrična distribucija membranskog sastava. Ujedno TJ-i ograničavaju paracelularnu propusnost [12]. Jedan od korisnih i često korištenih indikatora paracelularnog protoka iona je transendotelni električni otpor (TEER, engl. Transendothelial electrical resistance). TEER reflektira otpor prolazu malih nabijenih molekula kroz fiziološke barijere i smatra se točnom i osjetljivom metodom mjerenja integriteta BBB-a [12].

Strukturno, TJ-i formiraju kompleks paralelnih, međusobno povezanih transmembranskih i citoplazmatskih proteina (Slika 2) [8]. Transmembranski proteini grupirani su prema broju puta kojim prolaze membranu stanica. Tako TJ-e čine adhezijske molekule (JAM, engl. Junctional adhesion molecules) koje jednom prolaze kroz plazma membranu te kladini i okludin koji plazma membranu prolaze čak četiri puta [26]. Uz transmembranske, tu su i citoplazmatski proteini koji osiguravaju funkcionalnost TJ-a kroz njihovo povezivanje s aktinskim citoskeletom. Riječ je o cingulinu, AF-6 i 7H6 te MAGUK (engl. Membrane Associated Guanylate Kinase Like) skupini proteina kojoj pripadaju proteini *zonulae ocludens* (ZO) ZO-1, ZO-2 i ZO-3 [11].

Adhezijski spojevi (AJ, engl. Adherens junctions) također su bitna sastavnica endotelnih stanica. Njihove glavne građevne jedinice su transmembranski protein E-kadherin te citoplazmatski  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  katenini. E-kadherini stvaraju homotipske veze između susjednih endotelnih stanica, dok ih katenini sidre u citoplazmi vežući ih na aktinski filament [27]. Proteini AJ-a imaju signalne uloge u stanici te sudjeluju u regulaciji vaskularne morfogeneze, održavanja integriteta endotela i kontroli vaskularne propusnosti [28].

Kladini su skupina proteina veličine 20 – 27 kDa čija glavna uloga je uspostavljanje barijere i sprječavanje paracelularnog prolaza kod endotelnih i epitelnih stanica [6]. BEC predominantno eksprimiraju kladine- 3 i 5 te vrlo vjerojatno kladin – 12. Poznata je uloga ovih kladina u formiranju TJ-a i održavanju integriteta BBB-a. Prekomjerna ekspresija kladina – 5 tako jača svojstva barijere, dok njegov nedostatak uzrokuje povećanje propusnosti BBB-a [29].

Okludin je prvi otkriveni protein TJ-a, veličine 60 – 65 kDa. Početna opažanja upućivala su na bitnu ulogu okludina u formaciji i regulaciji TJ-a, ali i kao funkcionalne komponente TJ-a [30]. Novija istraživanja pokazuju da visoka razina okludina osigurava smanjenu paracelularnu propusnost i povišen električni otpor BEC-a, ali isto tako pokusi na knockout miševima ukazuju da okludin nije nužan za formaciju TJ-a jer ostali proteini TJ-a mogu kompenzirati njegov nedostatak [31].



Slika 2. Građa TJ-a i AJ-a. Svojstvo nepropusnosti, odnosno ograničenog paracelularnog prolaza BBB-a uvelike ovisi o kontinuiranom pojasu TJ-a. U svojoj osnovnoj strukturi, TJ-i građeni su od transmembranskih proteina (okludina, klaudina 3 i 5 te molekula adhezijskih spojeva) i MAGUK proteina (ZO-1, ZO-2 i ZO-3) koji osim što izgrađuju TJ-ove sudjeluju i u njihovoj regulaciji. Uz TJ-ove, endotelne stanice su povezane i AJ-ovima čije molekule E-kadherina su  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  kateninima vezane na aktinske filamente.

Najvažniji predstavnici citoplazmatskih proteina su ZO-1, ZO-2 i ZO-3. Od navedenih, ZO-1 je prvi povezan s TJ-ima, a uloga mu je povezivanje transmembranskih proteina TJ-a s aktinskim citoskeletom. Ova veza je kritična za stabilnost i funkciju TJ-a te je odvajanje ZO-1 od TJ kompleksa usko vezano uz povećanje propusnosti. Također, ZO-1 je i signalna molekula koja prenosi informacije o stanju TJ-a u unutrašnjost stanice i obratno [11]. ZO-2 je protein visoko homologan ZO-1 te se isto tako veže na proteine TJ-a ali i na transkripcijske čimbenike što ga čini strukturnim proteinom, ali i nuklearnim čimbenikom koji utječe na gensku ekspresiju i blokira stanični ciklus [12].

## 1.2. Oksidacijski stres

Poremećaj u ravnoteži između antioksidanasa i oksidanasa u korist oksidanasa Helmut Sies je 1985. godine definirao kao oksidacijski stres [32]. Do poremećaja može doći zbog tri glavna razloga: 1. povećanog stvaranja oksidanasa; 2. smanjenja antioksidacijske zaštite; 3. neuspješnog popravka nastalih oštećenja. U atmosferi bogatoj kisikom, oksidacijski stres je neizbježna posljedica, a rezultat ove neravnoteže je povećano stvaranje slobodnih radikala.

Slobodni radikal definiran je kao bilo koja čestica s nesparenim elektronom koja može samostalno postojati. Zbog nastojanja da postignu ravnotežno stanje, slobodni radikali reagiraju s elektronom najbliže molekule te se smatraju izrazito reaktivnima [33]. Ukoliko je riječ o biomolekulama (DNA, proteini, lipidi), slobodni radikali će uzrokovati njihove promjene te dovesti do njihova oštećenja (Slika 3), ali i do poremećaja homeostaze i u konačnici do stanične smrti [34]. Biokemijski su najznačajniji kisikovi i dušikovi radikali, ali i njihove neradikalne inačice. Zajedničkim imenom ove vrste nazivamo ROS te RNS. Biološki najvažniji ROS su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) te superoksidni anion ( $O_2\cdot^-$ ), dok su najvažniji RNS dušikov oksid ( $NO\cdot$ ), dušikov dioksid ( $NO_2\cdot$ ) i peroksnitrit ( $ONOO\cdot$ ).

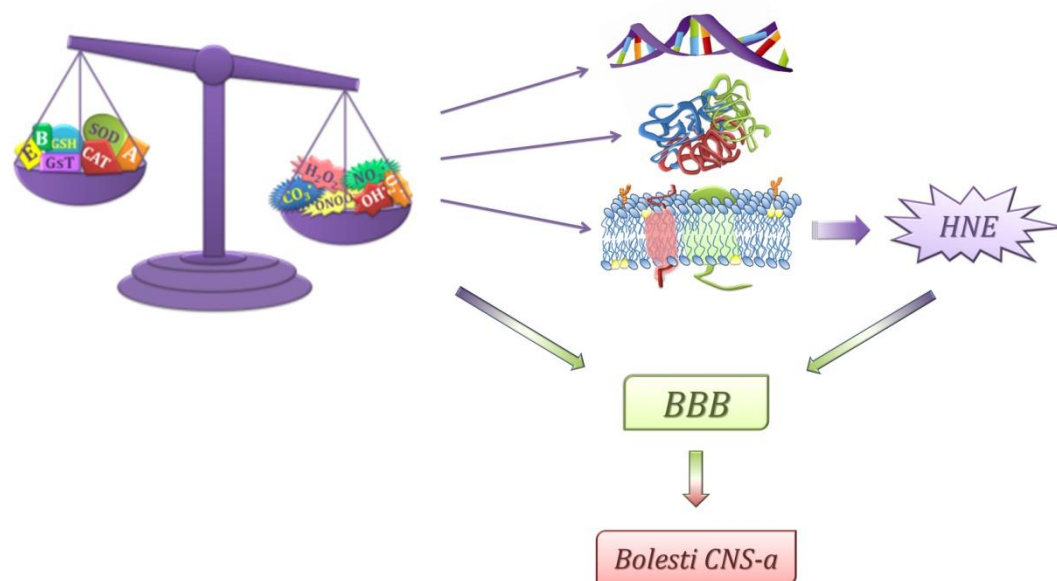
Kao glavni izvor ROS-a nameću se mitohondriji zbog stvaranja superoksidnog aniona tijekom procesa oksidativne fosforilacije. Čak 1-2% kisika u fiziološkim uvjetima se metabolizira do superoksidnog aniona, međutim zbog antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze razina ovog aniona ostaje niska [35]. Osim u mitohondrijima, ROS nastaje i u endoplazmatskom retikulumu djelovanjem citokroma P-450, u području jezgrine ovojnice djelovanjem citokrom oksidaza te u peroksisomima koji sadrže niz enzima odgovornih za stvaranje  $H_2O_2$ . Također, u citoplazmi postoji niz enzima (oksidaze i dehidrogenaze), od kojih je najpoznatiji ksantin oksidaza, čijim djelovanjem nastaje ROS [36]. Najbolje okarakteriziran enzim koji katalizira redukciju kisika do superoksidnog aniona je nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza (NOX, engl. Nitric oxide system). To je oksidaza koja se nalazi u plazma membrani fagocita, a služi u obrani organizma od infekcija mikroorganizmima [36]. Osim endogenih izvora, ROS može u organizmu nastati i uslijed izlaganja egzogenim izvorima kao što su ionizirajuće zračenje, ultraljubičasto zračenje, ozon, dim cigareta, industrijski onečišćivači i lijekovi [37].

Glijalne stanice mozga zahtijevaju više kisika i glukoze za kontinuirano stvaranje ATP-a kako bi se osiguralo dovoljno energije za normalan rad mozga. Uz to, mozak sadrži veće količine PUFA, veću količinu iona prijelaznih metala te relativno nisku razinu antioksidacijske zaštite u usporedbi s drugim organima. Stoga je mozak podložniji stvaranju ROS-a i oštećenjima uslijed oksidacijskog stresa [38].

Aktivacija mikroglije je glavni izvor prekomjernog stvaranja ROS-a, posebice superoksidnog aniona, hidroksilnog radikala i vodikovog peroksida, putem aktivacije NOX sustava [25]. ROS utječu na različite unutarstanične signalne putove uključujući protein tirozin fosfatazni put, put protein kinaze C, fosfatidilinozitol-3 kinazni (PI3K)/AKT put ili mitogenom aktiviran protein kinazni put

(MAPK, engl. Mitogen activated protein kinase). Također, ROS utječe i na transkripcijske čimbenike: nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, engl. Nuclear factor  $\kappa$ B) i nuklearni faktor 2 (Nrf2, engl. Nuclear factor 2) [25]. Integritet BBB-a je podložan modulaciji ROS-om uslijed prolazne aktivacije PI3K/AKT puta koji uzrokuje smanjenje ekspresije okcludina i kladina-5 te narušava integritet TJ-a [39]. Uz to, ROS uzrokuju aktivaciju metaloproteinaza matriksa, enzima koji razgrađuju kolagen i laminin bazalne membrane BEC-a što također dovodi do povećanja propusnosti BBB-a [40].

Osim direktnog utjecaja, ROS djeluju i kao sekundarni glasnici te uzrokuju aktivaciju dušik oksid sintaze (NOS) te potiču stvaranje  $\text{NO}^\bullet$  [25]. Prisustvo  $\text{NO}^\bullet$  u niskim koncentracijama igra važnu ulogu u fiziologiji CNS-a utječući na regulaciju neurotransmisije, vazodilatacije, spavanja, apetita, tjelesne temperature i neurosekrecije [41], dok visoke koncentracije u reakciji s ROS-om mogu dovesti do stvaranja peroksinitrita. Produkcija peroksinitrita može biti značajnija od produkcije vodikovog peroksida i superoksidnog aniona jer peroksinitrit u reakciji s ugljikovim dioksidom može stvarati tri iznimno potentna radikala – hidroksilni, dušikov dioksid i karbonatni radikal. Svaki od ova tri radikala ima sposobnost aktivacije lipidne peroksidacije [42].

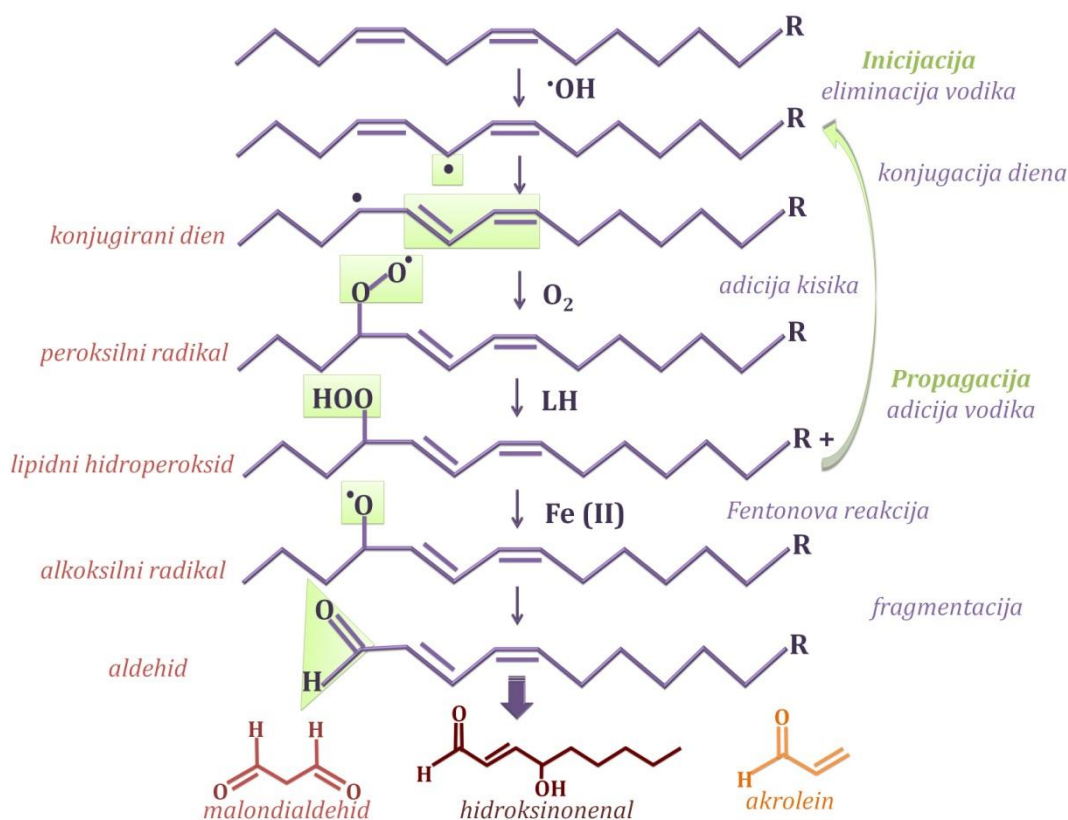


Slika 3. Oksidacijski stres uzrokuje oštećenja DNA, proteina i lipida. HNE kao produkt lipidne peroksidacije zajedno s ROS-om utječe na TJ-ove BBB-a i uzrokuje poremećaje funkcije BBB-a koji dovode do pojave i razvoja bolesti CNS-a.

### 1.3. Lipidna peroksidacija i 4-hidroksinonenal

Membrane stanica mozga smatraju se Pandorinom kutijom lipidnih medijatora čije aktivnosti mogu varirati od neuroprotektivnih do neurotoksičnih. Ovi medijatori uključuju slobodne masne kiseline kao što su arahidonska (AA, engl. Arachidonic acid) i dokosaheksaenska (DHA, engl. Docosahexaenoic acid) masna kiselina, ali i lisoglicerofosfolipide kao što su prostaglandini i leukotrieni te resolvini i neuroprotektini [43]. Međutim, lipidnom peroksidacijom nastaje potpuno novi komplet medijatora koji utječu na signalne putove stanice (oksisteroli, hidroperoksidi,  $\alpha$ ,  $\beta$  -aldehidi, keto-aldehidi, neuroprostani) [25].

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija (Slika 4) oksidacijskog oštećenja PUFA koja rezultira stvaranjem oksisterola, hidroperoksida i endoperoksida. Ovi intermedijeri se dalje metaboliziraju do reaktivnih  $\alpha,\beta$  aldehida (HNE, akrolein), dialdehida (malondialdehid, glioksal) i ketoaldehida (4-oksotransnonenal i isoketali) [44].



Slika 4. Lančana reakcija lipidne peroksidacije. Inicijacija reakcije događa se uslijed reakcije PUFA-e s jednim od izrazito reaktivnih radikala (hidroksilni, karbonatni ili dušikov dioksid radikal). Nastali lipidni hidroperoksidi imaju sposobnost daljnje propagacije reakcije čiji konačni produkti su reaktivni aldehidi.

Reaktivni aldehidi su, za razliku od ROS-a, relativno stabilniji te mogu difundirati od mjesta nastanka i širiti oksidativno oštećenje na molekule daleko od početnog oštećenja uzrokovanog ROS-om [45]. Zbog prisutnosti konačnih produkata lipidne peroksidacije u brojnim bolestima kao što su dijabetes, ateroskleroza, tumori i neurodegenerativne bolesti, smatra se da bi lipidna peroksidacija mogla biti jedan od uzroka nastanka i razvoja ovih bolesti [46].

Od tri glavna aldehida (HNE, akrolein i malondialdehid) i uz činjenicu da je akrolein 100 puta reaktivniji od HNE-a, zasada je HNE ipak najbolje opisan aldehyd. Njegova uloga u organizmu može varirati od fiziološke do patološke zbog uključenosti HNE-a u brojne signalne putove kojima se reguliraju diferencijacija, proliferacija, upala i apoptoza [47]. Iako HNE nastaje neenzimskim putem kao produkt lipidne peroksidacije  $\omega$ -6 PUFA, kao što su AA i linolna kiselina (LA), njegovo stvaranje je potaknuto u prisutnosti NADPH ovisnih enzima i dodatno ubrzano u prisutnosti iona željeza [48,49]. Jednom formiran, HNE se Michaelovom adicijom može vrlo brzo vezati na cisteinske, lizinske i histidinske ostatke proteina [48]. Zasada je identificirano nekoliko skupina proteina modificiranih HNE-om, uključujući transportere iona i nutrijenata na plazma membrani, receptore za brojne čimbenike rasta i neurotransmitere, proteine uključene u sustav prijenosa elektrona u dišnom lancu mitohondrija, šaperone, proteasomalne i citoskeletne proteine [49]. Tako je uključenost HNE-a u neuropatologiji najviše istraživana u kontekstu neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, u rasponu od blagog smanjenja kognitivnih sposobnosti pa do kasnog stadija ove bolesti, ali i u Parkinsonovoj i Huntingtonovoj bolesti te multiploj sklerozi i amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi [25].

Da HNE ima i signalnu ulogu te može utjecati na stanične procese putem modifikacije proteina, potvrđuju i istraživanja Alzheimerove bolesti gdje je pokazano da HNE ovisno o stadiju bolesti modificira druge skupine proteina [50]. Tako u stadiju blagog kognitivnog oštećenja, HNE modificira najviše skupina proteina uključujući proteine odgovorne za nadzor metabolizma, mitohondrijske funkcije, integriteta citoskeleta, sinteze proteina, antioksidacijske zaštite, odgovora na stres i neuronalne komunikacije. U ranom stadiju Alzheimerove bolesti, HNE modificira isključivo proteine odgovorne za mitohondrijsku funkciju što dovodi do poremećaja mitohondrija i sukladno, smanjenja energetskeg potencijala. Kasni stadij bolesti karakteriziran je HNE modifikacijama proteina citoskeleta i antioksidacijske zaštite [50].

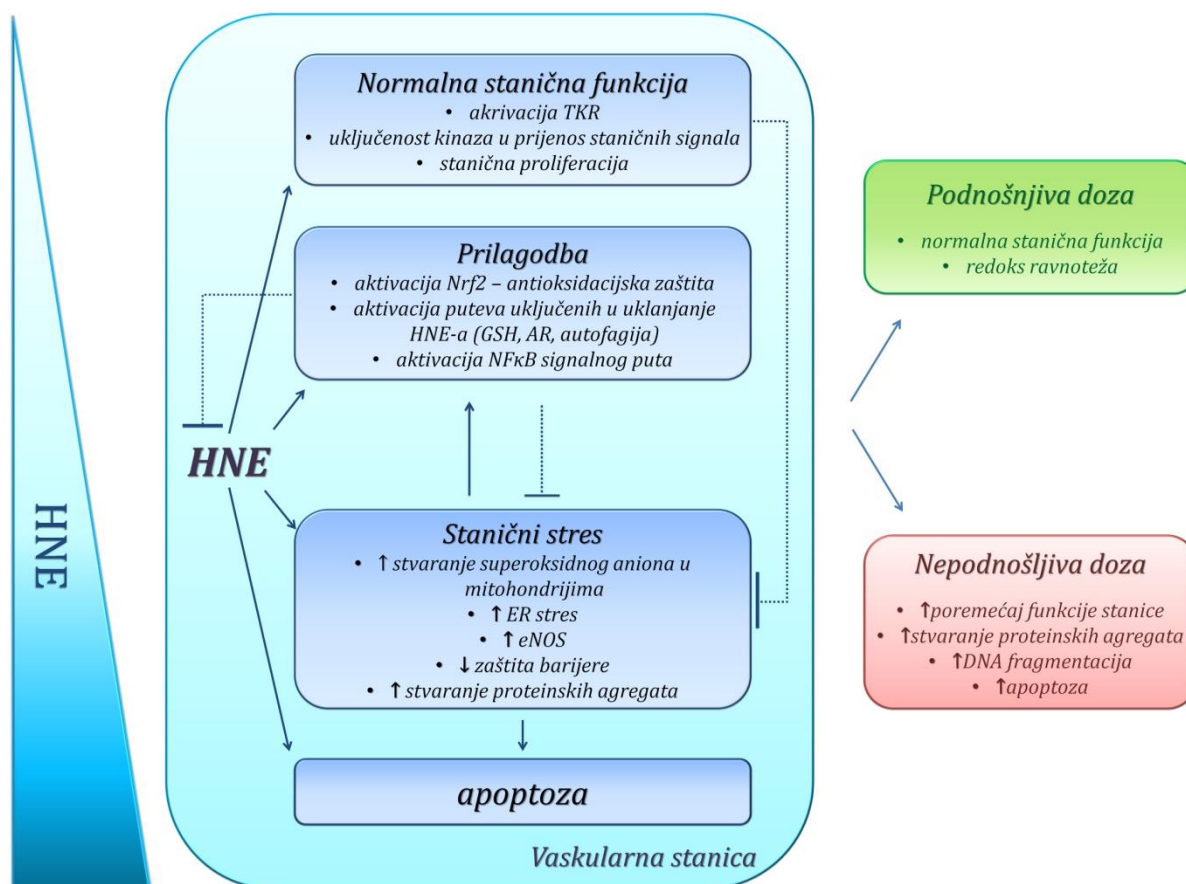
U posljednje vrijeme sve je očitija uloga HNE-a i u tumorima CNS-a. Naime, prisutnost HNE-om modificiranih proteina u tumorima CNS-a, ali i njihovim žilama raste proporcionalno s malignošću tumora i neovaskularizacijom te upućuje na moguću ulogu HNE-a u razvoju malignosti ovih tumora [51,52]. U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da prisutnost HNE-om modificiranih proteina proporcionalno korelira s prisutnošću i distribucijskim uzorkom prominina-1 (poznatog i kao CD 133) koji je površinski biljeg tumorskih matičnih stanica [53]. Međutim, točna uloga HNE-a u razvoju tumora CNS-a mora biti istražena.

*In vitro* istraživanja pokazala su da HNE u visokim koncentracijama (>50  $\mu\text{M}$ ) uzrokuje trenutno povećanje propusnosti BBB-a [54]. Jedan od mogućih mehanizama ovakvog učinka HNE-a dali su Ustayuk i sur. na modelu mikrovaskularnih endotelnih stanica pluća gdje su pokazali da HNE uzrokuje depleciju glutationa (GSH), aktivaciju MAPK signalnog puta, remodelaciju aktina te promjene u propusnosti ovog monosloja [55]. HNE je u ovim stanicama uzrokovao redistribuciju kinaze fokalne adhezije (FAK, engl. Focal adhesion kinase),  $\beta$ -katenina, paksilina, VE-kadherina i ZO-1, smanjenje površinskih integrina te tirozinsku fosforilaciju FAK-a [55]. Dakle, u endotelnim stanicama pluća HNE je modulacijom staničnih kontakata (adherentnih i čvrstih spojeva) uzrokovao promjene u propusnosti monosloja. U literaturi se HNE sve više spominje kao hormetički čimbenik vaskularnih endotelnih stanica (Slika 5) [56]. Njegove niske koncentracije imaju pozitivne učinke na stanični ciklus i proliferaciju endotelnih stanica, a uzrokovanjem ne toksične oksidacije proteina, HNE može potaknuti dugoročnu zaštitu stanica kroz aktivaciju Nrf2 signalnog puta te tako štiti stanicu od budućih oksidacijskih oštećenja [56]. U visokim koncentracijama, HNE uzrokuje pojačanu oksidaciju proteina, posebice onih s visokim udjelom tiolnih skupina kao što su proteini mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Ovakve modifikacije proteina uzrokuju aktivaciju pro-upalnih čimbenika i dovode do poremećaja funkcije endotelne barijere, ali i potenciraju daljnja oksidacijska oštećenja koja dovode do poremećaja funkcije mitohondrija i sinteze proteina [56].

Stanice posjeduju različite mehanizme obrane od HNE-a i HNE-om modificiranih proteina kako bi spriječile njihove štetne učinke. Glavni i najučinkovitiji sustav obrane od HNE-a je putem glutationa [57]. Glutation je tripeptid koji ima sposobnost vezanja HNE-a Michaelovom adicijom svojim cisteinskim ostatkom, a ova reakcija je dodatno katalizirana djelovanjem glutation - S - transferaze. Čak 60% HNE-a u vaskularnim stanicama se metabolizira ovim putem [56]. U posljednje vrijeme se na GSH gleda čak kao na nosač HNE-a koji mu osigurava prijenos u stanici do željenih meta. Nastali GSH - HNE konjugati se iz stanice izbacuju RLIP76 sustavom (engl. RalA-binding protein 16 encoded 76-kDa splice variant) i sustavom proteina višestruke otpornosti na lijekove (MRP1, engl. Multidrug resistance protein 1) [49,57]. Jedan od bitnih metaboličkih putova detoksikacije HNE-a je i oksidacija ili redukcija do njegove odgovarajuće kiseline ili alkohola aldo-keto reduktazama. Tako aldehid dehidrogenaza oksidira HNE do 4-hidroksinonenoične kiseline (HNA), dok aldehid reduktaza reducira HNE do 1,4-dihidroksinonena (DHN) [58]. Oksidacijski put aldehid dehidrogenazama aktivira se u stanju blagog stresa, dok se redukcijski put aldehid reduktazom aktivira u stanjima akutnog stresa [57].

Iako se većina HNE-a vrlo brzo uklanja iz stanica, pretpostavlja se da prosječno 1-8% HNE-a ostaje vezan za funkcionalne skupine proteina uključujući cistein, lizin i histidin te nastavlja utjecati na stanične procese [59].





Slika 5. Hormetička modulacija vaskularnih staničnih funkcija HNE-om. Niske koncentracije HNE-a povoljno djeluju na funkcioniranje vaskularnih endotelne stanice i održavaju redoks ravnotežu u stanicama. U ovim koncentracijama HNE može direktno utjecati na specifične stanične puteve, kao što je aktivacija receptora tirozin kinaze (TKR), koji rezultira pozitivnim učincima na staničnu proliferaciju. Dulja izloženost stanica niskim koncentracijama HNE-a uzrokuje razvoj adaptacijskog odgovora kroz aktivaciju Nrf2, pri čemu stanica postaje spremnija na odgovor uslijed porasta oksidacijskog stresa. Kronična izloženost visokim (patološkim) koncentracijama HNE-a uzrokuje poremećaj funkcije stanice karakteriziran gubitkom funkcije enzimskih sustava, brojnim staničnim oštećenjima, aktivacijom pro-upalnih čimbenika. U konačnici, ovi učinci dovode do apoptoze. Preuzeto i modificirano prema Chapple i sur. [56].

## 1.4. Masne kiseline mozga

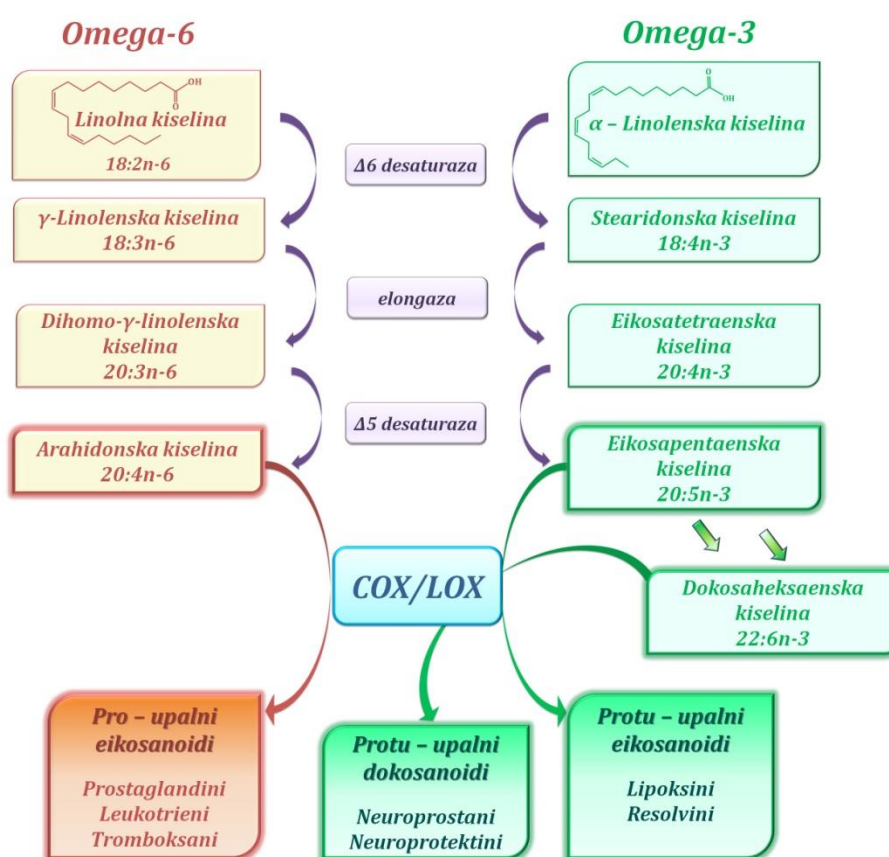
Biološke membrane su dinamične strukture građene od dvosloja amfipatskih molekula koje se drže zajedno nekovalentnim vezama. Fosfolipidi su dominantna vrsta membranskih lipida u eukariotskih stanica čija uloga se kreće od toga da predstavljaju barijeru za prolaz tvari i reguliraju funkcije mnogih katalitičkih procesa, do toga da djeluju kao donori tijekom sinteze makromolekula [60]. Hidrofobni repovi fosfolipida su zasićeni, jednostruko nezasićeni ili višestruko nezasićeni ugljikovodični lanci čija duljina varira od 14 do 22 atoma ugljika. Prosječna duljina lanca masnih kiselina u biološkim membranama kralježnjaka je 18 atoma ugljika, a omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina iznosi 40:60 [61]. Dva su glavna načina nomenklature PUFA [62]. Pojednostavljena nomenklatura specificira duljinu lanca, broj dvostrukih veza i poziciju posljednje dvostruke veze brojeći od metilnog kraja ( $\omega$  ugljik) te se naziva  $\omega$  ili n nomenklatura [62]. U delta ( $\Delta$ ) nomenklaturi pozicija dvostruke veze je označena  $\Delta$  i brojem prvog ugljikovog atoma koji formira dvostruku vezu, brojeći od ugljikovog atoma karboksilnog kraja kao prvog. Ova nomenklatura je nešto dulja jer uz duljinu lanca i broj dvostrukih veza uključuje i položaj svih dvostrukih veza. Također,  $\Delta$  nomenklatura uključuje i konfiguraciju dvostruke veze (cis ili trans). Kako su u većini bioloških sustava dvostruke veze cis konfiguracije, vrlo često se izbacuje opis konfiguracije u nomenklaturi. PUFA-e imaju pravilan raspored dvostrukih veza u lancu. Točnije, dvostruke veze su odvojene metilenskom skupinom ( $-\text{CH}_2-$ ), odnosno, svaki treći ugljikov atom započinje dvostrukom vezom. Zbog toga je najpoznatije PUFA-e moguće opisati navodeći samo položaj prvog atoma ugljika na kojem se nalazi dvostruka veza [62]. Popis najzastupljenijih PUFA u biološkim sustavima, koje će se ujedno najviše spominjati u ovoj disertaciji, sa kraticama i oba tipa nomenklature je dan u Tablici 1.

Tablica 1. Najzastupljenije PUFA-e u biološkim sustavima

PUFA	kratica	$\omega$ (n) nomenklatura	$\Delta$ nomenklatura
<b>Linolna kiselina</b>	LA	18:2 $\omega$ -6	18:2 $\Delta$ 9,12
<b><math>\gamma</math>-Linolenska kiselina</b>	GLA	18:3 $\omega$ -6	18:3 $\Delta$ 6,9,12
<b>Dihomo-<math>\gamma</math>-linolenska kiselina</b>	DGLA	20:3 $\omega$ -6	20:3 $\Delta$ 8,11,14
<b>Arahidonska kiselina</b>	AA	20:4 $\omega$ -6	20:4 $\Delta$ 5,8,11,14
<b><math>\alpha</math>-Linolenska kiselina</b>	ALA	18:3 $\omega$ -3	18:3 $\Delta$ 9,12,15
<b>Eikosapentaenska kiselina</b>	EPA	20:5 $\omega$ -3	20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17
<b>Dokosapentaenska kiselina</b>	DPA	22:5 $\omega$ -3	22:5 $\Delta$ 7,10,13,16,19
<b>Dokosaheksaenska kiselina</b>	DHA	22:6 $\omega$ -3	22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19

Kao masne kiseline s dvije ili više dvostrukih veza, PUFA-e su esencijalne komponente stanične membrane koje utječu na njezinu fluidnost, fleksibilnost i selektivnu propusnost. Također, PUFA-e utječu na brojne stanične i fiziološke procese uključujući modulaciju ionskih kanala i nosača, aktivnost membranskih enzima, regulaciju genske ekspresije, endocitozu, egzocitozu, prilagodbu na hladnoću, preživljenje i obranu od patogena [62].

Masne kiseline u kralježnjaka nastaju kao produkti sinteze masnih kiselina iz acetil – koenzima A i malonil koenzima A. Najčešće masne kiseline koje nastaju ovakvom *de novo* sintezom su palmitinska i stearinska masna kiselina. Njihovim daljnjim modifikacijama enzimima zvanim desaturaze, koji uvode dvostruke veze na određena mjesta ugljikovodičnog lanca, te sustavom pripadajućih elongaza, koje produljuju masnu kiselinu za 2 ugljikova atoma koristeći kao supstrat acetil-koenzim A, nastaju PUFA-e [60]. Dvije su PUFA-e esencijalne u čovjeka jer se ne mogu sintetizirati *de novo*. Riječ je o LA ( $\omega$ -6) i ALA ( $\omega$ -3) koje se moraju unositi u organizam, a potom u nizu koraka desaturacija i elongacija iz ovih masnih kiselina nastaju dugolančane PUFA-e (s više od 20 ugljikovih atoma u lancu) (Slika 6) [63].



Slika 6. Metabolički putovi  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina. Djelovanjem enzima ciklooksigenaza (COX) i lipoksisgenaza (LOX), iz  $\omega$ -6 masnih kiselina nastaju eikosanoidi pretežno pro-upalnog karaktera, dok iz  $\omega$ -3 masnih kiselina nastaju pretežno protu-upalni eikosanoidi i dokosanoidi.

Od svih organa u ljudskom tijelu, najveći udio lipida u svom sastavu ima mozak (čak 50-60% suhe tvari). Više od pola ovog udjela (35%) čine PUFA-e [64]. Najzastupljenije PUFA-e u mozgu su AA ( $\omega$ -6) čiji udio je 8 – 11% i DHA ( $\omega$ -3) s udjelom od 12 – 15%, dok primjerice udio esencijalne LA iznosi tek 1% [65]. Dok je AA podjednako zastupljena u svim stanicama mozga, DHA je najzastupljenija u neuronalnim membranama [43]. Kako neuroni ne mogu sami sintetizirati ove dvije masne kiseline, njihov glavni izvor u mozgu su astrociti i endotelne stanice. Ove stanice zajednički sudjeluju u sintezi i otpuštanju AA i DHA te održavaju razine ovih masnih kiselina u izvanstaničnom matriksu visokima i dostupnima neuronima [66].

DHA povećava fluidnost membrana čime se olakšavaju proteinske interakcije na razini membrana. Tako, povišeni udio DHA u mitohondrijskim membranama, zbog olakšanih proteinskih interakcija, povećava efikasnost transportnog lanca elektrona. Isto tako, postoji jasna korelacija između udjela DHA u mitohondrijskim membranama i njihove propusnosti za protone vodika [67]. DHA, bilo slobodna ili vezana u fosfolipidnom dvosloju, također utječe na funkciju receptora (smanjuje odgovor neurona na GABA-u) i aktivaciju signalnih putova (povećava aktivnost natrij – kalij – ATPaze i PKC-a). Uz to, obogaćivanje neurona sa DHA uzrokuje povećanje udjela fosfatidilserina u njihovim membranama te translokaciju raf-1 kinaze iz citosola u područje plazma membrane što zajedno sa stimulacijom PI3K/AKT signalnog puta sprječava apoptozu neurona zbog dokidanja aktivacije kaspaze 3 [68,69]. Slobodna DHA mijenja ekspresiju gena uključenih u prijenos signala, plastičnost sinapsi i produkciju eikosanoida, dok njezini metaboliti (dokosanoidi) štite neurone od oksidacijskog oštećenja [67].

Slobodna AA je kratkoživaća molekula koja brzo postaje supstrat enzima koji sadrže hem funkcionalnu skupinu [70]. Ovi enzimi dodaju atome kisika na različite pozicije lanca stvarajući brojne funkcionalne grupe na AA. Ove promjene uzrokuju transformaciju AA iz visoko lipofilne molekule u različite spojeve granične topivosti u vodenoj i lipidnoj okolini kako bi im se omogućila bolja difuzija kroz vodenu fazu i citosol. Posljedično nastaju prstenaste molekule s pet ili šest ugljikovih atoma u sredini lanca što ih čini rigidnijima u odnosu na AA. Nastala rigidnost bitan je čimbenik u vezanju ovih metabolita AA-e na receptore te tako i za stanične funkcije koje vrše [70].

Tri enzima imaju sposobnost kataliziranja reakcije otpuštanja AA iz vezanog fosfolipidnog oblika čime započinje kaskada reakcija stvaranja različitih AA metabolita. Riječ je o fosfolipazama A<sub>2</sub>, C i D od kojih jedino fosfolipaza A<sub>2</sub> otpušta slobodnu AA u jednom koraku [71]. Kaskada se nastavlja jednim od tri moguća puta djelovanjem ciklooksigenaza, lipoksigenaza i citokroma P450 koji u konačnici stvaraju sve metabolite AA-e zajedničkog naziva eikosanoidi [72]. Metaboliti ciklooksigenaza imaju proupalni karakter i uključuju prostaglandine, prostacikline i tromboksane, dok metaboliti lipoksigenaza mogu imati proupalne (leukotrieni), ali i protuupalne metabolite (lipoksini) [73]. Osim modulacije intenziteta i trajanja upale i imunološkog odgovora, AA-a i eikosanoidi imaju ulogu i u održavanju fluidnosti hipokampalnih staničnih membrana, aktivaciji sintaksina 3 – proteina uključenog u kontrolu rasta i popravka neurona, te modulaciji vaskularnog

tonusa [74–77]. Također kroz aktivaciju receptora aktivacije proliferacije peroksisoma gama (PPAR) pomaže u zaštiti mozga od oksidacijskih oštećenja [75].

Za razliku od AA, njezin direktni prekursor, LA je kao  $\omega$ -6 masna kiselina rijetko istraživana u kontekstu utjecaja na CNS. Razlog tome je vjerojatno njezin mali udio u ukupnim PUFA-ma mozga (svega 1-2%). Istraživanja pokazuju da slobodna LA vrlo brzo difundira iz krvi u mozak, a na stanicama neurona i astrocita u kulturi je pokazano da su astrociti tri puta aktivniji u unosu LA od neurona [78]. DeMar i suradnici su ustanovili da se većina LA (>86%) koja uđe u mozak vrlo brzo metabolizira  $\beta$ -oksidacijom, dok se vrlo mali udio ugrađuje u fosfolipide (9%) i trigliceride (2%), a manje od 1% se desaturira i elongira do AA [79].

Djelovanjem ciklooksigenaza i lipoksigenaza dolazi i do stvaranja metabolita LA, tzv. OXLAM-a (od engl. Oxidized linoleic acid metabolites). Riječ je o 9- i 13-hidroksil-oktadekadienskim kiselinama (9- i 13- HODE) te 9- i 13- okso-oktadekadienskim kiselinama (9- i 13- okso HODE) koje uzrokuju snažne upalne odgovore [80]. OXLAM-i se javljaju kao glavne komponente aterosklerotičnih plakova, te kao slobodno cirkulirajući u Alzheimerovoj bolesti, a njihova povećana količina direktno korelira s povećanom osjetljivošću receptora za osjet boli što rezultira hiperalgezijom i alodinijom [81].

Međutim, neki oksidacijski metabolit LA mogu imati i protektivne učinke. Tako, 12,13-epoksi-9-keto-10(trans)-oktadecenska kiselina (EKODE) aktivira enzime druge faze odgovorne za antioksidacijsku zaštitu stanice [82]. Autori smatraju da EKODE alkilira sulfhidrilne skupine Keap-a 1 (engl. Kelch-like ECH-associated protein 1) što dovodi do otpuštanja i translokacije transkripcijskog čimbenika Nrf2 u jezgru gdje aktivira element antioksidacijskog odgovora (ARE, engl. Antioxidant response element) [82]. ARE je pojačivač (engl. Enhancer) koji se nalazi u promotorskoj regiji gena odgovornih za sintezu antioksidacijskih enzima. Isti, ali slabiji učinak imao je i metabolit AA-e – 15-deoksi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 poznat po svojim neuroprotektivnim učincima [82,83].

## 1.5. BBB u bolestima središnjeg živčanog sustava

BBB održava stalan kemijski sastav mikrookoline neurona nužan za njihovo pravilno funkcioniranje, sinaptičku komunikaciju, angiogenezu i neurogenezu. Svako narušavanje integriteta BBB-a bilo zbog oštećenja TJ-a, promjena u transportu između krvi i mozga ili mozga i krvi, poremećene angiogeneze, ili upalnih procesa, doprinosi začaranom krugu razvoja bolesti CNS-a [17,31].

### 1.5.1. BBB i neurodegenerativni poremećaji

Poremećaj funkcije BBB-a ustanovljen je kod brojnih bolesti CNS-a. Tako je pokazano da uslijed reperfuzije nakon moždanog udara dolazi do povećanja propusnosti BBB-a u dvije faze. Početno reverzibilno povećanje propusnosti nastaje zbog aktivacije metaloproteinaze 2, a kasnije, ireverzibilno, zbog aktivacije metaloproteinaza 3 i 9 koje razgrađuju bazalnu membranu BEC-a [84]. Smatra se da je poremećaj funkcije BBB-a jedan od razloga razvoja Alzheimerove bolesti. Naime, ustanovljeno je da poremećaj neurovaskularne funkcije, koja uključuje atrofiju i nepravilnost arteriola i kapilara, oticanje i povećan broj pinocitičkih vezikula u BEC-u, smanjenje mikrovaskularne gustoće i raspad bazalne membrane, prethodi neuronalnoj degradaciji [85,86]. Zbog ovako poremećene BBB ne dolazi do izbacivanja amiloida  $\beta$  već se on uz žile nakuplja u obliku amiloidnih plakova [87]. Poremećaj funkcije BBB-a doprinosi i razvoju multiple skleroze gdje se u ranoj fazi bolesti uslijed aktivacije metaloproteinaza razara BBB, dolazi do degradacije mijelina te se omogućava ulaz leukocita [88]. Olakšan ulaz leukocita u CNS zbog razaranja BBB-a uzrok je i HIV vezane demencije. Naime, protein HIV-a – gp120 je toksičan za BEC i uzrokuje razaranje endotela BBB-a čime se oslobađa ulaz imunološkim stanicama u CNS, koje onda dodatno pojačavaju upalu i pridonose razvoju bolesti [89]. U navedenim bolestima ustanovljeno je i da osim razaranja bazalne membrane uslijed djelovanja metaloproteinaza, dolazi i do promjena u nekim od proteina TJ-a. Tako HIV inficirani leukociti otpuštaju protein Tat koji uzrokuje smanjenu ekspresiju okcludina i ZO-1 te doprinosi oštećenju BBB-a [90]. U multiploj sklerozi se netom prije pojave pojačane propusnosti BBB-a događa defosforilacija okcludina, a ove pojave prethode vidljivim znacima bolesti [91]. Kasnije, u uznapredovaloj fazi bolesti u aktivnim lezijama ustanovljeno je da čak 42% krvnih žila ima smanjenu ekspresiju ZO-1, dok svega 23% žila u neaktivnim lezijama pokazuje smanjenu ekspresiju ZO-1 [92]. U Alzheimerovoj bolesti otkriveno je nakupljanje okcludina u neuronima, astrocitima i mikrogliji, a ne u endotelnim stanicama [93]. Uz pojavu kludina - 5 u astrocitima uslijed ishemijske oštećenja BBB-a [94], moguće je da ova dva otkrića reflektiraju autofagiju proteina TJ-a od strane okolnih stanica nakon oštećenja BBB-a [95].

### 1.5.2. BBB i tumori CNS-a

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije, primarni tumori CNS-a dijele se u 14 skupina od kojih su najbrojniji tumori astrocitnog porijekla – gliomi [96]. Gliomi su karakterizirani pojačanom celularnošću, visokom mitotskom aktivnošću te naglašenom vaskularizacijom, dok su glavne karakteristike njihovih krvnih žila stvaranje fenestracija, promjene u broju mitohondrija i debljini endotelne bazalne membrane te povećani perivaskularni prostor [97]. Oslikavanje magnetskom rezonancijom pokazuje povećanu propusnost BBB-a u glioma višeg gradusa (III i IV) te nastanak edema u ovom području [98].

Jedan od razloga poremećene funkcije BBB-a u gliomima je gubitak ekspresije okcludina i kladina - 3, ali i visoka razina vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, engl. Vascular endothelial growth factor) kojeg luče tumori CNS-a, a koji uzrokuje endocitozu E-kadherina [99]. Gubitkom ovih proteina, dolazi i do slabljenja veza između endotelnih stanica karakteriziranog gubitkom TJ-a i AJ-a što uzrokuje poremećaj strukturnog integriteta BBB-a.

Osim utjecaja na stanične spojeve, Lee i suradnici su ustanovili da gliomi uzrokuju remodelaciju izvanstaničnog matriksa te promjene u astrocitima vezanima na BEC koje također doprinose poremećaju funkcije BBB-a [100]. Promjene u sastavu izvanstaničnog matriksa uključuju smanjenu ekspresiju laminina i agrina te povećanu ekspresiju tenascina [100]. Objašnjenje poremećaja funkcije BBB-a koju uzrokuju ove promjene leži u ulozi navedenih molekula u održavanju svojstva BBB-a. Tako je laminin proteoglikan izvanstaničnog matriksa koji se veže na integrine i regulira propusnost i stanični transport preko BBB-a [84], dok je agrin proteoglikan koji se nalazi u izvanstaničnom matriksu gdje u slučaju BBB-a stabilizira proteine AJ-a – E-kadherin,  $\beta$ -katenin i ZO-1 i doprinosi održavanju integriteta BBB-a [101]. Tenascin je glikoprotein bitan za staničnu adheziju, migraciju i proliferaciju čija ekspresija u gliomima je pojačana [100].

## ***CILJ RADA***



## 2. CILJ RADA

BBB predstavlja glavnu prepreku dotoku lijekova u mozak čime gotovo onemogućava liječenje bolesti CNS-a. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su oksidacijski stres, te posljedično lipidna peroksidacija usko povezani s promjenama u funkciji BBB-a u mnogim bolestima CNS-a uključujući neurodegenerativne bolesti i tumore CNS-a. Osim što mogu utjecati na signalne putove u samim stanicama koje sačinjavaju BBB, oksidacijski stres i lipidna peroksidacija mogu mijenjati i karakteristike izvanstaničnog matriksa.

Povećanje propusnosti BBB-a koje bi moglo olakšati i dotok lijekova, uočeno je uglavnom u kasnim stadijima navedenih bolesti kada izlječenje više nije moguće zbog oštećenja neuronalnih funkcija CNS-a. Otkrivanje uloge ROS-a i HNE-a u strukturnim i funkcionalnim promjenama svojstava BBB-a omogućilo bi primjenu novih saznanja u modulaciji propusnosti BBB-a i osiguralo nove pristupe liječenja bolesti CNS-a.

Stoga su ciljevi ovog rada:

1. Razviti *in vitro* model BBB-a kako bi se ispitaio utjecaj HNE-a.
2. Ispitati kako HNE, slobodni i/ili vezan na izvanstanični matriks, mijenja antioksidacijski status i lipidni profil stanica BBB-a te uzrokuje promjenu njezinih svojstava i funkcije.
3. Istražiti utjecaj micela LA, kao esencijalne  $\omega$ -6 PUFA-e i potencijalnog izvora HNE-a, na propusnost BBB-a i njezin lipidni profil.

## ***MATERIJALI I METODE***

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzgoj staničnih kultura i linija

U svrhu izrade doktorske disertacije korištene su stanične kulture astrocita štakora koje je ustupio prof. dr. sc. Neven Žarković te stanična linija endotela kapilara mozga štakora (stanice RbE4), koju je ustupio prof. dr. sc. Pierre Couraud.

##### 3.1.1. Uzgoj astrocita

Astrociti su uzgajani u Dulbeccovoj modifikaciji Eaglovog medija (DMEM, Sigma) uz dodatak fetalnog telećeg seruma (FCS, Sigma) u konačnom udjelu od 10% u inkubatoru za rast stanica na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Stanice su odvajane od podloge pomoću otopine tripsina s dodatkom EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina) (0.25%/0.02%). U svim pokusima nasađivano je 50 000 astrocita/cm<sup>2</sup> te su uzgajani tijekom 10 dana. Pri tome im je mijenjan medij svaki drugi dan. Nakon što su astrociti postigli konfluentnost, počeo se sakupljati kondicionirani medij astrocita (ACM). Ovaj medij koristio se za uzgoj stanica RbE4 u svim pokusima. U svrhu izrade modela BBB, astrociti su nasađivani s donje strane komorica u volumenu od 100 µl te su ostavljeni 24h kako bi se prihvatili za podlogu, nakon čega su komorice okrenute u bunariće s medijem, a u njih je dodana mala količina medija.

##### 3.1.2. Uzgoj stanica RbE4

Za uzgoj endotelnih stanica – RbE4 potrebno je obložiti podlogu, na kojoj će biti uzgajane, kolagenom koncentracije 3 µg/cm<sup>2</sup>. Nakon oblaganja, kolagen je ostavljen da se posuši preko noći u kabinetu za sterilni rad. U slučaju oblaganja podloge kolagenom modificiranim s HNE-om, kolagen i HNE su pomiješani neposredno prije nanošenja na podlogu. Konačna koncentracija kolagena iznosila je 3 µg/cm<sup>2</sup>, dok je konačna koncentracija HNE-a iznosila 10 µM.

Stanice RbE4 uzgajane su u mediju (sastav je dan u Tablici 2) uz 10% FCS-a u inkubatoru za rast stanica na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Stanice su odvajane od podloge pomoću otopine tripsina s dodatkom EDTA (0.1%/0.02%). U svim pokusima nasađivano je 180 000 stanica/cm<sup>2</sup> te su uzgajane tijekom 7 dana. Pri tome im je mijenjan medij svaki drugi dan. Ovaj medij sadržavao je 50% medija za uzgoj stanica RbE4 i 50 % ACM-a.

Prilikom opisa rezultata i u raspravi umjesto naziva RbE4 koristit će se naziv endotelne stanice.

Tablica 2. Sastav medija za uzgoj stanica RbE4

SASTAV	KOLIČINA
<b>MEM (Sigma)</b> <b>(Minimalni esencijalni medij)</b>	50% (V/V)
<b>Hamova F10 smjesa hranjivih</b> <b>tvari (Sigma)</b>	50% (V/V)
<b>L-glutamin (Sigma)</b>	2 mM
<b>G418 (Sigma)</b>	300 µg/ml
<b>bFGF (Peprotech)</b>	1 ng/ml

### 3.2. Imunocitokemija na GFAP

Prilikom odmrzavanja astrocita, dio stanica bi bio nasađen na predmetna stakalca u svrhu bojenja na GFAP. Nakon 24h od nasađivanja, astrociti su isprani u PBS-u i izloženi djelovanju hladnog metanola (-20°C) tijekom 3 minute. Potom su ostavljeni u puferiranom formalinu nakon čega su izloženi djelovanju proteinaze K u TE puferu (0.61 g Tris baze; 0.037 g EDTA; 0.5 ml Triton X-100; 100 ml dH<sub>2</sub>O) radi otkrivanja antigena. Astrociti su isprani u PBS-u i izloženi poliklonalnom protutijelu na GFAP (Dako) u razrjeđenju 1:500 tijekom 30 minuta. Nakon ispiranja PBS-om, dodana je 3% otopina vodikovog peroksida u PBS-u u svrhu blokiranja endogenih peroksidaza. Astrociti su isprani PBS-om prije dodavanja sekundarnog protutijela obilježenog peroksidazom (Dako) koje je ostavljeno da djeluje 30 minuta. Nastali imunokompleks je nakon ispiranja PBS-om vizualiziran 3,3'-diaminobenzidinom (DAB, Dako) koji daje smeđe obojenje. Analizom pod mikroskopom ustanovljen je udio astrocita u kulturi. U daljnjim pokusima su korištene samo kulture koje su imale 90% i više pozitivnih GFAP stanica.

### 3.3. Priprema HNE-a

HNE se čuva u inaktivnom obliku u formi dietilacetala u kloroformu na -80°C. Prije početka rada, organsko otapalo je potrebno ukloniti propuhivanjem dušikom, a sam HNE je potrebno prevesti u aktivni oblik dodatkom 1 mM kloridne kiseline u omjeru deset puta u odnosu na početni volumen HNE-a. Dobivena otopina čuva se u hladnjaku na +4°C i može se koristiti sve dok koncentracija HNE-a ne padne za više od 20% početno izmjerene koncentracije. Koncentracija HNE-a se određuje snimanjem spektra na spektrofotometru (Shimadzu) u rasponu od 200–350 nm. Očita se apsorbancija na 223 nm, a koncentracija otopine izračuna se formulom:

$$c(\text{mol/l}) = \frac{A \times R}{13750}$$

gdje je: c - koncentracija otopine u mol/l; A - apsorbancija pri 223 nm; R - razrjeđenje otopine; 13750 - konstanta dobivena umnoškom molarnog ekstinkcijskog koeficijenta HNE-a i duljine kivete (1 cm).

Prije svakog pokusa koji je uključivao tretman HNE-om izmjerila se točna koncentracija HNE-a kako bi se moglo pristupiti daljnjem pokusu i pripremiti potrebna razrjeđenja HNE-a.

### 3.4. Priprema micela linolne kiseline

Modelni lipidni sustav pripremljen je miješanjem LA, tipično 0.0125 ml LA i prethodno priređenih micela surfaktanta nastalih miješanjem 1.24  $\mu\text{l}$  Tween-20 u 0,75 ml otopine Hanksa. Uz intenzivno miješanje na magnetskoj miješalici, otopina se dalje razrjeđivala s Hanksom na ukupni volumen od 40 ml. Tipični sastav istraživanih sustava je bio: 100  $\mu\text{M}$  LA, 50  $\mu\text{M}$  Tween-20, pH 7. Razrjeđivanjem alikvota navedenih micela s 50  $\mu\text{M}$  otopinom Tween-20 u otopini Hanksa priređene su otopine odgovarajućih koncentracija LA i Tween-20 (Tablica 4) s kojima su dalje tretirane stanice.

### 3.5. Analiza proteina

Za izolaciju proteina korištena je tehnika ponavljanog smrzavanja i odmrzavanja uzoraka nakon dodatka fosfatnog pufera na suhi talog stanica. Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu [102]. Riječ je o spektrofotometrijskoj metodi kojom se prati apsorbancija vezane boje Coomasie briljant plavo na proteine u kiselj otopini. Koncentracije proteina u uzorku određuje se iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama albumina iz seruma goveda (BSA, engl. Bovine serum albumine). Ukratko, u mikrotitarsku pločicu na ledu nanese su lizati stanica u duplikatu po 5  $\mu\text{l}$ , a potom je dodano 200  $\mu\text{l}$  Bradford reagensa (10 mg Coomasie briljant plavo boje; 5 ml 96% etanola; 10 ml 14.79 M fosfatne kiseline; nadopuniti do 100 ml s  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Pločica je potom uklonjena s leda i tijekom 10 minuta se pratilo razvijanje boje nakon čega su rezultati očitani na čitaču pločica (Anthos) pri valnoj duljini od 595 nm.

### 3.6. Izolacija lipida

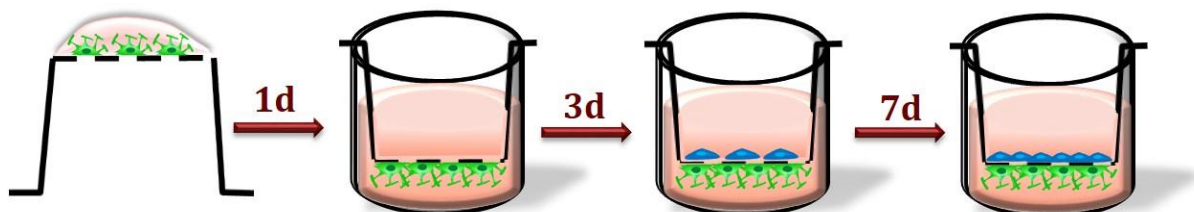
Lipidi su za potrebe analize lipidnih hidroperoksida i lipidnog profila izolirani metodom po Folchu [103]. Stanice su tripsinizirane, isprane s PBS-om i kao suhi talog spremljene na  $-80^\circ\text{C}$  do izolacije. Ekstrakcija je započeta dodatkom kloroforma (5 ml) nakon kojeg je slijedilo mućkanje.

Zatim je dodano 1.5 ml vodene otopine magnezijevog klorida (0.034%, w:v) te su uzorci homogenizirani tijekom 3 minute na vorteksu. Odvajanje slojeva provedeno je centrifugiranjem 3 minute na 2000xg (+4°C). Gornja vodena faza uklonjena je pomoću vakuum sisaljke. Donja faza i međusloj isprani su dodatkom 2.5 ml 2M otopine kalijevog klorida i metanola (4:1, v/v) te su nakon vorteksiranja slojevi ponovno razdvojeni centrifugiranjem. Ponovio se postupak usisavanja gornjeg vodenog sloja, a zaostali slojevi su isprani s 2.5 ml otopine kloroforma i metanola (2:1, v/v). Nakon vorteksiranja i odvajanja slojeva centrifugiranjem, uklanja se vodena faza, a donja organska faza pažljivo se vakuum sisaljkom prenosi u prethodno izvagane epruvete. Potom slijedi uparavanje organske faze pod strujom plina dušika. Suhi ostatak se nakon vaganja spremao na -80°C do daljnjih analiza lipidnih hidroperoksida ili sastava masnih kiselina.

### 3.7. Izrada modela BBB

U svrhu izrade ove doktorske disertacije razvijena su dva modela BBB-a. Kontrolni model razvijen je kao kokultura astrocita i stanica RbE4 na podlozi od kolagena (dalje u tekstu – model BBB). Drugi model BBB-a razvijen je također kao kokultura astrocita i stanica RbE4, no na kolagenu modificiranom s HNE-om koncentracije 10  $\mu$ M (dalje u tekstu – model BBB-H).

Za izradu modela korištene su difuzijske komorice (BD Falcon) s membranom od polietilen tereftelata (PET) s porama veličine 0.4  $\mu$ m u promjeru. Površina membrane dostupne za rast stanica iznosila je 0.9 cm<sup>2</sup>. Prije izrade modela komorice su s apikalne strane obložene kolagenom (za model BBB) ili modificiranim kolagenom s HNE-om (za model BBB-H). Astrociti su nasađivani s bazalne strane komorica te ostavljeni 24h kako bi adherirali za podlogu (Slika 7). Komorice su potom okrenute i stavljene u pločice s 12 bunarića u koje je prethodno stavljen medij za rast astrocita. Apikalno je u komorice također dodan mali volumen medija. Nakon tri dana, apikalno su dodane stanice RbE4 u mediju koji je sadržavao pola volumena medija za uzgoj stanica RbE4 i pola volumena ACM-a. Tijekom sedam dana medij je mijenjan s apikalne i bazalne strane komorica svaki drugi dan.



Slika 7. Grafički prikaz uzgoja astrocita i stanica RbE4 u svrhu izrade modela BBB.

Integritet BBB-a provjeren je mjerenjem TEER-a uređajem EVOM (WPI) od šestog do desetog dana razvoja BBB-a te potom isključivo deseti dan te dan poslije tretmana BBB-a. Uređaj se sastoji od dvije elektrode koje se okomito urone u komoricu i bunarić do dna kako bi se očitao nastali otpor (Slika 8). Izmjerena vrijednost ovisi o površini difuzijske komorice te se očitana vrijednost TEER-a u omima množi sa površinom komorice kako bi se dobila prava i usporediva vrijednost otpora. Dobivena vrijednost ima jedinicu ohm x cm<sup>2</sup>.



Slika 8. EVOM – uređaj za mjerenje TEER-a. Preuzeto od proizvođača – World Precision Instruments Inc. (<http://www.wpiinc.com>)

Propusnost BBB-a praćena je inertnom, netoksičnom bojom natrijevim fluoresceinom čiji intenzitet fluorescencije je mjeren spektrofotometrom (Varian) pri valnoj duljini ekscitacije 460 nm te valnoj duljini emisije 515 nm. Za potrebe mjerenja propusnosti, model je ispran bezbojnom otopinom Hanksa te je u bunarić stavljeno 1.5 ml ove otopine, a u komoricu 0.6 ml otopine natrijevog fluoresceina u bezbojnoj otopini Hanksa koncentracije 50 μM. Nakon sat vremena po 0.2 ml je uzeto sa svake strane komorice i prebačeno u mikrotitarsku pločicu za mjerenje fluorescencije. Istovremeno je u pločice nanoseno 0.2 ml natrijevog fluoresceina u serijskim razrjeđenjima kako bi se mogla načiniti baždarna krivulja. Iz ove krivulje očitavane su koncentracije natrijevog fluoresceina potrebne za izračun parametra propusnosti prema sljedećoj formuli:

$$P_{app} = \frac{V_b \times dc}{dt \times A \times c_0}$$

gdje je:  $P_{app}$  – propusnost mjerena u cm/s;  $V_b$  – volumen bazalnog bunarića (1.5 ml);  $d_c$  – promjena koncentracije natrijevog fluoresceina u bazalnom bunariću u  $\mu\text{M}$ ;  $d_t$  – promjena vremena u s;  $A$  – površina difuzijske komorice u  $\text{cm}^2$ ;  $c_0$  – početna koncentracija natrijeva fluoresceina (50  $\mu\text{M}$ ).

### 3.7.1. Elektronska mikroskopija modela BBB

Kao definitivna potvrda postojanja oba tipa stanica sa svake strane difuzijske komorice, razvijeni model BBB-a fiksiran je u otopini fiksativa za elektronsku mikroskopiju. Sastav otopina potrebnih za elektronsku mikroskopiju dan je u Tablici 3. Nakon fiksacije, difuzijske komorice su isprane u kakodilatnom puferu te postfiksirane otopinom osmijevog tetroksida (1%). Potom je uslijedila dehidracija uzoraka u seriji acetona u rastućem nizu (50%, 70%, 90%, 100%). Uzorci su stavljeni u smjesu epona i acetona (100%) u omjeru 1:1 tijekom dva sata. Neposredno prije uklapanja u epon, membrana je izrezana iz difuzijske komorice te je stavljena u kalup sa smolom tijekom tri dana na 64°C kako bi se smola polimerizirala. Dobiveni blokčići sa uzorkom prvo se režu na ultramikrotomu na tzv. polutanke rezove (1-1.5  $\mu\text{m}$ ). Takvi rezovi stavljaju se na predmetno staklo i boje na vrućoj ploči sa 10% otopinom metilenskog plavila sa 0.1% boraksa. Dio uzorka koji se želi gledati pod elektronskim mikroskopom reže se ultratanko (100-200 Å). Ovakvi rezovi stavljaju se na bakrene mrežice te se kontrastiraju prvo u otopini uranilovog acetata te potom u otopini Reynoldsa. Nakon ispiranja redestiliranom vodom, mrežice se posuše najfinijim filter papirom i spremaju u želatinozne kapsule sa brojem te u kartonske kutijice do analize na elektronskom mikroskopu.

Tablica 3. Sastav otopina potrebnih za elektronsku mikroskopiju

Kakodilatni pufer	Fiksativ	Otopina uranilacetata	Otopina Reynoldsa
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 21.4 g natrijevog kakodilata</li> <li>• 0.555 g kalcijevog klorida</li> <li>• otopiti u 800 ml re-H<sub>2</sub>O</li> <li>• podesiti pH na 7.2</li> <li>• nadopuniti re-H<sub>2</sub>O do 1000 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 ml formaldehida</li> <li>• 20 ml glutaraldehida</li> <li>• nadopuniti kakodilatnim puferom do 1000 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g uranilovog acetata</li> <li>• 50 ml etanola (50%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.33 g olovnog nitrata</li> <li>• otopiti u 30 ml prokuhane re-H<sub>2</sub>O ohlađene na 40°C</li> <li>• dodati 1.76 g natrijevog citrata dihidrata i ostaviti 30 minuta</li> <li>• dodati 8 ml 1M natrijeve lužine</li> <li>• podesiti pH na 12</li> <li>• nadopuniti do 50 ml prokuhanom re-H<sub>2</sub>O</li> </ul>



### 3.8. Vijabilnost i proliferacija stanica

#### 3.8.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri mitohondrijska aktivnost stanica, a koji je direktna mjera vijabilnosti stanica. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju slabo obojene ili neobojene tetrazolijeve soli u intenzivno obojene derivate formazana. Ove reakcije redukcije zbivaju se u funkcionalnom mitohondriju, a inaktiviraju se nekoliko minuta nakon smrti stanice. Za potrebe ove disertacije korišten je komercijalno dostupan komplet EZ4U (Biomedica). Ukratko, test je izvođen na mikrotitarskim pločicama na način da su stanice nasađene prema uputama iz poglavlja 3.1. Nakon 7 dana rasta stanica RbE4, te 10 dana rasta astrocita, stanice su izložene različitim koncentracijama HNE-a ili micelama LA različitih koncentracija. Raspon koncentracija i uvjeti tretmana dani su u Tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti tretmana modela BBB i BBB-H HNE-om i micelama LA.

Tretmani HNE-om	
<b>Koncentracije (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	1; 5; 10; 20; 40; 50; 75; 100; 150
<b>Volumen tretmana (<math>\text{ml}/\text{cm}^2</math>)</b>	0.67
<b>Medij za pripremu tretmana</b>	Medij za rast stanica bez FCS-a
<b>Uvjeti tretmana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nakon potrebnog vremena uzgoja za pojedine stanice, uklonjen je medij i na stanice stavljen tretman HNE-om</li> <li>• 1h kasnije u medij je dodan FCS do konačnog udjela u mediju 10%</li> </ul>
Tretmani micelama linolne kiseline	
<b>Koncentracije (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	1; 2.5; 5; 7.5; 10; 20
<b>Volumen tretmana (<math>\text{ml}/\text{cm}^2</math>)</b>	0.67
<b>Medij za pripremu tretmana</b>	Bezbojna otopina Hanksa
<b>Uvjeti tretmana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nakon potrebnog vremena uzgoja za pojedine stanice, uklonjen je medij i na stanice stavljen tretman micela</li> <li>• 2h kasnije tretman je uklonjen i na stanice je dodan medij za uzgoj stanica s 10% FCS-a</li> </ul>

Nakon 24h od tretmana, uklonjen je medij u kojem su stanice rasle te je u bunariće dodano 200  $\mu$ l otopine bezbojnog Hanksa, prethodno ugrijanog na 37°C. Pripremila se MTT-boja (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), na način da se 2.5 ml aktivatorske otopine ugrijane na 37°C dodalo u bočicu sa bojom i dobro promućkalo prema uputama proizvođača. Kapano je 20  $\mu$ l MTT boje u svaki bunarić nakon čega je uslijedila inkubacija na 37°C. Rezultati su očitavani na čitaču pločica (Anthos). Intenzitet obojenja mjeren je na 450 nm uz kontrolnu valnu duljinu na 620 nm.

U slučaju kombiniranih tretmana, stanicama je dozvoljen oporavak između tretmana u periodu od 24h.

### 3.8.2. Test ugradnje radioaktivno obilježenog timidina

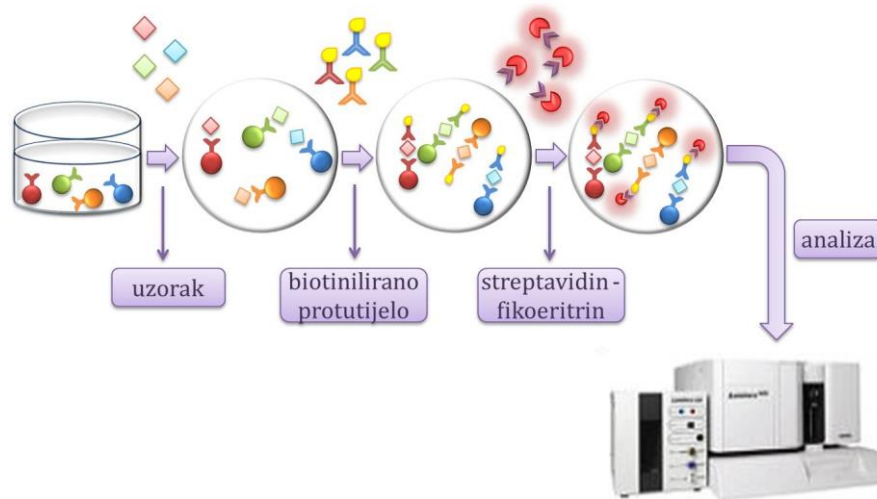
Za potrebe ovog testa korišteni su prethodno opisani uvjeti rasta i tretmana stanica (poglavlje 3.7.1.). Međutim, kako bi se tijekom 24h od tretmana pratila ugradnja radioaktivno obilježenog timidina, isti je dodan u bunariće ([6-<sup>3</sup>H]Thymidine; Amersham Pharmacia Biotech, 0.25  $\mu$ Ci/10  $\mu$ L po bunariću) odmah po isteku izlaganja stanica tretmanu te ostavljen tijekom 24h. Po isteku inkubacije stanice su isprane u sustavu za ispiranje stanica (Cell Harvester, Skatron) i prebačene na diskove filter papira od staklenih mikrovlakana (Skatron). Na osušene diskove dodano je po 1 ml scintilacijske tekućine (0.5% 2,5-difeniloksazol, 0.03% 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen u toluenu). Ugradnja radioaktivnog timidina u uzorcima je zatim mjerena na scintilacijskom  $\beta$ -brojaču (Beckman LS600 liquid scintillator counter, Beckman Instruments).

### 3.9. Lumineks analiza

Kako su prethodna istraživanja pokazala da HNE u visokim koncentracijama (>50  $\mu$ M) uzrokuje trenutno povećanje propusnosti BBB-a, željeli smo ustanoviti da li ove koncentracije uzrokuju rast upalnih čimbenika. Stoga je napravljena analiza sljedećih upalnih čimbenika: čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6) i citokinom potaknut kemoatraktant neutrofila 2 alfa/beta (CINC-2 $\alpha\beta$ ) te vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF). Ovi parametri analizirani su x-map tehnologijom na lumineksu iz supernatanata stanica modela BBB nakon tretmana visokim koncentracijama HNE-a. Ova tehnologija zasniva se na sustavu kuglica (mikrosfera) proizvedenih u 100 različitih kombinacija dviju boja čime se omogućava analiza do 100 različitih parametara iz jednog uzorka u jednom bunariću (Slika 9). Svaki set mikrosfera moguće je obložiti željenim parametrima.

Komplet korišten u ovoj disertaciji sastojao se od šest različitih setova mikrosfera. Svaki set obložen je protutijelom na jedan od šest gore navedenih čimbenika (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CINC-2 $\alpha\beta$ , VEGF). Nakon dodavanja uzorka u bunarić koji je sadržavao navedene setove mikrosfera uslijedilo je dodavanje biotiniliranog protutijela koje je detektirano sustavom streptavidin –

fikoeritrin. Potom je slijedila analiza na lumineksu (Athena Multylite). Ovaj uređaj po principu protočne citometrije koristi dva laserska izvora. Jedan očitava boju mikrosfere, a drugi intenzitet fikoeritrina na pripadajućoj mikrosferi. Konačni rezultat je kvantifikacija promatranih parametara u uzorku.



Slika 9. Prikaz x-map tehnologije.

### 3.10. Oksidacijski status stanica

#### 3.10.1. Određivanje unutarstaničnog ROS-a

Prilikom određivanja unutarstaničnog ROS-a korišteni su prethodno opisani uvjeti rasta i tretmana stanica (poglavlje 3.7.1.). Metoda se zasniva na mjerenju razvoja fluorescencije uslijed deacetilacije i oksidacije 2',7'-diklorodihidrofluoresceinog diacetata (DCFH-DA). Ovaj spoj ulazi u stanice gdje ga stanične esterase deacetiliraju do 2',7'-diklorodihidrofluorescina (DCFH), koji potom vrlo brzo uslijed djelovanja ROS-a oksidira do fluorescentnog 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (DCF). Intenzitet fluorescencije proporcionalan je razini ROS-a u staničnom citosolu. Pripremljena je otopina DCFH-DA koncentracije 1mM. Direktno u medij prisutan u bunarićima kapano je 20  $\mu$ l pripremljene otopine. Nakon jednog sata inkubacije, DCFH-DA je uklonjen iz bunarića te je nakon ispiranja bezbojnom otopinom Hanksa uslijedio tretman stanica. Odmah po izlaganju tretmanu, spektrofluorimetrom (Cary Eclipse Varian) je praćena količina ROS-a u stanicama mjerenjem intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini ekscitacije 500 nm i valnoj duljini emisije 529 nm. Promjene u razini ROS-a praćene su tijekom tri sata (5, 15, 30, 60, 120, 180 minuta).

### 3.10.2. Određivanje lipidnih hidroperoksida

Lipidi potrebni za ovu analizu izolirani su prema gore navedenom protokolu (poglavlje 3.6.). Lipidni hidroperoksidi određuju se metodom željezo (III) tiocijanata [104]. Hidroperoksidi su izrazito nestabilni spojevi koji brzo reagiraju sa željezo (II) ionom. Ovom reakcijom nastaju željezo (III) ioni koji u reakciji s tiocijanatnim ionom daju obojeni produkt čija apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski (Varian Cary 4000) pri valnoj duljini 500 nm.

## 3.11. Antioksidacijski status stanica

### 3.11.1. Određivanje GSH

Sama metoda određivanja koncentracije ukupnog GSH temelji se na reakciji sulfhidrilne skupine GSH sa Ellmanovim reagensom (DTNB – 5,5'-ditio-bis-2-(nitrobenzojeva kiselina)) koja rezultira žuto obojenim TNB-om (5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina). Disulfid između GSH i TNB-a, koji se neprestano stvara, reducira se pomoću glutation reduktaze i NADPH te tako uzrokuje recikliranje GSH i stvaranje TNB boje. Nastanak TNB boje direktno je proporcionalan ovoj reciklirajućoj reakciji, a time ujedno i koncentraciji GSH u uzorku. Apsorbancije TNB boje očitava se na čitaču pločica (Anthos) pri valnoj duljini 405 nm. Radi kvantifikacije GSH pripremi se raspon koncentracija GSH koji će dati baždarnu krivulju za iščitavanje koncentracije GSH u uzorcima.

Za potrebe ove metode korišteni su proteini izolirani na prethodno opisan način (poglavlje 3.5.). Svi uzorci su razrijeđeni u 0.01 M HCl-u tako da im konačna masa u bunariću iznosi 5 µg. Razrijeđeni uzorci i standardi (150 µl) nanoseni su u mikrotitarsku pločicu te ostavljeni na ledu dok se pripremaju ostali reagensi. U jednakom omjeru (1:1:1) pomiješaju se Ellmanov reagens (5.4 mM), glutation reduktaza (0.4 U/bunariću) i NADPH (1.8 mM) te se 75 µl ove smjese kapa direktno na uzorke. Apsorbancija TNB-a očitava se svake minute tijekom tri minute. Iz linearnog dijela standardne krivulje očitava se vrijednost GSH za svaki određeni vremenski interval uzorka te je izračunata prosječna vrijednost GSH za taj uzorak.

### 3.11.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze određuje se modificiranom metodom po Gothu [105]. Metoda se zasniva na enzimskoj aktivnosti katalaze da razgrađuje vodikov peroksid. U mikrotitarsku pločicu nanese se proteini razrijeđeni u kalij – fosfatnom puferu (60 mM) te kao standardi vodikov peroksid u rasponu koncentracija (0 mM – 100 mM). Nanosi se 40 µl proteina konačne mase u bunariću 30 µg. Reakcija započinje dodatkom 100 µl vodene otopine vodikovog peroksida koncentracije 65 mM. Očita se pozadinsko obojenje pri valnoj duljini 405 nm te se reakcija inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 µl otopine amonijevog molibdata koncentracije

32.4 mM, koji u reakciji s vodikovim peroksidom daje žuto obojenje. Intenzitet boje mjeri se na čitaču pločica pri valnoj duljini 405 nm (Anthos). Jedinica aktivnosti katalaze (1 U) definira se kao količina enzima koja je potrebna da razgradi 1  $\mu\text{mol}$  vodikovog peroksida u 1 minuti pri 25°C. Ovom metodom mjeri se vodikov peroksid preostao u bunarićima, a aktivnost katalaze računa se prema sljedećoj formuli:

$$CAT (U) = \frac{(Cp - Ck) \times Vp}{t}$$

gdje je CAT aktivnost katalaze; Cp – početna koncentracija vodikovog peroksida (65  $\mu\text{mol/ml}$ ); Ck – koncentracija vodikovog peroksida (u  $\mu\text{mol/ml}$ ) zaostalog u bunariću nakon zaustavljanja reakcije (iščitava se iz baždarne krivulje); Vp – volumen vodikovog peroksida koncentracije 65  $\mu\text{mol/ml}$  stavljenog na uzorke (0.1 ml); t – vrijeme reakcije u minutama (5 min).

### 3.12. Kapljične analize proteina (Dot – blot analize)

Proteini izolirani iz stanica (poglavlje 3.5.) korišteni su u kapljičnoj analizi radi utvrđivanja prisutnosti HNE–proteinskih konjugata, Nrf2 transkripcijskog čimbenika i okcludina. Za potrebe ovih analiza korišten je dot-blot uređaj (BioRad).

Za svaku pojedinu analizu, proteini su nanoseni na nitroceluloznu membranu u količini 10  $\mu\text{g}$  po kapljici. Nakon nanošenja uzoraka, na membranu je stavljena otopina za blokiranje nevezanih mjesta (blotto). Po završetku inkubacije od 1h, blotto je uklonjen sa membrane te je na nju stavljeno primarno protutijelo. Nakon inkubacije, membrana je isprana te je provedeno blokiranje endogenih peroksidaza 1.5% otopinom vodikovog peroksida pripremljenog u otopini 3% BSA u PBS-u tijekom 20 minuta. Potom je uslijedilo ispiranje membrane i inkubacija sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom iz hrena (HRP, engl. Horseradish peroxidase) te detekcija proteina od interesa. Dobiveni signali kvantificirani su u programu ImageJ.

Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela uz koncentracije, vrijeme inkubacije i način razrjeđenja te sastav otopine blotta i način detekcije, dani su u Tablici 5.

Za kvantifikaciju HNE–proteinskih konjugata pripremljeni su HNE–BSA standardi (raspon koncentracija HNE-a vezan na istu količinu BSA) iz kojih je napravljena baždarna krivulja. U slučaju Nrf2, na membranu je nanosen protein Nrf2 u rasponu koncentracija te je iz dobivenih signala napravljena baždarna krivulja iz koje su kvantificirani ostali signali.

Tablica 5. Popis primarnih i sekundarnih protutijela te potrebnih otopina za dot-blot analize.

<b>Primarno protutijelo</b>	<b>anti - HNE</b>	<b>anti - Nrf2</b>	<b>anti - okludin</b>
<b>vrsta</b>	mišje monoklonalno	zečje poliklonalno	zečje poliklonalno
<b>razrjeđenje</b>	1:100	1:50	1:50
<b>razrijeđeno u</b>	1% BSA u PBS-u	blotto	blotto
<b>vrijeme inkubacije</b>	2h	1h	1h
<b>blotto</b>	1% nemasno mlijeko u prahu u PBS-u	1% nemasno mlijeko u prahu, 1% BSA, 0.05% Tween-20 u TBS-u	1% nemasno mlijeko u prahu, 1% BSA, 0.05% Tween-20 u TBS-u
<b>Sekundarno protutijelo</b>	<b>EnVision</b>	<b>HRP-om obilježeni kozji imunoglobulini na zečja protutijela</b>	<b>HRP-om obilježeni kozji imunoglobulini na zečja protutijela</b>
<b>razrjeđenje</b>	1:25	1:10	1:10
<b>razrijeđeno u</b>	1% BSA u PBS-u	blotto	blotto
<b>vrijeme inkubacije</b>	45 minuta	45 minuta	45 minuta
<b>detekcija</b>	DAB	DAB	DAB

### 3.13. Određivanje lipidnog profila

Za analizu masnih kiselina plinskim kromatografom (Varian 450-GC) uzorke je potrebno transesterificirati. Suhi ostatak lipida je potrebno ostaviti da se termostatira na sobnu temperaturu prije početka trans esterifikacije. U svaki uzorak dodano je 5 ml 0.5 M otopine kalijeve lužine u metanolu. Zatvorene epruvete su miješane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodano 5 ml n-heksana te je nakon ručnog miješanja gornja faza (organski sloj) odvojena u čistu epruvetu i isprana dva puta s 2.5 ml vode. Nakon odvajanja faza, u heksansku fazu s lipidima je dodan natrijev sulfat radi sušenja. Uzorci su potom filtrirani radi uklanjanja natrijevog sulfata te upareni do suha pod strujom plina dušika i pohranjeni na -20°C do analize.

Analiza estera masnih kiselina izvršena je injektiranjem 1 µl uzorka lipida u plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom Stabilwax (Crossbond Carbowax polyethylene glycol; 60 m × 0.25 mm). Temperaturni režim je počinjao od 150°C (u trajanju od 1 minuta) do 250°C (21 minuta) s brzinom porasta temperature 5°C × min<sup>-1</sup>. Temperatura injektora bila je 250°C, a temperatura detektora 270°C uz helij kao plin nosilac, protoka 1.5 ml × min<sup>-1</sup>. Metilni esteri identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja komercijalno dostupnih standarada.

### 3.14. Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni koristeći program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software). Granična razina značajnosti postavljena je na 95% (granična P vrijednost = 0.05). Radi naglašavanja razine značajnosti korištene su tri P vrijednosti:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ . Svaki pokus izvođen je u kvadriplikatima i ponavljan barem tri puta.

Za testiranje razlika između tri ili više skupina unutar dvije grupe (usporedba skupina u uvjetima rasta na kolagenu i kolagenu modificiranom s HNE-om) korištena je dvosmjerna analiza varijance (engl. Two-way ANOVA) uz Bonferronijev test kao *post-hoc* analizu kako bi se utvrdile točne P vrijednosti između skupina dvije grupe. Razlike između tri ili više skupina unutar iste grupe testirane su jednosmjernom ANOVA-om (engl. One-way ANOVA). Kao *post-hoc* analiza korišten je Dunettov test kada se tražila razlika između skupina u odnosu na kontrolu, odnosno Bonferronijev test kada su uspoređivane razlike između svih skupina unutar grupe.

Oznaka 'a' predstavlja značajnost u odnosu na kontrolu (netretirani uzorak) u uvjetima rasta na kolagenu. Oznaka 'b' predstavlja značajnost u odnosu na kontrolu (netretirani uzorak) u uvjetima rasta na kolagenu modificiranom s HNE-om. Oznaka 'c' predstavlja značajnost istih skupina između dvije grupe. Ispod svakog grafa bit će naznačena P vrijednost navedenih oznaka.

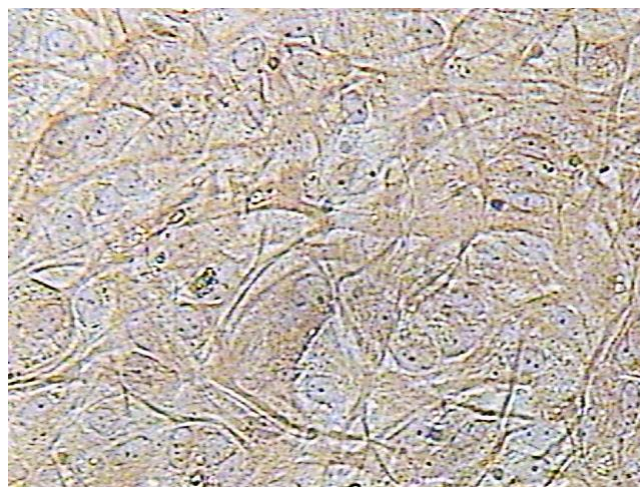
## ***REZULTATI***



## 4. REZULTATI

### 4.1. Imunocitokemija na GFAP

Kultura astrocita je prije početka svakog pokusa testirana na prisutnost GFAP-a (Slika 10) kako bi se utvrdila čistoća kulture i odredio postotak GFAP pozitivnih stanica. U pokusima su se dalje koristile isključivo kulture koje su imale više od 90% GFAP pozitivnih stanica te su potvrđene kao čiste kulture astrocita.



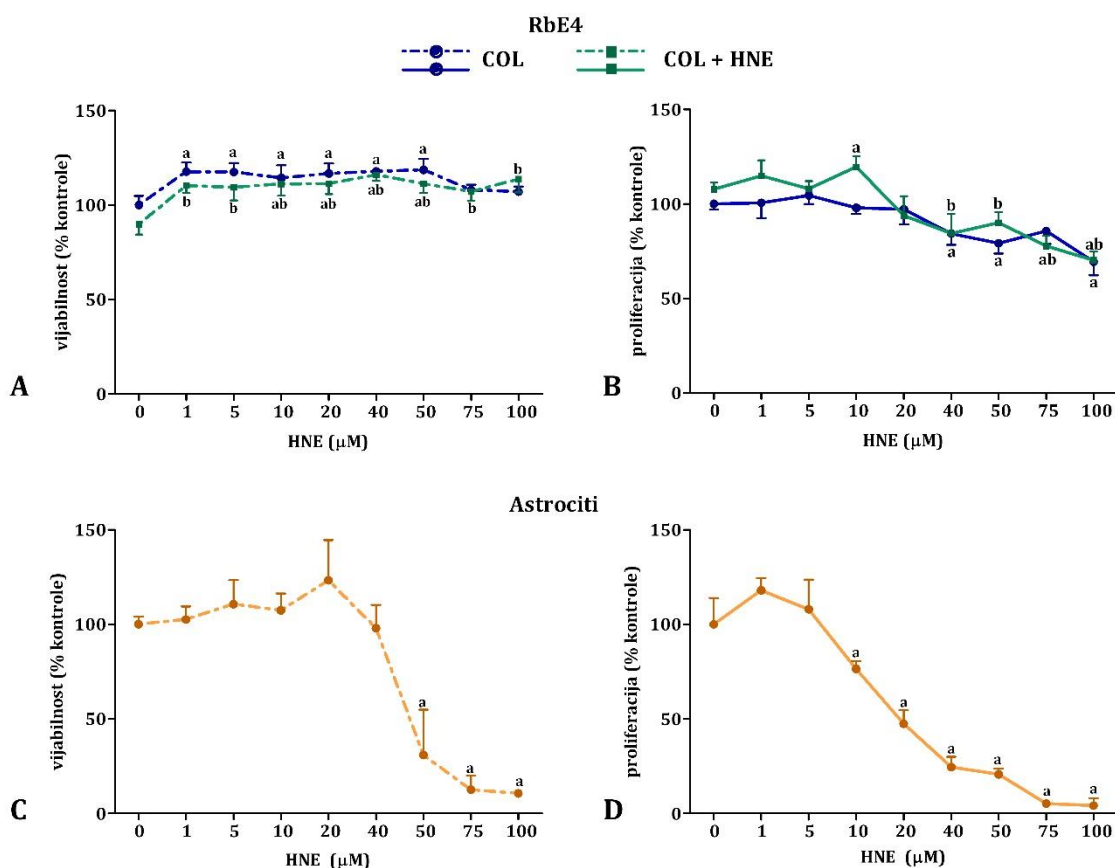
Slika 10. GFAP pozitivna kultura astrocita.

### 4.2. Utjecaj HNE-a na stanice

#### 4.2.1. Utjecaj HNE-a na vijabilnost i proliferaciju stanica

Utjecaj niza koncentracija HNE-a na vijabilnost i proliferaciju stanica (endotelnih i astrocita) provjeren je testom metaboličke aktivnosti i testom ugradnje radioaktivno obilježenog timidina. Vijabilnost endotelnih stanica raslih na modificiranom kolagenu niža je od onih koje su rasle na kolagenu, međutim razlika nije statistički značajna (Slika 11A). Unatoč velikom rasponu koncentracija, HNE nije imao negativnih učinaka na vijabilnost stanica.

U rasponu koncentracija od 1  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$ , HNE je statistički značajno potaknuo metaboličku aktivnost endotelnih stanica neovisno o podlozi na kojoj su rasle. Rezultati proliferacije stanica ukazuju na blagu stimulaciju proliferacije endotelnih stanica raslih na modificiranom kolagenu (Slika 11B). Do statistički značajnih razlika u stimulaciji proliferacije dolazi uslijed tretmana endotelnih stanica s 1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  HNE-om. Koncentracije HNE-a od 40  $\mu\text{M}$  do 100  $\mu\text{M}$  uzrokovale su zastoj u proliferaciji endotelnih stanica neovisno o podlozi na kojoj su rasle.



Slika 11. Vijabilnost (A) i proliferacija (B) endotelne stanice – RbE4 raslih na kolagenu i kolagenu modificiranom HNE-om te vijabilnost (C) i proliferacija (D) astrocita uslijed tretmana HNE-om.

Rezultati su prikazani kao postotak kontrole (netretirane stanice rasle na kolagenu) pri čemu je a – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu s HNE-om uz  $P < 0.001$ .

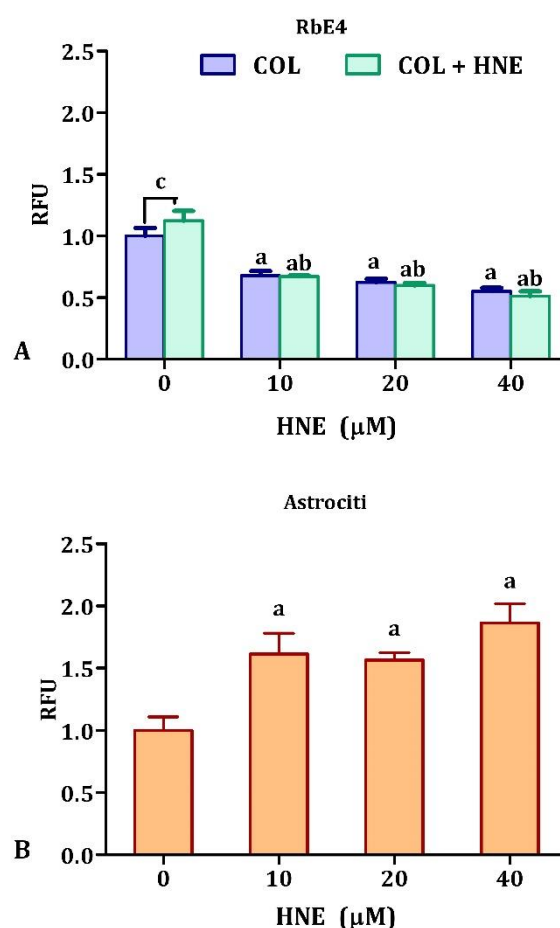
Isti raspon koncentracija HNE-a korišten je u tretmanu astrocita. Pokazalo se da su astrociti osjetljivije stanice od endotelne te su koncentracije HNE-a od 40 µM do 100 µM uzrokovale značajan pad vijabilnosti ovih stanica (Slika 11C). S druge strane, HNE je u koncentraciji od 10 µM doveo do statistički značajnog pada proliferacije astrocita za 25% što je s višim koncentracijama HNE-a postalo naglašenije (Slika 11D). Zanimljivo je da su i astrociti i endotelne stanice imale isti odgovor na tretman HNE-om koncentracije 1 µM, a to je statistički značajan porast proliferacije.

Kako je jedan od ciljeva ovog rada ispitati utjecaj HNE-a na BBB-u u koncentracijama koje nisu toksične za stanice, u daljnjim analizama koristile su se sljedeće koncentracije HNE-a: 10 µM, 20 µM i 40 µM.

## 4.2.2. Utjecaj HNE-a na oksidacijski status stanica

### 4.2.2.1. Kvantifikacija unutarstaničnog ROS-a

Razina ROS-a pratila se tijekom tri sata nakon tretmana HNE-om. Već u petoj minuti od tretmana dolazi do promjena u razini ROS-a kod obje vrste stanica. Kako tijekom tri sata nije došlo do značajnijih promjena u razini ROS-a u mjerenim vremenima, prikazani su rezultati razine ROS-a izmjereni dva sata nakon tretmana (Slika 12). Endotelne stanice koje rastu na modificiranom kolagenu imaju višu razinu ROS-a od onih koje rastu na kolagenu. Unatoč početnoj razlici u razini ROS-a kod endotelnih stanica ovisno o podlozi na kojoj rastu, uslijed tretmana s HNE-om te tijekom vremena te razlike nestaju.



Slika 12. Razina unutarstaničnog ROS-a u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) uslijed tretmana HNE-om mjerena relativnim jedinicama fluorescencije (RFU, engl. Relative fluorescence unit).

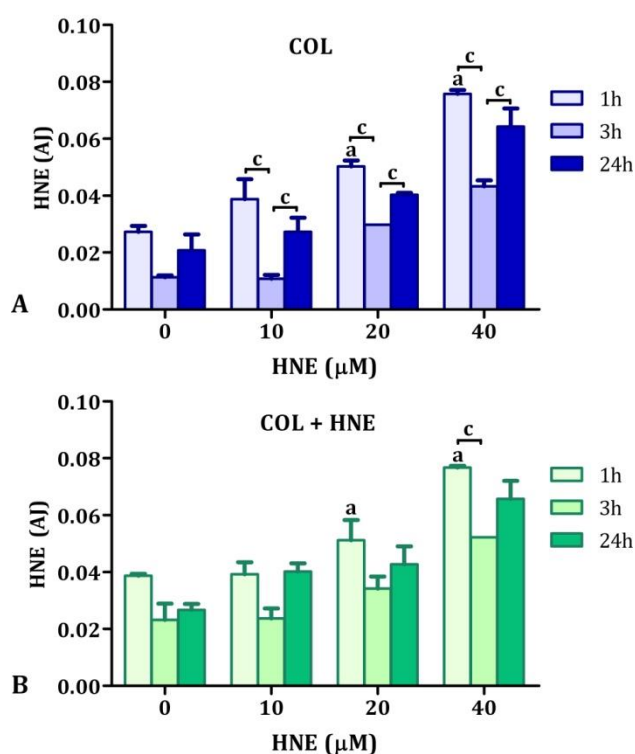
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu s HNE-om uz  $P < 0.001$ .

Zanimljivo je da HNE uzrokuje koncentracijski ovisan pad razine ROS-a u endotelnim stanicama (Slika 12A). Tako, najviša korištena koncentracija HNE-a (40  $\mu\text{M}$ ) kod endotelnih stanica koje su rasle na modificiranom kolagenu uzrokuje pad razine ROS-a za 50%. S druge strane, HNE u astrocitima uzrokuje 100%-tni rast razine ROS-a (Slika 12B). Čak i najniža koncentracija HNE-a (1  $\mu\text{M}$ ) uzrokuje rast ROS-a u astrocitima.

#### 4.2.2.2. Semikvantifikacija HNE – proteinskih konjugata

Usljed tretmana s HNE-om imunocitokemijom se pratila razina HNE–proteinskih konjugata u stanici kako bi se pratio metabolizam HNE-a, ali i kao mjera razine lipidne peroksidacije u stanicama. Razina HNE–proteinskih konjugata praćena je 1, 3 i 24 sata od tretmana HNE-om.

Iz rezultata je vidljivo da endotelne stanice imaju određenu početnu razinu HNE–proteinskih konjugata, koja je u stanicama raslima na modificiranom kolagenu veća nego kod stanica raslih na kolagenu (Slika 13).



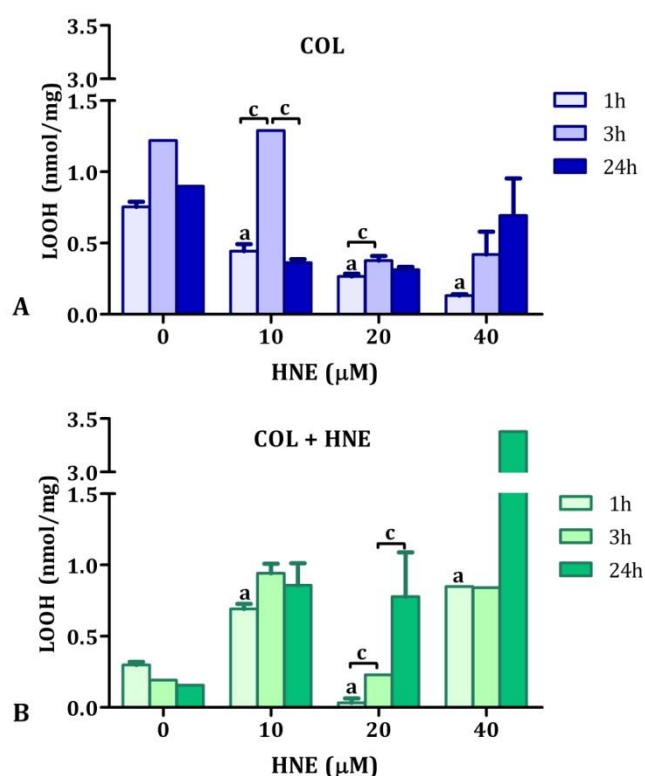
Slika 13. Semikvantifikacija HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama – RbE4 raslih na kolagenu (A) i kolagenu modificiranom HNE-om (B) 1h, 3h i 24h nakon tretmana prikazana arbitrarnim jedinicama (AJ).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

Sat vremena od tretmana vidi se koncentracijski ovisan porast razine HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama. Tri sata nakon tretmana HNE-om, razina HNE–proteinskih konjugata u stanicama pada gotovo do polovice vrijednosti izmjerene nakon jednog sata. Potom, 24 sata nakon tretmana, razina HNE–proteinskih konjugata u stanicama ponovno raste i ukazuje na pojavu lipidne peroksidacije u endotelnim stanicama. Neovisno o početno višoj razini HNE–proteinskih konjugata u stanicama koje su rasle na modificiranom kolagenu, one prate isti trend razine HNE–proteinskih konjugata kao i stanice rasle na kolagenu.

#### 4.2.2.3. Kvantifikacija lipidnih hidroperoksida

Kako su prethodni rezultati pokazali rast razine HNE–proteinskih konjugata u stanicama 24 sata nakon tretmana u odnosu na razine izmjerene tri sata od tretmana, a tretman je uzrokovao pad razine ROS-a, izmjerene su vrijednosti lipidnih hidroperoksida (Slika 14). Mjerene u istom vremenskom razdoblju kao i razina HNE–proteinskih konjugata, vrijednosti lipidnih hidroperoksida otkrivaju da endotelne stanice rasle na modificiranom kolagenu imaju znatno niže vrijednosti lipidnih hidroperoksida.



Slika 14. Razina lipidnih hidroperoksida u endotelnim stanicama – RbE4 raslih na kolagenu (A) i kolagenu modificiranom HNE-om (B) 1h, 3h i 24h nakon tretmana.

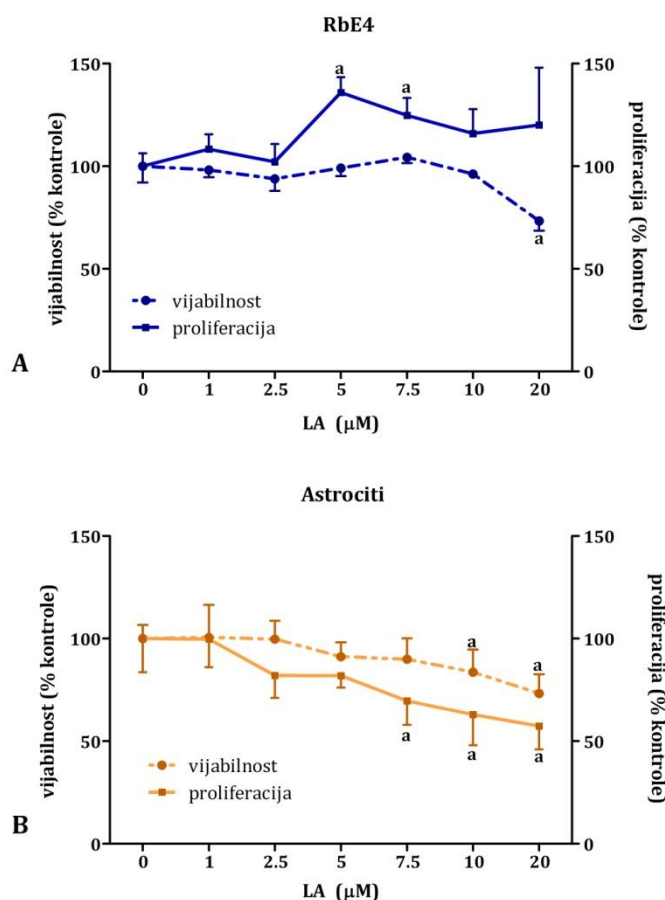
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) uz  $P < 0.01$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.01$ .

Međutim, tretman HNE-om uzrokuje značajan rast razine lipidnih hidroperoksida u endotelnim stanicama koje su rasle na modificiranom kolagenu već jedan sat od tretmana (Slika 14B). S druge strane, endotelne stanice koje su rasle na kolagenu, jedan sat od tretmana pokazuju koncentracijski ovisan pad razine lipidnih hidroperoksida (Slika 14A). No, tri sata od tretmana razina lipidnih hidroperoksida u ovim stanicama značajno raste.

### 4.3. Utjecaj micela LA na stanice

#### 4.3.1. Utjecaj micela LA na vijabilnost i proliferaciju stanica

Micela LA napravljene su u rasponu koncentracija LA od 1  $\mu\text{M}$  do 20  $\mu\text{M}$ . Kao što je vidljivo iz prikaza, micela LA nisu uzrokovale značajnije promjene u vijabilnosti endotelnih stanica, ali su utjecale na proliferacijsku sposobnost stanica (Slika 15A). Micela koje su sadržavale LA u koncentracijama 5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$  su uzrokovale statistički značajan porast proliferacije stanica RbE4.



Slika 15. Vijabilnost i proliferacija (A) endotelnih stanica – RbE4 raslih na kolagenu te vijabilnost i proliferacija (B) astrocita uslijed tretmana micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu uz  $P < 0.001$ .

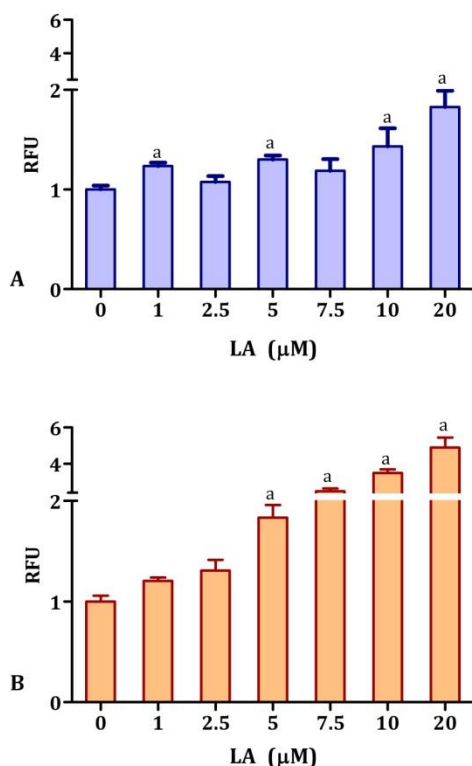
Istovremeno, na astrocitima su micela LA koncentracija 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  uzrokovale blagi pad vijabilnosti stanica, dok su micela LA koncentracija od 2.5  $\mu\text{M}$  naviše počele utjecati na sposobnost proliferacije astrocita (Slika 15B).

#### 4.3.2. Utjecaj micela LA na oksidacijski status stanica

##### 4.3.2.1. Kvantifikacija unutarstaničnog ROS-a

LA čija je koncentracija u micelama iznosila do 7.5  $\mu\text{M}$  uzrokovala je blagi porast razine ROS-a u endotelnim stanicama (Slika 16A). Više koncentracije LA (10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ ) uzrokovale su veći porast razine ROS-a u stanicama. Tijekom tri sata praćenja razine ROS-a, do najvećeg porasta došlo je u tretmanu micelama LA koncentracije 20  $\mu\text{M}$ .

Astroцити su se pokazali osjetljivijima na tretmane micelama LA te su tako povišenu razinu ROS-a uzrokovale koncentracije iznad 5  $\mu\text{M}$  (Slika 16B). Dva sata od tretmana, micela LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  uzrokovale su rast razine ROS-a za dva puta, dok je koncentracija 20  $\mu\text{M}$  uzrokovala čak pet puta veću razinu ROS-a nego u kontroli.



Slika 16. Razina unutarstaničnog ROS-a u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) uslijed tretmana micelama LA.

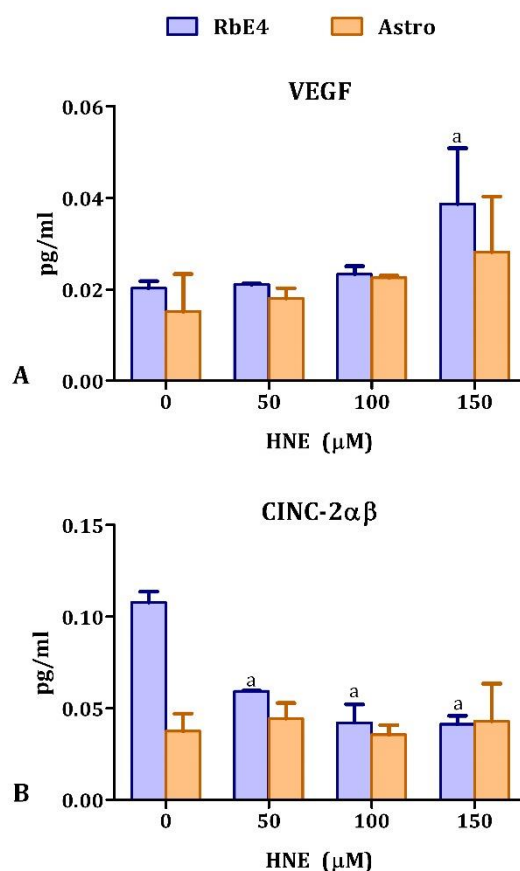
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu uz  $P < 0.001$ .

Za daljnje ispitivanje utjecaja micela LA na svojstva BBB korištene su micelle u kojima je koncentracija LA iznosila 2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4. Učinci HNE-a na BBB

##### 4.4.1. Rezultati analize na lumineksu

Kako su dosadašnja istraživanja uglavnom pokazala da visoke koncentracije HNE-a uzrokuju povećanje propusnosti BBB-a, zanimalo nas je da li ti tretmani potiču stvaranje proupalnih citokina i faktora rasta. Rezultati analize na lumineksu pokazuju da su od 6 mjerenih citokina samo dva uspješno detektirana, jer su koncentracije preostalih četiri bile nemjerljive. Uslijed visokih koncentracija HNE-a, detektirane su promjene u razini VEGF-a i CINC-2 $\alpha\beta$  (Slika 17). Značajna promjena u razini VEGF-a uočena je u endotelnim stanicama uslijed tretmana HNE-om koncentracije 150  $\mu\text{M}$  (Slika 17A), dok su i niže koncentracije HNE-a uzrokovale značajan pad razine CINC-2 $\alpha\beta$  (Slika 17B).



Slika 17. Razine VEGF-a (A) i CINC-2 $\alpha\beta$  (B) u endotelnim stanicama – RbE4 i astrocitima uslijed tretmana visokim koncentracijama HNE-a.

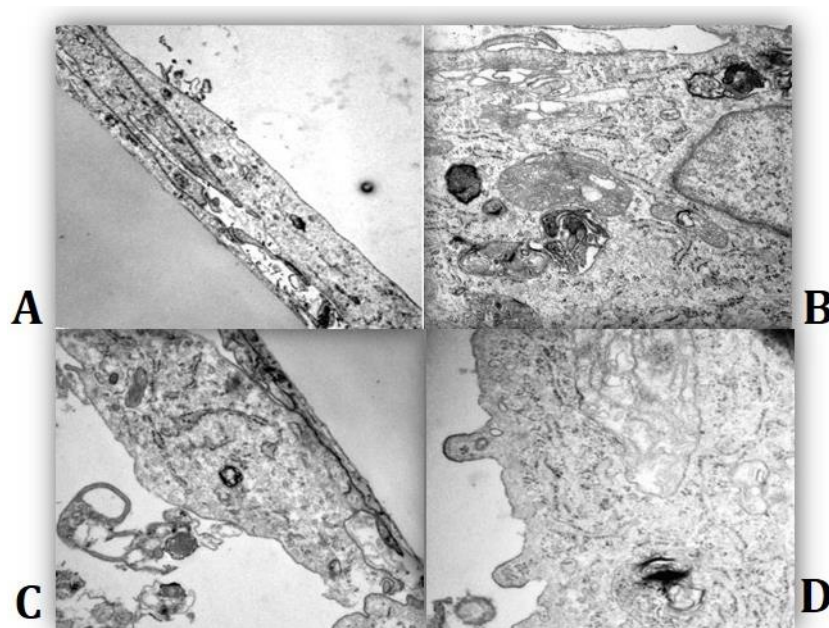
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu uz P<0.001.



U astrocitima dolazi do koncentracijski ovisnog porasta VEGF-a uslijed tretmana HNE-om, dok nema većih promjena u razini CINC-2 $\alpha\beta$ . Razina VEGF-a u obje vrste stanica je početno jednaka, dok postoji velika razlika u početnoj razini CINC-2 $\alpha\beta$ . Naime, astrociti imaju 2.5 puta nižu koncentraciju CINC-2 $\alpha\beta$  od endotelnih stanica.

#### 4.4.2. Integritet i propusnost BBB-a

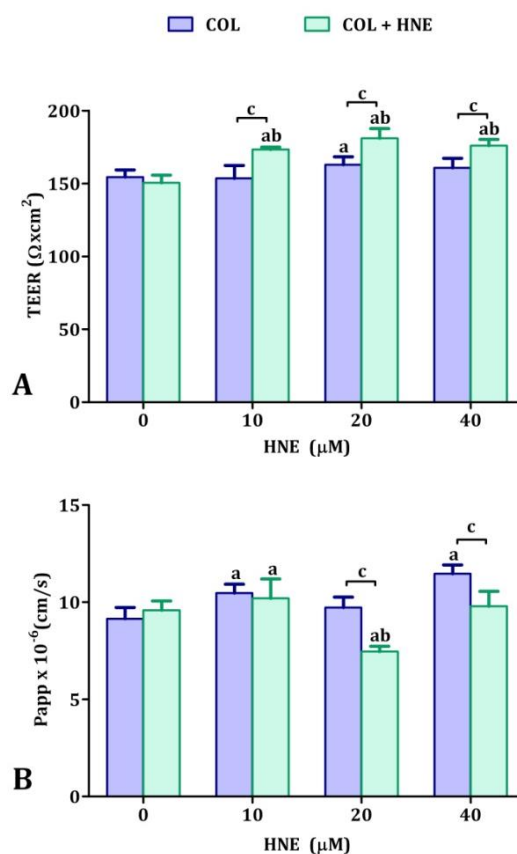
Prisutnost endotelnih stanica i astrocita na difuzijskim komoricama provjerena je elektronskom mikroskopijom. Iz poprečnog prereza difuzijskih komorica nakon razvoja modela BBB, vidljivo je lijepo preklapanje endotelnih stanica, koje grade čvrsti monosloj, s gornje strane membrane difuzijske komorice (Slika 18 A,B). Na suprotnoj strani membrane difuzijske komorice vidljivi su mnogo veći astrociti sa svojim izdancima (Slika 18 C,D).



Slika 18. Slike elektronske mikroskopije endotelnih stanica RbE4 (A, B) i astrocita (C, D) modela BBB

Modeli BBB i BBB-H izloženi su niskim koncentracijama HNE-a (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  i 40  $\mu\text{M}$ ) nakon čega su praćene promjene u integritetu BBB-a mjerenjem TEER-a (Slika 19A) te promjene u propusnosti BBB-a za natrijev fluorescein (Slika 19B). Iz grafova je vidljivo da tretman HNE-om (20  $\mu\text{M}$ ) uzrokuje blagi porast TEER-a kod modela BBB. Iako nema razlika u vrijednostima TEER-a između dva modela razvijena na različitim podlogama, tretman HNE-om uzrokuje značajan rast TEER-a kod modela BBB-H. Najveći porast TEER-a na ovom modelu uzrokovao je tretman HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$ .

Iako nije došlo do pada TEER-a niti u jednom modelu uslijed tretmana, zabilježen je porast propusnosti modela BBB uslijed tretmana HNE-om koncentracije 40  $\mu\text{M}$ . No, najveću promjenu u propusnosti BBB-a uzrokovao je tretman HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$ . Ovaj tretman uzrokovao je značajan pad propusnosti modela BBB-H za 18% u odnosu na netretirani model BBB.



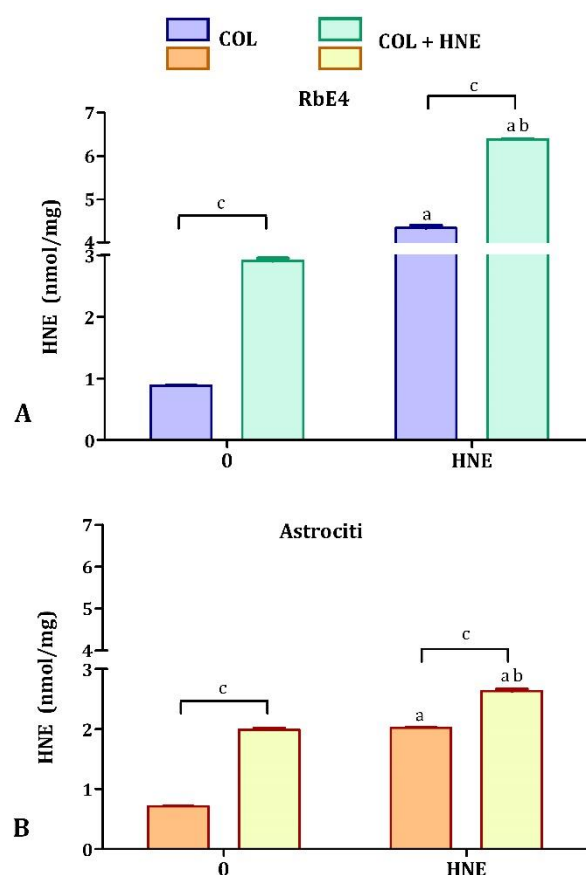
Slika 19. Promjene u integritetu oba modela BBB-a mjerene kao TEER (A) i propusnost za natrijev fluorescein (B).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

Sukladno s porastom TEER-a te padom propusnosti uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$  modela BBB-H, može se zaključiti da je tretman uzrokovao jačanje integriteta BBB-a i učinio je još nepropusnijom. Stoga su ispitani učinci HNE-a ove koncentracije na antioksidacijski sustav zaštite endotelnih stanica i astrocita oba modela BBB-a, te promjene lipidnog profila i razinu okludina u endotelnim stanicama. Također je ispitan učinak HNE-a ove koncentracije u kombiniranim tretmanima s micelama LA.

#### 4.4.3. HNE–proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a

Analizom količine HNE–proteinskih konjugata u BBB modelima uslijed tretmana HNE-om (20  $\mu$ M) ustanovljene su značajne razlike u količini ovih konjugata između ova dva modela neovisno o tretmanu. Opažen je i utjecaj modificiranog kolagena na količinu HNE–proteinskih konjugata kako u endotelnim stanicama, tako i u astrocitima. Tretman HNE-om je također utjecao na količinu HNE–proteinskih konjugata u oba tipa stanica, neovisno o tome što astroцити nisu bili direktno izloženi tretmanu, kao endotelne stanice (Slika 20).



Slika 20. Količina HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) nakon izlaganja modela BBB i BBB-H tretmanu HNE-om koncentracije 20  $\mu$ M.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

U endotelnim stanicama modela BBB-H pronađena je tri puta veća količina HNE–proteinskih konjugata nego u endotelnim stanicama modela BBB. Uslijed tretmana HNE-om, količina HNE–proteinskih konjugata značajno je porasla u endotelnim stanicama oba BBB modela (Slika 20A).

Tako je kod modela BBB količina HNE–proteinskih konjugata porasla čak četiri puta, dok je kod modela BBB-H ovaj porast bio manji (dva puta) u odnosu na početno stanje. Endotelne stanice modela BBB-H i dalje su imale više vrijednosti HNE–proteinskih konjugata od endotelnih stanica modela BBB.

U astrocitima oba modela je također izmjerena bazalna razina HNE–proteinskih konjugata (Slika 20B). Ponovno je došlo do očitih razlika u količini HNE–proteinskih konjugata ovisno o podlozi na kojoj je razvijan model BBB-a. Tako je u astrocitima iz modela BBB-H došlo do porasta u količini HNE–proteinskih konjugata za dva i pol puta u odnosu na astrocitate modela BBB.

Usljed tretmana BBB-a HNE-om, količina HNE–proteinskih konjugata u astrocitima modela BBB porasla je za dva i pol puta, dok je porast ovih konjugata u astrocitima modela BBB-H bio znatno manji. Međutim, i dalje je količina HNE–proteinskih konjugata u astrocitima modela BBB-H bila viša nego u astrocitima modela BBB .

#### **4.4.4. Antioksidacijski status BBB-a**

##### **4.4.4.1. Razina GSH i aktivnost katalaze u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a**

Usljed tretmana BBB-a HNE-om (20  $\mu$ M), praćene su razine GSH i katalaze kao antioksidacijski parametri stanica (Slika 21). Ponovno je vidljiv utjecaj modificiranog kolagena na ove parametre u oba tipa stanica, kao i utjecaj samog tretmana neovisno o tome što astrociti nisu bili direktno izloženi tretmanu.

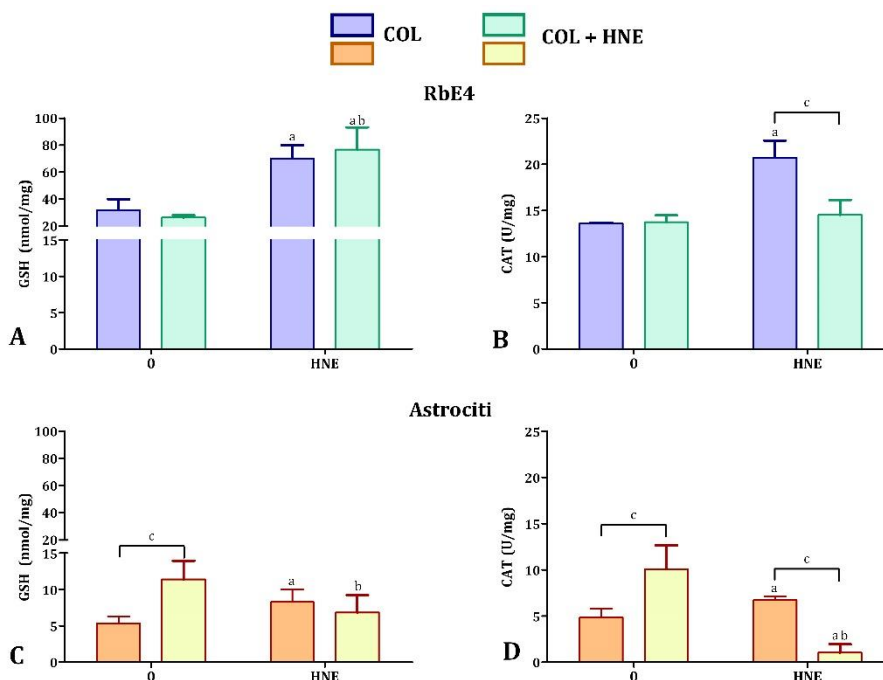
Početne razine GSH u endotelnim stanicama oba modela su podjednake (Slika 21A). Tretman HNE-om uzrokuje značajan porast razine GSH u endotelnim stanicama dvaju BBB modela.

Razlike u razini GSH ovisno o modelu BBB-a uočene su i u astrocitima (Slika 21C). Razina GSH u astrocitima modela BBB-H dva je puta veća od razine GSH u astrocitima modela BBB. Sam tretman BBB-a HNE-om uzrokovao je porast razine GSH u astrocitima modela BBB, ali pad razine GSH u modelu BBB-H.

Zanimljivo je da astrociti imaju značajno nižu razinu GSH od endotelnih stanica neovisno o modelu BBB-a i tretmanu.

Razlike u modelima BBB-a nisu imale utjecaja na aktivnost katalaze endotelnih stanica (Slika 21B). Međutim, tretman HNE-om uzrokovao je značajan porast aktivnosti katalaze endotelnih stanica modela BBB, dok na modelu BBB-H nije bilo promjena u aktivnosti katalaze.

Aktivnost katalaze je u astrocitima modela BBB porasla nakon tretmana HNE-om, dok je uočen pad u aktivnosti katalaze modela BBB-H (Slika 21D). Kao i u slučaju GSH, astrociti modela BBB-H imaju početno višu aktivnost katalaze nego astrociti modela BBB.



Slika 21. Antioksidacijski status modela BBB i BBB-H uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu$ M. Prikazane su razine GSH u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (C) te katalaze u stanicama RbE4 (B) i astrocitima (D).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

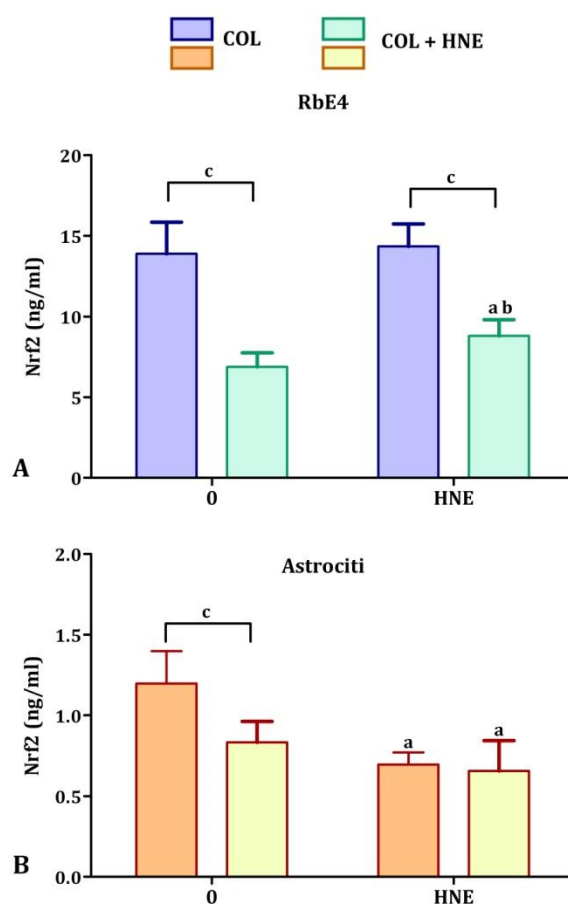
#### 4.4.4.2. Količina Nrf2 u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a

Na temelju baždarnе krivulje proteina Nrf2 očitane su vrijednosti ovog proteina u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu$ M (Slika 22).

Početna količina Nrf2 modela BBB je 25 puta veća u endotelnim stanicama nego u astrocitima, dok se u modelu BBB-H ova razlika još povećava te je razina Nrf2 u endotelnim stanicama modela BBB-H 75 puta veća nego u astrocitima istog modela. Međutim, razina Nrf2 u endotelnim stanicama modela BBB-H je dva puta manja nego u endotelnim stanicama modela BBB (Slika 22A). U astrocitima dvaju modela ova razlika se povećava te astroцити modela BBB imaju 6 puta veću razinu Nrf2 od astrocitа modela BBB-H (Slika 22B).

Tretman HNE-om ne uzrokuje promjene u razini Nrf2 u endotelnim stanicama modela BBB, ali uzrokuje porast Nrf2 u endotelnim stanicama modela BBB-H u odnosu na netretirani model BBB-H (Slika 22A).

Istovremeno, promjene u razini Nrf2 uslijed tretmana se javljaju i u astrocitima, iako oni nisu bili izravno izloženi djelovanju HNE-a (Slika 22B). Tako izlaganje oba modela BBB-a HNE-u uzrokuje pad razine Nrf2 u astrocitima oba modela.



Slika 22. Razina Nrf2 u stanicama RbE4 (A) i astrocitima (B) oba modela BBB-a uslijed tretmana HNE-om.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

#### 4.4.5. Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a

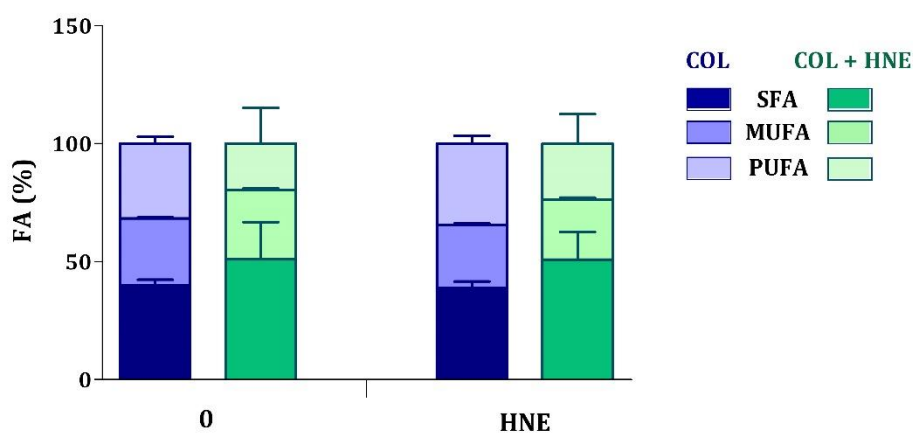
Analiziran je lipidni sastav isključivo endotelnih stanica dvaju modela BBB-a. Prikazane su razlike u sastavu SFA, MUFA i PUFA te je dan uvid u količinu pojedinačnih masnih kiselina iz skupine MUFA i PUFA. Popis ispitanih masnih kiselina dan je u Tablici 6. Kako se lipidni profili modela BBB i modela BBB-H bitno razlikuju, radi lakšeg praćenja rezultata lipidni profili dvaju

modela i njihove promjene uslijed tretmana prikazani su na odvojenim grafovima. Promjene uslijed tretmana praćene su za svaki model zasebno.

Tablica 6. Masne kiseline čiji udio je bio ispitivan u endotelnim stanicama oba modela BBB-a sa pripadajućim kraticama te broju ugljikovih atoma i dvostrukih veza.

MUFA	PUFA	
	$\omega$ -3	$\omega$ -6
Palmitoleinska kiselina ( <b>POA</b> ); C-16:1	$\alpha$ -Linolenska kiselina ( <b>ALA</b> ); C-18:3	Linolna kiselina ( <b>LA</b> ); C-18:2
Oleinska kiselina ( <b>OA</b> ); C-18:1	Eikosatrienska kiselina ( <b>ETE</b> ); C-20:3	Eikosadienska kiselina ( <b>EDA</b> ); C-20:2
	Dokosapentaenska kiselina ( <b>DPA</b> ); C-22:5	Arahidonska kiselina ( <b>AA</b> ); C-20:4
	Dokosaheksaenska kiselina ( <b>DHA</b> ); C-22:6	

Endotelne stanice modela BBB-H sadrže veći udio SFA te smanjeni udio PUFA za razliku od endotelnih stanica modela BBB (Slika 23). Sam tretman HNE-om (20  $\mu$ M) ne utječe bitno na odnose SFA i PUFA, neovisno o BBB modelu.



Slika 23. Razlike u sastavu SFA, MUFA i PUFA endotelnih stanica modela BBB i BBB-H uslijed tretmana HNE-om.

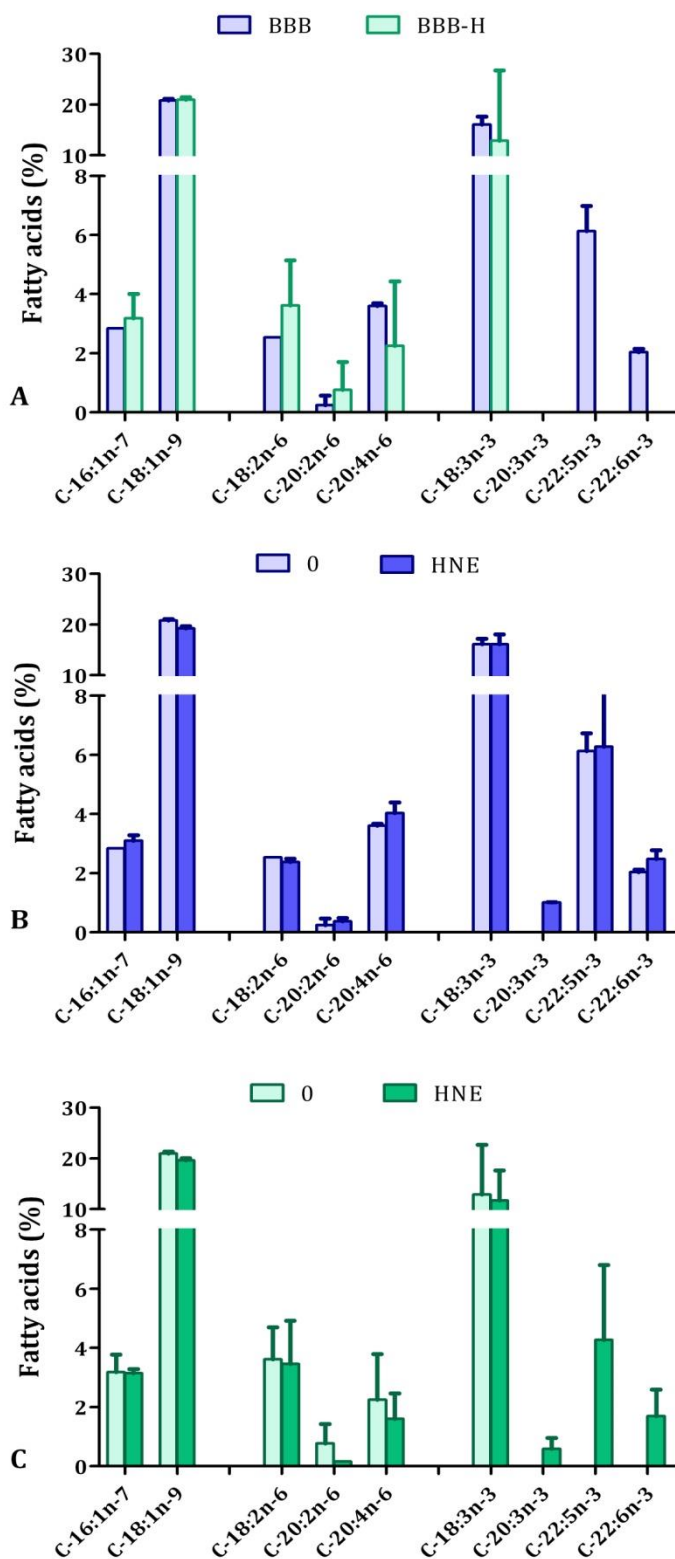
Međutim, ako se поближе pogleda sastav PUFA u oba BBB modela, vidljivo je da je modifikacija kolagena HNE-om (na kojoj je razvijen model BBB-H) uzrokovala promjene u sastavu PUFA endotelne stanice (Slika 24A), koje su mogle rezultirati konačnim povećanjem SFA. Endotelne stanice modela BBB-H imaju blago povišenu razinu LA te sniženu razinu AA u odnosu na stanice modela BBB. Također, u modelu BBB-H uopće nisu detektirani metaboliti ALA-e, što upućuje na moguću blokadu metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina. Zajedno s činjenicom da nije došlo do većeg porasta u količini  $\omega$ -6 PUFA, ovi rezultati objašnjavaju smanjenu razinu ukupnih PUFA u modelu BBB-H u odnosu na model BBB. Najveći udio MUFA i PUFA u oba BBB modela čine OA i ALA. U modelu BBB, udjelu PUFA pridonosi i veća količina DPA.

Iako sam tretman HNE-om nije dalje mijenjao odnose SFA i PUFA, utjecao je na metabolizam  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina, te promijenio njihove količine u odnosu na netretirane modele BBB-a.

Tako je HNE u modelu BBB (Slika 24B) uzrokovao porast  $\omega$ -6 masnih kiselina: EDA-e za čak 53% te AA za 12%. Istovremeno je u slučaju  $\omega$ -3 masnih kiselina uzrokovao pojavu ETE i porast DHA od 22%. Uočen je i blagi porast POA-e te blagi pad OA-e uslijed tretmana HNE-om.

U modelu BBB-H (Slika 24C), HNE je uzrokovao pad  $\omega$ -6 masnih kiselina i to posebice EDA-e za čak 79% te AA za 29% u odnosu na netretirani model BBB-H. S druge strane, HNE je doveo do iznimno velikog porasta količine  $\omega$ -3 masnih kiselina u odnosu na netretirani model BBB-H. Razlog tome je pojava  $\omega$ -3 masnih kiselina (ETE, DPA i DHA) koje su metaboliti ALA-e. Međutim, nije uočen pad ALA-e uslijed tretmana HNE-om, koji bi se očekivao kao reakcija pojave metabolita ALA-e.



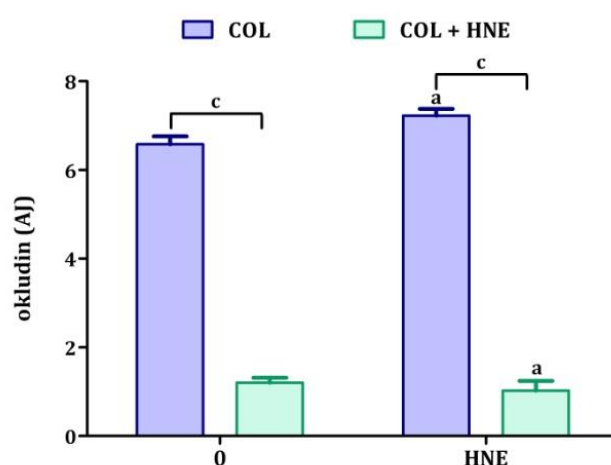


Slika 24. Razlike u sastavu pojedinih MUFA i PUFA u endotelnim stanicama: između dva modela – BBB i BBB-H (A); u modelu BBB uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu$ M (B); u modelu BBB-H uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu$ M (C).

#### 4.4.6. Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a

U svrhu razotkrivanja utjecaja TJ-a i potencijalnih promjena u njihovoj građi, praćena je razina okludina isključivo u endotelnim stanicama, jer je riječ o građevnom proteinu TJ-a koji čine vezu između dviju endotelnih stanica.

Kapljičnom analizom proteina praćene su promjene u razini okludina u endotelnim stanicama modela BBB i BBB-H uslijed tretmana HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$  (Slika 25). Model BBB-H ima drastično niže razine okludina u endotelnim stanicama nego model BBB. Tretman HNE-om uzrokuje blagi porast razine okludina u endotelnim stanicama modela BBB, dok u istim stanicama modela BBB-H uzrokuje pad razine okludina.



Slika 25. Promjene u okludinu endotelnih stanica – RbE4 u modelima BBB i BBB-H uslijed tretmana HNE-om prikazane u arbitrarnim jedinicama (AJ).

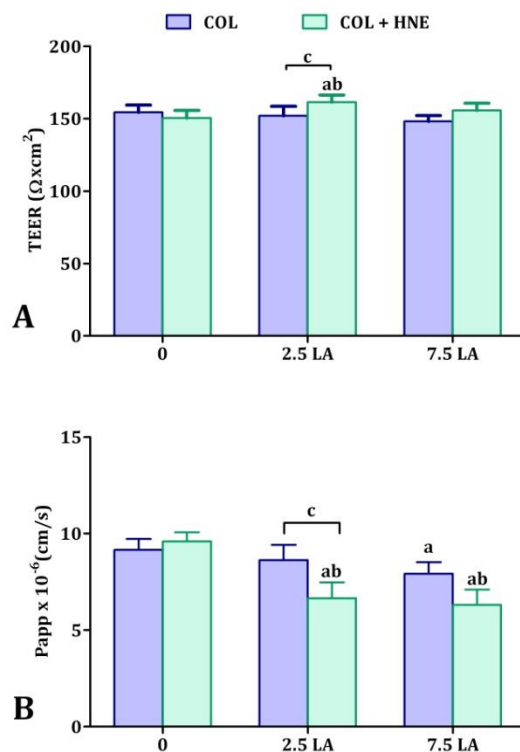
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.01$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.0001$ .

#### 4.5. Učinci micela LA na BBB

Ispitan je utjecaj micela LA prethodno odabranih koncentracija (2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ ) na svojstva i funkciju modela BBB i modela BBB-H. Uslijed tretmana pratio se utjecaj na integritet i propusnost dvaju modela, antioksidacijske parametre građevnih stanica modela te lipidni profil i promjene u razini okludina endotelnih stanica modela BBB i BBB-H.

##### 4.5.1. Integritet i propusnost BBB-a

Micela LA nisu imale značajnog utjecaja na integritet modela BBB-a neovisno o podlozi na kojoj su modeli razvijani (Slika 26). Razina TEER-a, kao mjere integriteta BBB-a, ostaje stalna kod modela BBB unatoč tretmanima, dok je kod modela BBB-H blago povišena uslijed tretmana micelama LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  (Slika 26A).



Slika 26. Promjene u integritetu oba modela BBB-a mjerene kao TEER (A) i propusnost za natrijev fluorescein (B) uslijed tretmana micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

Objke koncentracije LA u micelama uzrokovale su smanjenje propusnosti oba BBB modela (Slika 26B). Međutim, kod modela BBB, značajno smanjenje propusnosti uzrokovale su micelle s većom koncentracijom LA (7.5  $\mu\text{M}$ ). Kod modela BBB-H, objke koncentracije LA uzrokovale su značajno smanjenje propusnosti BBB-a. Dok je tretman HNE-om na modelu BBB-H uzrokovao smanjenje propusnosti za 18%, micelle LA uzrokovale su još intenzivnije smanjenje propusnosti. Tako su micelle LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  uzrokovale smanjenje propusnosti za 27%, dok su micelle s većom koncentracijom LA smanjile propusnost modela BBB-H za 31% u odnosu na propusnost netretiranog modela BBB.

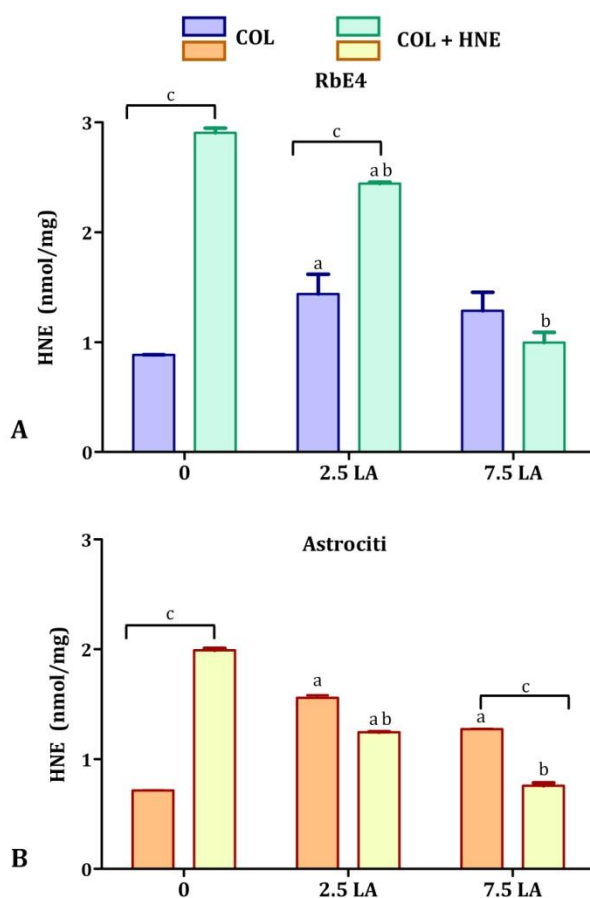
#### **4.5.2. HNE-proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a**

Micelle LA utjecale su na razinu HNE-proteinskih konjugata kako u endotelnim, tako i u stanicama astrocita (Slika 27).

U endotelnim stanicama modela BBB došlo je do podjednagog porasta količine HNE-proteinskih konjugata u oba tretmana (Slika 27A). Isti trend prati i razina HNE-proteinskih konjugata u astrocitima (Slika 27B). Tako je u modelu BBB došlo do gotovo identičnog porasta u razini HNE-proteinskih konjugata kao i u endotelnim stanicama u odnosu na netretirani model BBB.

Međutim, kod endotelnih stanica modela BBB-H tretman micelama LA uzrokovao je pad razine HNE-proteinskih konjugata u odnosu na netretirani model BBB-H (Slika 27A). S porastom koncentracije LA u micelama, pad razine HNE-proteinskih konjugata endotelnih stanica modela BBB-H je bio naglašeniji. Razina HNE-proteinskih konjugata endotelnih stanica modela BBB-H uslijed tretmana micelama LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  i dalje je tri puta veća u odnosu na netretirani model BBB.

Astroцити oba modela BBB-a prate sličan trend razine HNE-proteinskih konjugata kao i endotelne stanice. Tako su tretmani micelama LA uzrokovali rast razine HNE-proteinskih konjugata u astrocitima modela BBB, dok su u astrocitima modela BBB-H uzrokovali pad razine HNE-proteinskih konjugata (Slika 27B). Kao i u endotelnim stanicama, tretman modela BBB micelama LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  uzrokuje veći rast razine HNE-proteinskih konjugata nego tretman micelama više koncentracije LA. Razina HNE-proteinskih konjugata u modelu BBB-H uslijed tretmana micelama s nižom koncentracijom LA još uvijek je viša nego u netretiranom modelu BBB. Tretman micelama više koncentracije LA rezultirao je jednakom razinom HNE-proteinskih konjugata kao i u netretiranom modelu BBB.



Slika 27. Količina HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) nakon izlaganja modela BBB i BBB-H micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M i 7.5  $\mu$ M.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

### 4.5.3. Antioksidacijski status BBB-a

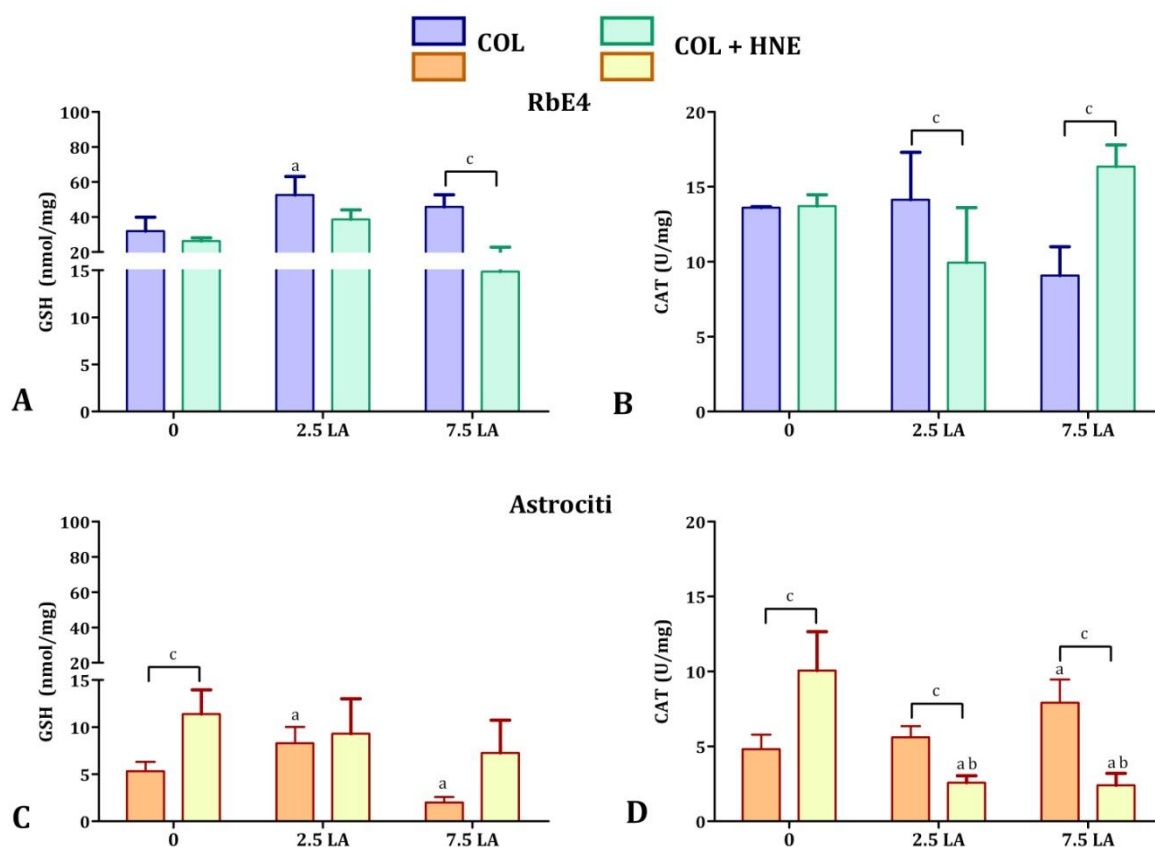
Usljed tretmana micelama LA praćen je antioksidacijski status oba modela BBB-a kroz mjerenje razine GSH i aktivnosti katalaze, te količine proteina Nrf2.

#### 4.5.3.1. Razina GSH i aktivnost katalaze u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a

Razina GSH u endotelnim stanicama raste uslijed tretmana micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M u oba modela BBB-a (Slika 28A). Tretman micelama više koncentracije LA uzrokovao je pad u razini GSH u endotelnim stanicama u oba modela BBB-a.

Tretman micelama LA niže koncentracije uzrokovao je pad aktivnosti katalaze u endotelnim stanicama modela BBB-H, ali nije imao utjecaja na aktivnost katalaze endotelnih stanica modela

BBB (Slika 28B). Istovremeno, micela više koncentracije LA uzrokovale su suprotan učinak. Naime, ovaj tretman je uzrokovao pad aktivnosti katalaze endotelnih stanica modela BBB. S druge strane, aktivnost katalaze u endotelnim stanicama modela BBB-H blago je porasla.



Slika 28. Antioksidacijski status modela BBB i BBB-H uslijed tretmana micelama LA koncentracija 2.5  $\mu$ M i 7.5  $\mu$ M. Prikazane su razine GSH u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (C) te katalaze u stanicama RbE4 (B) i astrocitima (D).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

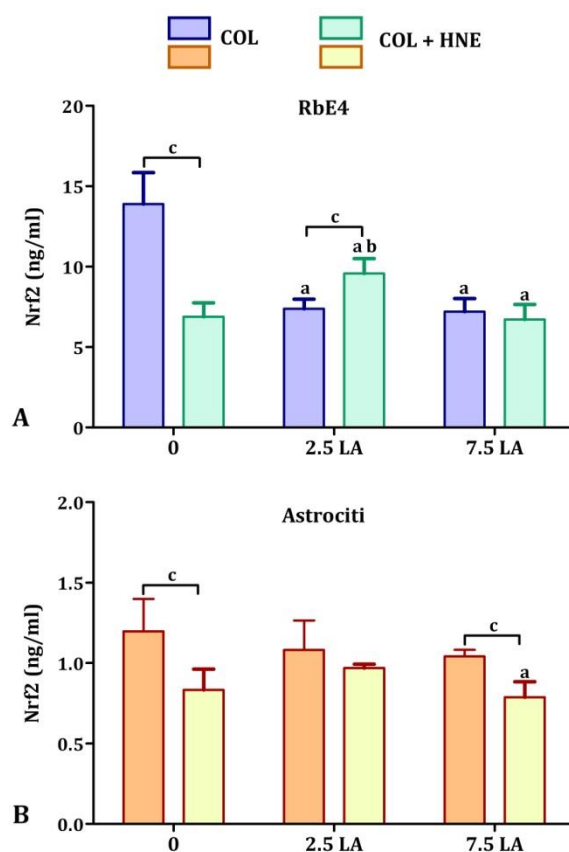
Tretman BBB-a micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M uzrokovao je rast razine GSH u astrocitima modela BBB, dok je tretman micelama LA više koncentracije uzrokovao pad razine GSH u astrocitima istog modela (Slika 28C). U modelu BBB-H, tretmani micelama LA uzrokovali su blagi pad razine GSH u astrocitima.

Tretmani micelama LA imali su suprotan učinak na aktivnost katalaze u astrocitima modela BBB i BBB-H (Slika 28D). Dok su tretmani micelama LA uzrokovali rast aktivnosti katalaze u astrocitima modela BBB, u astrocitima modela BBB-H uzrokovali su pad aktivnosti katalaze.

#### 4.5.3.2. Količina Nrf2 u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a

Tretman micelama LA uzrokovao je pad razine Nrf2 u endotelnim stanicama modela BBB (Slika 29A). U endotelnim stanicama modela BBB-H, tretman micelama koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  uzrokovao je porast razine Nrf2, dok micelle više koncentracije LA nisu uzrokovale promjene u količini Nrf2 ovog modela.

U astrocitima modela BBB dogodio se blagi porast razine Nrf2 uslijed tretmana micelama niže koncentracije LA, dok je tretman micelama više koncentracije LA uzrokovao značajan pad u razini Nrf2 (Slika 29B). U astrocitima modela BBB-H tretmani micelama LA nisu imali učinka na razinu Nrf2.

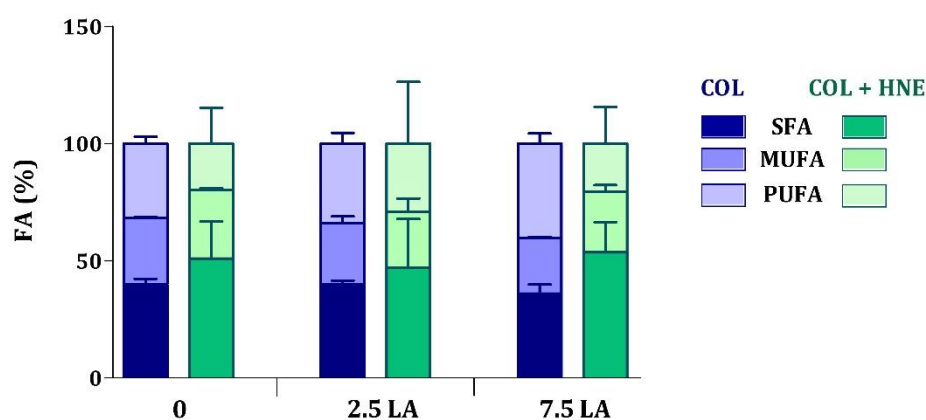


Slika 29. Razina Nrf2 u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) oba modela BBB-a uslijed tretmana micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

#### 4.5.4. Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a

U modelu BBB tretman micelama niže koncentracije LA nije izazvao promjene u lipidnom profilu endotelnih stanica u odnosu na netretirani model BBB. Micele više koncentracije LA uzrokovale su smanjenje količine SFA te porast PUFA u odnosu na netretirani model BBB-a (Slika 30). Detaljnijim uvidom u sastav masnih kiselina uslijed tretmana micelama više koncentracije LA vidljiv je porast u količini AA i DPA modela BBB (Slika 31A). Također je uslijed oba tretmana na modelu BBB zabilježen blagi pad razine OA (8%, odnosno 16% uslijed tretmana micelama više koncentracije LA). Tretmani su uzrokovali porast razine LA u stanicama za 44% uslijed tretmana micelama niže koncentracije LA, odnosno 51% uslijed tretmana micelama s višom koncentracijom LA. Oba tretmana uzrokuju iznimno velik porast EDA-e (od čak 200%). Tretman micelama s višom koncentracijom LA rezultira porastom u AA od 28% u odnosu na netretirani model BBB-a. Uočene su i znatne promjene u sastavu  $\omega$ -3 masnih kiselina uslijed tretmana. I dok tretman micelama s nižom koncentracijom LA uzrokuje blagi pad DPA i DHA, tretman micelama s višom koncentracijom LA dovodi do porasta ove dvije masne kiseline (redom za 59% i 13%) u odnosu na netretirani model BBB-a. Uslijed tretmana micelama LA uočena je pojava ETE, koja u netretiranom modelu uopće nije bila detektirana. Razina ETE uslijed tretmana micelama LA 2.5  $\mu$ M dvostruko je veća nego uslijed tretmana micelama LA 7.5  $\mu$ M.

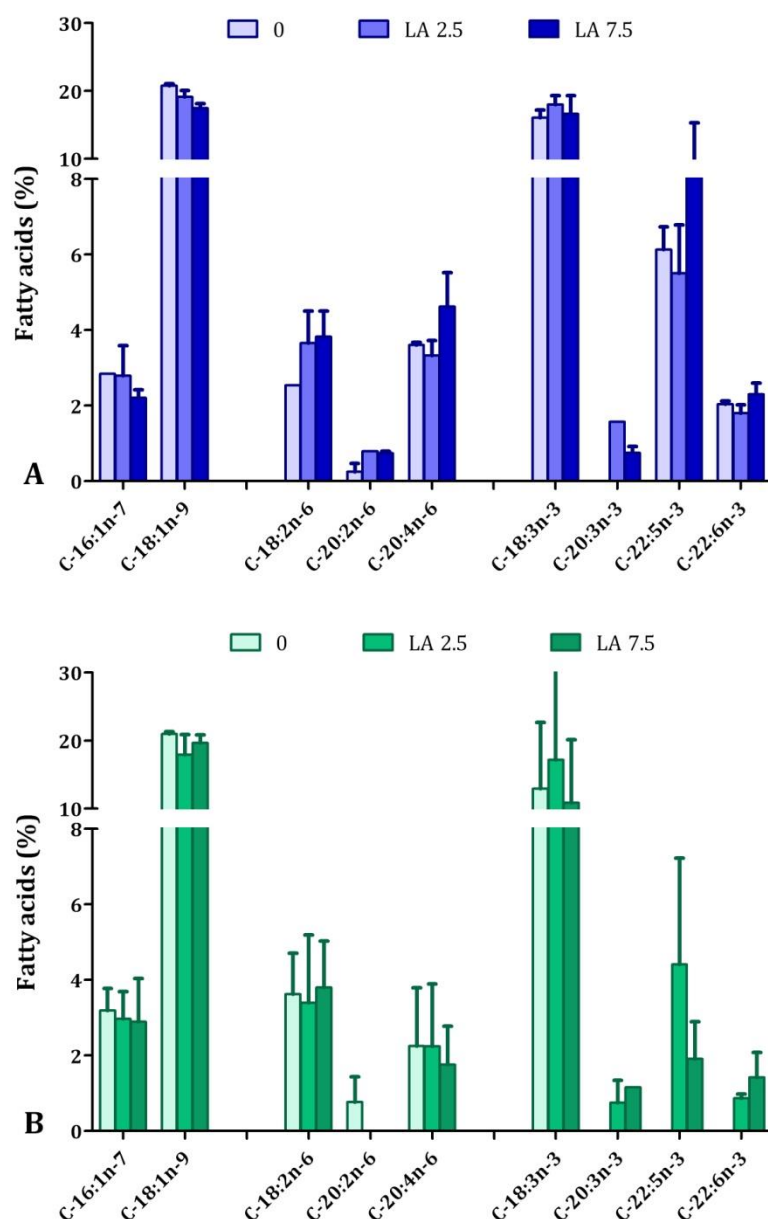


Slika 30. Razlike u sastavu SFA, MUFA i PUFA endotelnih stanica modela BBB i BBB-H uslijed tretmana micelama LA.

Model BBB-H (Slika 31B) prati trend u profilu nezasićenih masnih kiselina modela BBB, međutim zbog početne razlike u sastavu masnih kiselina ova dva netretirana modela, tretmani uzrokuju razlike u metabolizmu masnih kiselina. Tretmani micelama LA ne utječu bitno na količinu MUFA u endotelnim stanicama modela BBB-H.



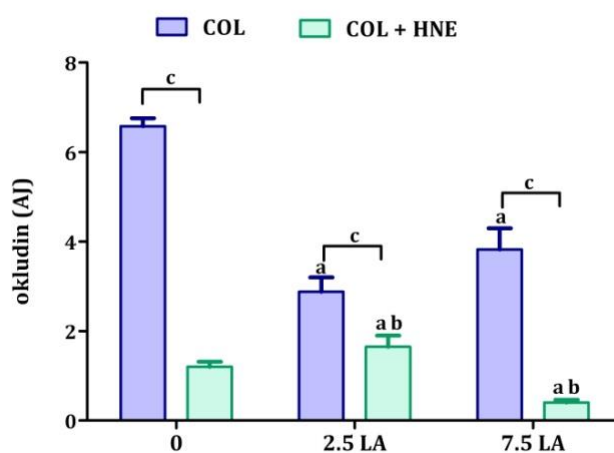
Najveće razlike javljaju se u području  $\omega$ -3 masnih kiselina. Tako tretman micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M uzrokuje porast ALA za 33%, te pojavu ETE, DPA i DHA u odnosu na netretirani model BBB-H. Uz pad AA za 22%, tretman micelama LA koncentracije 7.5  $\mu$ M također uzrokuje najveće promjene u području  $\omega$ -3 masnih kiselina. Uz vidljiv pad ALA-e za 16%, dolazi do intenzivnijeg rasta ETE i DHA te slabijeg rasta DPA u odnosu na tretman niže koncentracije.



Slika 31. Razlike u sastavu pojedinih MUFA i PUFA u endotelnim stanicama modela BBB(A) i BBB-H (B) uslijed tretmana micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M i 7.5  $\mu$ M.

#### 4.5.5. Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a

U endotelnim stanicama modela BBB, micela LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  uzrokuju pad razine okludina, koji potom blago raste uslijed tretmana micelama LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  (Slika 32). Okludin u endotelnim stanicama modela BBB-H blago raste uslijed tretmana micelama LA niže koncentracije, a potom naglo pada uslijed tretmana micelama koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$ .



Slika 32. Promjene u okludinu endotelnih stanica – RbE4 u modelima BBB i BBB-H uslijed tretmana micelama LA prikazane u arbitrarnim jedinicama (AJ).

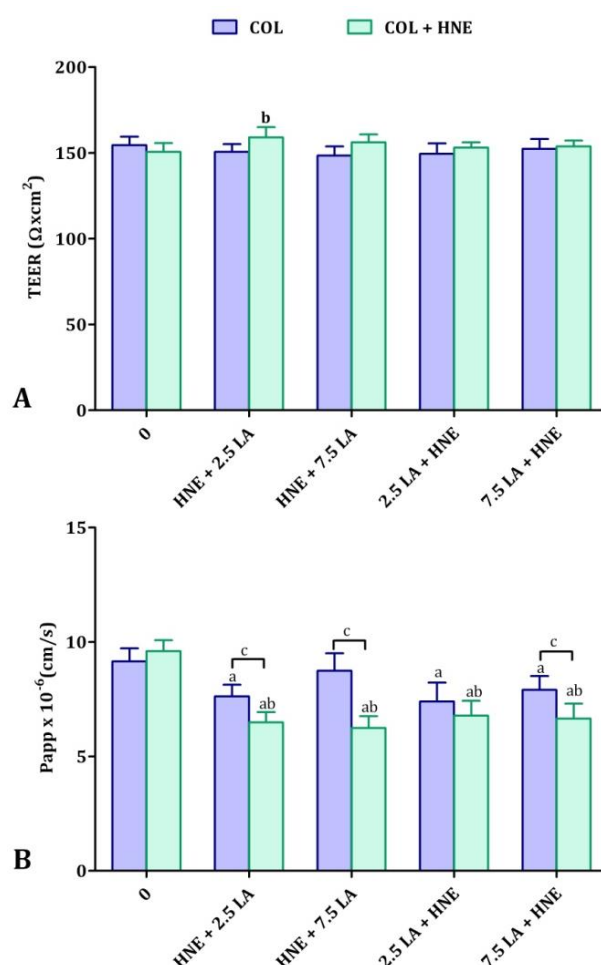
a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.01$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.0001$ .

#### 4.6. Učinci kombiniranog tretmana HNE-a i micela LA na BBB

Oba modela BBB-a izložena su kombiniranim tretmanima HNE-a (20  $\mu\text{M}$ ) i micela LA (2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ ). S time da su ispitani utjecaji tretmana u kojima je izloženost HNE-u prethodila izloženosti micelama LA, te obratno kada su modeli bili izloženi prvo micelama LA, a potom HNE-u.

##### 4.6.1. Integritet i propusnost BBB-a

Tretmani u kojima su micela LA prethodile tretmanu HNE-om nije došlo do promjena u razini TEER-a. Blagi rast razine TEER-a uočen je na modelu BBB-H uslijed kombiniranog tretmana u kojem je HNE prethodio micelama LA (Slika 33A).



Slika 33. Promjene u integritetu oba modela BBB-a mjerene kao TEER (A) i propusnost za natrijev fluorescein (B) uslijed kombiniranih tretmana HNE-om i micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

Za razliku od TEER-a, u propusnosti je ponovno došlo do značajnijih razlika. U modelu BBB, tretmani u kojima su micelle LA prethodile HNE-u, te u tretmanu u kojem je HNE prethodio micelama LA niže koncentracije, uočeno je značajno smanjenje propusnosti (za 15% do 18%).

Svi kombinirani tretmani doveli su do značajnog smanjenja propusnosti modela BBB-H u rasponu od 26% do 32% (Slika 33B). Kako u TEER-u nije bilo značajnijih razlika, za pretpostaviti je da tretmani nisu direktno utjecali na proteine TJ-a, već da je vjerojatnije promjena u lipidnom sastavu dovela do smanjenja propusnosti.

#### **4.6.2. HNE–proteinski konjugati u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a**

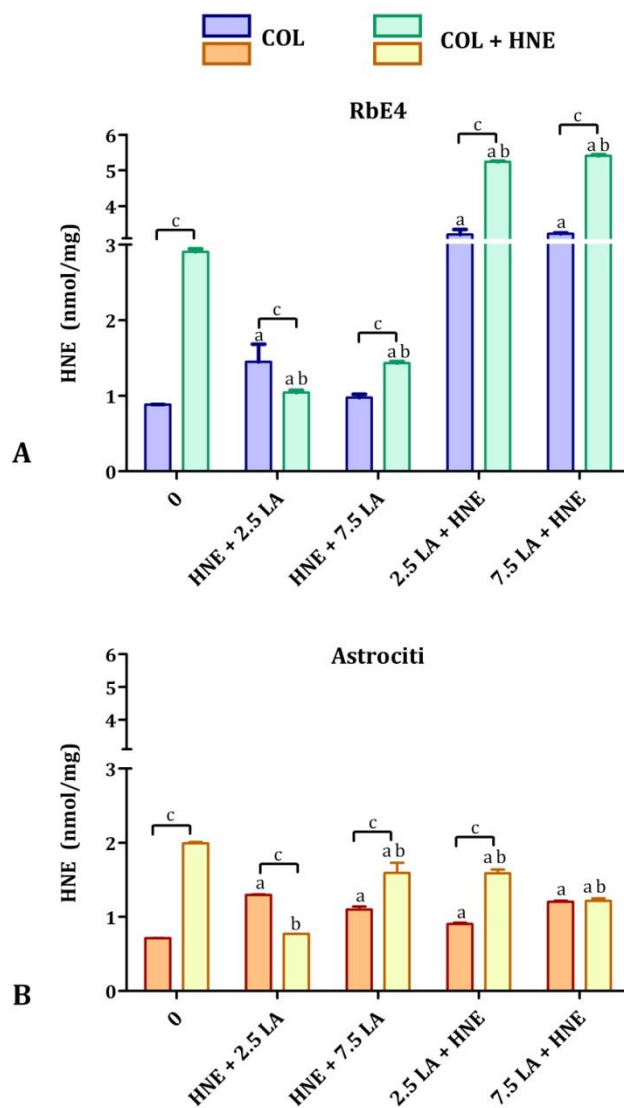
U endotelnim stanicama modela BBB, kombinirani tretman u kojem je HNE prethodio micelama linolne kiseline doveo je do blagog porasta količine HNE–proteinskih konjugata u odnosu na netretirani model (Slika 34A). Veći porast razine HNE–proteinskih konjugata uzrokovao je tretman s micelama niže koncentracije LA.

U slučaju modela BBB-H, unatoč blagom porastu HNE–proteinskih konjugata, uočen je posve suprotan učinak. Kombinirani tretman koji je sadržavao micelle više koncentracije LA uzrokovao je veći porast HNE–proteinskih konjugata.

U astrocitima se javlja gotovo identičan trend u oba BBB modela, sa gotovo jednakim količinama HNE–proteinskih konjugata (Slika 34B).

Kombinirani tretman u kojem su micelle LA prethodile HNE-u imao je posve drugačiji učinak na modele BBB-a. U modelu BBB ovi tretmani su u endotelnim stanicama uzrokovali trostruki porast razine HNE–proteinskih konjugata u odnosu na netretirani model. Gotovo dvostruki porast HNE–proteinskih konjugata uočen je u modelu BBB-H uslijed oba kombinirana tretmana.

I ovi tretmani utjecali su na promjene u količini HNE–proteinskih konjugata u astrocitima. U odnosu na netretirani model, u modelu BBB je uslijed tretmana došlo do porasta HNE–proteinskih konjugata. Isti tretmani su u astrocitima modela BBB-H uzrokovali pad razine HNE–proteinskih konjugata, koji je bio naglašeniji uslijed tretmana micelama više koncentracije LA kojem je uslijedio tretman HNE-om.



Slika 34. Količina HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) nakon izlaganja modela BBB i BBB-H kombiniranim tretmanima HNE-om i micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

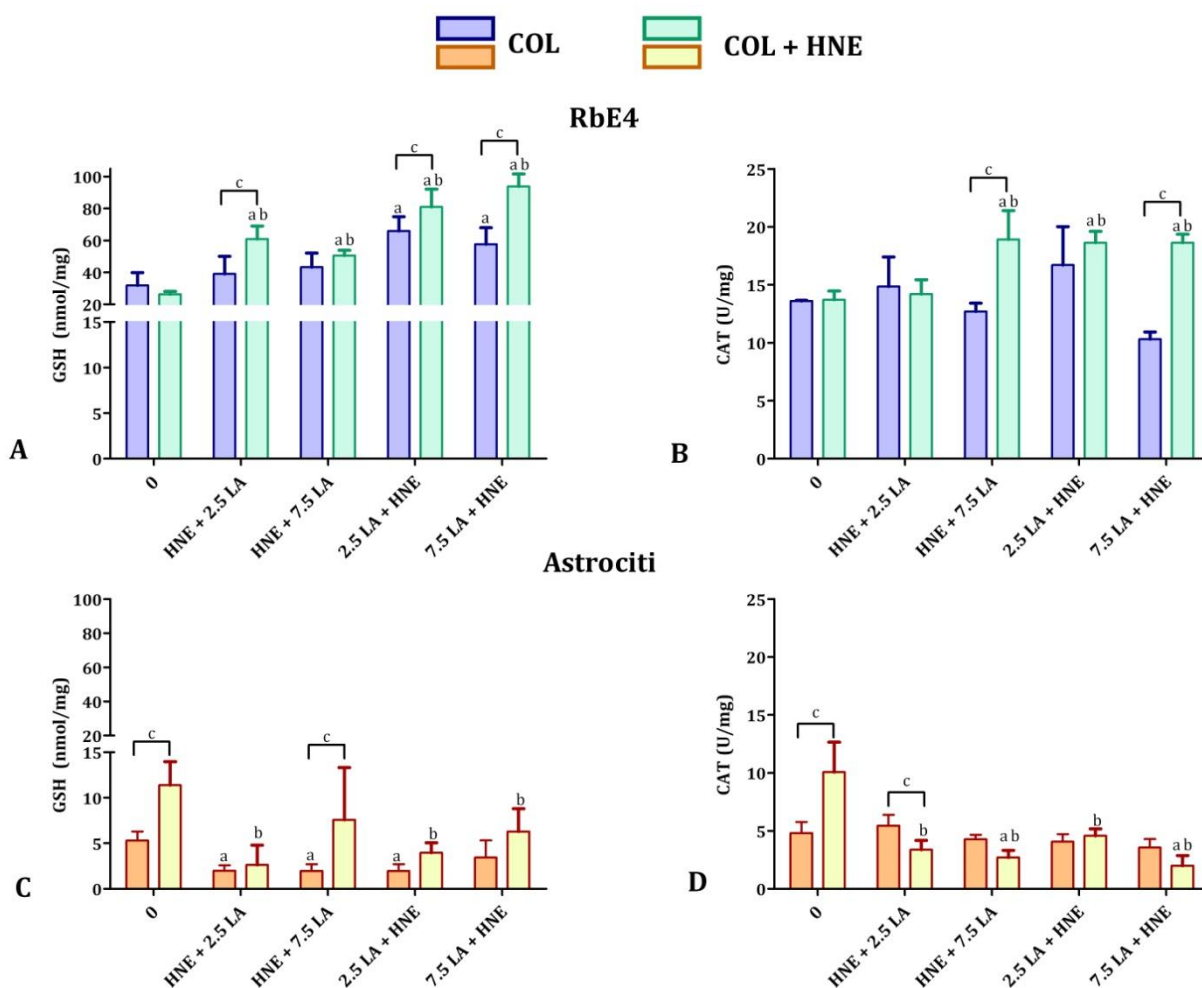
### 4.6.3. Antioksidacijski status BBB-a

#### 4.6.3.1. Razina GSH i aktivnost katalaze u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a

U endotelnim stanicama oba modela BBB-a kombinirani tretmani HNE-a i micela LA uzrokovali su jednake učinke na razinu GSH u ovim stanicama (Slika 35A). Kombinirani tretmani u kojima su micela LA prethodile tretmanu HNE-om, u endotelnim stanicama modela BBB uzrokovali su

značajni porast razine GSH. U endotelnim stanicama modela BBB-H, svi kombinirani tretmani doveli su do značajnog porasta razine GSH, s time da je porast razine GSH naglašeniji u kombiniranim tretmanima u kojima su micela LA prethodile tretmanu HNE-om.

Kombinirani tretmani nisu značajno utjecali na aktivnost katalaze endotelnih stanica modela BBB, ali su uzrokovali značajan porast aktivnosti katalaze u endotelnim stanicama modela BBB-H (Slika 35B). Tako je kombinirani tretman, u kojem je tretman HNE-om prethodio micelama LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$ , uzrokovao značajan porast razine GSH u endotelnim stanicama modela BBB-H. Isti učinak na ove stanice imali su i kombinirani tretmani u kojima su tretmani micelama LA prethodile tretmanu HNE-om.



Slika 35. Antioksidacijski status modela BBB i BBB-H uslijed kombiniranog tretmana HNE-om i micelama LA koncentracija 2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ . Prikazane su razine GSH u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (C) te katalaze u stanicama RbE4 (B) i astrocitima (D).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

Svi kombinirani tretmani, osim onog u kojima su micele LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  prethodile tretmanu HNE-om, doveli su do značajnog pada razine GSH u astrocitima modela BBB (Slika 35C). U astrocitima modela BBB-H, svi kombinirani tretmani doveli su do značajnog pada razine GSH, s time da je ovaj pad bio manje naglašen u kombiniranim tretmanima koji su sadržavali micele LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$ .

Kombinirani tretmani nisu imali učinka na aktivnost katalaze u astrocitima modela BBB (Slika 35D), dok su svi kombinirani tretmani uzrokovali značajan pad aktivnosti katalaze u astrocitima modela BBB-H.

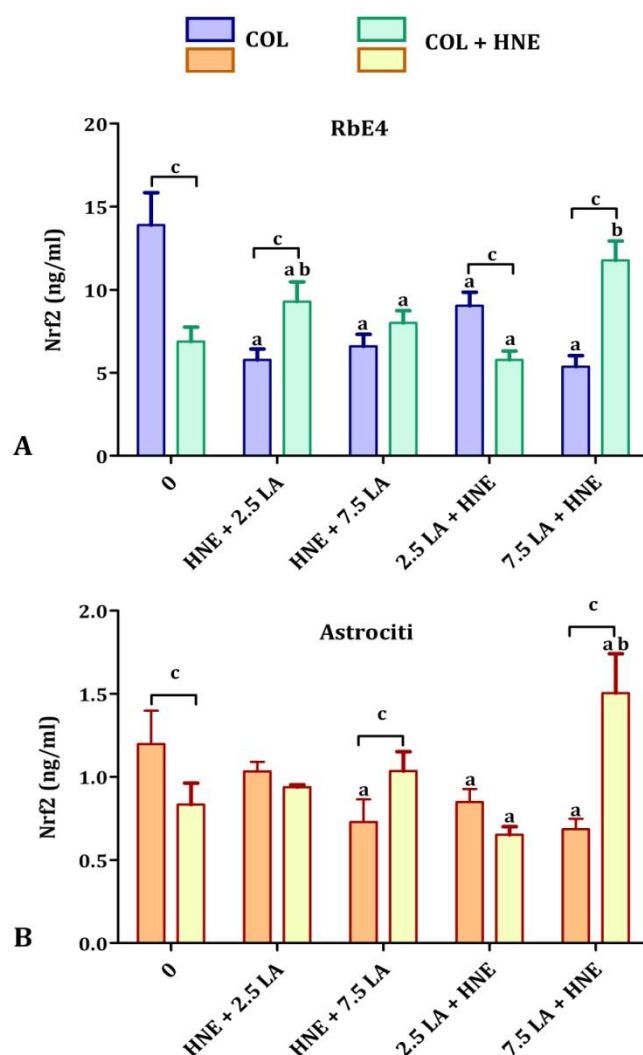
#### **4.6.3.2. Količina Nrf2 u endotelnim stanicama i astrocitima oba modela BBB-a**

Svi kombinirani tretmani su u endotelnim stanicama modela BBB uzrokovali pad razine Nrf2, dok su u endotelnim stanicama modela BBB-H doveli do rasta razine Nrf2 (Slika 36A). U slučaju modela BBB, u endotelnim stanicama blaži pad u razini Nrf2 dogodio se uslijed kombiniranog tretmana u kojem su micele LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  prethodile tretmanu HNE-om.

U modelu BBB-H, veći porast razine Nrf2 u endotelnim stanicama dogodio se uslijed kombiniranog tretmana u kojem je HNE prethodio micelama LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  te kombiniranog tretmana u kojem su micele LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  prethodile tretmanu HNE-om.

Kombinirani tretmani u kojima je HNE prethodio micelama LA, kao i tretman u kojem su micele LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  prethodile tretmanu HNE-om, uzrokovali su rast razine Nrf2 u astrocitima modela BBB (Slika 36B). Kombinirani tretman u kojem su micele LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  prethodile tretmanu HNE-om uzrokovao je pad razine Nrf2 u astrocitima modela BBB.

U astrocitima modela BBB-H, kombinirani tretmani u kojima je HNE prethodio micelama LA, dogodio se koncentracijski ovisan rast Nrf2. Dok kombinirani tretman u kojem su micele LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  nije imao većih učinaka na razinu Nrf2, isti kombinirani tretman s micelama više koncentracije uzrokovao je izniman rast Nrf2.



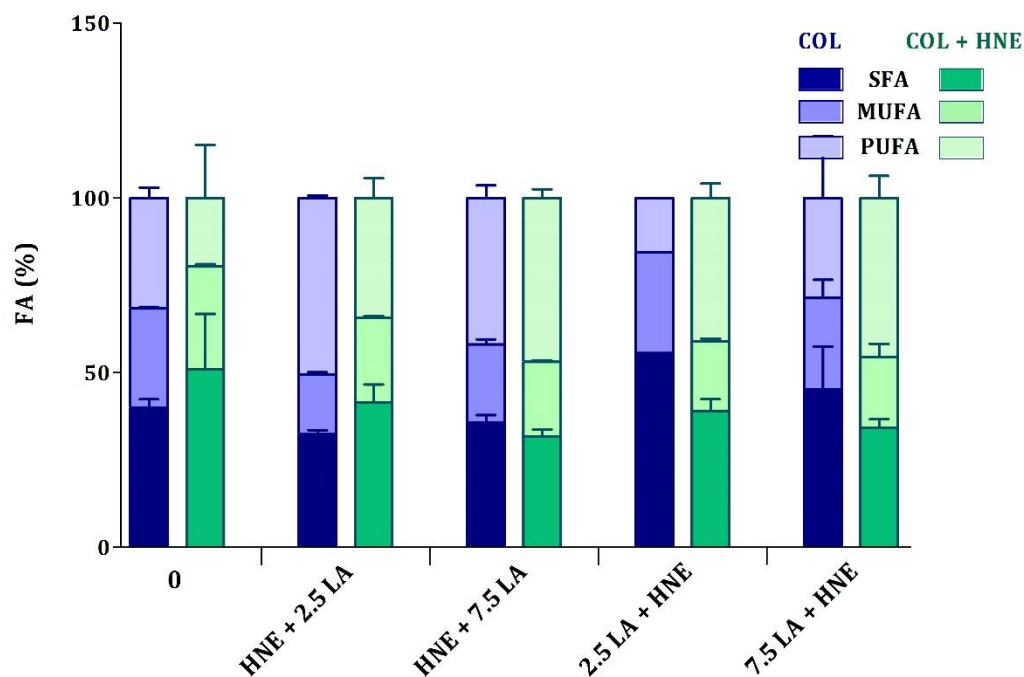
Slika 36. Razina Nrf2 u endotelnim stanicama – RbE4 (A) i astrocitima (B) oba modela BBB-a uslijed kombiniranih tretmana HNE-om i micelama LA.

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.001$ , b – statistički značajno u odnosu na kontrolu na kolagenu (0) s HNE-om uz  $P < 0.001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.001$ .

#### 4.6.4. Lipidni profil endotelnih stanica oba modela BBB-a

Kombinirani tretmani u kojima su micela LA prethodile HNE-u, u endotelnim stanicama modela BBB uzrokovao je porast SFA na račun PUFA. Porast SFA bio je veći uslijed tretmana koji je sadržavao micela LA niže koncentracije. Posve suprotan učinak izazvan je u modelu BBB-H, gdje je uočen pad SFA u korist PUFA. Veći pad SFA dogodio se uslijed tretmana koji je sadržavao micela LA više koncentracije (Slika 37).





Slika 37. Razlike u sastavu SFA, MUFA i PUFA endotelnih stanica modela BBB i BBB-H uslijed kombiniranih tretmana HNE-om i micelama LA.

U slučaju kada je HNE prethodio tretmanima s micelama LA, u modelima BBB i BBB-H, došlo je do pada SFA u korist PUFA. Naglašeniji rast PUFA u modelu BBB uzrokovao je tretman s micelama LA niže koncentracije, dok je u modelu BBB-H isti učinak izazvao tretman koji je uključivao micide LA više koncentracije.

Na razini sastava nezasićenih masnih kiselina, vidljive su velike promjene uzrokovane tretmanima (Slika 38). Radi lakšeg praćenja rezultata i promjena u sastavu nezasićenih masnih kiselina, rezultati su podijeljeni u dva potpoglavlja. Usporedba u sastavu nezasićenih masnih kiselina napravljena je u odnosu na netretirane modele BBB i BBB-H.

#### 4.6.4.1. Kombinirani tretman u kojem HNE prethodi tretmanu micelama LA

Modeli su izloženi HNE-u (20  $\mu\text{M}$ ) tijekom 1h te je stanicama dozvoljen oporavak od 24h nakon kojeg je uslijedio tretman micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ ).

U endotelnim stanicama modela BBB uslijed tretmana koji je sadržavao micide LA niže koncentracije (Slika 38A) uočen je pad MUFA (PAO i OA) i  $\omega$ -6 PUFA te rast  $\omega$ -3 PUFA. Unatoč tome što tretman predstavlja egzogeni izvor LA, uslijed tretmana je zabilježen pad LA uz naznaku pada i razine AA. U području  $\omega$ -3 masnih kiselina, tretman je uzrokovao pojavu ETE-a te rast DPA od 293%, ali nije utjecao na razinu DHA.

Tretman koji je sadržavao micelle LA više koncentracije (7.5  $\mu\text{M}$ ) na modelu BBB uzrokuje pad MUFA uz porast LA i ALA te pojavu ETE.

Endotelne stanice modela BBB-H (Slika 38B) uslijed tretmana koji je sadržavao micelle LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$  također pokazuje blagi pad MUFA. Promjene u području  $\omega$ -6 masnih kiselina ovog modela uključuju blagi pad LA te porast AA za 74%. U ovom modelu također najveći rast doživljavaju  $\omega$ -3 PUFA-e. Tako je uočena tendencija rasta ALA-e te pojava njezinih metabolita ETE, DPA i DHA koje u netretiranom modelu nisu bile detektirane.

Tretman koji je sadržavao micelle LA više koncentracije u modelu BBB-H također uzrokuje pad MUFA, dok u području  $\omega$ -6 masnih kiselina uzrokuje najveće promjene u količini EDA i AA koje se očituju kroz njihov rast. U modelu BBB-H uočen je i porast svih proučavanih  $\omega$ -3 masnih kiselina u odnosu na netretirani model BBB-H, ali i u odnosu na tretman s nižom koncentracijom micela LA (2.5  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.6.4.2. Kombinirani tretman u kojem micelle LA prethode tretmanu HNE-om**

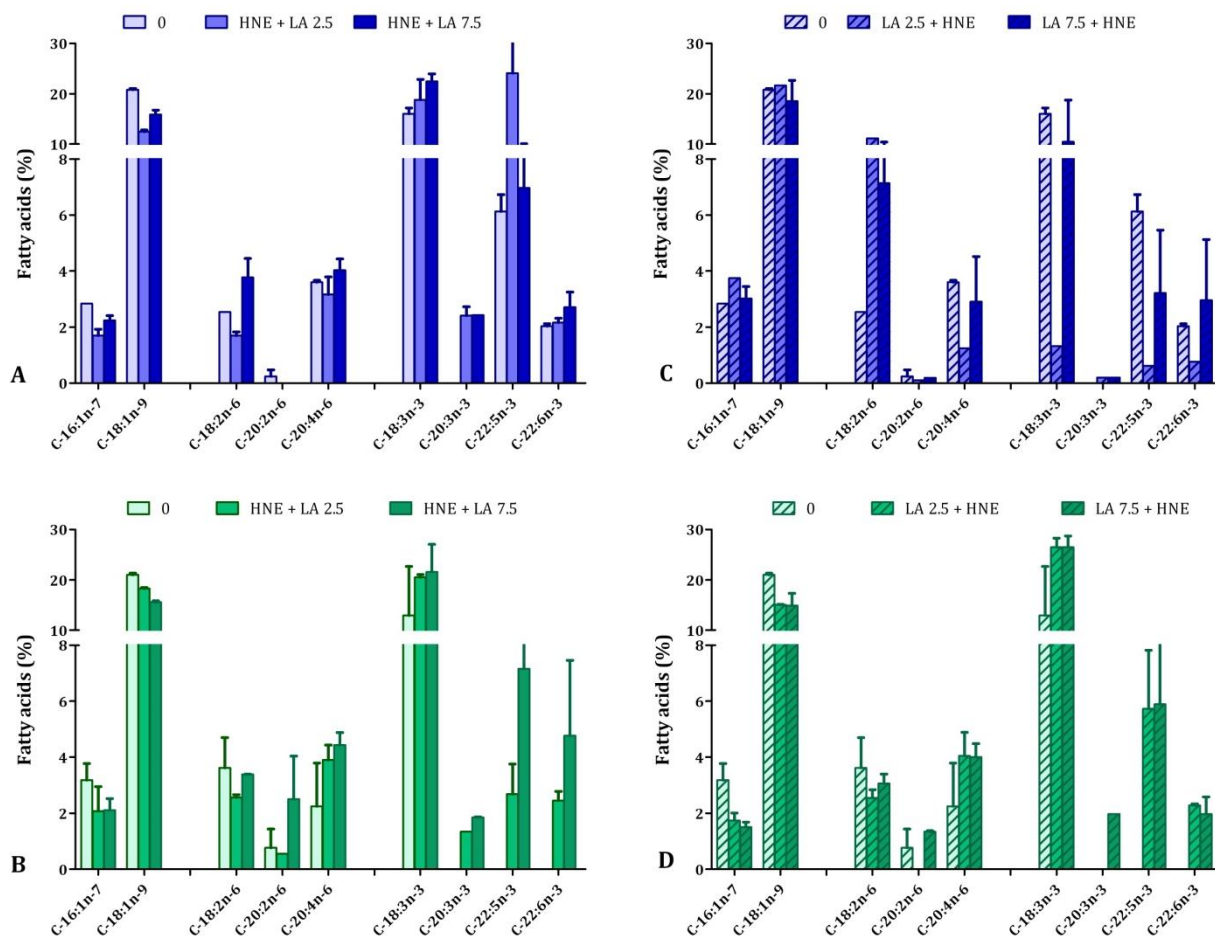
Modeli su izloženi micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$ ) tijekom 2h te je stanicama dozvoljen oporavak od 24h nakon kojeg je uslijedio tretman HNE-om (20  $\mu\text{M}$ ).

Tretman koji je sadržavao micelle LA niže koncentracije (Slika 38C) uzrokovao je porast POA od 32%, te porast LA za 337% u endotelnim stanicama modela BBB. Ujedno je uočen pad  $\omega$ -6 masnih kiselina: EDA za 55%, AA za 65% te pad sljedećih  $\omega$ -3 masnih kiselina: ALA za 92%, DPA za 90% i DHA za 62%.

Potpuno drugačiji učinak na endotelne stanice modela BBB imao je tretman koji je sadržavao micelle LA više koncentracije (Slika 38C). Tako je osim porasta LA od 181%, tretman potaknuo pad ostalih  $\omega$ -6 masnih kiselina i to EDA i AA. Međutim, ovaj tretman gotovo uopće nije utjecao na razinu ALA, ali je uzrokovao pad DPA. Iako je uočen porast DHA, zbog velikog odstupanja rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi koliki je.

Daleko veće promjene dogodile su se u endotelnim stanicama modela BBB-H (Slika 38D). Ovdje je tretman koji je sadržavao micelle LA niže koncentracije uzrokovao pad MUFA i to PAO za 45%, a OA za 28%. Istovremeno uzrokuje pad  $\omega$ -6 masnih kiselina uz iznimku AA koja pokazuje porast od 80%. Još veći porasti zabilježeni su u sastavu  $\omega$ -3 masnih kiselina, gdje ALA raste za 105%, te je uočena pojava DPA i DHA koje u netretiranom modelu BBB-H nisu bile detektirane.

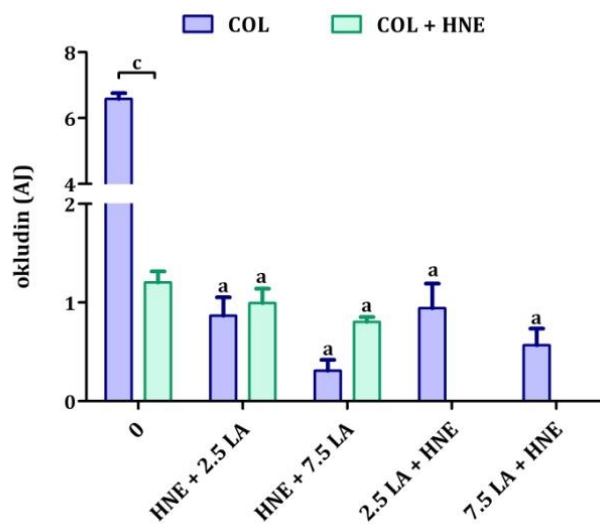
Gotovo identičan trend na modelu BBB-H uzrokovao je i tretman koji je sadržavao micelle LA više koncentracije. Jedina značajna razlika uočena je u pojavi ETE koja dotad nije bila detektirana.



Slika 38. Razlike u sastavu pojedinih MUFA i PUFA u endotelnim stanicama modela BBB (A, C) i BBB-H (B, D) uslijed kombiniranih tretmana u kojima je: tretman micelama LA prethodio tretmanu HNE-om (A, B); tretman HNE-om prethodio tretmanu micelama LA (C, D).

#### 4.6.5. Prisutnost okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB-a

Svi kombinirani tretmani dovode do smanjenja okludina u endotelnim stanicama oba modela BBB (Slika 39). Pad je naglašeniji u endotelnim stanicama modela BBB zbog početno više razine okludina. Također tretmani koji su sadržavali micle LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$  uzrokovali su veće smanjenje okludina. Okludin nije bilo moguće detektirati u endotelnim stanicama modela BBB-H uslijed kombiniranih tretmana u kojima su micle LA prethodile tretmanu HNE-om.



Slika 39. Promjene u okludinu endotelnih stanica – RbE4 u modelima BBB i BBB-H uslijed kombiniranih tretmana HNE-om i micelama LA prikazane u arbitrarnim jedinicama (A).

a – statistički značajno u odnosu na kontrolu (0) na kolagenu uz  $P < 0.0001$ , c – statistički značajno između dviju grupa uz  $P < 0.0001$ .

***RASPRAVA***

## 5. RASPRAVA

Oksidacijski stres uključen je u razvoj i/ili nastanak većine bolesti CNS-a te su produkti lipidne peroksidacije, posebice HNE, prepoznati kao potencijalni biomarkeri ovih bolesti. Osim toga, HNE je prepoznat i kao signalna molekula uključena u modulaciju brojnih putova prijenosa signala unutar stanice. Kako dosada nije opisan utjecaj niskih koncentracija HNE-a na integritet i propusnost BBB-a, bilo u fiziološkim uvjetima kada je BBB intaktna, bilo u patološkim uvjetima kada se pretpostavlja narušenost funkcije BBB-a, javlja se potreba za ovakvim istraživanjima pošto je BBB glavna prepreka dotoku lijekova u mozak. Stoga je u ovoj disertaciji ispitan utjecaj HNE-a na modulaciju propusnosti BBB-a, pri čemu su praćene razlike u antioksidacijskoj zaštiti stanica, razini HNE-proteinskih konjugata i okludina te promjene lipidnog sastava. Sam model BBB-a napravljen je kao kokultura endotelne stanice i astrocita te je prije izlaganja modela bilo kakvim tretmanima bilo potrebno ustanoviti koncentracije aktivnih tvari koje neće utjecati na vijabilnost stanica, a uzrokovat će promjenu svojstava BBB-a.

Testovi vijabilnosti i proliferacije pokazali su razliku u osjetljivosti na tretmane HNE-om ili micelama LA astrocita i endotelne stanice ukazujući na povećanu osjetljivost astrocita. Naime, HNE u rasponu koncentracija 1–100  $\mu\text{M}$  nije imao negativnog učinka na vijabilnost endotelne stanice već su sve koncentracije HNE-a dovele do stimulacije mitohondrijske aktivnosti ovih stanica. Međutim, test proliferacije je pokazao da HNE u koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  i višima smanjuje proliferaciju endotelne stanice. Istovremeno, na astrocitima je ova koncentracija HNE-a (40  $\mu\text{M}$ ) uzrokovala pad vijabilnosti stanice, dok su niže koncentracije (10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ ) već uzrokovale smanjenje proliferacije od 20 do 50%. Micele LA, s druge strane, u koncentracijama 5  $\mu\text{M}$  i 7.5  $\mu\text{M}$  uzrokovale su porast proliferacije endotelne stanice, dok su u istim koncentracijama uzrokovale pad proliferacije astrocita. Pad vijabilnosti endotelne stanice bio je uzrokovan tek micelama LA koncentracije 20  $\mu\text{M}$ , dok su isti učinak na astrocitima postizale micle koncentracije 10  $\mu\text{M}$ . Rezultati mjerenja razine ROS-a uslijed tretmana HNE-om i micelama LA također su pokazali različit odgovor dviju vrsta stanica. Dok je HNE u rasponu koncentracija 10 – 40  $\mu\text{M}$  u endotelnim stanicama uzrokovao trenutni pad razine ROS-a, u astrocitima je rezultirao gotovo dvostrukim porastom razine ROS-a. Iako su tretmani micelama LA uzrokovali koncentracijski ovisan rast razine ROS-a u obje vrste stanica, naglašeniji rast bio je uočten u astrocitima. Daljnja istraživanja pokazala su da astrociti imaju bitno nižu razinu antioksidacijske zaštite, koja uključuje nižu razinu proteina Nrf2 i GSH te aktivnosti katalaze u odnosu na endotelne stanice. Zbog smanjene antioksidacijske zaštite, a povećane produkcije ROS-a koju su izazivali tretmani HNE-om i micelama LA, astrociti su bili osjetljiviji na ove tretmane od endotelne stanice, kod kojih su tretmani uzrokovali porast mitohondrijske aktivnosti kao mjere vijabilnosti. Zbog velike heterogenosti u porijeklu astrocita i endotelne stanice koje se koriste u istraživanjima, ali i malobrojnim radovima gotovo je nemoguće uspoređivati rezultate. Međutim, pokazano je da HNE (50  $\mu\text{M}$ ) na astrocitima izoliranim iz glave optičkog živca ima sličan učinak kao u ovoj disertaciji – pad vijabilnosti stanice i pad GSH [106].

Nažalost, u radu nije opisan utjecaj na proliferacijsku sposobnost astrocita. S druge strane, prema dostupnoj literaturi, endotelne stanice su se pokazale osjetljivijima na HNE od astrocita, jer je u istoj koncentraciji (50  $\mu$ M) HNE uzrokovao gotovo 100% smrtnost [107]. Veća osjetljivost endotelnih stanica pokazana je i u slučaju izloženosti izvorima kratkotrajnog oksidacijskog stresa [108]. Iako su navedena istraživanja u suprotnosti s ovdje opisanim rezultatima, sami autori objašnjavaju da moguće razlike u odgovoru endotelnih stanica na stresore proizlaze iz vrste i porijekla endotelnih stanica [108]. Moguće objašnjenje ove razlike proizlazi i iz činjenice da su Bresgen i sur. radili na primarnim kulturama endotelnih stanica [108], a u ovoj disertaciji je korištena stanična linija endotelnih stanica.

Zanimljivo je da je tretman HNE-om uzrokovao trenutni koncentracijski ovisan pad razine ROS-a u endotelnim stanicama, ali je svejedno uzrokovao lipidnu peroksidaciju. Moguće objašnjenje pada razine ROS-a dolazi od sposobnosti HNE-a da kovalentno modificira mitohondrijske proteine razdvajanja (UCP – engl. Uncoupling protein) [109]. Naime, ova modifikacija UCP-a uzrokuje curenje protona natrag u mitohondrij što rezultira smanjenjem elektrokemijskog gradijenta i vodi do povećanja iskorištenja kisika [109,110]. Ovi učinci smanjuju stvaranje mitohondrijskog ROS-a. Ulogu HNE-a u modulaciji razine ROS-a putem UCP-a u endotelnim stanicama RbE4 trebalo bi pobliže istražiti.

Razina HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama je koncentracijski ovisno rasla s tretmanom, no očitane razine nakon 24h odgovarale su količinama HNE-a u tretmanima te se početno smatralo da HNE ne uzrokuje lipidnu peroksidaciju u ovim stanicama. No, razine lipidnih hidroperoksida mjerene 1h, 3h i 24h od tretmana HNE-om pokazale su suprotno. Tri sata od tretmana HNE-om dolazi do porasta lipidnih hidroperoksida i pada razine HNE–proteinskih konjugata u stanicama. Ovi rezultati su u skladu s dosada poznatim učincima HNE-a na endotelne stanice. Naime, istraživanja pokazuju da endotelne i stanice vaskularnog glatkog mišića iznimno brzo metaboliziraju HNE [111–113]. Tako humane endotelne stanice izložene HNE-u koncentracije 5  $\mu$ M nakon 30 minuta metaboliziraju 95% HNE-a [111], endotelne stanice aorte goveda izložene 25  $\mu$ M HNE-u dosežu vrhunac razine HNE–proteinskih konjugata unutar 4h koji naglo pada 6h od izlaganja [113]. Rast razine lipidnih hidroperoksida upućuje na aktivaciju lipidne peroksidacije, koju 24h kasnije prati i rast razine HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama. Lipidnu peroksidaciju uglavnom uzrokuje hidroksilni radikal, jer jedini od ROS-a ima dovoljno energije za pokretanje ove reakcije [114]. Kako u endotelnim stanicama tretman HNE-om nije izazvao porast ROS-a, a detektirana je lipidna peroksidacija, moguće je da su je potaknuli neki drugi radikali koji također imaju sposobnost aktivacije lipidne peroksidacije kao karbonatni radikal i dušikov dioksid [42]. Međutim, zasada ne postoji pouzdana metoda koja bi mjerila ova dva radikala.

Zbog prikazane izrazite otpornosti endotelnih stanica na HNE, prva ispitivanja učinaka HNE-a na BBB-u koristila su ga u koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  koja je uzrokovala trenutno povećanje propusnosti BBB-a [54]. U ovoj koncentraciji, HNE uzrokuje 30% smanjenje proliferacijske sposobnosti endotelnih stanica i 100% smrtnost astrocita. Kako su astrociti stanice koje aktivno sudjeluju u obrani CNS-a i mogu lučiti brojne citokine i faktore rasta, kao i endotelne stanice [115–119] te je pokazano da uslijed tretmana HNE-om aktiviraju NF $\kappa$ B signalni put [106], očekivalo se da će izlaganje BBB-a rasponu koncentracija HNE-a (50 – 100  $\mu\text{M}$ ) dovesti do stvaranja proupalnih citokina i faktora rasta. Stoga su mjerene razine IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CINC-2 $\alpha\beta$  i VEGF-a. Rezultati su pokazali da ove visoke koncentracije HNE-a ne potiču stanice BBB-a na lučenje proupalnih citokina, već naprotiv, uzrokuju nagli pad CINC-2 $\alpha\beta$  – kemoatraktanta neutrofila te upućuju na potencijalnu ulogu HNE-a u suzbijanju upale. U prilog ovom rezultatu ide i činjenica da HNE vezanjem na plazmalogen (glavni izvor AA) smanjuje aktivnost fosfolipaze A<sub>2</sub>, koja oslobađa AA iz plazmalogena, čime posljedično smanjuje razinu proupalnih metabolita AA-e i sudjeluje u regulaciji upalnih procesa [44]. Nagli porast VEGF-a pri koncentraciji HNE-a 150  $\mu\text{M}$ , najvjerojatnije je obrambeni mehanizam i odgovor na smanjenje proliferacije endotelnih stanica.

S obzirom da je cilj ove disertacije razjasniti ulogu HNE-a u modulaciji propusnosti BBB-a, zanimalo nas je kakve će učinke na BBB imati niže, netoksične koncentracije HNE-a (10 – 40  $\mu\text{M}$ ). Vaskularni endotel sačinjavaju endotelne stanice i proteini izvanstaničnog matriksa koji zajedno sudjeluju u regulaciji propusnosti endotelne barijere [120]. Istraživanja su pokazala da sam izvanstanični matriks doprinosi 50% vrijednosti TEER-a te je u ispitivanja svojstava propusnosti endotela nužno uključiti i svojstva izvanstaničnog matriksa [120]. Glavne građevne jedinice izvanstaničnog matriksa su kolagen, fibronektin, entaktin, hondroitin sulfat, perlekan i sindekan. Kolagen pritom služi kao sidrište svih ostalih proteina u izgradnji visoko elastične bazalne membrane. Osim što luče sve komponente izvanstaničnog matriksa, endotelne stanice imaju sposobnost njegove neprekidne remodelacije [120,121]. Interakcija izvanstaničnog matriksa s integrinima na površini endotelnih stanica inhibira proliferaciju i migraciju stanica, ali stimulira adheziju između samih endotelnih stanica, te endotelnih stanica i izvanstaničnog matriksa. Ove interakcije ključne su u formaciji intaktne endotelne barijere [121]. Kako su brojna istraživanja pokazala prisutnost HNE-a u obliku HNE–proteinskih konjugata u neuronalnim stanicama i parenhimu u raznim stadijima većine bolesti CNS-a [25,122], ali isto tako i naglasila ulogu lipida i promjene do kojih dolazi uslijed ovih bolesti [38,123], razvijena su dva modela BBB-a. Model BBB koji predstavlja BBB u fiziološkim uvjetima, te model BBB-H koji predstavlja BBB u patološkim uvjetima, kada je HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu.

Iako oba modela BBB-a (BBB i BBB-H) imaju vrlo slične vrijednosti TEER-a i propusnosti što ukazuje na jednak integritet, opažene su značajne promjene u lipidnom profilu endotelnih stanica, ali i antioksidacijskoj zaštiti kako endotelnih stanica tako i astrocita modela BBB-H u odnosu na

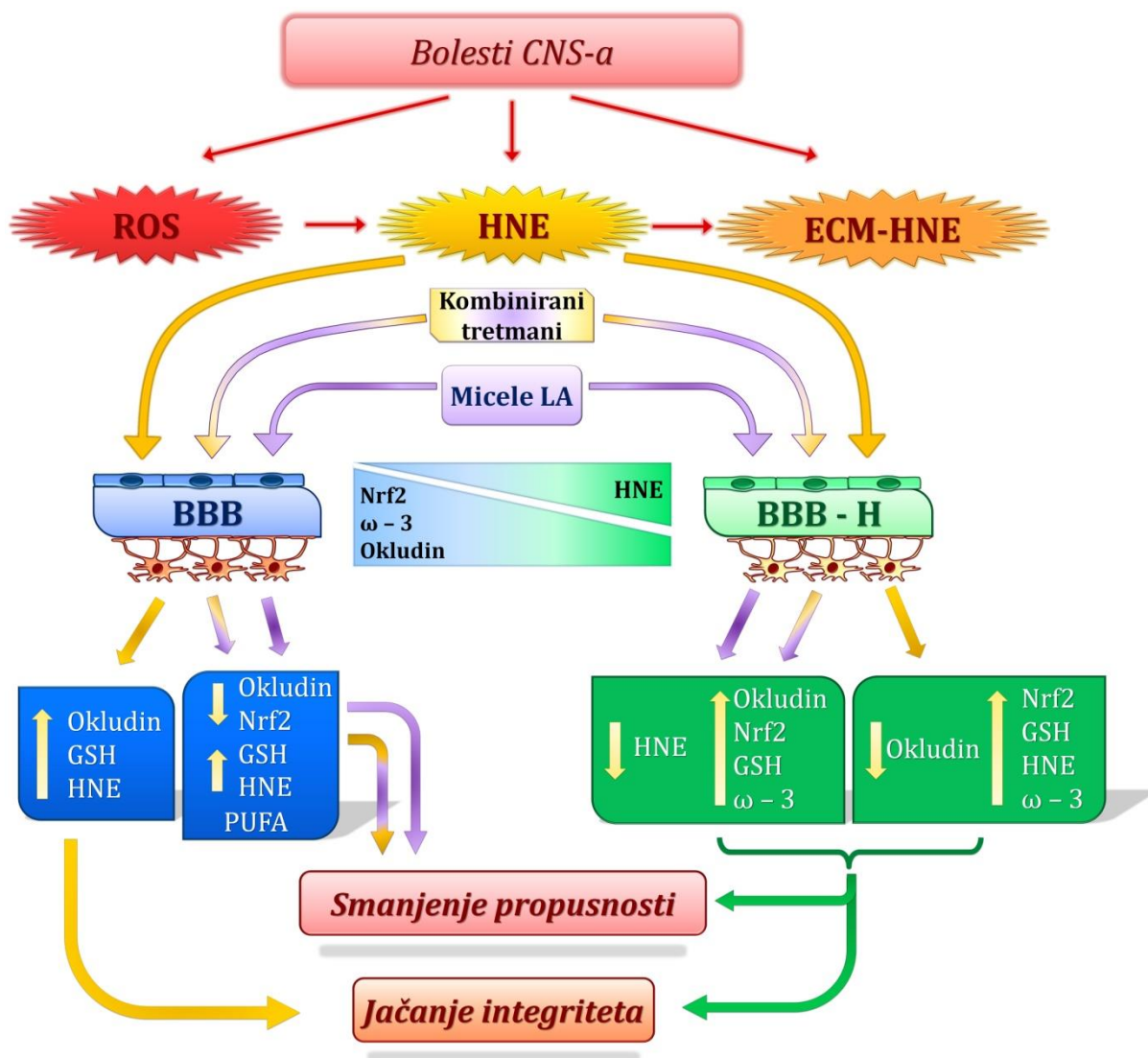


stanice modela BBB (Slika 40). Također je ustanovljena čak 6 puta manja razina okludina u endotelnim stanicama modela BBB-H nego u modelu BBB. Mogući razlog niže razine okludina u modelu BBB-H je supresija transkripcije i translacije okludina koja može biti uzrokovana aktivacijom p38 MAPK/NF- $\kappa$ B puta potaknutog aktivacijom receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. Epidermal growth factor receptor) [124]. U radu Chena i sur. EGFR je bio aktiviran djelovanjem metaloproteinaze 9, enzima izvanstaničnog matriksa [124], a poznato je da autofosforilaciju te time i aktivaciju ovog receptora uzrokuje i HNE [125]. Međutim, smanjena količina okludina u modelu BBB-H nije utjecala na integritet ovog modela. Iako je bitna sastavnica TJ-a koja utječe na funkciju BBB-a, pokazano je da prisutnost okludina nije nužna za normalno funkcioniranje BBB-a te da njegovu ulogu mogu preuzeti i drugi proteini TJ-a [31]. Da HNE vezan na proteine izvanstaničnog matriksa može utjecati i na adhezijske molekule potvrđuju preliminarna istraživanja Xua i sur. koja su pokazala da HNE vezan na fibronektin mijenja ekspresiju površinskih integrina, adhezijskih molekula i receptora VEGF-a [126].

Neovisno o tome što membrana difuzijske komorice fizički dijeli astrocite od kolagena modificiranog HNE-om u modelu BBB-H, uočene su promjene i u njihovom antioksidacijskom statusu i količini HNE–proteinskih konjugata. Očekivano, ove promjene dogodile su se i u endotelnim stanicama koje su bile u direktnom kontaktu s modificiranim kolagenom. U oba tipa stanica promjene su uključivale porast razine HNE–proteinskih konjugata i pad razine Nrf2. Kako na regulaciju Nrf2 utječu i adhezijske molekule, moguće je da HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu uzrokuje promjene u proteinima TJ-a i AJ-a endotelnih stanica koje utječu na razinu Nrf2 [126,127]. Naime, pokazano je da proteini AJ-a, E-kadherin i  $\beta$ -katenin stvaraju kompleks s proteinima Keap-1 i Nrf2 koji doprinosi ubikvitinaciji Nrf2 i sprječava njegovu translokaciju u jezgru te aktivaciju ARE-a [127]. Na ovaj način proteini AJ-a negativno reguliraju razinu Nrf2 što bi u ovom slučaju moglo objasniti pad razine Nrf2. Međutim, zanimljivo je da su u astrocitima porasle razina GSH i aktivnosti katalaze. Astrociti uz mikrogliju sudjeluju u aktivnoj obrani CNS-a od oksidacijskog stresa i imaju više razine enzima uključenih u sintezu GSH nego neuroni zbog čega ga efikasnije stvaraju i otpuštaju u izvanstanični prostor uslijed stimulacije [128]. Osim toga, GSH je glavni i najučinkovitiji sustav obrane od HNE-a [57] te je porast GSH u astrocitima vjerojatno posljedica prisutnosti HNE-a na kolagenu.

Promjene u lipidnom profilu modela BBB-H uključivale su porast SFA i pad PUFA u odnosu na model BBB, posebice  $\omega$ -3 masnih kiselina čiji metabolizam je u modelu BBB-H u potpunosti bio blokiran. Porast zasićenosti membrana čini ih rigidnijima zbog pravilnijeg slaganja fosfolipidnog dvosloja što može utjecati i na funkciju i strukturu proteina uklopljenih u membrane [43]. Osim toga, pokazano je da HNE (50  $\mu$ M) u endotelnim stanicama aorte goveda uzrokuje fosforilaciju tirozina koja je odgovorna za aktivaciju fosfolipaze D [129], čija aktivacija se prepoznaje kao okidač za stvaranje unutarstaničnih lipidnih glasnika odgovornih za reorganizaciju citoskeleta, membranski transport i prijenos signala unutar stanice [130]. Tako je HNE prisutan u

izvanstaničnom matriksu (model BBB-H) mogao uzrokovati aktivaciju fosfolipaze D i potaknuti promjene koje su rezultirale razlikama u ova dva modela. Uz to, prekomjerna ekspresija fosfolipaze D ključna je u razvoju neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest [130], a u kojima je dokazana prisutnost HNE–proteinskih konjugata.



Slika 40. Sažeti shematski prikaz razlike modela BBB i BBB-H, utjecaj tretmana HNE-om, micelama LA i kombiniranih tretmana na integritet i propusnost oba modela te razlike u odgovoru dvaju modela na ove tretmane.

Za model BBB prikazani su tretmani: HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$ ; micelama LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$ ; kombinirani tretman u kojem su micelle LA 2.5  $\mu\text{M}$  prethodile HNE-u.

Za model BBB-H prikazani su tretmani: HNE-om koncentracije 20  $\mu\text{M}$ ; micelama LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$ ; kombinirani tretman u kojem je HNE prethodio micelama LA 2.5  $\mu\text{M}$ .

Osim što je u brojnim bolestima mozga pokazana prisutnost HNE–proteinskih konjugata, ove bolesti izazivaju i sistemski oksidacijski stres koji može dovesti do stvaranja novih količina HNE-a. Stoga su dva modela BBB-a bila izložena tretmanu HNE-om (20  $\mu$ M). U modelima BBB i BBB-H ovaj tretman uzrokovao je jačanje integriteta oba modela kroz porast TEER-a, što je u modelu BBB bilo praćeno porastom okludina (Slika 40). U modelu BBB-H, uz jačanje integriteta, HNE je uzrokovao i smanjenje propusnosti modela, ali i dodatno smanjenje okludina. Samo jačanje integriteta i smanjenje propusnosti uzrokovano HNE-om, u suprotnosti je s dosadašnjim literaturnim opažanjima na mikrovaskularnim endotelnim stanicama pluća goveda, gdje je HNE (25  $\mu$ M) uzrokovao povećanje propusnosti i pad TEER-a nastale barijere [55]. Autori su pokazali da HNE uzrokuje smanjenje GSH, potiče stvaranje HNE–proteinskih konjugata, uzrokuje fosforilaciju tirozina FAK-a, aktivaciju MAPK-a te remodelaciju aktina koja uključuje redistribuciju FAK-a,  $\beta$ -katenina, paksilina i VE-kadherina [55,131]. Uz to, u endotelnim stanicama HNE također smanjuje ekspresiju ICAM-1 (engl. Intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (engl. Vascular adhesion molecule 1) te E-selektina, molekula koje sudjeluju u adheziji leukocita i kontroli upale [132]. Kako su endotelne stanice mozga specifične u svojoj građi i svojstvima kojima uvelike doprinose topivi čimbenici koje luče astrociti, moguće je da iz toga proizlazi i potpuno drugačiji odgovor na koncentracijski slične tretmane HNE-om. Također treba uzeti u obzir i duljinu uzgoja i broj stanica, način, volumen i vremenski interval izlaganja stanica tretmanu te vremenski interval u kojem se prate promjene. Svaki od ovih parametara može utjecati na konačne rezultate.

Uočena razlika dvaju modela u odgovoru na tretman HNE-om rezultat je promjena u endotelnim stanicama i astrocitima u razini HNE–proteinskih konjugata, proteina Nrf2 i GSH koja postoji između ova dva modela. Tako endotelne stanice oba modela bilježe porast HNE–proteinskih konjugata i sukladno tome porast GSH, koji su samo u modelu BBB-H popraćeni porastom razine Nrf2. Mogući razlog porasta Nrf2 samo u endotelnim stanicama modela BBB-H leži u dvostruko nižoj razini Nrf2 ovih stanica u odnosu na model BBB. Naime, zbog početno niže razine Nrf2, stanice će uslijed stresa pokušati aktivirati antioksidacijski obrambeni mehanizmi i podići njegovu razinu. Osim toga, poznato je da je HNE potentni aktivator Nrf2 jer ima sposobnost direktnog vezanja na cisteinske ostatke proteina Keap-1 u veznom mjestu za Nrf2 čime se mijenja konformacija Keap-1 i oslobađa Nrf2 te se omogućuje njegovo vezanje na ARE [133,134]. Protein Nrf2 ima bitnu ulogu u mozgu što potvrđuju istraživanja na knockout miševima (Nrf2<sup>-/-</sup>) čiji neuroni i astrociti su podložniji oksidacijskim oštećenjima, poremećaju homeostaze kalcija i djelovanju mitohondrijskih toksina [135]. Također, Nrf2 je nužan u cijeljenju traumatske ozljede mozga te se smatra važnim terapeutikom u neurodegenerativnim bolestima [136]. Stoga je u uvjetima već postojećeg stresa (model BBB-H, ali i bolesti CNS-a) očekivana aktivacija i rast Nrf2 uslijed novog stresora (HNE), kao obrambena reakcija. U endotelnim stanicama modela BBB aktivirana je tek prva linija antioksidacijske zaštite (rast aktivnosti katalaze i rast GSH) uslijed izlaganja HNE-u te u

promatranom vremenskom intervalu nije bio uočen porast Nrf2, koji se javlja kao druga linija antioksidacijske zaštite ukoliko za to postoji potreba.

U astrocitima je rast razine HNE–proteinskih konjugata bio praćen padom razine Nrf2 u oba modela BBB-a. Zanimljivo bi bilo ispitati mehanizme koji su potaknuli rast HNE–proteinskih konjugata u astrocitima s obzirom da oni nisu direktno bili izloženi djelovanju HNE-a. Moguće je da su isti mehanizmi doveli do pada razine Nrf2 što je suprotno od očekivanog, jer većina istraživanja pokazuje da HNE potiče nakupljanje Nrf2 u jezgri što aktivira ARE i rezultira porastom razine GSH i antioksidacijskih enzima [56,135]. Razina GSH u astrocitima modela BBB raste uslijed tretmana, dok je u astrocitima modela BBB-H uočen suprotan učinak, odnosno pad razine GSH. Kako su astrociti modela BBB-H imali početno višu razinu GSH, bili su spremni na nove razine HNE-a i njegovu konjugaciju te izbacivanje iz stanica što je moglo rezultirati smanjenjem razine GSH. To je ujedno i razlog manje naglašenog rasta razine HNE–proteinskih konjugata nego u astrocitu modela BBB. Osim toga, poznato je da astrociti luče GSH u izvanstanični prostor gdje služi za pravovremenu obranu neurona, ali i kao neurohormon [128,137]. U prilog ovoj činjenici govore i istraživanja GSH u mozgu koja su ustanovila visoke razine GSH u izvanstaničnom prostoru, otpuštanje GSH uslijed stimulacije i vezanje GSH na specifične izvanstanične receptore [138]. Moguće je da je izlaganje modela BBB-H novim razinama HNE-a djelovalo kao stimulans i potaknulo otpuštanje GSH u izvanstanični prostor što bi također objasnilo nižu razinu GSH u astrocitima. Istovremeno, u astrocitima modela BBB GSH raste nakon izlaganja modela HNE-u. Kako je astrocitima ovog modela to prvi susret s povišenom razinom HNE-a, oni reagiraju stvaranjem GSH i njegovom povišenom razinom. Postoji mogućnost da bi uslijed dulje izloženosti modela BBB HNE-u, razina GSH u astrocitima ovog modela također počela padati, međutim to zahtijeva dodatna ispitivanja.

Ključna razlika dvaju BBB modela uslijed tretmana HNE-om, javila se u sastavu masnih kiselina modela BBB-H. Naime, u modelu BBB-H došlo je do pojave metabolita ALA-e (DPA i DHA), ali i smanjenja metabolizma  $\omega$ -6 masnih kiselina (smanjenje razine EDA-e i AA-e). Kako pojava metabolita ALA-e, esencijalne  $\omega$ -3 masne kiseline, nije bila popraćena smanjenjem razine ALA-e, pretpostavlja se da nije došlo do aktivacije metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina, već da postoji novi izvor ove masne kiseline i/ili njezinih metabolita. *In vitro* istraživanja su pokazala da pojedine vrste endotelnih stanica (ovisno o organizmu) nemaju sve potrebne enzime za desaturaciju i elongaciju te stvaranje PUFA, ali da svoje membrane obogaćuju PUFA-ma koje otpuštaju astrociti [139]. Naime, u istraživanju koje je pratilo distribuciju radioaktivno obilježenih LA i ALA u astrocitima i endotelnim stanicama, te pripadajućim medijima, ustanovljeno je da endotelne stanice unose metabolite ovih masnih kiselina koje stvaraju astrociti [139]. Za razliku od primjerice neurona, astrociti vrlo lako otpuštaju masne kiseline, posebice DHA-e [140]. Medij za rast endotelnih stanica uz osnovni medij uključuje i jednaki dio kondicioniranog medija astrocitu te stoga može predstavljati potencijalni izvor novih masnih kiselina. Kako su modeli BBB-a uvijek bili izloženi istim medijima, te stanice nisu bile izlagane drugim izvorima masnih kiselina, može se pretpostaviti

da je tretman HNE-om potaknuo unos metabolita ALA-e u modelu BBB-H. Kako bi se ova pretpostavka potvrdila potrebno je napraviti lipidni profil astrocita i medija u kojem rastu te ispitati aktivnost enzima uključenih u metabolizam  $\omega$ -3 masnih kiselina.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da će BBB u patološkim uvjetima (model BBB-H) u potpunosti drugačije reagirati na nove izvore stresa u obliku HNE-a u odnosu na BBB u fiziološkim uvjetima (model BBB). Suprotno očekivanjima, HNE će potaknuti dodatno jačanje integriteta barijere i smanjiti njezinu propusnost čime bi se dodatno onemogućio već ionako otežan dotok lijekova u mozak. Tumori mozga kao najagresivniji oblik bolesti CNS-a počinju utjecati na propusnost BBB-a tek u uznapredovalom stadiju (tumori gradusa III i IV), dok u početku razvoja (gradus I i II) uopće ne uzrokuju povećanje propusnosti BBB-a [98]. A poznato je da količina HNE-proteinskih konjugata raste proporcionalno s malignošću tumora CNS-a [51,52]. Dobiveni rezultati upućuju na potencijalnu ulogu HNE-a u modulaciji propusnosti BBB-a, pri čemu razlike u razini Nrf2, okcludina i  $\omega$ -3 masnih kiselina igraju presudnu ulogu.

U drugom dijelu istraživanja ispitivan je utjecaj micela LA na modele BBB i BBB-H. LA je izabrana zbog toga što je esencijalna masna kiselina, glavni prekursor za AA čiji metaboliti su signalne molekule mozga te stoga što lipidnom peroksidacijom LA i AA nastaje HNE. Kao esencijalnu masnu kiselinu, LA moramo unositi u organizam svakodnevnom prehranom. Istraživanja pokazuju da je regulacijom prehrane i kontroliranim unosom  $\omega$  masnih kiselina moguće utjecati na lipidni sastav neuronalnih membrana te brzinu razvoja bolesti CNS-a [70]. Pri tome se suplementacija LA-om preporuča kod kožnih bolesti, dok se u slučaju bolesti CNS-a preporuča drastično smanjenje unosa LA [70]. Razlog tome je pad razine DHA, glavne sastavnice i čuvara neuronalnih membrana, te pojačano stvaranje proupalnih metabolita LA koji zajedno utječu na fluidnost i integritet staničnih membrana mozga [141]. Također, dosadašnja istraživanja su pokazala da PUFA-e mogu utjecati na propusnost BBB-a kroz promjene u ekspresiji proteina TJ-a [142,143]. Stoga su, kao i u slučaju HNE-a, odabrane koncentracije LA koje ne utječu na vijabilnost endotelnih stanica. Modeli su izlagani LA u obliku micela, kao jednostavnog vezikularnog transportnog sustava u koji bi se potencijalno mogli implementirati lijekovi za lakši unos u mozak.

Odgovor dvaju modela BBB-a na tretman micelama LA bio je u potpunosti različit. Tako su micela LA koncentracije 2.5  $\mu$ M uzrokovale jačanje integriteta i smanjenje propusnost modela BBB-H, dok je na propusnost modela BBB utjecao tek tretman micelama LA 7.5  $\mu$ M (Slika 40). Ovi učinci bili su praćeni povećanjem okcludina modela BBB-H u odnosu na netretirani model BBB-H. Treba imati na umu da su razine okcludina u ovom tretmanu i dalje niže nego u kontrolnom (netretiranom) modelu BBB. Iako je pokazano da PUFA-e mogu potaknuti ekspresiju okcludina u endotelnim stanicama i pri tome smanjiti propusnost barijere, u dosada opisanim istraživanjima, LA je uvijek imala suprotan učinak [142]. Od tri najčešće ispitivane masne kiseline (GLA, EPA, LA), LA je jedina uvijek pokazivala rast propusnosti te smanjenje TEER-a i okcludina [143]. Moguće je da oblik micela

pridonosi drugačijem učinku LA, međutim treba imati na umu da su endotelne stanice mozga drugačije u građi i funkciji od endotelnih stanica ostatka tijela te da njihova reakcija uvelike ovisi o prisutnosti drugih građevnih sastavnica neurovaskularne jedinice.

Jačanje integriteta i smanjenje propusnosti modela BBB-H uslijed tretmana micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$ ) praćeni su rastom razine Nrf2 koji je rezultirao porastom GSH i smanjenjem količine HNE-proteinskih konjugata endotelnih stanica. Dobiveni rezultati upućuju da je tretman micelama LA potaknuo aktivaciju Nrf2 u endotelnim stanicama koja je rezultirala povećanjem razine GSH i izbacivanjem HNE-a iz stanica što je dovelo do pada razine HNE-proteinskih konjugata. U prilog ovim rezultatima govori i činjenica da endogeni produkti oksidacije LA (EKODE) mogu aktivirati ARE i povećati ekspresiju Nrf2 [82]. Rezultat ove aktivacije je i povećano stvaranje GSH [82] što je u skladu s opažanjima u ovoj disertaciji. U astrocitima je tretman uzrokovao pad količine HNE-proteinskih konjugata, pad aktivnosti katalaze i razine GSH, međutim bez utjecaja na razinu Nrf2. Kao što je prethodno opisano, astrociti modela BBB-H uslijed tretmana micelama LA aktiviraju prvu liniju antioksidacijske zaštite, baš kao i u slučaju tretmana HNE-om. Kako su micelle uzrokovale rast ROS-a u astrocitima, očekivao se pad aktivnosti katalaze, a naznaka pada razine GSH upućuje na konjugaciju postojećeg HNE-a i njegovo izbacivanje iz stanice koje se očitovalo padom razine HNE-proteinskih konjugata. Osim navedenog, i ovaj tretman je doveo do povećanja  $\omega$ -3 masnih kiselina u modelu BBB-H što još jednom upućuje na potrebu ispitivanja sinteze i otpuštanja PUFA od strane astrocita. Zanimljivo je da su micelle LA (2.5  $\mu\text{M}$ ) postigle gotovo identičan učinak u jačanju integriteta i smanjenju propusnosti kao i tretman HNE-om, ali mehanizmom koji je uključivao porast okludina te pad razine HNE-proteinskih konjugata. Ovi rezultati upućuju na finu modulaciju propusnosti BBB-a kroz ravnotežu razine HNE-proteinskih konjugata i okludina pri čemu je nužan porast  $\omega$ -3 masnih kiselina. Gotovo identičan učinak na integritet i propusnost modela BBB-H kao i micelle LA (2.5  $\mu\text{M}$ ) imao je kombinirani tretman u kojem je HNE prethodio tretmanu micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$ ) uz naglašenije učinke na sustav antioksidacijske zaštite i količinu HNE-proteinskih konjugata. Naime, ovaj tretman je potaknuo rast GSH endotelnih stanica modela BBB-H te dodatno smanjio razinu HNE-proteinskih konjugata u odnosu na tretman samim micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$ ). Razina Nrf2 je i dalje bila povišena u odnosu na netretirani model BBB-H. Razlog ovakvih promjena u razini parametara antioksidacijske zaštite je vjerojatno dodatak HNE-a. Ovaj kombinirani tretman doveo je do pada SFA i MUFA te porasta PUFA zbog nove količine LA u obliku micela. Zbog brze konverzije LA, njezina koncentracija u stanicama nije porasla, ali uočen je porast njezinog glavnog metabolita – AA-e u odnosu na kontrolni model BBB-H. Također je porasla ukupna količina  $\omega$ -3 masnih kiselina u odnosu na kontrolni model BBB-H, ali i na tretman micelama LA (2.5  $\mu\text{M}$ ). Prisutnost  $\omega$ -3 masnih kiselina, posebice DHA, u membranama upućuje na povećanu fleksibilnost ovih membrana, a metode molekularnog modeliranja fosfolipidnih dvosloja pokazale su da su takve membrane manje osjetljive na mehanički stres u odnosu na membrane sa zasićenim masnim kiselinama [144]. Povećana fleksibilnost rezultira povećanom fluidnosti membrane što u slučaju

neuralnih stanica uključuje povećanje broja i rast afiniteta receptora u sinaptičkim regijama te pospješuje neurotransmisiju i utječe na signalne putove stanica [145]. Mogući mehanizam utjecanja na signalne putove je preko djelovanja na receptore G-vezanih proteina koji vežu izvanstanične signalne molekule i aktiviraju kaskadne reakcije prijenosa signala unutar stanica. U neuralnim stanicama G-proteini moduliraju natrij-kalijске kanale te moduliraju aktivnost fosfolipaze A2, enzima koji oslobađa masne kiseline iz fosfolipida [140]. Međutim, LA i ALA dijele enzimske sustave fosfolipaza, elongaza i desaturaza te je na animalnim modelima pokazano da suplementacija LA-om rezultira povećanjem njezinih metabolita, a smanjenjem DHA [146]. U ovoj disertaciji dobiven je suprotan učinak – unatoč suplementaciji LA-om, u stanicama modela BBB-H došlo je do porasta metabolita  $\omega$ -3 masnih kiselina DPA i DHA. U modelu BBB-H je prisutan HNE kao dio izvanstaničnog matriksa, a u brojnim istraživanjima ishemije i reperfuzije pokazana je prisutnost ovog aldehida [147–149]. S druge strane, tijekom ishemije i reperfuzije u mozgu fosfolipaza A2 uzrokuje otpuštanje DHA, koja se potom djelovanjem 15-lipoksigenaze-1 metabolizira do neuroprotektina D1 [146]. Neuroprotektin D1 štiti stanice od smrti jačanjem integriteta stanica utječući na natrij-kalijevu i natrij-kalcijevu pumpu i receptore N-metil-D-aspartata čime se smanjuje difuzija vode i sprječava nastanak edema. Također, neuroprotektin D1 i DHA stimuliraju produkciju antioksidanasa za uspješniju obranu stanica od velike količine ROS-a koji nastaje u takvim stanjima [146]. Stoga je potrebno ispitati razine i aktivnosti fosfolipaza i lipoksigenaza kako bi se mogla potvrditi ili odbaciti ova pretpostavka.

Ostali tretmani (micele LA 7.5  $\mu$ M, kombinirani tretman u kojem je HNE prethodio micelama LA 7.5  $\mu$ M i kombinirani tretmani u kojima micele LA prethode tretmanu HNE-om) na modelu BBB-H uzrokovali su smanjenje propusnosti modela, ali nisu utjecali na njegov integritet. Ovi tretmani uzrokovali su smanjenje razine okludina te porast razine  $\omega$ -3 masnih kiselina. Kombinirani tretmani su pritom potaknuli i rast razine AA, koji je, u slučaju kada su micele LA prethodile tretmanu HNE-om, popraćen rastom razine HNE–proteinskih konjugata. Glavna razlika između ovih tretmana i onih koji su uzrokovali i jačanje integriteta kroz porast TEER-a, je u razini okludina. Naime, iako model BBB-H ima nižu razinu okludina u odnosu na model BBB, ovi tretmani doveli su do dodatnog sniženja razine okludina zbog koje smanjenje propusnosti modela BBB-H nije praćeno jačanjem integriteta. Iako su istraživanja pokazala da ostali proteini TJ-a mogu preuzeti ulogu okludina [31], ovi rezultati upućuju na potrebu prisutnosti određene razine okludina kako bi se potaknuo rast integriteta. Potrebno je učiniti analize ostalih proteina TJ-a, posebice kladina-5 kako bismo bili sigurni da je porast TEER-a uz promjene lipidnog sastava endotelnih stanica također i rezultat promjena u količini TJ-a. U neurološkim poremećajima ustanovljeno je da se najveće promjene u lipidnom sastavu odnose na glicerofosfolipide koji sadrže etanolamin i inositol [150]. Kako je mozak izuzetno bogat lipidima, promjene u metabolizmu lipida posljedica su mnogih, a ujedno i mogući uzrok nekih bolesti CNS-a [123]. Plasmalogeni su glicerofosfolipidi koji uz estersku vezu kojom vežu PUFA-e imaju i eterski vezanu vinilnu skupinu. Oni čine 15-20% ukupnih

fosfolipida staničnih membrana, a najzastupljeniji su u mozgu čiji pojedini dijelovi sadrže i do 90% plasmalogeni [151]. Obzirom da su obogaćeni s AA i DHA, plasmalogeni djeluju kao spremnici ovih biološki aktivnih lipidnih medijatora, koji se otpuštaju djelovanjem fosfolipaza [152]. Poremećeni metabolizam lipida u bolestima CNS-a rezultira smanjenjem plasmalogeni te povećanjem slobodnih masnih kiselina, lipidnih peroksida i akumulacijom HNE-a [150]. U ovoj disertaciji nisu praćene promjene u lipidnim razredima te tako ni razina plasmalogeni, no kako HNE kovalentnim vezanjem na plasmalogen može uzrokovati promjene u distribuciji fosfolipida u membranama te posljedično utjecati na fluidnost membrana i sustave prijenosa signala [153–155], postoji mogućnost da je ova interakcija jedan od mehanizama koji su uzrokovali opisane promjene u modelu BBB-H.

Istovremeno, na modelu BBB tretmani micelama LA koncentracije 7.5  $\mu\text{M}$ , kombinirani tretman u kojem HNE prethodi micelama LA 2.5  $\mu\text{M}$  te kombinirani tretmani u kojima micela LA prethode HNE-u, uzrokovali su smanjenje propusnosti modela, ali bez utjecaja na integritet (Slika 40). Kako je riječ o modelu koji predstavlja BBB u fiziološkim uvjetima, iz dobivenih rezultata bi se moglo pretpostaviti da u prisutnosti niskih koncentracija HNE-a i LA, BBB ostaje intaktna, ali još manje propusna. Navedeni tretmani su u endotelnim stanicama modela BBB uzrokovali rast razine HNE–proteinskih konjugata praćen porastom GSH te padom razine Nrf2. U kombiniranim tretmanima logičan je porast razine HNE–proteinskih konjugata zbog egzogeno dodanog HNE-a, dok je u slučaju tretmana micelama LA 7.5  $\mu\text{M}$  ovaj rast rezultat lipidne peroksidacije nastale uslijed tretmana. Naime, same micela LA potiču stvaranje ROS-a u endotelnim stanicama, koji je mogao potaknuti lipidnu peroksidaciju. Pad razine Nrf2 potpuno je neočekivan, no moguće je da je u promatranom vremenskom intervalu (24h od tretmana) prestala stimulacija ARE-a nastala uslijed tretmana te je započela ubikvitinacija Nrf2. Pretpostavlja se da je postojala stimulacija ARE-a zbog porasta razine GSH, jer ARE nadzire transkripciju enzima odgovornih za metabolizam GSH [156]. U astrocitima modela BBB također je uočen rast razine HNE–proteinskih konjugata, ali i pad razine GSH uslijed ovih tretmana, te porast Nrf2 u slučaju kombiniranih tretmana koji su sadržavali micela LA koncentracije 2.5  $\mu\text{M}$ . Ponovno se javlja tzv. bystander učinak, odnosno, iako nisu direktno izloženi tretmanima, u astrocitima se također odvijaju promjene promatranih parametara kao i u endotelnim stanicama. Međutim, kako je riječ o drugom tipu stanica, promjene su drugačije nego u endotelnim stanicama. A kako je već prije opisano, astrociti na izvanstanični poticaj reagiraju lučenjem GSH u izvanstanični prostor kako bi na vrijeme pružili dodatnu zaštitu neuronima [137,157] što je mogući razloga pada razine GSH u astrocitima. Porast Nrf2 ide u prilog ovom objašnjenju jer je pokazano da Nrf2 posreduje nastanku brojnih enzima koji sudjeluju u zaštiti astrociti, uključujući enzime koji sudjeluju u biosintezi, iskorištavanju i lučenju GSH [157].

Tretmani na modelu BBB koji su doveli do smanjenja propusnosti također su uzrokovali pad razine okludina te promjene u količini  $\omega$ -3 masnih kiselina. Ove promjene uključuju rast razine  $\omega$ -3



masnih kiselina uslijed tretmana micelama LA 7.5  $\mu\text{M}$  i tretmana u kojem je HNE prethodio micelama LA 2.5  $\mu\text{M}$ , te pad razine  $\omega$ -3 masnih kiselina uslijed kombiniranih tretmana u kojima micela LA prethode HNE-u. Pad razine  $\omega$ -3 masnih kiselina u ovih tretmana prati rast razine LA, ali ne i njezinih metabolita što upućuje na moguću inhibiciju elongaza i desaturaza te bi bilo poželjno ispitati aktivnost ovih enzima. Što se tiče pada razine okludina, on je naglašeniji u kombiniranim tretmanima u kojima su micela LA prethodile HNE-u, odnosno uslijed ovih tretmana ga se uopće nije moglo detektirati. Još jednom se potvrđuje činjenica da okludin nije nužan za održavanje integriteta barijere, ali da njegova prisutnost doprinosi jačanju integriteta. Isto tako, ovi rezultati pokazuju da HNE u obliku HNE–proteinskih konjugata zasigurno ima ulogu u modulaciji integriteta i propusnosti BBB-a te je nužno ispitati mehanizme djelovanja ove signalne molekule. Također, razina  $\omega$ -3 masnih kiselina jedan je od ključnih elemenata koji doprinose regulaciji propusnosti BBB-a. A kao što je ranije opisano, HNE osim na proteine i utjecanja na signalne putove stanice vezanjem na proteine, može mijenjati putove prijenosa signala u stanici i vezanjem na lipide, te utjecati na promjene lipidnog sastava stanične membrane [155].

Mozak je uistinu zaseban organ s izrazito dobrim kontrolnim sustavom koji sprječava širenje štetnih utjecaja iz krvi i ostatka organizma do mozga. Naime, ovi rezultati pokazuju da niske razine stresa u obliku HNE-a, koje mogu biti prisutne u krvi uslijed oksidacijskog stresa organizma, u prisustvu LA, kao esencijalne masne kiseline prisutne u fiziološkim uvjetima, dodatno utječe na BBB smanjujući njezinu propusnost i sprječavajući širenje potencijalne štete do mozga.

HNE je jedna izuzetno potentna signalna molekula koja je, kako je već opisano, uključena u brojne signalne putove koji reguliraju funkcioniranje mozga u fiziološkim i patološkim uvjetima. Kako je pokazano u ovoj disertaciji, HNE modulira propusnost BBB-a, a jedan od mehanizama uključuje i promjene lipidnog sastava endotelnih stanica. Kao metabolit masnih kiselina, HNE ima naglašeni lipofilni karakter te zasigurno veliki dio svog djelovanja vrši kroz interakcije s lipidima. Međutim, ovaj dio njegovog djelovanja zasad je još nedovoljno istražen. Ova disertacija je još jedan pokazatelj direktnog utjecaja HNE-a na promjene lipidnog sastava stanica te bi svakako trebalo ispitati potencijalne mehanizme ovog učinka, koji dovodi do modulacije propusnosti BBB-a kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima organizma.

## ***ZAKLJUČCI***

## 6. ZAKLJUČCI

1. Astroцити су осјетљивији на третмане HNE-ом и/или micelama LA од endotelних stanica – RbE4 zbog slabijeg sustava antioksidacijske zaštite (manja razina Nrf2, GSH i katalaze).
2. HNE izaziva lipidnu peroksidaciju u astroцитima i endotelnim stanicama – RbE4. Međutim, dok u astroцитima lipidnu peroksidaciju najvjerojatnije potiče prekomjerno stvaranje ROS-a kao posljedica djelovanja HNE-a, u endotelnim stanicama lipidnu peroksidaciju potiču sustavi koji isključuju prekomjerno stvaranje ROS-a.
3. Visoke koncentracije HNE-a sprečavaju lučenje proupalnih citokina i kemokina te izazivaju nagli pad CINC-2 $\alpha\beta$  endotelnih stanica BBB-a i upućuju na potencijalnu ulogu HNE-a u suzbijanju razvoja upale.
4. HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu (model BBB-H) utječe na strukturni integritet BBB-a kroz promjene u sastavu masnih kiselina (rast SFA i pad PUFA) i blokadu metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina endotelnih stanica, kojima se nadoknađuje pad razine okludina. Istovremeno uzrokuje jačanje antioksidacijske zaštite u astroцитima.
5. HNE u koncentraciji 20  $\mu$ M uzrokuje jačanje integriteta oba modela BBB-a kroz porast TEER-a, što je u modelu BBB praćeno povećanjem okludina. U modelu BBB-H uz jačanje integriteta, HNE uzrokuje i smanjenje propusnosti modela praćeno jačanjem sustava antioksidacijske zaštite endotelnih stanica te povećanjem razine  $\omega$ -3 masnih kiselina.
6. Micele LA nemaju učinka na integritet modela BBB, dok bitno mijenjaju ove karakteristike modela BBB-H:
  - 6.1. Micele LA (2.5  $\mu$ M) uzrokuju jačanje integriteta kroz porast TEER-a i smanjenje propusnosti modela BBB-H što je praćeno povećanjem okludina, jačanjem antioksidacijske zaštite stanica, rastom razine  $\omega$ -3 masnih kiselina te padom razine HNE–proteinskih konjugata. Isti učinak uzrokuje i kombinirani tretman u kojem HNE prethodi tretmanu micelama LA (2.5  $\mu$ M).
  - 6.2. Smanjenje propusnosti modela BBB uzrokovano je micelama LA koncentracije 7.5  $\mu$ M. Pritom, micidele uzrokuju pad razine Nrf2 i okludina uz porast razine HNE–proteinskih konjugata i  $\omega$ -3 masnih kiselina.

7. Kombinirani tretmani u kojima micele LA prethode tretmanu HNE-om uzrokuju smanjenje propusnosti modela BBB i BBB-H što je ponovno praćeno jaćanjem antioksidacijske zaštite endotelnih stanica, međutim u modelu BBB rezultira povećanjem SFA i smanjenjem PUFA, dok u modelu BBB-H rezultira smanjenjem SFA i povećanjem PUFA te porastom razine  $\omega$ -3 masnih kiselina.
8. Integritet i propusnost BBB-a ne ovise samo o kolićini proteina TJ-a, veći i o stupnju antioksidacijske zaštite stanica, sastavu masnih kiselina, metabolizmu  $\omega$ -3 masnih kiselina i ukupnoj kolićini HNE-proteinskih konjugata u stanicama.
9. Niske razine stresa u obliku HNE-a, koje mogu biti prisutne u krvi uslijed oksidacijskog stresa organizma, u prisustvu LA, kao esencijalne masne kiseline prisutne u fiziološkim uvjetima, dodatno utjeće na BBB smanjujući njezinu propusnost i sprječavajući širenje potencijalne štete do mozga.
10. Prisutnost HNE-a u izvanstanićnom matriksu u ranim stadijima bolesti CNS-a može dodatno ojaćati integritet BBB-a i učiniti je još nepropusnijom za potencijalne lijekove, a time ujedno ubrzati razvoj bolesti.

## ***LITERATURA***

## 7. LITERATURA

1. Erlich P. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus : eine farbenanalytische Studie. Berlin: Verlag von August Hirschwald; 1885. p. 1–85.
2. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat. Rec. B. New Anat.* 2006;289:3–8.
3. Goldmann E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem: beiträg zur Physiopathologie des plexus choroideus der Hirnhäute. *Abhandl Königl Preuss Akad Wiss.* 1913;1:1–60.
4. Abbott NJ, Patabendige A a K, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis. Elsevier Inc.*; 2010;37:13–25.
5. Nag S, Begley DJ. Blood Brain Barrier, Exchange of metabolites and gasestle. *Pathol. Genet. Cerebrovasc. Dis. ISN Neuropath Press*; 2005. p. 22–9.
6. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1:223–36.
7. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7:41–53.
8. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 2002;38:323–37.
9. el-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 1999;45:15–23.
10. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 2002;200:629–38.
11. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005;57:173–85.
12. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev. Elsevier B.V.*; 2010;64:328–63.
13. Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol. Rev.* 2012;248:228–39.
14. De Boer a G, Gaillard PJ. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J. Neural Transm.* 2006;113:455–62.
15. Deli M a. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*; 2009;1788:892–910.
16. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008;55:310–8.
17. Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J. Neurochem.* 2009;111:291–314.

18. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*. 2013;61:1939–58.
19. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007;28:5–11.
20. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008;67:1113–21.
21. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J. Neurovirol.* 1999;5:556–69.
22. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell.* 2011;21:193–215.
23. Guillemin GJ, Brew BJ. pericytes : a review of function and identification. 2010;
24. Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 2011;91:461–553.
25. Rojo AI, McBean G, Cindric M, Egea J, López MG, Rada P, et al. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;
26. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25:16–26.
27. Brown RC, Davis TP. Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function: A Potential Mechanism for Blood-Brain Barrier Disruption After Stroke. *Stroke*. 2002;33:1706–11.
28. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1778:794–809.
29. Luissint A-C, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud P-O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* 2012;9:23.
30. Tsukita S, Furuse M. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells.* 1998;3:569–73.
31. Zlokovic B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57:178–201.
32. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress*. London: Academic Press INC. LTD; 1985. p. 1–8.
33. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993;49:481–93.
34. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001;54:176–86.
35. Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 2009;7:65–74.
36. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000;279:L1005–28.

37. Pramod J, Singh S, Singh J. Role of Free Radicals and Antioxidants in Human Health and Disease. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 2013;05:14–22.
38. Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2010;12:125–69.
39. Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S, et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.* 2007;21:3666–76.
40. Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J. Neurochem.* 2007;101:566–76.
41. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8:766–75.
42. Hall ED, Detloff MR, Johnson K, Kupina NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2004;21:9–20.
43. Farooqui A a, Horrocks L a, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J. Neurochem.* 2007;101:577–99.
44. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak a, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* 2010;44:1098–124.
45. Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. *Chem. Biol. Interact. Elsevier Ireland Ltd;* 2011;192:14–20.
46. Wildburger R. Lipid Peroxidation and Age-Associated Diseases-Cause or Consequence?: Review. 2009;189–93.
47. Petersen DR, Doorn J a. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.* 2004;37:937–45.
48. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991;11:81–128.
49. Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic. Biol. Med. Elsevier;* 2013;62:157–69.
50. Butterfield DA, Reed T, Sultana R. Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* 2011;45:59–72.
51. Zarkovic K, Juric G, Waeg G, Kolenc D, Zarkovic N. Immunohistochemical appearance of HNE-protein conjugates in human astrocytomas. *Biofactors.* 2005;24:33–40.
52. Juric-Sekhar G, Zarkovic K, Waeg G, Cipak A, Zarkovic N. Distribution of 4-hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori.* 2009;95:762–8.



53. Kolenc D, Jakovčević A, Macan M, Žarković K. The co-expression of 4-hydroxynonenal and prominin-1 in glioblastomas. *Transl. Neurosci.* 2011;2:163–7.
54. Mertsch K, Blasig I, Grune T. 4-Hydroxynonenal impairs the permeability of an in vitro rat blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 2001;314:135–8.
55. Usatyuk P V, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *J. Biol. Chem.* 2006;281:35554–66.
56. Chapple SJ, Cheng X, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol. Elsevier*; 2013;1:319–31.
57. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ.* 2013;20:1615–30.
58. Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem. J.* 2003;376:615–23.
59. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol. Aspects Med.* 2003;24:167–75.
60. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1777:1249–62.
61. Hulbert a. J. Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 2003;206:2303–11.
62. Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 2002;27:467.
63. Shaikh SR, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;84:1277–89.
64. Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can. J. Psychiatry.* 2003;48:195–203.
65. Whelan J. (n-6) and (n-3) Polyunsaturated fatty acids and the aging brain: food for thought. *J. Nutr.* 2008;138:2521–2.
66. Moore SA. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 16:195–200; discussion 215–21.
67. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005;21:633–57.
68. Kim HY, Akbar M, Lau a, Edsall L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem.* 2000;275:35215–23.
69. Akbar M, Kim H-Y. Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J. Neurochem.* 2002;82:655–65.
70. Youdim K a, Martin a, Joseph J a. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000;18:383–99.

71. Farooqui AA, Horrocks LA. Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:613–31.
72. Hyde C a C, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int. Immunopharmacol. Elsevier B.V.*; 2009;9:701–15.
73. Tassoni D, Kaur G, Weisinger RS, Sinclair AJ. The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2008;17 Suppl 1:220–8.
74. Fukaya T, Gondaira T, Kashiya Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, et al. Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiol. Aging.* 2007;28:1179–86.
75. Wang Z-J, Liang C-L, Li G-M, Yu C-Y, Yin M. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices. *Chem. Biol. Interact.* 2006;163:207–17.
76. Darios F, Davletov B. Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature.* 2006;440:813–7.
77. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002;56 Suppl 3:S14–9.
78. Cohen SR, Bernsohn J. The in vivo incorporation of linolenic acid into neuronal and glial cells and myelin. *J. Neurochem.* 1978;30:661–9.
79. DeMar JC, Lee H-J, Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI, et al. Brain elongation of linoleic acid is a negligible source of the arachidonate in brain phospholipids of adult rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1761:1050–9.
80. Choque B, Catheline D, Rioux V, Legrand P. Linoleic acid: between doubts and certainties. *Biochimie. Elsevier Masson SAS*; 2014;96:14–21.
81. Ramsden CE, Ringel A, Feldstein AE, Taha AY, MacIntosh BA, Hibbeln JR, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2013;87:135–41.
82. Wang R, Kern JT, Goodfriend TL, Ball DL, Luesch H. Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids. Elsevier*; 2009;81:53–9.
83. Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, Aburatani H, Furuta K, et al. Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress. *Eur. J. Neurosci.* 2003;17:2249–55.
84. Yang Y, Rosenberg G a. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2011;42:3323–8.
85. Jaeger LB, Dohgu S, Hwang MC, Farr SA, Murphy MP, Fleegal-DeMotta MA, et al. Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. *J. Alzheimers. Dis.* 2009;17:553–70.
86. Bell RD, Zlokovic B V. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118:103–13.

87. Deane R, Wu Z, Zlokovic B V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 2004;35:2628–31.
88. Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L, et al. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain*. 2001;124:1743–53.
89. Kanmogne GD, Kennedy RC, Grammas P. HIV-1 gp120 proteins and gp160 peptides are toxic to brain endothelial cells and neurons: possible pathway for HIV entry into the brain and HIV-associated dementia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002;61:992–1000.
90. Pu H, Hayashi K, Andras IE, Eum SY, Hennig B, Toborek M. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2007;1184:333–44.
91. Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom a J, Chung R, et al. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience*. 2007;147:664–73.
92. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2007;33:86–98.
93. Romanitan MO, Popescu BO, Winblad B, Bajenaru OA, Bogdanovic N. Occludin is overexpressed in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Cell. Mol. Med.* 11:569–79.
94. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007;27:697–709.
95. Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, et al. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Med.* 2005;11:959–65.
96. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97–109.
97. Noell S, Wolburg-buchholz K, Mack AF. The Blood-Brain Barrier in Brain Tumours, Management of CNS Tumors. Garami M, editor. InTech; 2011.
98. Larsson HB, Stubgaard M, Frederiksen JL, Jensen M, Henriksen O, Paulson OB. Quantitation of blood-brain barrier defect by magnetic resonance imaging and gadolinium-DTPA in patients with multiple sclerosis and brain tumors. *Magn. Reson. Med.* 1990;16:117–31.
99. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud P-O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* Elsevier B.V.; 2009;1788:842–57.
100. Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, Gonzalez AM, Baird A, Eliceiri BP. Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res.* Elsevier B.V.; 2009;1288:125–34.
101. Steiner E, Enzmann GU, Lyck R, Lin S, Rüegg M a, Kröger S, et al. The heparan sulfate proteoglycan agrin contributes to barrier properties of mouse brain endothelial cells by stabilizing adherens junctions. *Cell Tissue Res.* 2014;

102. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248–54.
103. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226:497–509.
104. Mihaljević B, Katusin-Razem B, Razem D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;21:53–63.
105. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* 1991;196:143–51.
106. Malone PE, Hernandez MR. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp. Eye Res.* 2007;84:444–54.
107. Karlhuber G., Bauer H., Eckl P. Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1997;381:209–16.
108. Bresgen N, Jaksch H, Bauer H, Eckl P, Krizbai I, Tempfer H. Astrocytes Are More Resistant Than Cerebral Endothelial Cells Toward Geno- and Cytotoxicity Mediated by Short-Term Oxidative Stress. 2006;1828:1821–8.
109. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otín M, et al. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 2003;22:4103–10.
110. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 2007;43:1351–71.
111. Srivastava S, Liu S-Q, Conklin DJ, Zacarias A, Srivastava SK, Bhatnagar A. Involvement of aldose reductase in the metabolism of atherogenic aldehydes. *Chem. Biol. Interact.* 2001;130-132:563–71.
112. Hill BG, Haberzettl P, Ahmed Y, Srivastava S, Bhatnagar A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 2008;410:525–34.
113. Whitsett J, Picklo MJ, Vasquez-Vivar J. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2340–7.
114. Farber JL. Mechanisms of Cell Injury by Activated Oxygen Species. *Environ. Health Perspect.* 1994;102:17.
115. Aschner M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol. Lett.* 1998;102-103:283–7.
116. Lau LT, Yu AC. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma.* 2001;18:351–9.
117. Reyes TM, Fabry Z, Coe CL. Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli. *Brain Res.* 1999;851:215–20.

118. Ayalasmayajula SP, Kompella UB. Induction of vascular endothelial growth factor by 4-hydroxynonenal and its prevention by glutathione precursors in retinal pigment epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;449:213–20.
119. Erickson M a, Dohi K, Banks W a. Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation.* 2012;19:121–30.
120. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 2006;86:279–367.
121. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3:422–33.
122. Zarkovic K. 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* 2003;24:293–303.
123. Adibhatla RM, Hatcher JF. Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. *Future Lipidol.* 2007;2:403–22.
124. Chen F, Hori T, Ohashi N, Baine A-M, Eckman CB, Nguyen JH. Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure. *Hepatology.* 2011;53:1294–305.
125. Suc I, Meilhac O, Lajoie-Mazenc I, Vandaele J, Jürgens G, Salvayre R, et al. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J.* 1998;12:665–71.
126. Xu H, Liu Q, Du J, Shi Y, Pritchard KA, Weihrauch D. Changes in endothelial cell surface proteins in response to oxidatively modified fibronectin. *FASEB J.* 2011;25:S21.39.
127. Kim WD, Kim YW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *J. Cell Sci.* 2012;125:1284–95.
128. Vargas MR, Johnson J a. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009;11:e17.
129. Natarajan V, Scribner WM, Vepa S. Phospholipase D Activation in Vascular Endothelial Cells. 1997;
130. Oliveira TG, Di Paolo G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*; 2010;1801:799–805.
131. Usatyuk P V, Natarajan V. Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279:11789–97.
132. Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, Barrera G. The “Two-Faced” Effects of Reactive Oxygen Species and the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in the Hallmarks of Cancer. *Cancers (Basel).* 2010;2:338–63.
133. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest. *Med. Res. Rev.* 2008;28:569–631.
134. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 2003;42:318–43.

135. Lee J-M, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, et al. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J.* 2005;19:1061–6.
136. Lewis KN, Mele J, Hayes JD, Buffenstein R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr. Comp. Biol.* 2010;50:829–43.
137. Sagara J, Makino N, Bannai S. Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 1996;66:1876–81.
138. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000;62:649–71.
139. Bernoud N, Fenart L, Bénistant C, Pageaux JF, Dehouck MP, Molière P, et al. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J. Lipid Res.* 1998;39:1816–24.
140. Bradbury J. Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients.* 2011;3:529–54.
141. Chang C-Y, Ke D-S, Chen J-Y. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol. Taiwan.* 2009;18:231–41.
142. Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;244:414–20.
143. Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yamori Y, Nara Y, Itoh S. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. *Neuroscience.* 2003;116:649–56.
144. Huber T, Rajamoorthi K, Kurze VF, Beyer K, Brown MF. Structure of docosahexaenoic acid-containing phospholipid bilayers as studied by (2)H NMR and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124:298–309.
145. Wassall SR, Brzustowicz MR, Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem. Phys. Lipids.* 2004;132:79–88.
146. Mayurasakorn K, Williams JJ, Ten VS, Deckelbaum RJ. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2011;14:158–67.
147. Urabe T, Hattori N, Yoshikawa M, Yoshino H, Uchida K, Mizuno Y. Colocalization of Bcl-2 and 4-hydroxynonenal modified proteins in microglial cells and neurons of rat brain following transient focal ischemia. *Neurosci. Lett.* 1998;247:159–62.
148. Urabe T, Yamasaki Y, Hattori N, Yoshikawa M, Uchida K, Mizuno Y. Accumulation of 4-hydroxynonenal-modified proteins in hippocampal CA1 pyramidal neurons precedes delayed neuronal damage in the gerbil brain. *Neuroscience.* 2000;100:241–50.
149. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep.* 2008;41:560–7.
150. Farooqui A a, Ong W-Y, Horrocks L a. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem. Res.* 2004;29:1961–77.

- 
151. Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*; 2012;1822:1442–52.
152. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog. Lipid Res.* 2011;50:35–51.
153. Bacot S, Bernoud-Hubac N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Ponsin G, et al. Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals. *J. Lipid Res.* 2007;48:816–25.
154. Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, et al. Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J. Lipid Res.* 2003;44:917–26.
155. Guichardant M, Chantegrel B, Deshayes C, Lagarde M. Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation . Effects on aminophospholipids. 2002;67:147–9.
156. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2004;36:1199–207.
157. Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem. Pharmacol. Elsevier Inc.*; 2012;83:1005–12.

## ***SAŽETAK***



## 8. SAŽETAK

BBB je dinamičko sučelje koje održava homeostazu za normalan rad CNS-a te ujedno štiti mozak od štetnih tvari, zbog čega predstavlja glavnu prepreku dotoku lijekova u mozak čime gotovo onemogućava liječenje bolesti CNS-a. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su oksidacijski stres, te posljedično lipidna peroksidacija usko povezani s promjenama u funkciji BBB-a u mnogim bolestima CNS-a uključujući neurodegenerativne bolesti i tumore CNS-a. Osim što mogu utjecati na signalne putove u samim stanicama koje sačinjavaju BBB, oksidacijski stres i lipidna peroksidacija mogu mijenjati i karakteristike izvanstaničnog matriksa.

Povećanje propusnosti BBB-a koje bi moglo olakšati dotok lijekova u mozak, uočeno je uglavnom u kasnim stadijima navedenih bolesti kada izlječenje više nije moguće zbog oštećenja neuronalnih funkcija CNS-a. Otkrivanje uloge ROS-a i HNE-a u strukturnim i funkcionalnim promjenama svojstava BBB-a omogućilo bi primjenu novih saznanja u modulaciji propusnosti BBB-a i osiguralo nove pristupe liječenja bolesti CNS-a.

U svrhu ispitivanja utjecaja HNE-a i/ili LA kao esencijalne masne kiseline na BBB, razvijena su dva modela BBB-a: model BBB koji predstavlja BBB u fiziološkim uvjetima te model BBB-H koji predstavlja BBB u patološkim uvjetima kada je HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu.

Ukoliko je prisutan u izvanstaničnom matriksu (model BBB-H), HNE utječe na integritet i propusnost BBB-a kroz promjene u sastavu masnih kiselina i blokadom metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina endotelnih stanica. Istovremeno, HNE uzrokuje jačanje antioksidacijske zaštite astrocita. Također je pokazano da su astrociti, kao jedna od sastavnica BBB-a, osjetljiviji na tretmane HNE-om i/ili micelama LA zbog slabijeg sustava antioksidacijske zaštite što je dokazano manjom količinom proteina Nrf2 i GSH te smanjenom aktivnošću katalaze u odnosu na endotelne stanice.

Nakon izlaganja modela BBB i BBB-H HNE-u koncentracije 20  $\mu$ M aktiviraju se različiti mehanizmi koji rezultiraju istim učinkom – jačanjem integriteta BBB-a. U slučaju modela BBB, uz povećanje antioksidacijske zaštite endotelnih stanica i astrocita, dolazi do povećanja okludina – sastavnog proteina TJ-a. S druge strane, u modelu BBB-H, razina okludina pada, ali raste razina Nrf2 uz aktivaciju metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina što uz jačanje integriteta dovodi i do smanjenja propusnosti modela BBB-H.

Isti učinak, jačanje integriteta i smanjenje propusnosti modela BBB-H kroz povećanje razine okludina, jačanje antioksidacijske zaštite i aktivaciju metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina te smanjenje ukupne količine HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama i astrocitima imali su micela LA koncentracije 2.5  $\mu$ M te kombinirani tretman u kojem je HNE prethodio micelama LA koncentracije 2.5  $\mu$ M.

Do smanjenja propusnosti modela BBB-H doveli su i kombinirani tretmani micelama LA obje koncentracije i HNE-a također uz jačanje antioksidacijske zaštite i aktivaciju metabolizma  $\omega$ -3 masnih kiselina.

S druge strane, na modelu BBB tretmani dovode isključivo do smanjenja propusnosti modela bez utjecaja na integritet, i to tretmani micelama LA 7.5  $\mu$ M, te svi kombinirani tretmani. Smanjenje propusnosti rezultat je promjena koje uključuju pad razine okludina i Nrf2 te promjene u metabolizmu  $\omega$ -3 masnih kiselina.

Zaključno, HNE prisutan u izvanstaničnom matriksu mijenja svojstva i funkciju BBB-a te njezin integritet jača, a propusnost se smanjuje u prisutnosti micela LA, ali i novih količina HNE-a, te njihovih kombinacija. Jačanje integriteta i smanjenje propusnosti rezultat su promjena u razini okludina, parametara antioksidacijske zaštite, promjena u metabolizmu  $\omega$ -3 masnih kiselina i ukupne količine HNE–proteinskih konjugata u endotelnim stanicama.

## ***SUMMARY***

## 9. SUMMARY

BBB is a dynamic interface that maintains homeostasis needed for normal CNS functioning, but also protects brain from potentially harmful blood borne substances. Hence, BBB represents main obstacle to the efficient drug delivery to the brain, thus making CNS diseases almost incurable. Recent findings have shown that oxidative stress and consequently lipid peroxidation are important (co)factors in BBB dysfunction in numerous CNS disease including neurodegenerative diseases and brain tumors. Besides affecting major signaling pathways in neurovascular unit, oxidative stress and lipid peroxidation can change characteristics of extracellular matrix.

BBB dysfunction is revealed mainly in the late stages of most CNS diseases when there is no effective way of treatment due to massive loss of neuronal functions. Revealing the role of ROS and HNE in structural and functional changes of BBB could provide new insights in modulation of BBB permeability and assure new approaches in CNS diseases treatments.

In order to study effects of HNE and/or LA micelles, as an essential fatty acid, on function and structure of BBB, two BBB models were developed: BBB model that represents BBB in physiological conditions, and BBB-H model that represents BBB in pathological conditions where HNE is present in extracellular matrix.

When present in extracellular matrix, HNE affects BBB integrity and permeability through changes in fatty acid composition and activation of  $\omega$ -3 fatty acid metabolism of endothelial cells. At the same time, it causes increase in the antioxidant protection of astrocytes. Furthermore, it was shown that astrocytes as a part of neurovascular unit are more sensitive to HNE and/or LA micelles treatments than endothelial cells, due to lower level of antioxidant protection (lower amounts of Nrf2, GSH, and catalase activity).

After exposure of both models to HNE (20  $\mu$ M), different mechanisms are activated that lead to the same effect – increase in BBB integrity. In the case of BBB model, in addition to increased antioxidant defense of endothelial cells and astrocytes, increase in occludin occurred. On the other hand, in the BBB-H model, occludin levels decreased, but increase in Nrf2 and activation of  $\omega$ -3 fatty acid metabolism occurred, followed with decrease in permeability of BBB-H model.

The same effect, increase in BBB-H integrity, and decrease in its permeability, occurred through increase in occludin levels, antioxidant defense increase and activation of  $\omega$ -3 fatty acid metabolism followed with decrease in HNE-protein conjugates in endothelial cells and astrocytes, had LA micelles (2.5  $\mu$ M) and combined treatment in which HNE preceded LA micelles (2.5  $\mu$ M).

Decrease in BBB-H permeability resulted also after combined treatments of LA micelles (both concentrations) and HNE due to increase in antioxidant defense and activation of  $\omega$ -3 fatty acid metabolism.

On the other hand, on the BBB model, treatments lead solely to permeability decrease without affecting the integrity (treatments included LA micelles (7.5  $\mu$ M) and all combined treatments).

Decrease in permeability occurred as a result of changes that include decrease in occludin and Nrf2 levels and changes in  $\omega$ -3 fatty acid metabolism.

Finally, HNE present in extracellular matrix changes structure and function of BBB thus leading to increase in integrity followed by permeability decrease in presence of LA micelles and new HNE levels, and their combinations. Integrity increase and permeability decrease are result of changes in occludin levels, but also changes in antioxidant defense and  $\omega$ -3 fatty acids metabolism and total HNE-protein conjugates levels in endothelial cells.

## ***ŽIVOTOPIS***

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobne informacije

Ime i prezime: **Marina Cindrić**

Bračni status: udana, 1 dijete

Titula: dipl. ing. molekularne biologije

Adresa: Katedra za patologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3,  
10000 Zagreb, Hrvatska

E-mail: mstroser@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 13.02.1983. Zagreb, Hrvatska

### Radno iskustvo

Datum (od – do): od 02.01.2008.

Institucija: Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Pozicija: znanstveni novak, PhD student

Područje rada: oksidacijski stres, maligne bolesti, modeli bioloških barijera *in vitro*

### Obrazovanje

Datum: od 13.06.2008

Mjesto: Osijek

Institucija: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku  
i Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilišni poslijediplomski  
interdisciplinarni doktorski studij 'Molekularne bioznanosti'

Datum: 07.11.2008. – 17.02.2014.

Mjesto: Zaprešić

Institucija: Visoka škola za poslovanje i upravljanje 'Baltazar Adam Krčelić',  
Specijalistički diplomski stručni studij Projektni menadžment

Titula: stručna specijalistica projektnog menadžmenta

Datum: 16.07.2001.–11.07.2007.

Mjesto: Zagreb

Institucija: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Titula: dipl. ing. molekularne biologije

## Jezici

Materinji jezik: hrvatski

Engleski jezik:

govor: tečan govor

pisanje: izvrsno

čitanje: izvrsno

Njemački jezik: pasivno

## Znanstveni i ostali projekti

od 2008. znanstveni novak na projektu 'Oksidacijski stres i tumori središnjeg živčanog sustava'

Bilateralni projekti:

2013. – 2014.- istraživač na hrvatsko-francusko bilateralnom projektu „Modifikacija elastina karbonilnim stresom: utjecaj na starenje i zadebljanje krvnih žila“

2013. – 2014. - istraživač na hrvatsko-njemačkom bilateralnom projektu „Uloga produkata lipidne peroksidacije u regulaciji rasta stanica kosti potaknutog novim vrstama 45S5 Cu-biostakla“

2012.- istraživač na hrvatsko-njemačkom bilateralnom projektu: „Utjecaj novog Cu-biostakla i produkata lipidne peroksidacije na regeneraciju kosti“

2008.-2009. - istraživač na hrvatsko-mađarskom bilateralnom projektu „Modifikacija rezistencije na lijekove oksidacijskim stresom i antioksidansima“

## Članstva

Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR),

The European Association for Cancer Research (EACR)

The International HNE-Club

## Računalne vještine

MS Office; Adobe Acrobat; Adobe Photoshop



**Popis publikacija****Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima**

1. Rojo, Ana I.; MacBean, Gethin; **Cindric, Marina**; Egea, Javier; García, Manuela; Rada, Patricia; Zarkovic, Neven; Cuadrado, Antonio. Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance. // *Antioxidants & redox signaling*. 21 (2014); 1766-1801 (pregledni rad, znanstveni).
2. **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Zapletal, Emilija; Jaganjac, Morana; Milković, Lidija; Waeg, G.; Stolc, S.; Žarković, Neven; Borović Šunjić, Suzana. Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal. // *Toxicology in vitro*. 27 (2013), 1; 426-432 (članak, znanstveni).
3. Jaganjac, Morana; Poljak-Blaži, Marija; Schaur, Rudolf Joerg; Žarković, Kamelija; Borović, Suzana; Čipak, Ana; **Cindrić, Marina**; Uchida, Koji; Waeg, Georg; Žarković, Neven. Elevated neutrophil elastase and acrolein-protein adducts are associated with W256 regression. // *Clinical and experimental immunology*. 170 (2012), 2; 178-185 (članak, znanstveni).
4. Jaganjac, Morana; Prah, Iva Ozana; Čipak, Ana; **Cindrić, Marina**; Mrakovčić, Lidija; Tatzber, Franz; Ilinčić, Petar; Rukavina, Vinko; Spehar, Branka; Parlov Vuković, Jelena; Telen, Sanda; Uchida, Koji; Lulić, Zoran; Žarković, Neven. Effects of Bioreactive Acrolein from Automotive Exhaust Gases on Human Cells In Vitro. // *Environmental toxicology*. 27 (2012), 11; 644-652 (članak, znanstveni).
5. Corvino, V.; Marchese, E.; Žarković, Neven; Žarković, Kamelija; **Cindrić, Marina**; Waeg, G.; Michetti, F.; Geloso, M.C. Distribution and Time-Course of 4-Hydroxynonenal, Heat Shock Protein 110/105 Family Members and Cyclooxygenase-2 Expression in the Hippocampus of Rat During Trimethyltin-Induced Neurodegeneration. // *Neurochemical research*. 36 (2011), 8; 1490-1500 (članak, znanstveni).
6. Lovaković, Tomislava; Poljak-Blaži, Marija; Duburs, Gunars; Čipak, Ana; **Cindrić, Marina**; Vigante, Brigita; Bisenieks, Egils; Jaganjac, Morana; Mrakovčić, Lidija; Dedić, Azra; Žarković, Neven. Growth modulation of human cells in vitro by mild oxidative stress and 1, 4-dihydropyridine derivative antioxidants. // *Collegium antropologicum*. 35 (2011), 1; 137-141 (članak, znanstveni).
7. **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Serly, Julianna; Plotniece, Aiva; Jaganjac, Morana; Mrakovčić, Lidija; Lovaković, Tomislava; Dedić, Azra; Soldo, Ivo; Duburs, Gunars; Žarković, Neven; Molnár, József. Reversal of Multidrug Resistance in Murine Lymphoma Cells by Amphiphilic Dihydropyridine Antioxidant Derivative. // *Anticancer research*. 30 (2010), 10; 4063-4070 (članak, znanstveni).
8. Čipak, Ana; Borović, Suzana; Jaganjac, Morana; Bresgen, Nikolaus; Kirac, Iva; Grbeša, Ivana; Mrakovčić, Lidija; **Cindrić, Marina**; Šćukanec-Špoljar, Mira; Gall-Trošelj, Koraljka; Čorić, Marijana; Eckl, Peter; Žarković, Neven. Influence of 4-hydroxynonenal and spleen cells on primary hepatocyte culture and a novel liver-derived cell line resembling hepatocyte stem cells. // *Acta biochimica Polonica*. 57 (2010), 2; 185-191 (članak, znanstveni).

9. Čipak, Ana; Mrakovčić, Lidija; Ciz, Milan; Lojek, Antonin; Mihaylova, Boryana; Goshev, Ivan; Jaganjac, Morana; **Cindrić, Marina**; Sitić, Sanda; Margaritoni, Marko; Waeg, Georg; Balić, Marija; Žarković, Neven. Growth suppression of human breast carcinoma stem cells by lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal and hydroxyl radical-modified collagen. // *Acta biochimica Polonica*. 57 (2010), 2; 165-171 (članak, znanstveni).
10. Ćustović, Zajim; Žarković, Kamelija; **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Jurković, Ilija; Sonicki, Zdenko; Uchida, Koji; Žarković, Neven. Lipid peroxidation product acrolein as a predictive biomarker of prostate carcinoma relapse after radical surgery. // *Free radical research*. 44 (2010); 497-504 (članak, znanstveni).
11. Jaganjac, Morana; Matijević, Tanja; **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Mrakovčić, Lidija; Gubisch, Wolfgang; Žarković, Neven. Induction of CMV-1 promoter by 4-Hydroxy-2-nonenal in human embryonic kidney cells in vitro. // *Acta biochimica Polonica*. 57 (2010), 2; 179-183 (članak, znanstveni).
12. Mrakovčić, Lidija; Wildburger, Renate; Jaganjac, Morana; **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Borović Šunjić, Suzana; Waeg, Georg; Moguš Milanković, Andrea; Žarković, Neven. Lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal as factor of oxidative homeostasis supporting bone regeneration with bioactive glasses. // *Acta biochimica Polonica*. 57 (2010), 2; 173-178 (članak, znanstveni).
13. Gverić-Ahmetašević, Snježana; Borović Šunjić, Suzana; Skala, Hana; Andrišić, Luka; **Štroser, Marina**; Žarković, Kamelija; Škrablin, Snježana; Tatzber, Franz; Čipak, Ana; Jaganjac, Morana; Gverić, Tugomir; Žarković, Neven. Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers. // *Free radical research*. 43 (2009), 4; 376-384 (članak, znanstveni).
14. Ravichandran, Srividhya; Žarković, Kamelija; **Štroser, Marina**; Waeg, Georg; Žarković, Neven; Kalaiselvi, Periandavan. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate. // *International journal of developmental neuroscience*. 27 (2009), 3; 223-231 (članak, znanstveni).

#### Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Sobočanec, Sandra; Balog, Tihomir; Šarić, Ana; Mačak-Šafranko, Željka; **Štroser, Marina**; Žarković, Kamelija; Žarković, Neven; Stojković, Ranko; Ivanković, Siniša; Marotti, Tatjana. Antitumor effect of Croatian propolis as a consequence of diverse sex-related dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) protein expression. // *Phytomedicine*. 18 (2011); 852-858 (članak, znanstveni).
2. Mrakovčić, Lidija; **Cindrić, Marina**; Žarković, Neven; Borović Šunjić, Suzana; Moguš Milanković, Andrea; Wildburger, Renate. In vitro model of bone regeneration with bioactive glass and lipid peroxidation. // *Clinical and Experimental Medical Journal*. 4 (2010); 73-78 (članak, znanstveni).
3. **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Mrakovčić, Lidija; Žarković, Kamelija; Borović, Suzana; Wildburger, Renate; Žarković, Neven. Homeostasis, Stress & Aging. // *Türkiye Klinikleri = Journal of Medical Sciences*. 29 (2009), 5-S1; S3-S5 (pregledni rad, znanstveni).

4. Wildburger, Renate; Mrakovčić, Lidija; **Štroser, Marina**; Andrišić, Luka; Borović Šunjić, Suzana; Žarković, Kamelija; Žarković, Neven. Peroxidation and Age-Associated Diseases-Cause or Consequence?. // Türkiye Klinikleri = Journal of Medical Sciences. 29 (2009); 189-193 (pregledni rad, znanstveni).

#### Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Ćorić, Marijana; Grabarević, Željko; **Štroser, Marina**; Andrišić, Luka; Waeg, Georg; Seiwerth, Sven; Brčić, Luka; Žarković, Neven. 4-Hydroxynonenal in human and animal chronic liver diseases // Abstracts of the 20th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology; u: Acta Clinica Croatica 48 (2009) (S). Zagreb, 2009. 17-17 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

#### Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunar.rec.

1. Žarković, Neven; Ćipak Gasparović, Ana; **Cindrić, Marina**; Waeg, Georg; Borović Šunjić, Suzana; Mrakovčić, Lidija; Jaganjac, Morana; Kolenc, Danijela; Andrišić, Luka; Gverić Ahmetašević, Snježana; Katušić, Ana; Cherkas, Andriy; Jurić Sekhar, Gordana; Wildburger, Renate; Žarković, Kamelija. 4-Hydroxynonenal-protein adducts as biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and oxidative homeostasis // Free Radicals Health and Lifestyle: contributions from the Europe Meeting of the Society for Free Radical Research / Caporossi, Daniela; Pigozzi, Fabio; Sabatini Stefania (ur.). Rim: Medimond International Proceedings, 2009. 37-44 (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

#### Radovi u zbornicima skupova bez recenzije

1. Žarković, Kamelija; **Cindrić, Marina**; Kolenc, Danijela; Žarković, Neven. 4-Hydroxynoneal as second messenger of free radicals in the blood-brain barrier // (predavanje, objavljeni rad, znanstveni).

#### Sažeci u zbornicima skupova

1. **Cindrić, Marina**; Tartaro Bujak, Ivana; Ćipak, Ana; Milković, Lidija; Mihaljević, Branka; Žarković, Neven; Žarković, Kamelija. 4-Hydroxynonenal and linoleic acid micelles can modulate permeability of an in vitro blood-brain barrier // (**predavanje**, sažetak, znanstveni).
2. **Cindric, Marina**; Milkovic, Lidija; Balic, Marija; Dandachi, Nadia; Cipak, Ana. Hydroxynonenal modified extracellular matrix affects colonospheres growth // (poster, sažetak, znanstveni).
3. Cipak, Ana; Milkovic, Lidija; Ciz, Milan; Lojek, Antonin; Mihaylova, Boryana; Goshev, Ivan; Sitic, Sanda; Jaganjac, Morana; **Cindric, Marina**; Balic, Marija; Zarkovic, Neven. Oxidized collagen and 4-hydroxynonenal cause growth suppression of human breast cancer stem cells // Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells. 2012. (poster, sažetak, znanstveni).
4. Milkovic, Lidija; Wildburger, Renate; Jaganjac, Morana; **Cindric, Marina**; Cipak, Ana; Borovic Sunjic, Suzana; Waeg, Georg; Mogus Milankovic, Andrea; Zarkovic, Kamelija; Zarkovic, Neven. Lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal as a factor of oxidative homeostasis supporting

- bone regeneration // COST ACTION TD09/05 Epigenetics – Bench to Bedside. 2011. (predavanje, sažetak, znanstveni).
5. **Cindrić, Marina**; Čipak, Ana; Mrakovčić, Lidija; Žarković, Neven; Žarković, Kamelija. 4-Hydroxynonenal modulated cytokine production of in vitro blood-brain barrier // (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  6. Mrakovčić, Lidija; Wildburger, Renate; **Cindrić, Marina**; Borović Šunjić, Suzana; Moguš Milanković, Andrea; Žarković, Neven. Novel in vitro bone regeneration model comprises bioglass, 4-hydroxynonenal and/or protein // (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  7. **Cindric, Marina**; Cipak, Ana; Serly, Julianna; Plotniece, Aiva; Jaganjac, Morana; Mrakovcic, Lidija; Lovakovic, Tomislava; Dedic, Azra; Soldo, Ivo; Duburs, Gunars; Molnar, Jozsef; Zarkovic, Neven. Inhibition of multidrug resistance in murine lymphoma cells by novel dihydropyridine derivative // (poster, sažetak, znanstveni).
  8. Poljak-Blazi, Marija; Vukovic, Tea; Hirsl, Nevenka; Duburs, Gunars; Cipak, Ana; **Cindric, Marina**; Vigante, Brigita; Bisenieks, Egils; Zarkovic, Neven. Growth Modulation of Human Osteosarcoma Cells by Mild Oxidative Stress and Novel Synthetic Antioxidants // (poster, sažetak, znanstveni).
  9. Mrakovčić, Lidija; Borović Šunjić, Suzana; **Štroser, Marina**; Moguš Milanković, Andrea; Žarković, Neven; Wildburger, Renate. Lipid Peroxidation and Bone Regeneration // Abstracts of the The third Integrative Physiology Post-Graduate students conference. (predavanje, sažetak, znanstveni).
  10. Borović Šunjić, Suzana; **Štroser, Marina**; Živković, Emilija; Žarković, Neven. 4-Hydroxynonenal enhances permeability of in vitro intestinal barrier model // Abstracts of the COST Meeting "Oxygen, stress and lipids". (poster, sažetak, znanstveni).
  11. **Štroser, Marina**; Borović Šunjić, Suzana; Živković, Emilija; Stolc, Svorad; Žarković, Neven. In vitro model of intestinal barrier in oxidative stress research // Herman Esterbauer Meeting From Biochemistry to Human Disease: Reactive Oxygen Species & Antioxidants: book of abstracts. (poster, sažetak, znanstveni).