

THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF RHO-KINASE INHIBITION IN 1-METHYL-4-PHENYLPYRIDINIUM (MPP⁺)-INDUCED CELLULAR MODEL OF NEURODEGENERATION

ISPITIVANJE NEUROPROTEKTIVNOG EFEKTA INHIBICIJE RO-KINAZE U ĆELIJSKOM MODELU NEURODEGENERACIJE IZAZVANE 1-METIL-4-FENILPIRIDINIJUMOM (MPP⁺)

Sanja Blagojević¹, Marija Jeremić^{1,2}, Maja Jovanović-Tucović^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Klinički centar Srbije, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Beograd, Srbija

Correspondence: blagojevic2509@gmail.com

Abstract

Introduction: The 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridinium (MPTP) induced model of neurodegeneration in Parkinson's disease (PD) is one of the most commonly used experimental models. This neurotoxic agent, or rather its metabolite MPP⁺, leads to inhibition of mitochondrial complex I, an increase in free radicals' production and ATP depletion, all resulting in cellular demise and death. Rho-kinase is an enzyme involved with numerous cell-regulatory mechanisms, such as cytoskeleton organization, axonogenesis, vesicular transport regulation and apoptosis regulation, which are all important for cell survival.

Aim: Our aim was to investigate the effects of Rho-kinase inhibition on the MPP⁺ induced model of neurodegeneration and the role of Akt and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathways in this process.

Material and methods: The experiments were performed on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. The MTT test was used to measure the viability of the cells after the MPP⁺ and/or Rho-kinase inhibitor, fasudil, treatments. Changes in activation levels, or expression of pAMPK, pAkt, AMPK and Akt, were measured using the immunoblotting method, and the protein levels were quantified by densitometry.

Results: The MPP⁺ caused a dose-dependent decrease in cellular viability, compared to the control group (untreated cells), while fasudil treatment, prior to MPP⁺ exposure, improved cell viability in a dose dependant manner, compared to MPP⁺ treatment. Analysis of activation status of target proteins showed an increase in Akt activation after the fasudil treatment, while the AMPK activation was not significantly changed.

Conclusion: Inhibition of Rho-kinase using fasudil causes a decrease in MPP⁺ induced cell death, which is possibly mediated by an activation of the Akt/PI3K signaling pathway.

Keywords:

Akt,
AMPK,
fasudil,
neurodegeneration,
MPP⁺,
Rho-kinase

Sažetak

Uvod: Model neurodegeneracije indukovano primenom 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridijuma (MPTP) jedan je od najčešće korišćenih modela Parkinsonove bolesti u eksperimentalnim uslovima. Ovo organsko jedinjenje, tj. njegov metabolit MPP⁺, inhibira kompleks I u mitohondrijama i povećava proizvodnju slobodnih radikala, što vodi ka deplekciji adenzin-trifosfata (ATP) i ćelijskoj smrti. Ro-kinaza je enzim uključen u regulaciju važnih procesa u ćeliji, kao što su organizacija citoskeleta, aksonogeneza, regulacija vezikularnog transporta i apoptoza, koji su značajni za ćelijsku funkciju i preživljavanje.

Cilj: Cilj ovog rada je bio ispitivanje efekta inhibicije Ro-kinaze u ćelijskom modelu neurodegeneracije izazvane MPP⁺-om, kao i uloga regulatornih kinaza i to protein kinaze B/Akt i adenzin monofosfatom aktivirane kinaze (AMPK) u tom procesu.

Materijal i metode: Eksperimenti su rađeni na ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Za određivanje vijabiliteta ćelija, nakon tretmana MPP⁺-om sa/bez prisustva inhibitora Ro-kinaze, fasudila, korišćen je MTT test. Imunoblot metoda je korišćena za određivanje nivoa aktivacije proteina uključenih u kontrolu metaboličkih puteva, AMPK i Akt, a kvantifikacija je urađena denzitometrijom.

Rezultati: Pokazano je da tretman MPP⁺-om dovodi do pada vijabiliteta ćelija neuroblastoma u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije, dok se u uslovima pretretmana fasudilom uočava dozno zavisni porast vijabiliteta u odnosu na tretman samo MPP⁺-om. Ispitivanje ciljnih proteina je pokazalo da u uslovima tretmana fasudilom i MPP⁺-om dolazi do značajanog porasta u aktivaciji Akt, dok nema značajnih promena u aktivaciji AMPK.

Zaključak: Inhibicija Ro-kinaze upotrebom fasudila poboljšava preživljavanje ćelija neuroblastoma u uslovima citotoksičnog dejstva MPP⁺ neurotoksina i dovodi do aktivacije Akt/PI3K signalnog puta.

Ključne reči:

Akt,
AMPK,
fasudil,
neurodegeneracija,
MPP⁺,
Ro-kinaza

Uvod

Parkinsonova bolest (PB) se javlja u 2% populacije starije od 60 godina, čineći je drugom po učestalosti neurodegenerativnom bolešću i najčešći je uzrok parkinsonizma, sindroma koji karakterišu bradikinezija, rigor, tremor u miru i posturalna nestabilnost (1,2). Iako je patofiziološki mehanizam oštećenja i smrti dopaminergičkih (DA) neurona u PB i dalje nedovoljno razjašnjen, identifikovani su neki od procesa koji dovode do ćelijske smrti, uključujući oksidativni stres, poremećenu funkciju mitohondrija, nastanak agregata proteina alfa sinukleina (ASYN), kao i poremećaj funkcije ćelijskih sistema uključenih u homeostazu proteina (3,4).

Važan korak u istraživanju etiopatogeneze parkinsonizma i molekularnih mehanizama koji leže u osnovi oštećenja DA neurona omogućilo je slučajno otkriće meperidinskog analoga 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Zanimljivo je da je MPTP model jedan od retkih za koji su prva saznanja dobijena u humanoju populaciji, kada se MPTP našao kao primesa sintetskog heroina, što je za posledicu imalo brz razvoj uznapredovale kliničke slike parkinsonizma kod nekoliko korisnika narkotika (5). Usledila su brojna istraživanja, tokom kojih je ustanovljeno da MPTP prolazi krvno-moždanu barijeru, kao i da se u astrocitima dejstvom enzima monoamino-oksidge B (MAO-B) metaboliše u toksin 1-metil-4-fenilpiridinijum (MPP⁺) (6-9), koji dalje selektivno ulazi u DA neurone posredstvom dopaminskog transportera (DAT) (6), gde inhibira kompleks I mitohondrijalnog respiratornog lanca i indukuje porast slobodnih radikala. Oni inhibiraju tirozin

hidroksilazu, što dovodi do smanjene sinteze dopamina i poremećaja u neurotransmisiji (10,11). Oksidativno oštećenje izazvano MPP⁺-om dovodi do disfunkcije mitohondrija, sledstvenog pada u sintezi adenzin-trifosfata (ATP), oštećenja i smrti DA neurona (12). Kada se u obzir uzme činjenica da je sinteza dopamina sama po sebi proces u kome nastaju slobodni radikali, kao i da u ovim neuronima prirodno postoje niža aktivnost enzima antioksidativne zaštite i veća zastupljenost gvožđa, jasno je zašto su upravo DA neuroni posebno vulnerabilni kada je u pitanju oksidativni stres (13).

Ro (engl. *Rho*) protein spada u grupu malih guanozin-trifosfat (GTP) vezujućih proteina i ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskih funkcija i to preko regulacije svog nishodnog efektor, Ro-kinaze (engl. *Rho-associated kinase*). Ovaj enzim učestvuje u prenosu ćelijskih signala i regulaciji ćelijskih funkcija poput organizacije citoskeleta, aksonogeneze, regulacije vezikularnog transporta, apoptoze i mnogih drugih (14-16). Pokazano je da je Ro-kinaza vrlo rasprostranjena u centralnom nervnom sistemu (CNS) i da se njena ekspresija povećava sa starenjem (16,17). Smatra se da njena povećana ekspresija negativno utiče na proces oporavka oštećenih neurona u CNS-u tako što inhibira regeneraciju aksona u oštećenim nervnim ćelijama (18). To je razlog zbog čega njena inhibicija predstavlja potencijalno novi pristup u neuroprotekciji (19,20). Fasudil, selektivni inhibitor Ro-kinaze (21), uveden je kao antagonist kalcijumovih (Ca²⁺) kanala i kao vazodilatator u cerebrovaskularnim poremećajima (22), a danas se istražuje njegova potencijalna primena u različitim metaboličkim poremećajima i neurodegenerativnim bolestima (19,20,23).

Osim što inhibira Ro-kinazu, pokazano je da fasudil aktivira LKB1 (engl. *liver kinase B1*) u skeletnim mišićima, a ova kinaza zatim fosforiliše i aktivira adenozin monofosfatom aktiviranu protein kinazu (AMPK) (23). Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza centralni je unutarćelijski energetska senzor čija je osnovna funkcija održavanje energetske homeostaze u ćeliji. Aktivira se pri promeni energetske stanja ćelije, usled pada ATP-a i porasta adenozin-monofosfata (AMP) ili adenozin-difosfata (ADP), kao i uslovima povećane koncentracije unutarćelijskog kalcijuma (24). Aktivacija AMPK dovodi do inhibicije anaboličkih i promocije kataboličkih procesa u ćeliji, kako bi održala energetska homeostazu ćelije (24). Kako u uslovima oštećenja DA neurona u PB dolazi do disfunkcije kompleksa I (25) i posledične deplecije ATP-a, moguće je da dolazi i do aktivacije AMPK, sa ciljem očuvanja normalnog energetskeg naboja i sprečavanja smrti neurona.

Akt (protein kinaza B) je serin-treonin kinaza koja učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije, apoptoze i metabolizma glikogena. Pored toga, pokazano je da u CNS-u stimuliše grananje i obnavljanje oštećenih aksona (26–28). S druge strane, *post mortem* analize moždanog tkiva su pokazale da u uzorcima pacijenata obolelih od PB postoji značajno smanjenje aktivnosti Akt signalnog puta u odnosu na uzorke dobijene od zdravih kontrola (29,30). Pokazano je da inhibicija Ro-kinaze dovodi do aktivacije Akt/PI3K signalnog puta (21), koja je u modelima neurodegeneracije izazvanim MPP⁺-om imala protektivno dejstvo (31–33), što ukazuje na značaj Akt/PI3K signalnog puta u mogućem neuroprotektivnom delovanju inhibitora Ro-kinaze, fasudila.

Cilj ovog rada je bio da se ispita efekat inhibicije Ro-kinaze na preživljavanje neurona u neurotoksičnom oštećenju izazvanom primenom MPP⁺-a, kao i uloga kinaza AMPK i Akt u tom procesu

Materijal i metode

Za potrebe eksperimenata korišćena je ćelijska linija humanog neuroblastoma, SH-SY5Y. Ćelije su gajene na 37 °C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% ugljen-dioksida (CO₂), u medijumu F12/MEM (1:1), obogaćenom fetalnim goveđim serumom (10%), L-glutaminom (2 mM), neesencijalnim aminokiselinama (1% NEAA) i smešom antibiotik/antimikotik (1%). Kao pretretman dodat im je fasudil (u koncentracijama 12,5 μM, 25 μM i 50 μM za vijabilitet i 50 μM za imunoblot), a nakon 1h tretirane su 2 mM MPP⁺.

MTT test vijabiliteta

Boja MTT (3-(4-5-dimetilazol-2-il)-2-5-difenilte-trazolijum-bromid) vezuje se za mitohondrije i u njima se redukuje u nerastvorni formazan. Pošto je redukcija formazana moguća samo u funkcionalnim mitohondrijama, intenzitet dobijene boje direktno je proporcionalan mitohondrijalnoj aktivnosti ćelija, odnosno broju živih ćelija,

što je očitavano na 570 nm korišćenjem automatskog čitača mikrotitracione ploče (*TECAN Sunrise*, Švajcarska).

Za potrebe testa vijabiliteta ćelije su postavljene u mikrotitracione ploče sa 96 bunarića, sa gustinom od 2 x 10⁴ ćelija/bunarić, a tretmani su rađeni u triplicatu. Ćelije su inkubirane u prisustvu odgovarajućih tretmana tokom 24h, nakon čega je rađen MTT test. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na kontrolnu grupu, koju su činile ćelije bez tretmana, čiji je vijabilitet arbitrarno određen kao 100%.

Tehnika imunoblot (Western blot)

Imunoblot tehnika korišćena je za detekciju eventualne promene u nivou fosforilacije AMPK i Akt kinaza, kao pokazatelja njihove aktivacije prilikom primene fasudila, u SH-SY5Y ćelijskoj liniji tretiranoj MPP⁺-om.

Za ovu metodu ćelije su postavljene u Petri šolje sa gustinom 3 x 10⁶. Tretirane su MPP⁺-om (2 mM), a kao pretretman (1h pre MPP⁺) dodat je fasudil (50 μM). Nakon 8h ćelije su lizirane na ledu puferom za liziranje (engl. *lysis buffer*) (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM fenilmetilsulfonil-fluorid i inhibitori proteaza), centrifugirane na 14000 g, 15 min na 4 °C, nakon čega je pokupljen supernatant.

Nakon liziranja ćelija određivana je koncentracija proteina u svakom uzorku metodom po Bradfordu (34), a na osnovu standardne krive, dobijene pomoću rastvora albumina poznatih koncentracija. Proteini iz uzoraka ćeljskih lizata razdvojeni su elektroforezom na 10% gelu od poliakrilamida, u prisustvu natrijum-dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS-PAGE). Nakon elektroforeze, proteini su sa gela preneti na nitrocelulozne membrane (*Bio-Rad*, Francuska), koje su zatim inkubirane u rastvoru primarnog antitela za fosfo-Akt (1:1000), Akt (1:1000), fosfo-AMPK (1:1000), AMPK (1:1000) i β-aktin (1:2000) (*Cell Signaling Technology*, SAD), a zatim, nakon ispiranja i u rastvoru sekundarnog antitela (engl. *Anti-rabbit IgG-HRP At*, 1:5000, *Jackson IP Laboratories*, SAD). Vizuelizacija je izvršena nalivanjem hemiluminiscentnog reagensa na membrane (*Amersham Pharmacia Biotech*, SAD).

Snimanje hemiluminiscentnog signala, kvantifikacija i denzitometrijska analiza odrađeni su u softverskom paketu *ImageLab* (*BioRad*, Francuska). Kvantifikacija je rađena na osnovu srednje vrednosti denzitometrija iz dva odvojena eksperimenta i njome je određen nivo fosforilisanih formi AMPK i Akt proteina u odnosu na ukupan nivo proteina i potvrđena značajnost u promeni njihove zastupljenosti. Beta aktin je korišćen kao pokazatelj ukupne količine proteina nanete na gel za svaki uzorak. Analiza je urađena za uzorke iz dva nezavisna tretmana.

Statistička analiza

Za analizu rezultata korišćen je Studentov t-test za dva nezavisna uzorka. Kao kriterijum značajnosti uzeto je p < 0,05 (statistički značajna razlika) i p < 0,01 (visoko statistički značajna razlika).

Rezultati

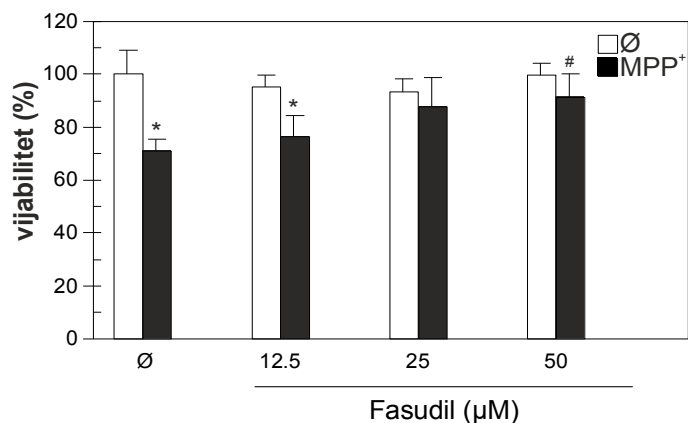
Efekti inhibicije Ro-kinaze na toksični efekat MPP⁺-a

U cilju ispitivanja neuroprotektivnog delovanja inhibicije Ro-kinaze na ćelije neuroblastoma, u uslovima odsustva ili prisustva neurotoksina MPP⁺, ćelije su tretirane fasudilom (12,5 μM, 25 μM i 50 μM) i MPP⁺-om (2 mM) u trajanju od 24h. Rezultati su pokazali da tretman fasudilom nije doveo do promene u vijabilitetu ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije. Primena MPP⁺-a (2 mM) uzrokovala je statistički značajan pad vijabiliteta ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Pretretman fasudilom (1h) je, međutim, doveo do dozno zavisnog porasta vijabiliteta ćelija tretiranih MPP⁺-om u odnosu na ćelije izložene samo MPP⁺-u, koji je bio statistički značajan u uslovima koncentracije fasudila od 50 μM (**grafikon 1**).

Ovi rezultati pokazuju da fasudil ima neuroprotektivni efekat u neurotoksičnom oštećenju izazvanom MPP⁺-om.

Ispitivanje uloge AMPK i Akt u neuroprotektivnom efektu fasudila

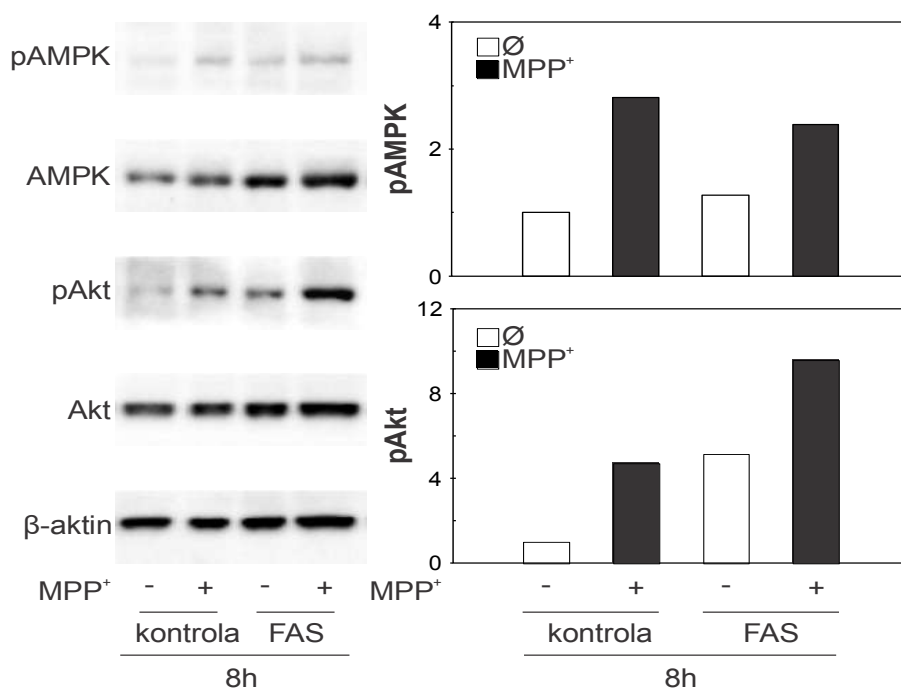
Aktivnost enzima praćena je na osnovu zastupljenosti fosforilisanih formi (pAMPK i pAkt) u odnosu na ukupni sadržaj enzima u ćeliji (AMPK i Akt), što je urađeno primenom imunoblota u uzorcima kontrolnih ćelija, ćelija tretiranih fasudilom (50 μM) i MPP⁺-om (2 mM) i u uslovima kombinovanog tretmana (fasudil i MPP⁺). Rezultati pokazuju porast zastupljenosti fosforilisane forme Akt pri tretmanu MPP⁺-om, kao i tretmanu fasudilom. Međutim, u uzorku ćelija koje su bile izložene kombinovanom tretmanu došlo je do porasta aktivacije Akt, ne samo u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije već i u odnosu na ćelije



Grafikon 1. Analiza vijabiliteta SH-SY5Y ćelija MTT testom nakon pretretmana fasudilom i tretmana MPP⁺-om (2 mM) nakon 24h. Vijabilitet ćelija je predstavljen kao procenat živih ćelija u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 nezavisna uzorka ± SD (*označava p < 0,05 u odnosu na kontrolu koju čine ćelije na koje nije primenjen tretman, dok # označava p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane samo MPP⁺-om).

tretirane samo MPP⁺-om ili fasudilom (**slika 1**). Ovi rezultati pokazuju da primena fasudila dovodi do dodatne aktivacije Akt signalnog puta, što ukazuje na njegovu moguću ulogu u pokazanom neuroprotektivnom delovanju fasudila u uslovima primene MPP⁺-a.

Ispitivanje nivoa aktivnosti AMPK u navedenim tretmanima pokazalo je da dolazi do porasta nivoa fosfo-AMPK u tretmanu MPP⁺-om, dok primena fasudila nije dovela do značajne promene aktivnosti AMPK u odnosu na kontrolne ćelije, niti na ćelije tretirane samo MPP⁺-om (**slika 1**). Ovaj rezultat ukazuje da neuroprotektivno delovanje fasudila nije povezano sa aktivacijom AMPK.



Slika 1. Imunoblot analiza ekspresije AMPK i Akt, i aktiviranih, fosforilisanih formi AMPK (pAMPK) i Akt (pAkt) u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y nakon tretmana MPP⁺-om (2mM) i/ili fasudilom (50 μM), u trajanju od 8h.

Diskusija

Molekularni mehanizmi oštećenja dopaminergičkih neurona u Parkinsonovoj bolesti predstavljaju predmet mnogih istraživanja. U ovim ispitivanjima se koristi veliki broj modela, među kojima je i model oštećenja ćelija toksinom MPTP i njegovim aktivnim metabolitom MPP⁺ koji smo mi koristili. U našim eksperimentima, kao što je prethodno pomenuto, korišćene su ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y, koje eksprimiraju dopaminergičke transportere, pa je preko DAT omogućeno preuzimanje MPP⁺-a u ćelije (35,36). Nakon ulaska toksina u ćeliju dolazi do njegovog transporta u mitohondrije, inhibicije kompleksa I respiratornog lanca i porasta produkcije slobodnih radikala, oštećenja autofagije i sistema proteazoma, što odgovara oštećenjima koja se sreću u PB (4,36).

Neurotoksin MPP⁺ se u eksperimentalnim uslovima koristi i za indukciju ekspresije Ro-kinaze (15). Porast aktivnosti ovog enzima ima za posledicu ubranu aksonsku degeneraciju, koja se ogleda u skraćanju aksona (19,20), a ostvarena je modulacijom lakog lanca miozina, fosforilacijom LIM-kinaze i drugim mehanizmima (14). Osim degeneracije aksona, Ro-kinaza ima uticaja i na procese apoptoze i neuroinflamacije (37). U brojnim studijama je pokazano da inhibicija ovog enzima dovodi do smanjenog propadanja ćelija (18–21).

Prethodno je pokazano da MPP⁺ izaziva dozno zavisnu smrt SH-SY5Y ćelija (31). Testom MTT pokazali smo da primenjena doza MPP⁺-a izaziva značajan pad vijabilnosti ćelija. Primenom inhibitora Ro-kinaze, fasudila, pokazano je da dolazi do dozno zavisnog porasta vijabilnosti ćelija, što se slaže se studijom iz 2012. godine, u kojoj je efekat fasudila na dopaminergičke neurone testiran u *in vitro* i *in vivo* modelima (20). Neuroprotektivni efekat fasudila je najverovatnije posledica aktivacije i interakcije nekoliko signalnih puteva (18). Mi smo, međutim, posmatrali dva signalna puta, Akt/PI3K i AMPK, za koje je u prethodnim istraživanjima pokazano da dovode do spasavanja ćelija u modelima neurotoksičnog oštećenja dopaminergičkih neurona primenom MPP⁺-a ili 6-OHDA (31,32,38).

Istraživanje iz 2014. godine pokazalo je da u ćelijama skeletnih mišića i hepatocitima miševa pod uticajem fasudila dolazi do aktivacije AMPK signalnog puta, ali nema podataka o uticaju fasudila na aktivaciju AMPK u ćelijama nervnog sistema (23). U našem modelu oštećenja neurona pokazano je da nema njegove značajne aktivacije i da neuroprotektivni efekat fasudila ne uključuje aktivaciju AMPK.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je potencijalni mehanizam neuroprotektivnog dejstva fasudila aktivacija Akt/PI3K signalnog puta, što je u skladu sa rezultatima iz prethodnih studija u modelima PB i ishemijskog oštećenja CNS-a (20,21). Akt se smatra jednim od glavnih regulatora ćelijskog rasta, proliferacije i apoptoze (26,27). Na modelu ishemijske bolesti mozga pokazano je da inhibicija Ro-kinaze dovodi do inhibicije PTEN (engl. *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome*

10) (21), najvažnijeg inhibitora signalnih puteva koji deluju preko fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfata, uključujući i Akt (39). Moguće je da je i u našem modelu inhibicija PTEN-a bila razlog veće zastupljenosti fosfo-Akt u ćelijama tretiranim fasudilom, ali su neophodna dalja istraživanja kako bi se to i dokazalo. Uz to, postoji mogućnost i da je protektivni efekat aktivacije Akt kinaze povezan sa inhibicijom proapoptoskog proteina Bad (proteinski agonist ćelijske smrti udružen sa Bcl2, engl. *Bcl2 associated agonist of cell death*), koji nakon fosforilacije podleže konformacionoj promeni i otpušta svoje antiapoptotske ekvivalente proteina B-ćelijskog limfoma (engl. *B-cell lymphoma*, Bcl), konkretno proteini Bcl2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) i Bcl-X (engl. *BCL2 like protein 1*). Osim toga, smatra se da Akt ima sposobnost direktne fosforilacije i inaktivacije kaspaze 9. Pored ovih puteva, Akt može da reguliše inhibiciju apoptoze i na transkripcionom nivou, preko nuklearnog faktora- κ B (engl. *nuclear factor κ B*, NF- κ B), p53, Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*) i drugih transkripcionih faktora (26,27). Bilo koji od ovih Akt zavisnih puteva regulacije smrti ćelija može biti deo mehanizma kojim inhibicija Ro-kinaze dovodi do poboljšanja vijabilnosti ćelija u uslovima njihovog oštećenja delovanjem MPP⁺.

Zaključak

Inhibitor Ro-kinaze, fasudil, dovodi do poboljšanja preživljavanja ćelija nakon tretmana neurotoksinom MPP⁺, posredstvom Akt/PI3K signalnog puta. Dalja istraživanja su potrebna kako bi se detaljnije ispitao mehanizam neuroprotektivnog efekta inhibicije Ro-kinaze.

Literatura

1. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139(S1):216–31.
2. Apostolski Slobodan, Bulat Petar, Bumbaširević Ljiljana, Cerovac Nataša DN. *Neurologija za studente. drugo.* Kostić Vladimir, Vojdović Nikola PI, editor. Beograd; 2018.
3. Kumar V, Abbas AA, Fausto N, Mitchell RN. *Robinsove osnovne patologije.* 8. Boričić I, Đuričić S, editors. Beograd: Data Status; 2010. 893,894.
4. Keane H, Ryan BJ, Jackson B, Whitmore A, Wade-Martins R. Protein-protein interaction networks identify targets which rescue the MPP⁺ cellular model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2015; 5(1):17004.
5. Langston J, Ballard P, Tetrud J, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* (80-). 1983; 219(4587):979–80.
6. Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP⁺. *Neurosci Lett.* 1987; 75(3):323–8.
7. Brooks WJ, Jarvis MF, Wagner GC. Astrocytes as a primary locus for the conversion MPTP into MPP⁺. *J Neural Transm.* 1989; 76(1):1–12.
8. Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett.* 1984; 48(1):87–92.
9. Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 1984; 311(5985):464–7.

10. Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem.* 1986; 261(17):7585–7.
11. Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, et al. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxyne and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95(13):7659–63.
12. Ito K, Eguchi Y, Imagawa Y, Akai S, Mochizuki H, Tsujimoto Y. MPP⁺ induces necrostatin-1- and ferrostatin-1-sensitive necrotic death of neuronal SH-SY5Y cells. *Cell Death Discov.* 2017; 3:17013.
13. Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007; 83:507-20.
14. Labandeira-Garcia JL, Rodríguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Borrajo A, Dominguez-Mejide A, Guerra MJ. Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration. *Neurosci.* 2015;21(6):616–29.
15. Villar-Cheda B, Dominguez-Mejide A, Joglar B, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiol Dis.* 2012; 47(2):268–79.
16. Hashimoto R, Nakamura Y, Kosako H, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M, et al. Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 263(2):575–9.
17. Komagome R, Kimura K, Saito M. Postnatal changes in Rho and Rho-related proteins in the mouse brain. *Jpn J Vet Res.* 2000; 47(3–4):127–33.
18. Zhao Y, Zhang Q, Xi J, Li Y, Ma C, Xiao B. Multitarget intervention of Fasudil in the neuroprotection of dopaminergic neurons in MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2015; 353(1–2):28–37.
19. Koch JC, Tönges L, Barski E, Michel U, Bähr M, Lingor P. ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death Dis.* 2014; 5(5):e1225–e1225.
20. Tonges L, Frank T, Tatenhorst L, Saal KA, Koch JC, Szego EM, et al. Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain.* 2012; 135(11):3355–70.
21. Wu J, Li J, Hu H, Liu P, Fang Y, Wu D. Rho-Kinase Inhibitor, Fasudil, Prevents Neuronal Apoptosis via the Akt Activation and PTEN Inactivation in the Ischemic Penumbra of Rat Brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 32(7):1187–97.
22. Sako K, Tsuchiya M, Yonemasu Y, Asano T. HA1077, a novel calcium antagonistic antivasospasm drug, increases both cerebral blood flow and glucose metabolism in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 1991;209(1–2):39–43.
23. Noda K, Nakajima S, Godo S, Saito H, Ikeda S, Shimizu T, et al. Rho-Kinase Inhibition Ameliorates Metabolic Disorders through Activation of AMPK Pathway in Mice. Claret M, editor. *PLoS One.* 2014; 9(11):e110446.
24. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2017; 45:31-7.
25. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP. Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. *J Neurosci.* 2006; 26(19):5256–64.
26. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell.* 2007; 129(7):1261–74.
27. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(1):59-71.
28. Ries V, Cheng HC, Baohan A, Kareva T, Oo TF, Rzhetskaya M, et al. Regulation of the postnatal development of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo by Akt/protein kinase B. *J Neurochem.* 2009; 110(1):23-33.
29. Malagelada C, Jin ZH, Greene LA. RTP801 Is Induced in Parkinson's Disease and Mediates Neuron Death by Inhibiting Akt Phosphorylation/Activation. *J Neurosci.* 2008;28(53):14363–71
30. Greene LA, Levy O, Malagelada C. Akt as a victim, villain and potential hero in Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 31(7):969-78.
31. Jovanovic-Tucovic M, Harhaji-Trajkovic L, Dulovic M, Tovilovic-Kovacevic G, Zogovic N, Jeremic M, et al. AMP-activated protein kinase inhibits MPP⁺-induced oxidative stress and apoptotic death of SH-SY5Y cells through sequential stimulation of Akt and autophagy. *Eur J Pharmacol.* 2019; 863:172677.
32. Aleyasin H, Rousseaux MWC, Marcogliese PC, Hewitt SJ, Irrcher I, Joselin AP, et al. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(7):3186–91.
33. Kim C, Park S. IGF-1 protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway. *Endocr Connect.* 2018; 7(3):443–55.
34. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994; 32:9-15.
35. Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine β-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 290(2):503–10.
36. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017; 12(1):1–11.
37. Zhao Y, Zhang Q, Xi J, Xiao B, Li Y, Ma C. Neuroprotective effect of fasudil on inflammation through PI3K/Akt and Wnt/β-catenin dependent pathways in a mice model of Parkinson's disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(3):2354–64.
38. Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, Stefanis L, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, et al. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis.* 2014; 63:1–11.
39. Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal.* 2002; 14(4):285–95.