

---

Aleksa Mičić

## Efekat hlorogenske kiseline na ćelijske linije mikroglije BV-2 i neuroblastoma SH-SY5Y tretirane toksičnim koncentracijama kofeina

---

*Kofein i hlorogenska kiselina su jedinjenja veoma zastupljena u biljnim napicima i smatraju se aktivnim supstancama sa širokim spektrom dejstva. U ranijim istraživanjima pokazano je dozno-zavisno citoprotektivno, ali i citotoksično dejstvo ovih jedinjenja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje efekta hlorogenske kiseline na ćelijske linije tretirane toksičnim dozama kofeina. Za istraživanje su odabrane ćelijske linije mikroglije BV-2 i neuroblastoma SH-SY5Y kao modeli centralnog nervnog sistema. Citotoksičnost je ispitivana kroz merenje mitohondrijske aktivnosti MTT testom i vijabilnosti ćelija kristal violet testom. Kofein je ispoljio citotoksičan efekat na obe ćelijske linije. Hlorogenska kiselina nije pokazala značajan efekat na ćelijsku liniju SH-SY5Y. Na ćelije mikroglije hlorogenska kiselina nije imala direktan efekat u smislu smanjenja citotoksičnosti uzrokovane kofeinom. Međutim, pri srednjim primenjenim koncentracijama kofeina (0.5 mM i 1 mM) značajno je povećavala aktivnost mitohondrijskih enzima.*

---

### Uvod

Kofein je alkaloid i predstavlja jednu od najčešće konzumiranih psihoaktivnih supstanci. (Filament *et al.* 1968; Jang *et al.* 2002). Kod čoveka, kofein, kao antagonist adenozienskog receptora, stimuliše rad centralnog nervnog sistema, ubrzava srčanu frekvenciju i frekvenciju disanja i deluje kao diuretik (Shlonsky *et al.* 2003; Minić 2013). Konzumacija kofeina pove-

zana je sa povišenom koncentracijom holesterola u krvi, povećanom incidencom dijabetesa tipa 2, koronarnih bolesti i karcinoma (Farah *et al.* 2006). U ranijim istraživanjima pokazano je da kofein ima citotoksično dejstvo na nervne ćelije, kroz pokretanje apoptoze, aktivaciju mehanizma autofagije i zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Saiki *et al.* 2011; Bavari *et al.* 2015). Kofein je blago citotoksičan pri koncentraciji od 0.5 mM, dok sa povećanjem koncentracije citotoksičnost kofeina raste (Jang *et al.* 2004). Pri koncentraciji od 1 mM kofein značajno smanjuje membranski potencijal mitohondrija, dok sa povećanjem koncentracije preko 5 mM, dolazi do dezintegracije membrana mitohondrija (Saiki *et al.* 2011). Poremećaji u radu mitohondrijskih membrana mogu dovesti do smanjene mitohondrijske aktivnosti, a zatim i smrti ćelija (Bavari *et al.* 2015).

Hlorogenska kiselina je estar kafeične kiseline i (-)-hininske kiseline i predstavlja važan biosintetski intermedijer lignina. Zajedno sa kofeinom, hlorogenska kiselina je u velikoj meri zastupljena u biljnim napicima, poput čaja i kafe. (Clifford 2000; Boerjan *et al.* 2003). Istraživanja su pokazala da hlorogenska kiselina ima antioksidativno, antitumorsko i antimutageno dejstvo, kao i da smanjuje rizik od oboljevanja od dijabetesa tipa 2, Parkinsonove i Alchajmerove bolesti (Yi-Fang 2012; Zheng *et al.* 2014).

Prema Miyamae *et al.* (2012) citoprotektivno dejstvo hlorogenske kiseline je dozno-zavisno i manifestuje se pri koncentracijama manjim od 100 µM. Pri koncentracijama većim od 100 µM, efekat hlorogenske kiseline je citotoksičan.

U velikom broju istraživanja je testirano citotoksično i citoprotektivno dejstvo kofeina i hlorogenske kiseline pojedinačno. Međutim,

---

*Aleksa Mičić (1998), Kragujevac, Josifa Šnersona 4/I-25, učenik 3. razreda Druge kragujevačke gimnazije*

**MENTORI:**

*Anđelka Isaković, Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

*Bojana Mičić, Istraživačka stanica Petnica*

kombinovani efekat ovih supstanci nije bio ispitivan.

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita efekat hlorogene kiseline na aktivnost i proliferaciju ćelijskih linija mikroglije BV-2 i neuroblastoma SH-SY5Y tretiranih toksičnim koncentracijama kofeina.

## Materijal i metode

**Gajenje i tretman ćelija.** Kao model nervnog sistema, korišćene su ćelijske linije neuroblastoma SH-SY5Y i mikroglije BV-2. Ćelijska linija neuroblastoma dobijena je sa Instituta za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a ćelijska linija mikroglije dobijena je sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Ćelije su gajene na temperaturi od 37°C pri vlažnosti vazduha od 95% i koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%. Korišćen je RPMI medijum (Biowest, Nemačka) sa dodatkom 1% Penicilin-Streptomycin smeše (Biowest, Nemačka) i 10% fetalnog govedeg seruma (Biotest, Nemačka).

Kofein je rastvaran u destilovanoj vodi, a hlorogenska kiselina u dimetil sulfoksidu (DMSO). Prema Jang i saradnicima (2004), odabrane su koncentracije kofeina koje se kreću od blago toksične prema veoma toksičnoj (0.5 mM, 1 mM i 10 mM). Hlorogenska kiselina se u dosadašnjim ispitivanjima pokazala kao citoprotektivna u koncentracijama do 100 µM pa su testirane sledeće koncentracije: 1 µM, 10 µM i 100 µM (Miyamae *et al.* 2012).

Ćelije su gajene u T75 flaskovima (Nunc, Thermo Fisher Scientific, SAD). Za postavljanje eksperimenta korišćene su mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (Brand, Nemačka). Eksperiment je postavljen u duplikatu. Zasejavano je po 10 000 ćelija po bunariću.

Nakon izlaganja ćelija tretmanu u trajanju od 24 h, urađeni su MTT i Kristal violet test.

**MTT test.** Odliven je medijum sa tretmanom. Ćelije su isprane PBS-om nakon čega je u bunariće dodato po 100 µL rastvora MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) koncentracije 0.5 mg/mL. Nakon inkubacije od 120 minuta na 37°C, boja je odlivena, a u svaki bunarić dodato je po 200 µL DMSO-a. Očitane su apsorbance na talasnoj dužini od 540 nm (Thermo Multiskan Ex, Nemačka).

**Kristal violet test.** Nakon fiksacije metanolom od 20 minuta, metanol je odliven, a u bunariće je dodato po 100 µL 0.4% rastvora kristal violet boje. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37°C, boja je odlivena, a u svaki bunarić je dodato po 200 µL 33% sirćetne kiseline. Apsorbance su očitane na talasnoj dužini od 540 nm (Thermo Multiskan Ex, Nemačka).

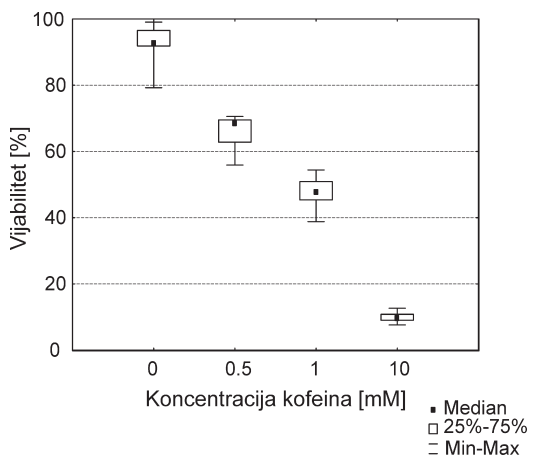
## Rezultati i diskusija

Kofein je u svim testiranim koncentracijama pokazao toksičan efekat koji se ogledao u smanjenju broja ćelija kod ćelijske linije SH-SY5Y (slika 1) i BV-2, kao i u smanjenju mitohondrijske aktivnosti kod obe ćelijske linije (rezultati nisu prikazani).

Prema Bavari i saradnicima (2015) kofein indukuje apoptozu povećanjem produkcije slobodnih radikala, smanjenjem nivoa glutationa (GSH) i povećanjem aktivnosti kaspaze-3.

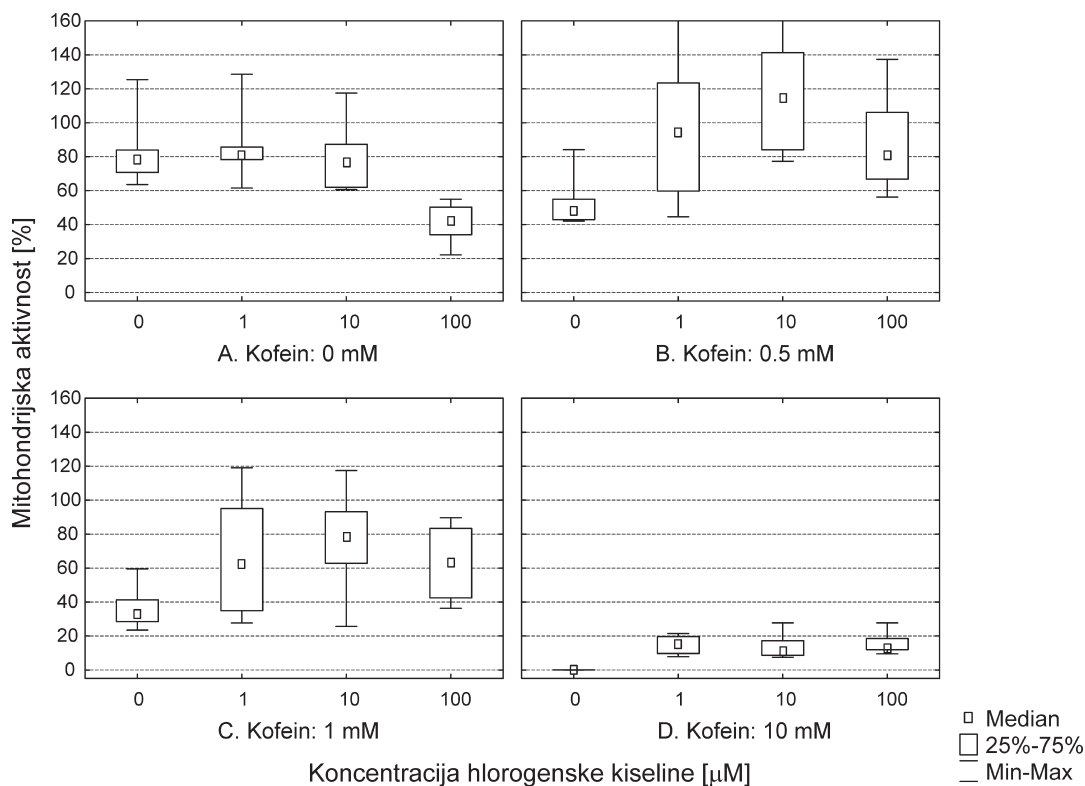
Direktan efekat, u smislu smanjenja citotoksičnosti kofeina, hlorogenska kiselina nije pokazala ni u jednoj testiranoj koncentraciji, ni na jednoj od ispitivanih ćelijskih linija (rezultati nisu prikazani).

Na ćelijskoj liniji mikroglije BV-2, pri tretmanu srednjim testiranim koncentracijama kofeina (0.5 mM i 1 mM) hlorogenska kiselina je



Slika 1. Vijabilitet ćelijske linije neuroblastoma SH-SY5Y pri tretmanu kofeinom

Figure 1. Effects of caffeine on viability of SH-SY5Y cell line



Slika 2. Mitohondrijska aktivnost ćelijske linije mikroglije BV-2

Figure 2. Mitochondrial activity of microglia BV-2 cell line

značajno povećavala aktivnost mitohondrijskih enzima (slika 2). Ranijim istraživanjima pokazano je da hlorogenska kiselina smanjuje smrtnost nervnih ćelija tako što povećava ekspresiju Bcl-2 i Bcl-xL, proteinskih regulatora koji smanjuju aktivaciju kaspaze-3 (Kim i Lee 2011). Čelije tretirane 1 µM i 10 µM koncentracijama hlorogenske kiseline u kombinaciji sa 0.5 mM kofeinom ispoljile su veću aktivnost nego ćelije u kontrolnoj grupi (slika 2B). Ova pojava se može objasniti time što hlorogenska kiselina indukuje povećanu aktivnost 5' adozin monofosfat-aktivirane proteinske kinaze (AMPK). AMPK je enzim koji povećava energetska aktivnost ćelija, tako što inhibira anaboličke procese, a stimuliše kataboličke procese u ćeliji, poput β-oksidacije masnih kiselina, glikolize i povećanog unosa glukoze (Zheng *et al.* 2014). Pored toga, može se pretpostaviti da Bcl-2 proteinski regulator intere-

aguje sa IP3Rs (intracelularni otpuštajući kanali za kalcijum) i sprečava smanjenje membranskog potencijala mitohondrija izazvano kofeinom (Rizzuto 2009).

Pri najvećoj testiranoj koncentraciji kofeina (10 mM), hlorogenska kiselina nije dovela do povećanja aktivnosti mitohondrijskih enzima (slika 2D).

Tretman hlorogenskom kiselinom nije doveo do značajnih promena u aktivnosti mitohondrijskih enzima, osim pri najvišoj koncentraciji (100 µM), koja se pokazala kao inhibitorna (slika 2A).

## Zaključak

Hlorogenska kiselina nije ispoljila direktan efekat u smislu smanjenja citotoksičnosti izazvane kofeinom, ali je dovela do povišene akti-

vnosti mitohondrijskih enzima kod ćelijske linije mikroglije BV-2. Povišena aktivnost mitohondrijskih enzima ukazuje na to da ćelija ima veću potrebu za energijom, što je karakteristično za stanje stresa. Pretpostavlja se da bi produživanjem ekspozicije u kombinaciji sa kofeinom hlorogenska kiselina doprinela citotoksičnom efektu. Potrebno je dodatno ispitati efekte kofeina u koncentracijama 0.5 mM i 1 mM i hlorogenske kiseline u koncentracijama 1 µM, 10 µM, 100 µM, produžiti ekspoziciju i dalje ispitati koje mehanizme i metaboličke puteve vezane za mitohondrijsku aktivnost pokreću ove dve supstance u smeši.

---

## Literatura

- Bavari M., Tabandeh M. R., Varzi H. N., Bahramzadeh S. 2015. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of L-carnitine against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug and Chemical Toxicology*, **39** (2): 157.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **54**: 519.
- Clifford M. N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** (7), 1033.
- Farah A. De Paulis T., Trugo L. C., Martin P. R. 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (2): 374.
- Filament I., Gautchi F., Winter M., Willhalm B., Stoll M. 1968. *Les composants furaniques de l'arome cafe: quelques aspects chimiques et spectroscopiques*. Paris: International Coffee Science Association (ASIC)
- Jang M. Shin M. 2004. 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) inhibits caffeine-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience letters*, **358** (3): 189.
- Jang M., Shin M. Kang I., Baik H., Cho Y., Chu J., Kim E., Kim C. 2002. Caffeine Induces Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell Line SK-N-MC. *Journal of Korean Medical Science*, **17**: 674.
- Kim J., Lee S. 2011. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H2O2-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochemistry International*, **60**: 466.
- Minić M. 2013. *Citoprotektivno dejstvo kofeina*. Beograd: Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Miyamae Y., Kurisu M., Murakami K., Han J., Isoda H., Irie K., Shigemori H. 2012. Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β-protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20** (19): 5844.
- Rizzuto R. 2009. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1787** (11): 1342.
- Saiki S., Sasazawa Y., Imamichi Y., Kawajiri S., Fujimaki T., Tanida I., Kobayashi H., Sato F., Sato S., Ishikawa K. I., Imoto M. 2011. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy*, **7** (2): 176.
- Shlonsky A. K., Klatsky A., Armstrong A. 2003. *Traits of persons who drink decaffeinated coffee*. School of Public Health, University of California Berkeley
- Yi-Fang C. 2012. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Wiley-Blackwell
- Zheng G., Qiu Y., Zhang Q., Li D. 2014. Chlorogenic acid and caffeine in combination inhibit fat accumulation by regulating hepatic lipid metabolism-related enzymes in mice. *British Journal of Nutrition*, **112** (6): 1034.

---

*Aleksa Mičić*

## Effect of Chlorogenic Acid on Microglial BV-2 and Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Lines Treated with Toxic Caffeine Concentrations

Caffeine and chlorogenic acid are compounds commonly present in herbal tonics. They are active substances with various effects. Previous studies showed both cytoprotective and cytotoxic dose-dependent effects of these molecules. The aim of this study was to examine the effect of chlorogenic acid on cell lines treated with toxic caffeine doses. For this purpose, microglial BV-2 and neuroblastoma SH-SY5Y cell lines were used, as a model for the central nervous system. Cytotoxicity was analyzed through the MTT test of mitochondrial activity and crystal violet assay of cell viability. The main effect of caffeine was toxic and shown in the decrease of cell number and mitochondrial activity in both cell lines. Chlorogenic acid had no effect on the neuroblastoma cell line. In the microglial cell line, the effect of chlorogenic acid was not shown through the reduction of caffeine cytotoxicity. However, when applied with middle-range concentrations of caffeine (0.5 mM and 1 mM), it significantly increased activity of mitochondrial enzymes. 