

Gdański Uniwersytet Medyczny

Sylwia Barbara Gul-Hinc

Współdziałanie czynników neuroprotekcyjnych w  
ekscytotoksycznych uszkodzeniach komórek cholinergiczych

Praca doktorska

Praca wykonana  
w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej  
Katedry Biochemii Klinicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:  
Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz  
Kierownik Zakładu:  
dr hab. n. med. Hanna Bielarczyk

Gdańsk 2013

*Składam najszczerze podziękowania Mojemu Promotorowi  
Panu Profesorowi Andrzejowi Szutowiczowi  
za nieocenioną pomoc w powstawaniu i redagowaniu niniejszej pracy.  
Dziękuję za poświęcony mi czas oraz okazaną życzliwość i wyrozumiałość.*

*Dziękuję również Kierownikowi Zakładu Medycyny Laboratoryjnej  
Pani dr hab. n med. Hannie Bielarczyk  
za wskazówki merytoryczne i metodyczne a także za wspieranie  
mnie we wszelkich działaniach zmierzających do powstania tej pracy.*

~

*Pragnę również podziękować wszystkim moim obecnym i byłym współpracownikom z  
Zakładu Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej za wszelką pomoc  
przy realizacji tej pracy, życzliwość i wspianą atmosferę.*

~

*Dziękuję również mojej rodzinie a w szczególności Rodzicom, za wsparcie,  
motywację i wiarę we mnie.*

*Pawłowi...*

## SPIS TREŚCI:

1.	STRESZCZENIE .....	12
2.	WSTĘP .....	14
2.1.	Układ cholinergiczny .....	14
2.2.	Metabolizm reszty acetylowej acetylocholiny .....	15
2.3.	Toksyczność tlenku azotu .....	17
2.4.	Neurotoksyczność cynku .....	19
2.5.	Choroba Alzheimerera .....	20
2.6.	Hodowle linii neuronalnych komórek cholinergiczych jako model do badań nad neurotoksycznością .....	23
2.7.	Mechanizmy neuroprotekcji .....	26
2.7.1.	Resweratrol ( $C_{14}H_{12}O$ ; 3,4',5-trihydroxystilben ) .....	29
2.7.1.1.	Resweratrol w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym .....	31
2.7.1.2.	Resweratrol w ośrodkowym układzie nerwowym .....	33
2.7.2.	Wpływ resweratrolu na aktywność mikrogleju .....	35
2.7.2.1.	Właściwości mikrogleju .....	35
2.7.2.2.	Modyfikacja prozapalnych właściwości mikrogleju przez resweratrol .....	36
3.	CEL PRACY .....	38
4.	MATERIAŁY I METODY .....	39
4.1.	Odczynniki .....	39
4.2.	Materiały zużywalne .....	39
4.3.	Komórki cholinergiczne SN56 .....	40
4.4.	Komórki mikroglejowe N9 .....	41
4.5.	Zamrażanie komórek .....	42
4.6.	Czynniki neurotoksyczne .....	43
4.6.1.	Cynk .....	43
4.6.2.	Tlenek azotu .....	43
4.7.	Czynniki neuroprotekcyjne .....	43
4.7.1.	Resweratrol .....	43
4.8.	Oznaczanie aktywności enzymów .....	43
4.8.1.	Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) (Szutowicz i wsp. 1981) .....	44
4.8.2.	Akonitaza (EC 4.2.1.3) (De Villafranca i Haines 1974) .....	44

4.8.3.	Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP (ICH-NADP, EC 1.1.1.42) (Plaut 1968) .....	45
4.8.4.	Liaza ATP-cytrynianowa (ACL, EC 2.3.3.8) (Szutowicz i Angielski 1970) .....	45
4.8.5.	Acetylotransferaza cholinowa (ChAT, EC 2.3.1.6) (Fonnum 1969).....	45
4.8.6.	Oznaczanie poziomu białka acetylotransferazy cholinowej (ChAT) .....	46
4.9.	Oznaczanie wskaźników reakcji zapalnej.....	47
4.9.1.	Oznaczanie stężenia interleukiny 6 (IL-6).....	47
4.9.2.	Oznaczanie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ).....	47
4.10.	Badanie metabolizmu acetylo-CoA komórek SN56.....	47
4.11.	Oznaczanie metabolitów .....	48
4.11.1.	Tlenek azotu (NO) (Miranda i wsp. 2001) .....	48
4.11.2.	Całkowity acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk 1987).....	48
4.11.3.	Całkowity ATP (Gorman i wsp. 2003).....	49
4.12.	Ocena uszkodzenia komórek (Butler,1989).....	50
4.13.	Liczba komórek .....	50
4.14.	Białko (Bradford, 1976).....	50
4.15.	Metody statystyczne .....	51
5.	WYNIKI .....	52
5.1.	Charakterystyka komórek SN56 i N9.....	52
5.1.1.	Neuronalne komórki SN56 .....	52
5.1.2.	Komórki mikroglejowe N9.....	54
5.2.	Neurotoksyczność przewlekła .....	55
5.2.1.	Neurotoksyczność nitroprusydku sodu.....	55
5.2.2.	Przewlekły wpływ resweratrolu na żywotność komórek cholinergiczych SN56 .....	56
5.2.3.	Modyfikujący wpływ resweratrolu na przewlekłe cytotoksyczne działanie SNP w komórkach SN56 .....	57
5.2.4.	Cytotoksyczność cynku .....	58
5.2.5.	Skojarzony, przewlekły wpływ cynku, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na żywotność komórek neuronalnych SN56 .....	59
5.2.6.	Skojarzony, przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na całkowitą liczbę komórek neuronalnych SN56. ....	61

5.2.7.	Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na endogenną produkcję azotynów w komórkach neuronalnych SN56.....	62
5.2.8.	Skojarzony, przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na poziom IL-6 i TNF- $\alpha$ w środowisku hodowlanym. .	63
5.2.9.	Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach neuronalnych SN56 .....	65
5.2.10.	Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikrogleju N9 na poziom acetylo-CoA w cholinergicznym komórkach neuronalnych SN56.....	66
5.2.11.	Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność akonitazy w komórkach SN56.....	71
5.2.12.	Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej-NADP w komórkach SN56 .....	72
5.2.13.	Przewlekły wpływ Zn, SNP i RES na całkowity poziom ATP w komórkach SN56 .....	74
5.2.14.	5.2.13. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność liazy ATP-cytrynianowej.....	76
5.2.15.	Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność acetylotransferazy cholinowej w zróżnicowanych komórkach neuronalnych SN56.....	77
5.2.16.	Neurotoksyczność mikrogleju. ....	82
5.3.	Neurotoksyczność ostra .....	83
5.3.1.	Ostry wpływ Zn i RES na żywotność komórek SN56.....	83
5.3.2.	Ostry wpływ Zn i RES na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56 .....	84
5.3.3.	Ostry wpływ Zn i RES na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56 .....	85
5.3.4.	Ostry wpływ Zn i RES na aktywność liazy ATP-cytrynianowej .....	87
6.	DYSKUSJA.....	89
6.1.	Komórki neuronalne SN56 jako komórkowy model encefalopatii cholinergiczych.....	89
6.2.	Ekscytotoksyczność cholinergiczna.....	92

6.2.1.	Zn i NO jako wczesne sygnały neurotoksyczne .....	92
6.3.	Resweratrol – neuroprotekcja? .....	98
6.4.	Mikroglej N9 a neuroprotekcja.....	100
6.4.1.	Wpływ na przeżywalność komórek cholinergicznym .....	101
6.4.2.	Wpływ na fenotyp cholinergiczny .....	104
7.	WNIOSKI .....	107
8.	PIŚMIENNICTWO .....	109

## WYKAZ RYCIN UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Ryciny:

Ryc. 1. Metabolizm acetylo-CoA – kluczowy punkt metabolizmu energetycznego i funkcji neuroprzebieżnikowych w neuronach cholinergicznym.	17
Ryc. 2. Wzór strukturalny resweratrolu.	30
Ryc. 3. Komórkowy model neurotoksyczności i neuroprotekcji neuronów cholinergicznym.	41
Ryc. 4. Hodowle łączone neuronalnych komórek cholinergicznym SN56 i mikroglejowym N9.	42
Ryc. 5. Niezróznicowane (A) i zróżnicowane cAMP/RA (B) cholinergiczne komórki neuronalne SN56. Wpływ (C) 24 godzinnej inkubacji zróżnicowanych cholinergicznym komórek neuronalnych z 0.175 mM Zn i 16 godzinnej inkubacji z 0.4mM SNP (D).	53
Ryc. 6. Stabilność aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i acetylotransferazy cholinowej w kolejnym pasażach niezróznicowanych i zróżnicowanych cholinergicznym komórek SN56.	54
Ryc. 7. Wpływ LPS na wydzielanie (A) IL-6 i (B) TNF- $\alpha$ przez komórki mikrogleju hodowane na insertach.	55
Ryc. 8. Zależny od stężenia wpływ 16 godzinnej ekspozycji na SNP, na szybkość wzrostu (●)zróżnicowanych komórek SN56 i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu (○).	56
Ryc. 9. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ resweratrolu na wzrost komórek SN56 i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu.	57
Ryc. 10. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ RES na komórki SN56 hodowane w warunkach kontrolnym i w obecności 0.4 mM SNP.	58
Ryc. 11. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ Zn na wzrost komórek i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu.	59
Ryc. 12. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejowym N9 na zdolność komórek neuronalnych SN56 do wydalania błękitu trypanu.	60
Ryc. 13. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na całkowitą liczbę komórek SN56 oraz całkowitą liczbę komórek nieuszkodzonych.	61
Ryc. 14. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na syntezę NO przez komórki neuronalne SN56.	63
Ryc. 15. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na syntezę IL-6.	64
Ryc. 16. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i wstawek z komórkami N9 na syntezę TNF- $\alpha$ .	65



Ryc. 17. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w cholinergicznych komórkach neuronalnych SN56. ....	66
Ryc. 18. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i wstawek z mikroglejem N9 na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56. ....	67
Ryc. 19. Prosta znamienna korelacja między poziomem acetylo-CoA i aktywnością PDHC (A). Wysoce znamienna prosta korelacja między aktywnością PDHC i poziomem acetylo-CoA w hodowli SN56 bez komórek N9. ....	68
Ryc. 20. Wykresy prostych korelacji między aktywnościami PDHC (A) i poziomami acetylo-CoA (B) oraz odwrotnej korelacji między śmiertelnością komórek SN56 (C) i poziomem IL-6 w środowisku hodowlanym w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych. ....	70
Ryc. 21. Wykresy nieznamiennych korelacji między aktywnościami PDHC (A) i poziomami acetylo-CoA (B) oraz prostej korelacji między śmiertelnością komórek SN56 (C) i poziomem TNF- $\alpha$ w środowisku hodowlanym w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych. ....	71
Ryc. 22. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność akonitazy w komórkach SN56. ....	72
Ryc. 23. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP w komórkach SN56. ....	73
Ryc. 24. Wykresy odwrotnych wysoce znamiennych korelacji między śmiertelnością a aktywnościami akonitazy ( $r=0.82$ , $p=0.00011$ ) (A) i ICDH-NADP ( $r=0.86$ , $p<0.0001$ ) (C) w komórkach SN56 po ich przewlekłej ekspozycji na różne zestawienia czynników neurotoksycznych i neuroprotekcyjnych. ....	74
Ryc. 25. Przewlekły wpływ Zn, SNP i RES na poziom całkowitego ATP w komórkach SN56. ....	75
Ryc. 26. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejowych N9 na aktywność liazy ATP-cytrynianowej. ....	76
Ryc. 27. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność ChAT w zróżnicowanych komórkach SN56. ....	78
Ryc. 28. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na poziom białka ChAT w zróżnicowanych komórkach SN56. ....	79
Ryc. 29. Wykres korelacji pomiędzy poziomem białka ChAT a aktywnością ChAT w komórkach SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikrogleju N9. ....	79

Ryc. 30. Wykres korelacji między wielkością frakcji uszkodzonych komórek SN56 a aktywnością ChAT.....	80
Ryc. 31. Korelacje pomiędzy (A): aktywnością ChAT i całkowitym poziomem acetylo-CoA (B): aktywnością ACL i całkowitym poziomem acetylo-CoA w komórkach SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9. ....	81
Ryc. 32. Korelacje pomiędzy aktywnością ChAT i poziomem IL-6 w środowisku (A); aktywnością ACL i poziomem IL-6 w środowisku SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9.....	81
Ryc. 33. Przewlekły wpływ Zn, wstawek z komórkami N9 oraz LPS na produkcję IL-6 i TNF- $\alpha$ na zawartość białka komórkowego i aktywność ChAT w komórkach SN56. ....	82
Ryc. 34. Ostry wpływ Zn i RES na zdolność komórek SN56 do wydalania błękitu trypanu. ....	84
Ryc. 35. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56.....	85
Ryc. 36. Ostry wpływ Zn i RES na poziom acetylo-CoA całkowitego w komórkach SN56. ....	86
Ryc. 37. Korelacje pomiędzy (A): całkowitym poziomem acetylo-CoA a aktywnością PDHC(B): śmiertelnością komórek SN56 a aktywnością PDHC (B) i poziomem acetylo-CoA (C) przy ich ostrej ekspozycji na Zn i resweratrol. ....	87
Ryc. 38. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w komórkach SN56. ....	88
Ryc. 39. Zmiany aktywności enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w zróżnicowanych komórkach SN56, wywoływane przez Zn i NO oraz w mózgach osób zmarłych, z chorobą Alzheimera. ....	91

## OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

acetylo-CoA	acetylowany koenzym A
ACh	acetylocholina
ACL	liaza ATP-cytrynianowa
AMPA	kwasy $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-izoksazolo- propionowy
ATP	adenozyno tri-fosforan
cAMP	cykliczny AMP
ChAT	acetylotransferaza cholinowa
db- cAMP	dwumaślan cAMP
DMEM	środowisko wzrostowe dla komórek Eagle zmodyfikowane wg. Dulbecco
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa
IL-6	interleukina 6
NMDA	kwasy N-metylo-D-asparaginianowy
NO	tlenek azotu
NOS	synteza tlenku azotu
PDH	dehydrogenaza pirogronianowa
RES	resweratrol
SNP	nitroprusydek sodu
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworu

## 1. STRESZCZENIE

Zaburzenia metabolizmu energetycznego są uznawane za jeden z istotnych elementów patomechanizmu choroby Alzheimera i innych encefalopatii cholinergicznnych. Niedobory energetyczne powodują inhibicję neuroprzeżyźnictwa cholinergicznego, prowadząc ostatecznie do preferencyjnej utraty neuronów cholinergicznnych przegrody mózgu i postępującego otępienia u osób dotkniętych tymi patologiami. Dlatego uważa się, że skuteczne przeciwdziałanie spadkowi produkcji energii w mózgu osób w podeszłym wieku, mogłoby zapobiegać lub hamować postęp tych chorób. Wiadomo również, że w określonych warunkach niektóre cytokiny wydzielane przez neurony i glejocyty, mogłyby wywierać ograniczone działanie neuroprotekcyjne.

Przedstawiana rozprawa doktorska miała na celu zweryfikowanie hipotezy, czy jeden z naturalnie występujących polifenoli (resweratrol), o właściwościach antyoksydacyjnych, może w warunkach *in vitro*, sam lub w połączeniu z endogennymi cytokinami, pochodzenia neuronalnego lub glejocytarnego, zapobiegać neurotoksycznemu działaniu znanych związków, związanych z ostrymi i przewlekłymi mechanizmami neurotoksyczności.

Hipotezę tę weryfikowano, używając pojedynczych i/lub łączonych hodowli neuronalnych, cholinergicznnych komórek neuroblastoma SN56 z przegrody mózgu myszy oraz komórek mikroglejowych N9.

Zarówno Zn, jak i nadmierna produkcja NO (SNP jako donor) powodowały wzrost frakcji uszkodzonych komórek SN56, jak i spadek ich liczby, zarówno w warunkach krótko (30 min), jak i długotrwałej ekspozycji (16 godz). Zmiany tych parametrów korelowały ze stopniem inhibicji aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej, jak również ze spadkiem poziomu acetylo-CoA i ATP oraz wydzielania neuronalnej IL-6. Łączne dodanie do hodowli zarówno Zn, jak i SNP wywierało synergistyczne działanie inhibicyjne na wyżej wymienione parametry. Supresji syntezy acetylo-CoA i metabolizmu energetycznego, towarzyszył spadek ekspresji fenotypu cholinergicznego komórek SN56, mierzonego aktywnością i poziomem białka acetylotransferazy cholinowej.

W warunkach przewlekłej ekspozycji komórek SN56 na Zn i SNP, resweratrol (5 $\mu$ mol/L) zmniejszał ich śmiertelność, lecz nie wpływał, ani na obniżoną aktywność enzymów metabolizmu energetycznego, ani na poziom acetylo-CoA oraz aktywność

acetylotransferazy cholinowej i liazy ATP-cytrynianowej. Wyższe stężenia resweratrolu wywierały w tych warunkach działanie cytotoksyczne. Z kolei przy ekspozycji krótkoczasowej, niskie stężenia resweratrolu były nieskuteczne, lecz wysokie (50 μmol/L) odwracały supresyjne działanie Zn na wszystkie parametry metabolizmu energetycznego oraz aktywności enzymów cytoplazmatycznego metabolizmu acetylo-CoA.

Dodanie wstawek z mikroglejem N9 (SN56:N9 = 3:1), hamowało supresyjne oddziaływanie Zn i SNP na większość badanych parametrów metabolizmu energetycznego i cholinergicznego, zwiększając poziomy IL-6 w środowisku do wartości kontrolnych. Resweratrol nasilał działanie cytoprotekcyjne N9, nie modyfikując jego parakrynnego oddziaływania na parametry mitochondrialnego i cytoplazmatycznego metabolizmu acetylo-CoA. Na istotną rolę zmian metabolizmu acetylo-CoA dla przeżywalności neuronów cholinergicznym wskazują wysoce znamienne korelacje między śmiertelnością komórek a aktywnościami dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy oraz poziomem acetylo-CoA w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych. Na związek acetylo-CoA z funkcją neuroprzekąźniczą neuronów cholinergicznym wskazują silne korelacje między jego stężeniem a aktywnością acetylotransferazy cholinowej i liazy ATP-cytrynianowej, w różnych warunkach doświadczalnych. Na istotną rolę IL-6 w utrzymaniu integralności strukturalnej i funkcjonalnej neuronów cholinergicznym w warunkach cytotoksycznych, wskazują znamienne korelacje między jej poziomem w środowisku a aktywnościami dehydrogenazy pirogronianowej, acetylotransferazy cholinowej, liazy ATP-cytrynianowej oraz poziomem acetylo-CoA.

Przedstawione dane wskazują, że wczesne sygnały neurodegeneracyjne o charakterze ekscytotoksycznym mogą być znoszone przez parakrynną aktywność niepobudzonych komórek mikroglejowych, która zapobiega inhibicji kluczowych enzymów, związanych z mitochondrialnym i cytoplazmatycznym metabolizmem acetylo-CoA. Wydaje się, że resweratrol może wspomagać to cytoprotekcyjne działanie za pośrednictwem mechanizmu(ów) niezależnych od acetylo-CoA.

## 2. WSTĘP

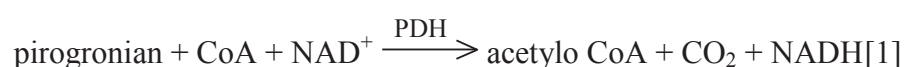
### 2.1. Układ cholinergiczny

Układ cholinergiczny odgrywa szczególną rolę w układzie nerwowym. Neurony cholinergiczne, które magazynują i kwantowo uwalniają acetylocholinę (ACh), pełnią istotną rolę w procesach uczenia, regulacji formowania pamięci oraz stanowią ważny składnik strukturalny procesów kojarzenia. Neurony cholinergiczne stanowią około 5-10% wszystkich neuronów mózgu i występują we wszystkich strukturach przedmózgowia, śródmózgowia oraz pnia mózgu. Kompleks jąder okolicy podstawnej przedmózgowia, stanowią neurony cholinergiczne ze stosunkowo długimi aksonami. W skład tego kompleksu, zlokalizowanego w septum, wchodzi jądro środkowe przegrody, pozioma i pionowa gałąź pasma ukośnego Broca oraz jądro podstawne Meynerta. Neurony cholinergiczne rejonu przegrody mózgu i pionowej gałęzi pasma ukośnego Broca wysyłają swoje aksony głównie do hipokampa, natomiast pozioma gałąź pasma ukośnego Broca unerwia opuszkę węchową. Neurony jąder podstawy Meynerta są źródłem projekcji cholinergicznym do ciała migdałowatego i kory mózgu (Mesulam i wsp. 1986). Procesy syntezy i uwalniania ACh z zakończeń neuronów cholinergicznym, wymagają ekspresji specyficznych enzymów i białek strukturalnych, takich jak acetylotransferaza cholinowa (ChAT), transporter choliny o wysokim do niej powinowactwie (CHT1) oraz transporter pęcherzykowy acetylocholin (Vesicular Acetylcholine Transporter, VAChT), jak również pre i postsynaptyczne receptory nikotynowe i muskarynowe. Niezbędne są również białka, dzięki którym możliwa jest fuzja pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową, tworzących kompleks SNAP-NSF-SNARE (Tuček i wsp. 1990). Kluczową rolę w układzie cholinergicznym odgrywa ChAT, której najwyższy poziom znajduje się w cytoplazmie cholinergicznym zakończeń synaptycznych (Fonnum, 1969). Jest to enzym markerowy, występujący wyłącznie w neuronach cholinergicznym. W warunkach prawidłowych aktywność tego enzymu w cytoplazmie zakończeń cholinergicznym jest na tyle wysoka, żeby zapewnić szybkość syntezy ACh, odpowiadającą szybkości jej wydzielania, dzięki czemu utrzymywany jest stały poziom tego neuroprzekaźnika w zakończeniach nerwowych, niezależnie od ich aktywności. W badaniach pośmiertnych, pacjentów z chorobą Alzheimera (AD), stwierdza się znaczne obniżenie aktywności ChAT w hipokampie, ciele

migdałowatym oraz w regionach kory mózgowej, odpowiedzialnych za różne funkcje poznawcze (Bowen i wsp. 1976, 1979, Davies i Maloney 1976, Perry i wsp. 1977, White i wsp. 1998).

## 2.2. Metabolizm reszty acetylowej acetylocholinyl

Acetylo-CoA jest, obok cholinyl, drugim substratem niezbędnym do syntezy ACh. Powstaje on z pirogronianu w reakcji dekarboksylacji oksydacyjnej, katalizowanej przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (oksydoreduktaza pirogronian: liponian acetylująca akceptor, PDHC) (Browning i Schulman 1968, Tuček i Cheng 1970, 1974, Lefresne i wsp. 1973).



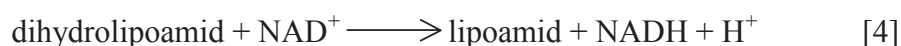
PDHC składa się z trzech enzymów. Reakcja ta zachodzi w czterech etapach. Pierwszy etap jest katalizowany przez składnik kompleksu o aktywności dehydrogenazy pirogronianowej-E1 (EC1.4.2.1). Pirogronian po związaniu z pirofosforanem tiaminy (TPP) ulega dekarboksylacji.



Kolejnym etapem jest przeniesienie grupy acetylowej, która powstała po utlenieniu grupy hydroksyetylenowej, na lipoamid. Następnie składnik E2 kompleksu-acetylotransferaza dihydroliponianowa (EC 2.3.1.12) katalizuje przeniesienie grupy acetylowej z acetolipoamidu na CoA i utworzenie acetylo-CoA. W tym przypadku grupą prostetyczną jest amid kwasu liponowego.



W ostatnim etapie następuje regeneracja utlenionej formy lipoamidu, katalizowana przez dehydrogenazę dihydroliponianową, składnik-E3 kompleksu (EC 1.8.1.4). Grupą prostetyczną dla tej podjednostki jest FAD.



W niecholinergicznym komórkach nerwowych, acetylo-CoA jest zużywany prawie w całości do produkcji energii w cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz do syntezy lipidów strukturalnych (około 1%). Natomiast w neuronach cholinergicznym, prócz podstawowego zużycia do produkcji energii, acetylo-CoA jest wykorzystywany do syntezy ACh.

Acetylo-CoA powstający w mitochondriach, musi zostać przetransportowany przez błonę mitochondrialną do cytoplazmy. W ten sposób staje się dostępny dla ChAT. Wykazano istnienie kilku dróg transportu acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy. Około 50% tego substratu jest dostarczane pośrednio przez cytrynian. Cytrynian powstaje z wewnątrzmitochondrialnego acetylo-CoA i szczawiooctanu w reakcji katalizowanej przez syntazę cytrynianową. Po przetransportowaniu do cytoplazmy za pośrednictwem transportu wymiennego sprzężonego z L-jabłczanem, cytrynian zostaje rozłożony do acetylo-CoA i szczawiooctanu w reakcji katalizowanej przez liazę ATP-cytrynianową (C-acetylotransferaza acetylo-CoA:szczawiooctan (pro-S) karboksymetylo-syntetyzująca, ADP-fosforylująca, EC 2.3.3.8, ACL) (Sreere 1965). Istnienie tej drogi metabolicznej w mózgu kwestionowano, ze względu na, jak uważano bardzo niską aktywność ACL w tej tkance (Tuček 1967ab). Dopiero badania przeprowadzone w naszym Zakładzie wykazały, że aktywność tego enzymu jest w rzeczywistości kilkadziesiąt razy wyższa niż to podawano poprzednio (Szutowicz i wsp. 1975, 1980, 1982).

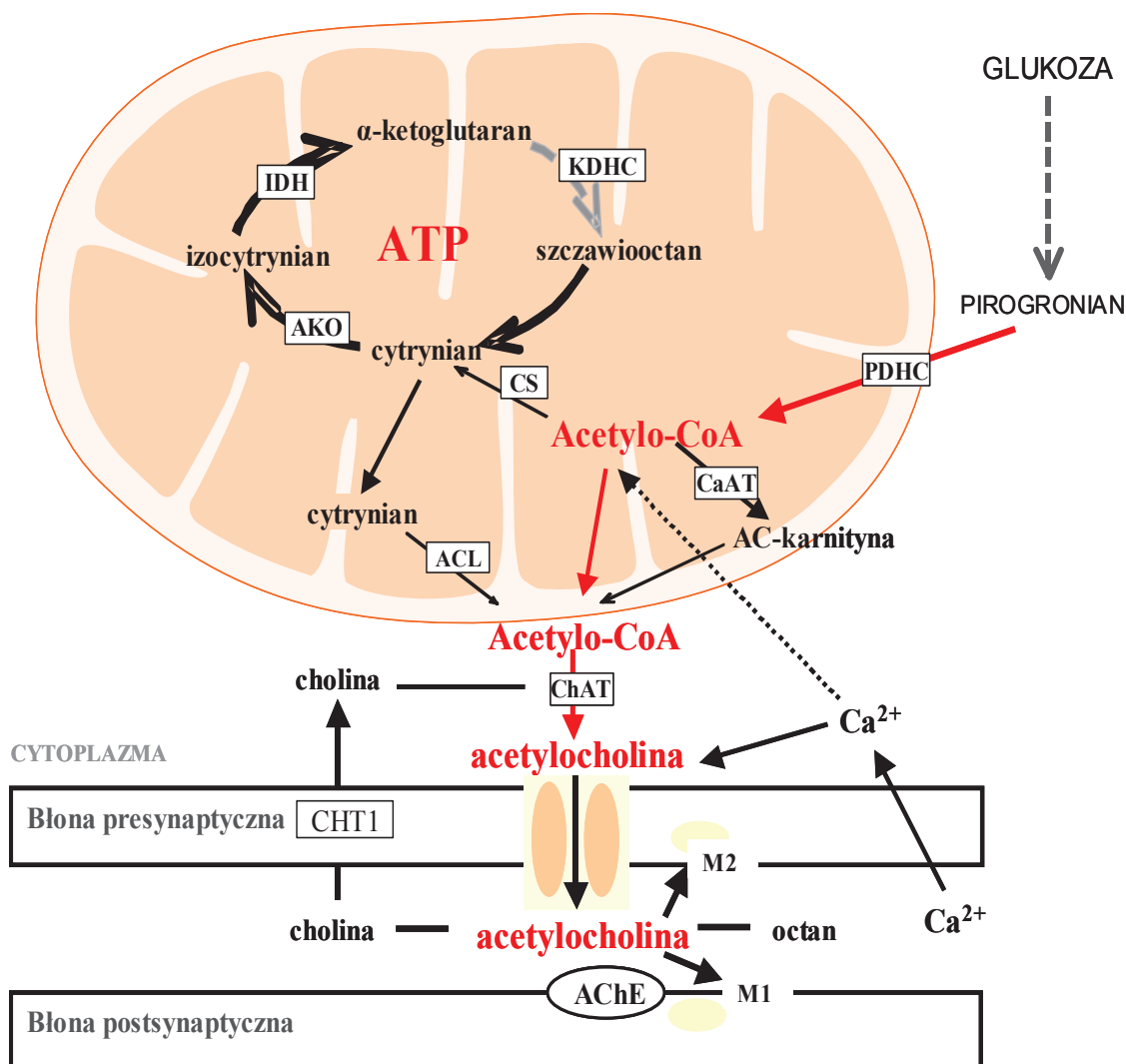
(-)-Hydroksycytrynian, jest specyficznym inhibitorem ACL, kompetycyjnym w stosunku do cytrynianu (Szutowicz i wsp. 1976, 1977). Inhibitor ten hamował szybkość syntezy acetylocholino, zwiększał akumulację cytrynianu, zarówno w skrawkach mózgu, jak i w synaptosomach. Ocenia się, że około 30-50% ACh syntetyzowanej w mózgu pochodzi z acetylo-CoA, transportowanego drogą ACL (Gibson i Shimada 1980, Řičný i Tuček 1982, Sterling i O'Neill 1978, Sterling i wsp. 1981, Szutowicz i wsp. 1976, 1981, Tuček i wsp. 1981).

Innymi związkami uczestniczącymi w transporcie reszty acetylowej do cytoplazmy, są acetylokarnityna i octan (Tuček 1993, Szutowicz i wsp. 1994). Grupa hydroksylowa karnityny wiąże grupę acetylową z acetylo-CoA, w reakcji acetylotransferazy karnitynowej I na wewnętrznej stronie błony wewnętrznej mitochondriów. Z kolei na zewnętrznej stronie błony wewnętrznej, acetylotransferaza karnitynowa II odtwarza acetylo-CoA. Natomiast nasze badania po raz pierwszy wskazały na możliwość istnienia bezpośredniego transportu całej cząsteczki acetylo-CoA przez błonę mitochondrialną, za pośrednictwem hydrofilowych kanałów o wysokiej przepuszczalności (permeability transition pores, PTP), powstających w obecności jonów wapnia (Bielarczyk, Szutowicz 1989, Bielarczyk i wsp. 1998).

Szereg sygnałów neurotoksycznych hamuje aktywność PDHC, a więc i syntezę acetylo-CoA w mitochondriach neuronalnych. Powoduje to z kolei inhibicję różnych



dróg transportu reszt acetylowych do cytoplazmy. I tak, w synaptosomach niedobór pirofosforanu tiaminy hamował transport reszt acetylowych drogą ACL (Jankowska-Kulawy i wsp.2010).



Ryc. 1. Metabolizm acetylo-CoA – kluczowy punkt metabolizmu energetycznego i funkcji neuroprzebieżnikowych w neuronach cholinergicznym.

### 2.3. Toksyczność tlenu azotu

W ośrodkowym układzie nerwowym tlenek azotu (NO) bierze udział w procesach poznawczych, uczenia się i formowania pamięci, jak również w regulacji krążenia wewnątrzmożgowego. Na poziomie komórkowym stymuluje on cytosolowy izoenzym cykazy guanylanowej i powoduje wzrost produkcji cGMP. NO powstaje z grupy guanidynowej L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS). Drugim produktem powstającym w tej reakcji jest L-cytrulina. Zidentyfikowano trzy izoformy NOS. Endotelialna izoforma syntazy tlenu azotu

(eNOS) została zidentyfikowana w komórkach endotelium i w neuronach a neuronalna izoforma (nNOS) w neuronach. Oba izoenzymy są izoformami konstytutywnymi, a ich aktywność jest zależna od obecności jonów wapnia w cytosolu. Trzecią izoformę stanowi indukowalna syntaza tlenu azotu (iNOS), której aktywność jest niezależna od jonów wapnia. Jej ekspresję indukują cytokiny, takie jak jak IL-1 i interferon- $\gamma$ . Najsilniejszym aktywatorem iNOS są bakteryjne lipopolisacharydy. Stwierdzono, że iNOS jest obecna przede wszystkim w mikrogleju i monocytach (Murphy i wsp., 2000), ale również w neuronach (Heneka i wsp., 2001) i komórkach endotelium (Calabrese i wsp., 2007).

Aktywność iNOS wykazuje dużą zmienność międzygatunkową. Wykazano, że w mikrogleju mysim, aktywność iNOS jest wyższa aniżeli w ludzkim, dzięki czemu mikroglej myszy produkuje więcej tlenu azotu (Colton i wsp. 1996; Vitek i wsp. 2006). Neuronalna nNOS występuje przede wszystkim w cytosolu neuronów ale również w mikrogleju i astrocytach (Murphy i wsp. 1993, Wood i wsp. 1994). W ośrodkowym układzie nerwowym, nNOS uczestniczy w mechanizmach długoterminowego pobudzenia synaptycznego (O'Dell i wsp. 1991, Schuman i wsp. 1991, Izumi i wsp. 1992, Izumi i wsp. 1993). Doświadczenia behawioralne na zwierzętach wykazują, że inhibitory nNOS powodują upośledzenie procesów uczenia się i wywołują objawy amnezji (Böhme i wsp. 1993, Hölscher i wsp. 1992). Z drugiej jednak strony stwierdzono, że wzrost aktywności iNOS, może powodować wzrost stężenia NO/nadtlenkoazotynów do poziomów patogennych, rzędu  $\mu\text{mol/L}$ . Takie stężenia NO, mogłyby już odgrywać znaczącą rolę w patogenezie choroby Alzheimerera, Parkinsona, uszkodzeń ischemicznych, hipoksemicznych, hipoglikemicznych czy też stwardnienia rozsianego (Steinert i wsp. 2010).

Nadmierna produkcja NO, wywołana pobudzeniem ekscytotoksycznym, powoduje zmianę jego roli z czynnika-sygnalizatora wewnątrz i międzykomórkowego, na czynnik neurotoksyczny. Wysokie poziomy NO/NOO<sup>-</sup> powodują obniżenie produkcji energii, poprzez inhibicję enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych i łańcucha oddechowego (Brown, 2010). W ten sposób dochodzi do uruchomienia błędnego koła zaburzeń akumulacji i transportu wapnia w mitochondriach oraz zwiększenia syntezy wolnych rodników tlenowych (Jankowska i wsp. 2000, Tomaszewicz i wsp. 1997). Ostatecznie prowadzi to do wzmożenia procesów nekrozy i apoptozy, wprost proporcjonalnego do nasilającego się stanu zapalnego (Bonfoco i wsp. 1995, Brorson i wsp. 1999). Jednocześnie, obniżenie aktywności

PDHC spowodowane wysokim stężeniem  $\text{NOO}^-$ , hamuje syntezę acetylo-CoA (Bolanos i wsp. 1997, Tomaszewicz i wsp. 1997, Szutowicz i wsp. 2006, Stewart i wsp. 2000).

Zatem, bezpośrednią przyczyną preferencyjnego uszkodzenia neuronów cholinergicznycych jest zahamowanie aktywności PDHC przez, aktywowaną Ca, kinazę PDH oraz wysokie stężenia  $\text{NOO}^-$ . Wykazały to doświadczenia z zastosowaniem SNP jako donora NO. SNP powodował spadek aktywności PDHC w cholinergicznycych komórkach SN56, z jednoczesnym zwiększeniem przepuszczalności błon mitochondrialnych dla acetylo-CoA, oraz wzrostem frakcji komórek uszkodzonych (Lai i wsp. 1998, Pesonett i wsp. 2000, Szutowicz i wsp. 1998, 2000, 2001, Tomaszewicz i wsp. 1997). Dodatkowo, zahamowanie syntezy acetylo-CoA na poziomie PDHC, powodowało inhibicję jego zużycia w cyklu kwasów trójkarboksylowycych. (Tomaszewicz i wsp. 1997, Zatta i wsp. 2000). Inhibicja przepływu metabolicznego przez cykl kwasów trójkarboksylowycych, może być spowodowana bezpośrednią inhibicją, przez  $\text{NOO}^-$ , akonitazy i kompleksu dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranowej (EC 1.2.4.4, KDHC) (Szutowicz i wsp. 1998). W tej sytuacji, wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych dla acetylo-CoA, może zwiększać względną szybkość jego bezpośredniego transportu do cytoplazmy, pogłębiając istniejący już deficyt energetyczny w mitochondriach tych neuronów (Prast i wsp. 1998, Szutowicz i wsp. 1998, 2000). Jednak w końcowym efekcie, bezwzględna ilość transportowanego acetylo-CoA ulega zmniejszeniu, powodując wtórny spadek poziomu tego metabolitu w cytoplazmie. Prowadzi to do zahamowania kwantowego wydzielania ACh. Natomiast zmiany w niekwantowym wydzielaniu ACh zależały od indywidualnego sygnału cytotoksycznego (Szutowicz i wsp. 1998).

#### **2.4. Neurotoksyczność cynku**

Cynk (Zn) jest metalem śladowym, występującym we wszystkich organizmach żywych. Obecność Zn jest niezbędna do aktywacji kilkuset enzymów oraz białek strukturalnych, spełniających funkcje transportowe, kofaktorowe, proteazowe, związane z regulacją syntezy DNA i RNA i ich stabilizacją (Fuwa i wsp. 1960, Shin i Eichhorn 1968). Zn reguluje wydzielanie hormonów (insulina) i niektórych neuroprzekaźników (L-glutaminian) (Takeda 2000, Choi i Koh 1998). Tkanką, w której występuje najwyższe jego stężenie jest mózg. Stężenie Zn w płynie mózgowo-

rdzeniowym wynosi  $150\mu\text{mol/L}$  (Mocchegiani i wsp. 2005, Takeda 2000, Fredericson 1989). W mózgu, znacząca część Zn ulega sekwestracji do zakończeń presynaptycznych, gdzie formuje populację neuronów glutaminianergicznych, w których neuroprzekaźnik L-glutaminian jest akumulowany w pęcherzykach synaptycznych, w postaci kompleksu z Zn (Frederickson i Danscher 1990).

Szereg danych, w tym również i nasze badania, wskazują że Zn jest zaangażowany we wczesne stadia patomechanizmów choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych (Ronowska i wsp. 2010). Wykazano między innymi, że w AD dochodzi do zmian dystrybucji międzykomórkowej Zn w niektórych rejonach mózgu (Cuajungco i Lees, 1997a, 1997b). Szczególnie w hipokampie oraz w ciele migdałowatym zaobserwowano wzrost całkowitego stężenia cynku u pacjentów z AD (Cornett i wsp. 1998, Deibel i wsp. 1996, Lovell i wsp. 1998). Dlatego też, oznaczono poziomy ekspresji transporterów cynkowych ZnT w chorobie Alzheimera. Transportery z rodziny ZnT zapewniają utrzymanie homeostazy cynku w neuronach, poprzez obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia tego kationu. Wykazano, że we wczesnych stadiach AD wzrastały poziomy ekspresji dla ZnT-1, 4 oraz 6 (Lovell i wsp. 2005, Smith i wsp. 2004). Wzrost poziomu ekspresji dla ZnT6 prowadził do inhibicji aktywności  $\alpha$ -sekreazy (Bush i wsp. 1994). Wcześniejsze badania dowiodły, iż płytki starcze zawierają podwyższone stężenia jonów cynku, miedzi i żelaza (Dong i wsp. 2003, Smith i wsp. 1997).

W warunkach *in vitro*, Zn przyspiesza agregację amyloidu- $\beta$  co mogłoby prowadzić do jego oligomeryzacji i akumulacji w pobudzonych synapsach (Deshpande i wsp. 2009). Badania ostatnich lat wskazują również na rolę Zn w powstawaniu wewnątrzneuronalnych agregatów białka Tau. Jest to zapewne związane ze zwiększaniem przez Zn fosforylacją PI3K i MAPK, odgrywających kluczową rolę w hiperfosforylacji białka Tau przez GSK-3 (An i wsp. 2005).

Zn okazał się również inhibitorem szeregu enzymów metabolizmu energetycznego w tym PDHC, akonitazy, KDHC, oraz kilku enzymów łańcucha oddechowego (Ronowska i wsp. 2010).

## **2.5. Choroba Alzheimera**

Choroba Alzheimera (Alzheimer's disease, AD) uważana jest za jedną z głównych przyczyn otępień, występujących ze zwiększającą się z wiekiem częstotliwością, szczególnie u osób powyżej 65 roku życia. Dotychczasowe badania

określają rozpowszechnienie AD w granicach 1,9-5,8 % populacji ogólnej osób 65-letnich i starszych (Kiejny 1998). AD stanowi około 70% wszystkich rodzajów demencji u ludzi w podeszłym wieku (Fratiglioni i wsp. 1999, Small i wsp. 1997). Najczęstszą formą AD jest postać sporadyczna (Hardy i wsp. 1997). Jednakże zdarzają się również postaci dziedziczne, dziedziczone jako cecha dominująca autosomalna (Tanzi i wsp. 1996). Postacie dziedziczne AD, występujące już na początku szóstej dekady życia, powiązane są z obecnością mutacji w obrębie genu APP w chromosomie 21 (locus) kodującego białko prekursorowe amyloidu- $\beta$ , złożone, w zależności od tkanki, z 695–772 aminokwasów. Zawiera ono w swojej sekwencji domenę peptydu amyloidu- $\beta$ , stanowiącego 39-42 aminokwasowy fragment białka (Goate i wsp. 1991). Za wybitnie amyloidogenny uważa się peptyd o długości 42 aminokwasów. Stanowi on około 10% wszystkich peptydów amyloidu- $\beta$  (Lewczuk i wsp. 2004). Mutacja w sekwencji kodującej genu APP, prowadzi do zwiększonej podatności białka na proteolityczny rozkład przez beta-sekretazę i zwiększonej produkcji amyloidu- $\beta$ . Amyloid- $\beta$  jest niewrażliwy na szereg enzymów proteolitycznych, takich jak insulinaza, nikastryna czy plazminogen. Wzrost poziomu amyloidu- $\beta$  w płynie pozakomórkowym mózgu, przyspiesza jego agregację, a tym samym formowanie płytek starczych (Seubert i wsp. 1993).

Podobne działanie amyloidogenne mają mutacje punktowe w genach, kodujących białka preseniliny -1 (PS1) i -2 (PS2), zlokalizowanych na chromosomach 14 i 1 (Sherrington i wsp. 1995, Levy-Lahad i wsp. 1995). Te dwa białka znalezione w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego, tworzą część kompleksu gamma-sekretazy, enzymu wycinającego amyloid- $\beta$  od C-końca (Kovacs i wsp. 1995). Mutacja punktowa w genach presenilin powoduje zwiększone powstawanie złożeń fragmentu 1-42 amyloidu- $\beta$  (Lemere i wsp. 1996). Mutacje w genach presenilin są typowe dla rodzinnej postaci AD typu wczesnego (FAD early-onset).

W typie późnym (late-onset) AD, zaliczanym do grupy demencji sporadycznych, obserwuje się częste występowanie homozygotycznego genotypu genu APO-E4, kodującego apolipoproteinę E4, która jest białkiem zaangażowanym w transport cholesterolu. Obecność podwójnej kopii genu izoformy apoE4, zwiększa 15-30 razy, prawdopodobieństwo wystąpienia sporadycznej postaci AD (Corder i wsp. 1993, Strittmatter i wsp. 1995).

Współczesne metody obrazowania pozwalają prawidłowo rozpoznać AD przyżyciowo w ponad 90% przypadków, dzięki możliwości stwierdzenia

charakterystycznego upośledzenia wychwytu 18-fluorodeoksyglukozy oraz akumulacji amyloidu- $\beta$ , metodami pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) (Ishii i wsp. 2010, Osseukoppele i wsp. 2011). Ostateczna weryfikacja rozpoznania klinicznego, możliwa jest jednak dopiero pośmiertnie, gdy potwierdzi się wystąpienie zmian neuropatologicznych, typowych dla AD. Są to zmiany zarówno makroskopowe, jak i mikroskopowe. Pod względem makroskopowym, mózg wykazuje zaniki w korze płatów czołowych, skroniowych i ciemieniowych. Charakterystyczne dla AD zmiany mikroskopowe w mózgu to zwyrodnienia neurofibrylarne oraz płytki starcze. Zwyrodnienia neurofibrylarne to neuropatologiczne struktury zlokalizowane wewnątrz komórek neuronalnych. Głównym ich składnikiem jest wysoce ufosforylowane białko tau. Białko to występuje głównie w neuronach, ale jego obecność stwierdzono również w innych komórkach jądrzastych. Jego fizjologiczną funkcją jest stabilizacja podjednostek A i B mikrotubuli. W warunkach neurodegeneracji, białko tau ulega nietypowej fosforylacji przez, aktywowaną napływem Ca, i drogą sygnalizacji receptora WNT, kinazę glikogenu 3B (Rick i wsp. 2009). Stwierdzono istnienie ścisłej zależności między dystrybucją wysoce ufosforylowanego białka tau, a rozwojem AD (Castellani i wsp. 2008, Nelson i wsp. 2009). Utrata fizjologicznych funkcji stabilizacyjnych białka tau, wywołana czynnikami cytotoksycznymi, prowadzi do zaburzeń w transporcie aksonalnym i do degeneracji aksonalnej neuronów (Castellani i wsp. 2010).

Drugą, typową zmianą, pojawiającą się w mózгах osób chorych na AD są złogi amyloidu- $\beta$ , tworzące oligomery oraz polimery, przyjmujące postać płytek starczych w przestrzeniach międzykomórkowych. W fizjologicznym procesie starzenia, płytki starcze zawierające amyloid- $\beta$ , pojawiają się w umiarkowanych ilościach. Natomiast ich znaczne nagromadzenie stwierdzono w AD, jak również w innych chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak encefalopatia pourazowa, zespół Downa, choroba Parkinsona czy też degeneracja typu ciał Lewy'ego (Selkoe 1996, Dickson 1997).

W rodzinnych i wczesnych, genetycznie uwarunkowanych, postaciach AD, dochodzi do zwiększonej akumulacji amyloidu- $\beta$  i tworzenia jego agregatów już w piątej dekadzie życia. Wynika to z punktowych mutacji genu APP i zmiany pierwszorzędowej struktury białka prekursorowego amyloidu- $\beta$  (APP) przez sekretazy. W warunkach prawidłowych, białka o aktywności  $\alpha$ -sekretazowej (ADAM 10 i 17) degradują APP, prowadząc do powstania C-końcowego fragmentu

sAPP $\alpha$ , z którego kompleks błonowych proteaz -  $\gamma$ -sekreazy, wycina nieamyloidogenny 26 aminokwasowy peptyd P3 (Parvathy i wsp. 1999). Droga amyloidogenna polega na degradacji APP przez  $\beta$ -sekreazę (beta-site APP cleaving enzyme 1, BACE-1), a następnie przez  $\gamma$ -sekreazę. Degradacja przez  $\beta$ -sekreazę prowadzi do powstania dłuższych, amyloidogennych peptydów amyloidu- $\beta$  o długości łańcucha 1-42 aminokwasów. Peptyd 1-42 amyloidu- $\beta$  wykazuje największą zdolność do samoistnej agregacji i formowania nierozpuszczalnych złogów amyloidowych, ich akumulacji oraz ostatecznego uformowania blaszek amyloidowych (Lemere i wsp. 1996, Iwatsubo i wsp. 1998). Amyloid- $\beta$  powoduje destabilizację błony neuronu a w konsekwencji obumieranie komórek. Zmiany te są szczególnie nasilone w jądrach podstawy i w hipokampie.

Deficyt neuroprzebieżnictwa cholinergicznego w chorobie Alzheimera związany jest z obniżeniem poziomu ACh i spadkiem aktywności ChAT i VAcT, szczególnie w hipokampie i korze czołowej. Jest to wynikiem, nie tylko nagromadzenia się patologicznych form amyloidu- $\beta$ , ale również następstwem szoku oksydacyjnego, stanu zapalnego, apoptozy i uszkodzenia mitochondriów, co z kolei prowadzi do utraty neuronów w tych regionach mózgu. Stopień tych uszkodzeń dodatnio korelował z upośledzeniem funkcji poznawczych u osób chorych na AD (Coyle i wsp. 1983, Whitehouse i wsp. 1982, Bartus i wsp. 1982, Collerton i wsp. 1986, Minger i wsp. 2000).

## **2.6. Hodowle linii neuronalnych komórek cholinergicznym jako model do badań nad neurotoksycznością.**

Cholinergiczne neurony kory i przegrody mózgu wykazują szczególną wrażliwość na bodźce neurodegeneracyjne, prowadzące do rozwoju encefalopatii, takich jak AD, choroba Parkinsona, encefalopatia dializacyjna czy zespół Korsakoff (Bohnen i wsp. 2003, Terry i Buccafusco 2003). Przyczyny tej szczególnej wrażliwości neuronów cholinergicznym nie są poznane. Dodatkowym utrudnieniem w badaniach in vivo i in vitro, na preparatach całego mózgu, jest niemożność wyodrębnienia przedziałów metabolicznym poszczególnym grup neuronów, z homogenatów lub innych preparatów całego mózgu. Tym samym, wykazanie zmian ilościowych w metabolizmie acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym, stanowiącym około 1% wszystkich komórek mózgu i 10% populacji neuronów, nie

jest możliwe (Tomaszewicz i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 1994). Zastosowanie do badań, klonalnych komórek neuronalnych cholinergicznym czy też innych układów neuroprzebieżniczych, pozwala na omińnięcie tych problemów.

Zatem, modelem badawczym zastosowanym do naszych badań, stały się komórki hybrydowe SN56B5.G4. Komórki te uzyskano w wyniku fuzji neuronów cholinergicznym przegrody mózgu 21-dniowej myszy, z niecholinergicznymi komórkami neuroblastoma N18TG2 (Hammond i wsp. 1990). Komórki te wykazują cechy komórek neuronalnych i cholinergicznym, takie jak zależny od sodu wychwyt choliny, wywołane depolaryzacją uwalnianie ACh oraz aktywność ChAT i VACHT. Cechy te czynią komórki SN56 wartościowym modelem do badań nad mechanizmami cytotoxyczności cholinergicznym (Blusztajn i wsp. 1992, Pedersen i wsp. 1995, Malik i wsp. 2000, Szutowicz i wsp., 2000).

Mimo, że linie tych komórek blastycznych stanowią homogeną populację cholinergiczną, to w warunkach podstawowych charakteryzują się stosunkowo słabą ekspresją neuroprzebieżnictwa cholinergicznym. Jednak znaczne zwiększenie ekspresji przebieżnictwa cholinergicznym można uzyskać przez skojarzone różnicowanie komórek SN56 cyklicznym 3', 5'-adenozynomonofosforanem (cAMP) i kwasem all-trans-retinowym (RA) (Blusztajn i wsp. 1997, Jankowska i wsp. 2000). Cykliczny AMP nie przechodzi jednak przez błony komórkowe. Dlatego do różnicowania stosuje się dwumaślan cAMP (dbcAMP), który przechodzi przez błony plazmatyczne komórek neuronalnych. W celu uzyskania trwałego efektu różnicującego, należy poddać hodowlę działaniu czynników różnicujących przez 2-3 doby (Prasad i Kumar 1974, Szutowicz i wsp. 1998). Wzrost stężenie cAMP w komórce powoduje aktywację kinazy białkowej A (PKA), od której oddysocjują aktywne podjednostki katalityczne. Po przejściu do jądra komórkowego, katalizują one fosforylację reszty serynowej białka CREB (ang. cAMP response element-binding protein). Ufosforylowany CREB łączy się z sekwencją CRE (ang. cAMP response element) promotora i aktywuje transkrypcję genów zależnych od cAMP. Sekwencja CRE wchodzi w skład locus cholinergicznym, dlatego też aktywacja tego elementu prowadzi do zwiększenia poziomu transkrypcji ChAT oraz VACHT (Berse i Blusztajn 1997, Crino 1998).

Drugi czynnik używany do różnicowania komórek SN56 to RA. Ten naturalny prekursor witaminy A wywiera wpływ na wiele procesów biologicznym, w tym podziały i różnicowanie komórek (Maden i Holder 1992), zdolność do promowania



fenotypu neuronalnego w komórkach macierzystych pnia (Bain i wsp. 1995) i zwiększania odsetka neuronów powstających z komórek macierzystych hipokampa (Palmer i wsp. 1997). Zarówno nadmiar, jak i deficyt RA, powoduje nieprawidłowy rozwój ośrodkowego układu nerwowego (Conlon i wsp. 1992, Maden i wsp. 1996). RA wywołuje zahamowanie podziałów komórkowych poprzez promowanie różnicowania, ale także przez bezpośrednią inhibicję fazy G1/S w cyklu komórkowym (Favennec i wsp. 1988). Wykazano, iż wpływ RA na transkrypcję genów odbywa się poprzez wiązanie jądrowego receptora dla kwasu retinowego (RARs). Zidentyfikowano trzy podtypy receptorów klasy RAR,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , kodowane przez trzy różne geny (Chambon 1996). Zidentyfikowano również drugą klasę receptorów-RXR, posiadającą również trzy podtypy:  $RXR_{\alpha}$ ,  $RXR_{\beta}$  i  $RXR_{\gamma}$  (Leid i wsp. 1992, Mangelsdorf i wsp. 1990). Ekspresja receptorów klasy RAR i RXR była w ostatnich latach przedmiotem badań na różnych liniach komórek neuroblastoma (Clagett-Dame i wsp. 1993, Hill i Robertson 1997, Rana i wsp. 2001, 2002). Stwierdzono, że w komórkach neuroblastoma poziom ekspresji  $RAR_{\alpha}$  i  $RAR_{\gamma}$  jest wyższy aniżeli  $RAR_{\beta}$ . Jednakże pod wpływem RA poziom ekspresji  $RAR_{\beta}$  znacząco wzrasta. Stwierdzono również, że aktywacja receptorów klasy RXR nie ma wpływu na wydłużanie neurytów w komórkach neuroblastoma (Giannini i wsp. 1997, Hewson i wsp. 2000). RA wywiera modulujący wpływ na neurony cholinergiczne, poprzez aktywację receptora jądrowego  $RAR_{\alpha}$  (Pedersen i wsp. 1995). Aktywacja  $RAR_{\alpha}$  powoduje wzrost poziomu mRNA dla ChAT, aktywności ChAT oraz wewnątrzkomórkowego poziomu ACh (Pedersen i wsp. 1995, Szutowicz i wsp. 2001, Madziar i wsp. 2003). Stwierdzono również, że RA poprzez postranslacyjną modyfikację ChAT, powoduje jej aktywację (Casper i wsp. 1989). Regulacja ekspresji fenotypu cholinergicznego przez RA odbywa się poprzez pobudzenie receptorów  $RAR_{\alpha}$  (Pedersen i wsp. 1995). Natomiast regulacja wzrostu komórek odbywa się poprzez aktywację receptorów  $RAR_{\beta}$ . RA podwyższa nie tylko poziom mRNA ChAT ale również innych białek zaangażowanych w ekspresję fenotypu cholinergicznego np. VACHT (Berse i Blusztajn 1995). Sekwencja kodująca genu VACHT jest ściśle związana z sekwencją kodującą dla ChAT, co oznacza, że ich transkrypcja jest regulowana przez wspólne miejsca promotorowe. Poziom mRNA tych białek wzrasta, między innymi, pod wpływem RA (Berse i Blusztajn 1995). Wykazano również modulujący wpływ RA na ekspresję receptorów dla NGF (Rodriguez-Tebar i Rohrer 1991, Holst i wsp. 1997, Haskell i wsp. 1987).

Wcześniejsze badania dowiodły, że przewlekłe podawanie NGF dorosłym szczurom, wzmacnia ekspresję markerów fenotypu cholinergicznego, z jednoczesnym wzrostem syntezy i wydzielania ACh (Hefti i Will 1987, Hefti i Knusel 1988, Williams i Rylett 1990, Rylett i Williams 1994). Zatem, RA promuje różnicowanie w kierunku fenotypu cholinergicznego również pośrednio, poprzez aktywację ekspresji receptorów dla NGF. Z drugiej strony, nasze prace wykazały, że różnicowanie neuronów SN56 zwiększa ekspresję receptorów p75 dla NGF, powodując ich uwrażliwienie na bodźce cytotoksyczne (Szutowicz i wsp. 2001).

Powyższe dane wykazują, że cholinergiczne komórki neuroblastoma SN56 różnicują się do trwałego fenotypu cholinergicznego, co czyni je wygodnym modelem do badań nad mechanizmami neurotoksyczności cholinergiczej.

## **2.7. Mechanizmy neuroprotekcji**

Badania nad mechanizmami choroby Alzheimera, stały się punktem wyjścia do poszukiwań potencjalnych terapii i czynników neuroprotektoryjnych. Doświadczenia, zarówno na modelach zwierzęcych, jak i na liniach komórkowych, przyczyniły się do poznania szeregu związków hamujących drogi metaboliczne, odpowiedzialne za postęp zmian neurodegeneracyjnych. Liczne badania z ostatnich lat skupiały się na poznaniu mechanizmów zapobiegających powstawaniu wolnych rodników tlenowych i nitrozylowych oraz zapobieganiu neurotoksyczności złogów amyloidu- $\beta$ , prowadzących do rozwoju zmian zapalnych w mózgu.

Wiele uwagi poświęcono mechanizmom ekscytotoksyczności i potencjalnym metodom jej zapobiegania. Powszechnie wiadomo, że zjawisko ekscytotoksyczności, polegające na długotrwałym pobudzeniu neuronów glutaminianergicznych, uruchamia kaskadę procesów prowadzących do nadmiernej syntezy tlenku azotu, aktywacji lipaz i endonukleaz oraz prawdopodobnie przyczynia się do aktywacji procesu amyloidogenezy i powstawania blaszek starczych oraz złogów białka tau. Kluczowe znaczenie w tym procesie ma pobudzenie receptorów N-metylo D-asparaginianowych (NMDA). W warunkach fizjologicznych, kwas glutaminowy uwalniany do szczeliny synaptycznej z zakończeń neuronów glutamatergicznych, ulega szybko wychwytowi zwrotnemu przez odpowiednie transportery EAAT 1-5, zlokalizowane w komórkach astroglajowych lub neuronach (Briz i Suñol 2011). Wykazano, że amyloid- $\beta$  hamuje wychwyt zwrotny glutaminianu przez synaptosomy i komórki glajowe (Tran i wsp. 2002). Nadmierna aktywacja receptorów NMDA,

wywołuje niekontrolowany napływ jonów wapnia do neuronów, co doprowadza do uszkodzenia lub/i śmierci neuronów (Hass 1981, Choi 1994, Butterfield i wsp. 2003). Uważa się, że amyloid- $\beta$ , hamując wychwyt zwrotny glutaminianu, wywołuje efekt ekscytotoksyczny, co wyzwała stres oksydacyjny. Powoduje to aktywację iNOS i nadmierną produkcję NO i rodników nitrozylowych (NOO<sup>•</sup>).

Teoria ta pozostaje w zgodzie z badaniami wykazującymi, że związki usuwające wolne rodniki, przeciwdziałają hamowaniu zwrotnego wychwytu glutaminianu (Harris i wsp. 1995). Powyższe doniesienia stanowiły podstawę teoretyczną strategii neuroprotekcyjnych zmierzających do inhibicji pobudzenia receptorów glutamatergicznych klasy NMDA, AMPA czy też kainianowych poprzez zastosowanie różnego rodzaju antagonistów. Jednym z nich jest memantyna, blokująca otwarcie kanału receptora NMDA, a przez to ekscytotoksyczność glutaminianu (Erdo i wsp. 1991, Parsons i wsp. 1993). Wykazano, iż podawanie memantyny szczurom, hamowało degenerację neuronów, spowodowaną wcześniejszym podawaniem amyloidu- $\beta_{(1-40)}$ , (Miguel-Hidalgo i wsp. 2002). Dodatkowo, memantyna, hamując nadmierną aktywację receptora NMDA nie upośledza jego fizjologicznej aktywności (Farlow i wsp. 2008).

W związku z różnorodnością mechanizmów prowadzących do rozwoju AD, badania ostatnich lat skupiały się również na związkach interferujących jednocześnie w wiele różnych, potencjalnych mechanizmów tej choroby. Zarówno w badaniach na zwierzętach transgenicznym, jak i w badaniach klinicznych testowano dziesiątki związków wykazujących działanie przeciwzapalne, przeciw-wolnorodnikowe, przywracających prawidłową funkcję mitochondriów, czy też hamujących amyloidogenezę.

Jedną z przyczyn choroby Alzheimera jest inhibicja metabolizmu oksydacyjnego mózgu, spowodowana inhibicją enzymów mitochondrialnych, takich jak np. PDHC i KDHC czy też akonitazy (Bubber i wsp. 2004, Sheu i wsp. 1985, Gibson i wsp. 2000). Aktywność tych dwóch enzymów zależy w znacznym stopniu od pirofosforanu tiaminy i kwasu RS- $\alpha$ -liponowego, stanowiących ich kofaktory. Stwierdzono, że kwas RS- $\alpha$ -liponowy wykazuje wiele różnych aktywności neuroprotekcyjnych. Między innymi w mózgach osób z encefalopatiami, powodował przywrócenie aktywności PDHC oraz obniżał śmiertelność komórek dzięki zdolności do usuwania wolnych rodników (Liu i wsp. 2002, Fröhlich i wsp. 2004). Szczególnie efektywnie ochraniał on komórki neuronalne przed uszkadzającym wpływem

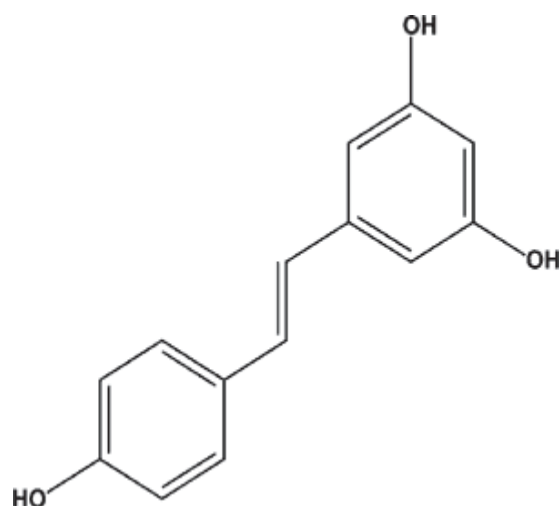
wolnych rodników nitrozylowych (Zhang i wsp. 2001, Rezk i wsp. 2004). Wykazano również ochronny wpływ kwasu RS- $\alpha$ -liponowego na neurony cholinergiczne, w których jego działanie neuroprotekcyjne polegało na podwyższaniu poziomu acetylo-CoA w mitochondriach z jednoczesnym wzrostem przeżywalności tych komórek (Bielarczyk i wsp. 2006). Okazał się on skuteczniejszym czynnikiem ochronnym aniżeli acetylo-L-karnityna czy też niskie stężenia interleukiny 1 $\beta$  (Bielarczyk i wsp. 2005, Szutowicz i wsp. 2005). Acetylo-karnityna i interleukina 1 $\beta$  powodowały wzrost poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA i funkcji neuroprzebieżniczych w komórkach cholinergicznym SN56, poddanych działaniu A- $\beta$ , lecz nie zapobiegały spadkowi ich żywotności. (Bielarczyk i wsp. 2005, Szutowicz i wsp. 2005).

Interleukina 1 $\beta$ , znana jest głównie z wywoływania reakcji zapalnych i efektu cytotoksycznego w różnych tkankach. Stwierdzono wzrost poziomu interleukiny 1 $\beta$  po ischemii, w AD, jak również w innych modelach badających mechanizmy neurotoksyczności (McGeer i McGeer 2003, Rothwell i Luheshi 2000). Interleukina 1 $\beta$  powoduje dysfunkcję neuronów cholinergicznym, przejawiającą się obniżoną ekspresją i aktywnością ChAT oraz obniżeniem poziomu ACh (Casamenti i wsp. 1999, Giovannini i wsp. 2002, Stoll i wsp. 2000). Niemniej jednak istnieją coraz liczniejsze doniesienia na temat potencjału neuroprotekcijnego cytokin prozapalnych w tym interleukiny 1 $\beta$ , interleukiny 6 czy też TNF (Tumor Necrosis Factor). Badania ostatnich lata wykazały, że niskie (10ng/mL) stężenia IL 1 $\beta$  mogą wywierać działanie cholinotropowe w neuronach cholinergicznym. Efekt ten jest prawdopodobnie spowodowany, zależną od interleukiny 1 $\beta$ , aktywacją kinazy białkowej MAPK (mitogen-associated protein kinase) (Rothwell i Luheshi 2000), która następnie aktywuje białko CREB w locus cholinergicznym, prowadząc do wzrostu ekspresji i aktywności ChAT (Szutowicz i wsp. 2004). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze badania, które wykazały neuroprotekcyjne właściwości IL 1 $\beta$  w komórkach neuronalnym zależne, od jej stężenia (Strijbos i wsp. 1997). Między innymi stwierdzono, że cytokina ta indukuje ekspresję różnych czynników wzrostowych w komórkach neuronalnym, takich jak np. BDNF (Rage i wsp. 2006) czy NGF (Strijbos i wsp. 1995). Istnieją jednocześnie dane na temat neuroprotekcijnego działania TNF (Barger i wsp. 1995, Bruce i wsp. 1996, Cheng i wsp. 1994). Polega ono na ochronie neuronów przed pobudzeniem ekscytotoksycznym, bezpośrednio przez modulowanie funkcji receptora NMDA lub pośrednio poprzez hamowanie reakcji metabolicznym, prowadzących do aktywacji

jonotropowego receptora glutaminianowego (GluR). Również IL-6 może wywierać działanie neuroprotekcyjne. Mechanizm jej działania jest jednak inny niż TNF- $\alpha$ . Wymaga ona aktywacji receptora dla interleukiny 1 (IL-1ra) oraz prawdopodobnie wzrostu wydzielania NGF (Strijbos i Rothwell 1995). Potwierdzają to doświadczenia wykazujące, że antagoniści receptora IL-1 i przeciwciała anty-NGF, hamują neuroprotekcyjne działanie IL-1 oraz IL-6 (Carlson i wsp. 1999).

### **2.7.1. Resweratrol ( $C_{14}H_{12}O$ ; 3,4',5-trihydroxystilben )**

Resweratrol (RES) jest naturalnym polifenolem występującym w wielu gatunkach roślin, wchodzących w skład codziennej diety. Są to m.in. orzeszki ziemne, czerwone winogrona i wina (Karuppagounder i wsp., 2009). Stwierdzono, że synteza tej fitoaleksyny odbywa się w odpowiedzi na uszkodzenie mechaniczne, promieniowanie UV, czy też infekcje grzybicze (Drecks i wsp. 1989). Wysokie stężenie RES w skórce czerwonych winogron (50-100 $\mu$ g/g) jest prawdopodobnie wynikiem częstych u tego gatunku roślin zakażeń grzybiczych (Dereks i wsp. 1989). Najwyższe stężenia tego polifenolu, od 1.5 do 3 mg/L, znajdują się w czerwonym winie (Goldberg i wsp. 1995, Romero-Perez i wsp. 1996). Inni podają wartości dużo wyższe, od 4 do 20 mg/L (Langcake i wsp. 1976, Siemann i wsp. 1992). W produktach spożywczych RES występuje jak mieszanina pochodnych cis- i trans. Izomeryzacja z formy trans-do cis zachodzi pod wpływem promieniowania UV. Jego podstawową formą jest postać glikozylowana - 3-O- $\beta$ -D-glukozyd-RES. Zarówno rośliny, mikroorganizmy jak i zwierzęta, posiadają enzymy utleniające, a tym samym inaktywujące polifenole. Natomiast glikozylacja RES hamuje jego utlenianie, co powoduje stabilizację, utrzymanie biologicznej aktywności i biodostępności (Regev-Shoshani i wsp. 2003, Krasnow i wsp. 2004).



Ryc. 2. Wzór strukturalny resweratrolu.

Komórki nabłonka jelit są zdolne do absorpcji jedynie nieglikozylowanej formy RES. W związku z tym absorpcja tego związku jest procesem wymagającym obecności glikozydaz. Zróżnicowana aktywność i poziom ekspresji jelitowych glikozydaz, może tłumaczyć różną kinetykę wchłaniania RES ze światła przewodu pokarmowego, obserwowaną w ludzkich i zwierzęcych modelach badawczych (Signorelli i wsp. 2005). Badania nad aktywnością RES nabrały szybkiego tempa od czasu, gdy zaobserwowano odwrotną korelację pomiędzy ilością spożywanego czerwonego wina, a częstością incydentów sercowo-naczyniowych, których we Francji jest o 40% mniej aniżeli w pozostałych krajach europejskich (Renaud i de Lorgeril 1992). Zważywszy na tradycyjną, bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe, dietę francuską, zjawisko to nazwano „francuskim paradoksem”, który zapoczątkował okres intensywnych badań nad RES (Goldberg i wsp. 1995, Burns i wsp. 2000, Constant i wsp. 1997, Das i wsp. 1999, Renaud i wsp. 1996). Nie były to jednak jedyne obserwacje wskazujące na terapeutyczną aktywność tej fitoaleksyny. Stwierdzono również, dodatnią korelację pomiędzy działaniem RES, a zahamowaniem procesów nowotworzenia w modelu mysim (Jang i wsp. 1997). Dalsze badania prowadzone w tym kierunku wykazały, iż antynowotworowe działanie RES wynika z jego aktywności pro-apoptotycznej (Clement i wsp. 1998). Od tej pory badania nad aktywnością RES pozwoliły na scharakteryzowanie jego właściwości:

- przeciwzapalnych (Birrell i wsp. 2005, Chen i wsp. 2010),
- antynowotworowych, głównie dzięki aktywności antyoksydacyjnej (Fauconneau i wsp. 1997, Chen i wsp. 2009, Yu i wsp. 2009),

- spowalniających procesy starzenia poprzez jego działanie protekcyjne w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak AD, choroba Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne (Wang i wsp. 2006, Marambaud i wsp. 2005).

Wykazano również jego hamujący wpływ na agregację płytek krwi oraz aktywność fitoestrogenową (Carbo i wsp. 1999, Wadsworth i wsp. 1999, Park i wsp. 2001, Bowers i wsp. 2000, Ray i wsp. 1999).

#### *2.7.1.1. Resweratrol w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym*

Choroba niedokrwienna serca i udar mózgu są następstwem stwardnienia i zwężenia tętnic wieńcowych i mózgowych. Są one zejściem ogólnoustrojowych przewlekłych procesów chorobowych w układzie sercowo naczyniowym, w rozwój których zaangażowanych jest wiele patomechanizmów. Do kluczowych czynników patogennych miażdżycy naczyń krwionośnych zalicza się zaburzenia metabolizmu cholesterolu/lipoprotein oraz procesów hemostazy osoczowej i komórkowej. Również prace prowadzone w naszym Zakładzie wykazały, że istotną rolę w tym procesie odgrywają zaburzenia transportu cholesterolu w cząstkach HDL (Wróblewska i wsp. 2009, 2010). Prawidłowa funkcja komórek śródbłonna naczyń jest uwarunkowana ich zdolnością do syntezy tlenku azotu, prostacyklin i tkankowego aktywatora plazminogenu. Równowaga między tymi czynnikami zapewnia utrzymanie podstawowej aktywności przeciwplatekowej i zapobiega powstawaniu zmian miażdżycowych (Gryglewski i wsp. 1995). Jedną z hipotez dotyczących rozwoju miażdżycy, opiera się na stwierdzeniu wydłużonego czasu retencji lipoprotein w ścianie naczyń krwionośnych, co z kolei prowadzi do lokalnego stanu zapalnego (Kreuzer i wsp. 1994, Schissel i wsp. 1994). Stan zapalny pobudza komórki fagocytarne do adhezji i zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS, reactive oxygen species) (Halliwell i wsp. 1989). Stres oksydacyjny, spowodowany miejscowym stanem zapalnym uruchamia sekwencję reakcji, prowadzących do utlenienia LDL (low density lipoproteins) (Steinberg i wsp. 1989). Proces ten jest inicjowany przez wolne rodniki hydroksylowe, wykazujące wysokie powinowactwo do cząsteczek LDL. Dodatkowo, ROS, powstają w reakcji nadtlenu wodoru z kationami niektórych metali np.  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ . Kationy te są zazwyczaj związane ze specyficznymi białkami, takimi jak transferyna czy ceruloplazmina. Stan zapalny w ścianie naczyń związany jest z lokalnym obniżeniem pH w przestrzeni śródmiaższowej, co powoduje uwolnienie w/w

kationów z kompleksów z białkami (Ignatowicz i wsp. 1994). Stwierdzono, że RES hamuje odkładanie się LDL w ścianie naczyń krwionośnych, w zależności od jego stężenia (Fremont i wsp. 2000). Dodatkowo stwierdzono, że hodowle hepatocytów, poddane działaniu RES, wydzielały mniej zestryfikowanego cholesterolu i triglicerydów, podczas gdy wewnątrzkomórkowy poziom lipidów pozostawał bez zmian. Nasuwa to przypuszczenie, że RES zmniejsza sekrecję VLDL z wątroby, który następnie byłby przekształcany w LDL w krążeniu. Zatem RES blokuje metabolizm lipoprotein wątrobowych (Ganziano i wsp. 1994, Goldberg i wsp. 1995, Hahn i wsp. 1992). RES, może również zapobiegać utlenianiu cząsteczek LDL, poprzez aktywność antyoksydacyjną i zdolność do wiązania kationów metali (Belguendouz i wsp. 1997). Zaproponowano kilka mechanizmów, dzięki którym ta fitoaleksyna pełnić może funkcję antyoksydacyjną. Po pierwsze, RES konkuruje z koenzymem Q w kompleksie III łańcucha oddechowego, który jest miejscem powstawania wolnych rodników tlenowych (Zini i wsp. 1999). Jest silnym inhibitorem utleniania zredukowanej formy fosforanu nikotynoamido-adeninowego (NADPH) i adenozylo 5'-difosforanu (ADP) oraz peroksydacji lipidów, wywołanej promieniami UV (Miura i wsp. 2000). RES, z 95 % wydajnością, zapobiegał peroksydacji lipidów w modelu wykorzystującym, poddawane promieniowaniu  $\gamma$ , liposomy (Stojanovic i wsp. 2001). Dla porównania, wydajność antyoksydacyjna witaminy E wynosiła 65% a witaminy C zaledwie 37% (Stojanovic i wsp. 2001). Najlepiej poznanym, antyoksydacyjnym działaniem RES jest jego zdolność do aktywacji białek sirtuin (Chen i wsp. 2009, Yu i wsp. 2009). U ssaków scharakteryzowano siedem białek klasy sirtuin, od SIRT1 do SIRT7 (Baur, Sinclair, 2006). Sirtuiny regulują wiele szlaków wewnątrzkomórkowych, poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych oraz enzymów odpowiedzialnych za dostępność substratów energetycznych. Główną rolę odgrywa SIRT1, zaangażowana w procesy naprawy DNA, przeżycie komórek, glukoneogenezę, regulację cyklu komórkowego oraz metabolizm lipidów (Brooks i Gu 2009). Wykazano, że RES hamuje, wywołaną hipoksją, apoptozę komórek H9c2, poprzez aktywację SIRT1 (Chen i wsp. 2009). Zaktywowany SIRT1 uruchamia mechanizmy antyoksydacyjne, prowadzące do zmniejszenia produkcji mitochondrialnych ROS (Ungvari i wsp. 2009). Pozostałe sirtuiny a zwłaszcza SIRT3, 4 i 7 zaangażowane są w przeżycie i ochronę przed apoptozą, spowodowaną stresem oksydacyjnym w miocytach serca (Yu i wsp. 2009). Powszechnie wiadomo, że obniżona produkcja NO w komórkach endotelium



proceeds to narrowing of blood vessels, excessive aggregation of blood platelets and oxidative stress (Bai et al. 2010, Gatouillat et al. 2010, Jiang et al. 2010, Wang et al. 2010). In unharmed blood vessels, RES causes an increase in the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and with that an increase in its synthesis and an increase in the level of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which with NO forms a protective system for the cardiovascular system (Wang et al. 2007). There are, however, reports that RES also has a direct opposite effect. It was observed in lipopolysaccharide-activated macrophages, as well as in a line of human B lymphocytes isolated from patients with lymphatic leukemia (Tsai et al. 1999, Wadsworth et al. 1999, Matsuda et al. 2000, Roman et al. 2002). It consists in a reduction of NO production, through inhibition of mRNA transcription for iNOS and a reduction of the cytosolic level of this protein, most likely as a result of inhibition of I- $\kappa$ B phosphorylation and activation of NF- $\kappa$ B (Tsai et al. 1999). In activated macrophages, this results in a reduction of the inflammatory state, induced among others by the anion of nitroperoxy (ONOO<sup>-</sup>). On the other hand, inhibition of NO production by iNOS in cancer cells promotes their apoptosis (Roman et al. 2002). Another effect of RES is the inhibition of blood clotting rate. It was shown that this polyphenol inhibits the adhesion of blood platelets to type I collagen, which is the first step in the activation of platelets and clot formation (Fremont et al. 2000). It was also shown that RES inhibits arachidonic acid (AA)-induced aggregation of platelets (Crescente et al. 2009).

#### 2.7.1.2. *Resveratrol in the central nervous system*

It is established that natural polyphenols, and in particular RES, possess certain properties, which can prevent the development of many neurodegenerative diseases, such as AD, Parkinson's disease, sporadic or familial amyotrophic lateral sclerosis. Polyphenols can protect neurons from the effects of various cytotoxic factors. The protective function of these compounds does not result only from their antioxidant activity. Recent studies have shown that natural polyphenols also modify directly different signaling pathways and cascades of neurodegenerative processes and the synthesis and degradation of amyloid- $\beta$  in the brain (Ono et al. 2003).

Jak powszechnie wiadomo, zmiany histopatologiczne w mózgach osób chorych na AD, dotyczą głównie, obecności wewnątrzneuronalnych zwyrodnień neurofibrylarnych i zewnątrzkomórkowych płytek starczych, których składnikami są odpowiednio: hiperfosforylowane białko tau, oraz agregaty amyloidu- $\beta$ . Stanowi to podstawę hipotezy, że białko amyloidu- $\beta$  odgrywa kluczową rolę w rozwoju AD (Hardy i wsp. 1992). Postuluje się istnienie kilku mechanizmów neurotoksyczności amyloidu- $\beta$ , takich jak stres oksydacyjny, apoptoza, wpływ na enzymy mitochondrialne, aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, czy też tworzenie kanałów wapniowych o wysokiej przewodności (Kaltschmidt i wsp. 1997). Istnieje wiele danych epidemiologicznych wskazujących, iż umiarkowane spożywanie wina, będącego jednym z głównych źródeł RES przekłada się na rzadsze występowanie incydentów AD (Wang i wsp. 2006, Savaskan i wsp. 2003). Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, iż RES zawarty w winie może opóźnić objawy tej choroby, poprzez inhibicję powstawania złogów amyloidu- $\beta$  w mózgu (Ono i wsp. 2003). Poza tym wiele danych dowodzi, iż zwyrodnienia neurofibrylarne, indukowane przez amyloid- $\beta$  są źródłem wolnych rodników tlenowych (ROS) (Gervais i wsp. 1999). Zarówno ROS, jak i złogi amyloidu- $\beta$  prowadzą do śmierci komórek na drodze apoptozy. Przeprowadzając badania na różnych liniach komórkowych stwierdzono, że RES hamuje powstawanie ROS, generowanych przez zwyrodnienia neurofibrylarne (Jang i Surh 2003), dodatkowo blokując mechanizmy apoptozy (Jang i Surh 2003). Wykazano, że RES w stężeniach od 20 do 40  $\mu$ mol/L znacząco obniża poziom wydzielanego i wewnątrzkomórkowego amyloidu- $\beta$  (Marambaud i wsp. 2005). Co ciekawsze efekt ten nie wiąże się z zahamowaniem aktywności  $\beta$  i  $\gamma$ -sekreazy, lecz ze zwiększeniem stopnia degradacji amyloidu- $\beta$ , najprawdopodobniej poprzez zależną od RES aktywację proteasomów (Marambaud i wsp. 2005). Teoria ta uzupełnia wcześniejsze badania, które wykazały, iż amyloid- $\beta$  powoduje inhibicję aktywności proteasomów (Eckman i wsp. 2003). RES jest też zaangażowany w inny mechanizm, zapobiegający powstawaniu złogów amyloidu- $\beta$ . Polega on na ujemnej modulacji aktywności czynnika jądrowego kappa B (NF- $\kappa$ B). Jak wiadomo, NF- $\kappa$ B jest czynnikiem transkrypcyjnym, zwiększającym przeżycie komórek, zdolność do adhezji, wzrost komórek i ich różnicowanie. Z drugiej strony nasila on reakcje zapalne. Jednym z czynników aktywujących NF- $\kappa$ B jest białko amyloidu- $\beta$  (Kaltschmidt i wsp. 1999). NF- $\kappa$ B występuje w cytoplazmie w formie nieaktywnej. Dodatkowo, RES może hamować aktywację NF- $\kappa$ B, poprzez reakcję z

białkami, takimi jak sirtuiny. Białko SIRT1 z rodziny sirtuin jest  $\text{NAD}^{+}$ -zależną deacetylazą. Wzrost jej ekspresji hamuje neurodegenerację w zwierzęcych modelach AD czy też choroby Huntingtona (Anekonda i wsp. 2006). Nadekspresja SIRT1 w połączeniu z działaniem RES wyraźnie hamowała aktywację NF- $\kappa$ B, wywołaną amyloidem- $\beta$ , poprzez deacetylację fragmentów lizyny w pozycji 310, podjednostki p65 (Chen i wsp. 2005). Zatem inhibitorowy wpływ RES na NF- $\kappa$ B aktywowany amyloidem- $\beta$ , odbywa się również w wyniku aktywacji SIRT1. Tak więc oprócz bezpośredniego działania antyoksydacyjnego, RES wywiera długoterminowe działanie neuroprotekcyjne, poprzez aktywację SIRT1 i regulację aktywności NF- $\kappa$ B (Pervaiz i wsp. 2003). Biorąc pod uwagę różnorodność mechanizmów, które mogą być modyfikowane przez RES, uzasadnione są dalsze badania dotyczące jego potencjału terapeutycznego w AD.

### **2.7.2. Wpływ resweratrolu na aktywność mikrogleju**

#### **2.7.2.1. Właściwości mikrogleju**

Komórki mikrogleju stanowią odrębną populację komórek glejowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Po raz pierwszy zostały one opisane w 1932 roku przez del Rio-Hortega. Stworzył on pojęcie tzw. „trzeciego elementu”, gdzie obok oligodendrocytów, umieścił również mikroglej, odróżniając go wyraźnie od neuronów i astrocytów (Prinz i wsp. 2011). Liczne doniesienia sugerują, że populację mikrogleju stanowią wyspecjalizowane komórki, pochodzące z jednojądrowej linii fagocytowej. Przemawia za tym zdolność mikrogleju do ekspresji domeny Fc oraz receptorów dla składowych układu dopełniacza CD11b i F4/80, obecnych również na mielomonocytach (Hanisch i wsp. 2002, Perry i wsp. 1985). Prekursory mikrogleju zasiedlają ośrodkowy układ nerwowy już podczas embriogenezy i w okresie płodowym (Rezaie i Male 2002). Pierwsze, makrofagopodobne komórki o ameboidalnym kształcie powstają we wczesnych stadiach embriogenezy (miedzy 8 a 10 dniem życia płodowego) (Ashwell 1990). Już wtedy w woreczku żółtkowym znajdują się pierwsze niedojrzałe makrofagi, które mogą być prekursorami komórek mikroglejowych. Następnie migrują do rozwijającego się mózgu, gdzie przekształcają się w dojrzały mikroglej (Herbomel i wsp. 2001). Zatem komórki mikrogleju w centralnym układzie nerwowym pochodzą z prekursorów myeloidowych, które powstają w czasie rozwoju embrionalnego. W dojrzałym mózgu mogą one występować jako mikroglej spoczynkowy, mikroglej

zaktywowany i mikroglej fagocytarny (Verkhatsky i Butt, *Glial Neurobiology*, 2007). Zazwyczaj komórki mikrogleju występują w stanie spoczynkowym (tzw. mikroglej rozgałęziony) i są obecne w całym mózgu. Najwięcej komórek mikroglejowych znajduje się w hipokampie, korze węchowej, zwojach podstawy i w istocie czarnej. Stanowią one około 10% wszystkich komórek glijowych mózgu. Komórki mikroglejowe posiadają wiele receptorów i miejsc rozpoznawanych przez cząsteczki immunologiczne, stąd ważną właściwością mikrogleju jest zapoczątkowywanie reakcji immunologicznej w przypadku procesów zapalnych w mózgu.

#### *2.7.2.2. Modyfikacja prozapalnych właściwości mikrogleju przez resweratrol*

Powszechnie wiadomo, że nadmiar NO i jego reaktywnych form odgrywa jedną z kluczowych ról w procesach śmierci komórkowej w chorobie Parkinsona i AD. W związku z tym podjęto intensywne badania nad mechanizmami hamowania syntezy NO i usuwania wolnych rodników nitrozylowych. Komórki mikroglejowe, wywodzące się z linii makrofagowej, mogą zostać zaktywowane w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek stanu zapalnego lub w przebiegu infekcji bakteryjnej (Stoll i wsp. 1999). Stwierdzono, że aktywacja mikrogleju w mózgu, powoduje zwiększone uwalnianie ROS, NO oraz proteaz i cytokin prozapalnych (Stoll i wsp. 1999). Nadmierna i wydłużona stymulacja mikrogleju uruchamia szereg mechanizmów, które wpływają niekorzystnie na przebieg wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym AD, choroby Parkinsona (Stoll i wsp. 1999, McGeer i wsp. 1993), stwardnienia rozsianego, czy też otępienia spowodowanego zakażeniem wirusem HIV (Kaul i wsp. 2001). W związku z tymi doniesieniami postuluje się, że kluczową rolę w terapii tych schorzeń powinny odgrywać związki hamujące aktywację mikrogleju. RES, posiadający zdolność do indukcji ekspresji wewnątrzkomórkowych enzymów antyoksydacyjnych, wykazuje również aktywność przeciwzapalną. Polega ona, prawdopodobnie, na hamowaniu ekspresji genów stanu zapalnego, kodujących enzymy syntetyzujące eikosanoidy czy też indukowaną formę iNOS w aktywowanych LPS komórkach mikrogleju (Matesuda i wsp. 2000). RES może również hamować wydzielanie czynników prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6. TNF- $\alpha$  jest produkowany w niepobudzonym mikrogleju w śladowych ilościach (Feinstein i wsp. 1994), natomiast po stymulacji mikrogleju lipopolisacharydem jego uwalnianie wzrasta wielokrotnie. Mikroglej stymulowany

amyloidem- $\beta$ , również uwalnia duże ilości TNF- $\alpha$ , który staje się czynnikiem neurotoksycznym. RES silnie hamuje produkcję TNF- $\alpha$  w mikrogleju pobudzonym LPS. Transkrypcja i biosynteza TNF- $\alpha$  jest kontrolowana, między innymi, przez NF- $\kappa$ B (Surh i wsp. 2001). Wykazano, że RES wpływa na aktywację NF- $\kappa$ B indukowaną różnymi czynnikami prozapalnymi (Manna i wsp. 2000). Powoduje również inhibicję NF- $\kappa$ B poprzez inhibicję aktywności I $\kappa$ B (Holems-McNary i wsp. 2000).

Zatem powyższe doniesienia sugerują, że przeciwzapalne właściwości RES sprowadzają się głównie do hamowania aktywacji NF- $\kappa$ B, AP-1 oraz kinazy białkowej MAP, regulujących poziom NO i cytokin prozapalnych a zwłaszcza TNF- $\alpha$  (Manna i wsp. 2000). Niewiele jest jednak doniesień na temat wpływu RES na niepobudzony mikroglej, produkujący małe ilości cytokin prozapalnych.

Wiadomo również, że jednym z głównych zaburzeń metabolizmu mózgu w encefalopatiach takich jak: AD, encefalopatia wątrobowa, dializacyjna czy zespół Wernicke-Korskoff, są niedobory energetyczne spowodowane inhibicją enzymów związanych z metabolizmem glukozy, pirogronianu i acetylo-CoA (Bielarczyk i wsp. 1998, Bubber i wsp. 2004, 2005, Jankowska-Kulawy i wsp. 2008, 2010). Dotychczasowe badania nad neuroprotekcijnym działaniem RES nie uwzględniają jednak takiego potencjalnego punktu uchwytu dla tego związku.

Wątpliwości co do neuroprotekcijnego działania polifenoli wzbudzają również wyniki metaanalizy kilkudziesięciu badań populacyjnych i klinicznych nad ewentualnym działaniem RES zawartego w czerwonym winie, który miałby zapobiegać rozwojowi AD (Neafsey, Collins, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2011,7,465-484). Tylko 30% z nich wykazywało pozytywny wpływ spożywania „umiarkowanych dawek” czerwonego wina na funkcje poznawcze osób w podeszłym wieku. Około 50% badań nie wykazało żadnego wpływu, a 20% działanie negatywne (Neafsey, Collins 2011).

Wymienione rozbieżności i braki w danych doświadczalnych uzasadniały podjęcie badań nad wpływem RES na kluczowe parametry metabolizmu energetycznego neuronów cholinergicznyc,h w warunkach złożonej ekspozycji na różne czynniki neurotoksyczne.

### 3. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie potencjału cytotoprotekcyjnego RES, oddziałującego na cholinergiczne komórki SN56, poddawane wpływowi czynników cytotoksycznych, takich jak Zn i SNP. Jednocześnie, wykorzystując model hodowli łączonych, cholinergicznych neuronów SN56 z komórkami mikrogleju N9, zbadano w jaki sposób niepobudzony lub pobudzony mikroglej może modyfikować odpowiedź cholinergicznych neuronów SN56 na bodźce zarówno cytotoksyczne, jak i cytotoprotekcyjne.

W związku z powyższymi celami zbadano:

1. Wpływ RES, Zn i SNP na aktywność PDHC i innych enzymów zaangażowanych w metabolizm energetyczny cholinergicznych neuronów SN56
2. Wpływ Zn i SNP na poziom parametrów metabolizmu energetycznego w komórkach cholinergicznych SN56
3. Potencjalne możliwości cytotoprotekcyjne RES w stosunku do cholinergicznych komórek SN56, eksponowanych na neurotoksyczne oddziaływanie Zn lub/i SNP w obecności i nieobecności parakrynnego oddziaływania komórek mikroglejowych.

## 4. MATERIAŁY I METODY

### 4.1. Odczynniki

Odczynniki pochodzące z Sigma Chemicals Co., Poznań, Polska: acetylo-CoA, acetylo-fosforan, acetonitryl, albumina wołowa, amfoterycyna B, ATP, błękit trypanu, chlorek cynku, cis-akonitan, cytrynian sodu, dehydrogenaza jabłczanowa, dehydrogenaza izocytrynianowa, 2,5-difenyloksazol, ditiotreitrol (DTT), środowisko Eagle zmodyfikowane według Dulbecco (DMEM), dimetylosulfotlenek (DMSO), DL-izocytrynian, dwumaślan cyklicznego AMP, fosfotransacetylaza, glukoza, L-glutamina, glicyna, HEPES, immunoglobulinana ludzka, koenzym A (CoA),  $\alpha$ -ketoglutaran sodu, kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DNTB), kwas fosforowy, liaza cytrynianowa z *Bacillus subtilis*, lipopolisacharyd (LPS), lucyferyna, lucyferaza, środowisko MEM, NAD, NADH, NADP, NADPH, nadtlenuk wodoru, nitroprusydek sodu, odczynnik Griessa, pirofosforan tiaminy, pirogronian, roztwór penicyliny i streptomycyny, resweratrol (*1,3-Benzenodiol,5-(2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl)*), syntaza cytrynianowa, szczawiooctan, siarczan dodecyłu (SDS), tetrafenyloboran sodu, trójetanolamina, TRIS, Tricina, toluen.

Odczynniki pochodzące z Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria: bezwodnik kwasu maleinowego, kwas trójchlorooctowy.

Odczynniki pochodzące z POCH (Gliwice, Polska): chloroform, etanol, metanol, kwas mrówkowy, kwas nadchlorowy, kwas solny, chlorek potasu, chlorek sodu, wodorowęglan potasu, węglan potasu, wersenian sodowy, wodorotlenek potasowy, wodorotlenek sodowy.

Odczynniki pochodzące z firmy Gibco: surowica płodowa cielęca (FBS).

Odczynniki pochodzące z firmy Bio-Rad (Warszawa, Polska): Coomassie blue R250.

Odczynniki pochodzące z firmy Perkin Elmer (Boston, USA): [1-14C] acetylo-CoA.

Odczynniki pochodzące z firmy USCN Life Science Inc. (Wuhan, Chiny): zestaw do oznaczania poziomu białka ChAT metodą ELISA.

### 4.2. Materiały zużywalne

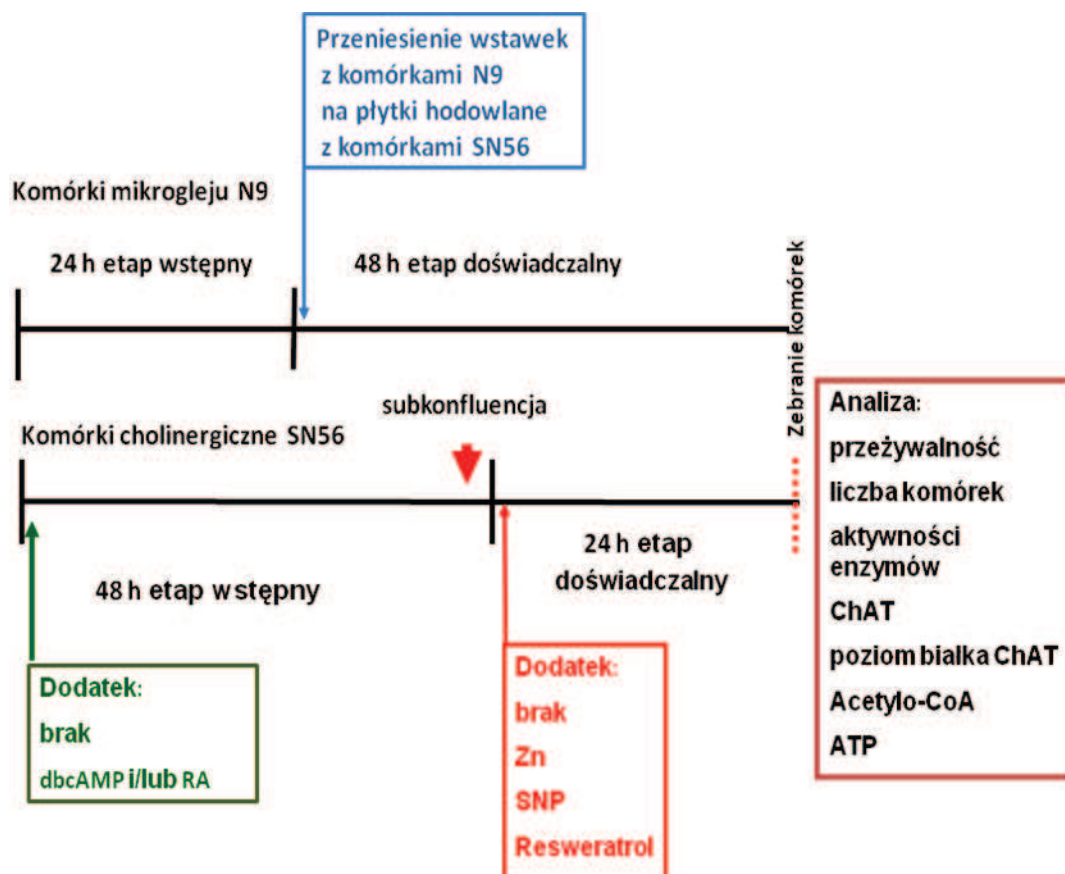
Naczynia plastikowe jednorazowego użytku do hodowli komórkowej dostarczone były przez Sarstedt (Stare Babice, Polska) i Medlab (Raszyn, Polska). Wstawki do hodowli łączonych z półprzepuszczalną membraną typu Millicell o porowatości 0.4 $\mu$ m i średnicy 30 mm pochodziły z firmy Millipore.

### 4.3. Komórki cholinergiczne SN56

Doświadczenia były prowadzone na linii komórek cholinergicznych SN56 (klon SN56 B5.G4.). Komórki te uzyskano w wyniku fuzji niecholinergicznych mysich komórek neuroblastoma N18TG2 z cholinergicznymi neuronami z przegrody mózgu 21-dniowej myszy (Hammond i wsp. 1990, Lee i wsp. 1990). Otrzymaliśmy je dzięki uprzejmości prof. Jana K. Blusztajna (Boston University, USA). Hodowlę prowadzono w środowisku hodowlanym Eagle, zmodyfikowanym według Dulbecco (DMEM), zawierającym 10% surowicy płodowej cielęcej (FBS) oraz 2 mM L-glutaminę, z dodatkiem 50 µg/ml streptomycyny, 50 J.M/ml penicyliny, 0.25 µg/ml amfoterycyny B. Dzięki adherentnym właściwościom, komórki SN56 przylegają do powierzchni plastikowych naczyń hodowlanych, bez konieczności ich uprzedniego pokrywania kolagenem. Po rozmrożeniu, komórki hodowano przez 7 dni, w celu ich odpowiedniego namnożenia, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza. Komórki hodowano w środowisku hodowlanym DMEM, które wymieniano co 2-3 dni. Doświadczenia przeprowadzano na pasażach od 22 do 26. Każde doświadczenie składało się z dwóch etapów: wstępnego i doświadczalnego. W etapie wstępnym komórki hodowano w płaskich butelkach (Sarstedt, Stare Babice, Polska) o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> lub płytkach o średnicy 10 cm przy gęstości początkowej 13000/cm<sup>2</sup> do stanu subkonfluencji, co odpowiadało pokryciu przez komórki około 80% powierzchni naczynia hodowlanego. Stan subkonfluencji uzyskiwano po 48 godzinach od rozpoczęcia hodowli. W celu zwiększenia ekspresji fenotypu cholinergicznego, do hodowli na wstępnym etapie dodawano czynniki różnicujące: 2 mM dwumaślan-cAMP i 1 µM kwas retinowy. Po 48 godzinach hodowli z tymi czynnikami, środowisko wzrostowe zmieniano na środowisko doświadczalne, do którego dodawano czynniki cytotoksyczne lub/i cytoprotekcyjne i kontynuowano hodowlę przez następne 24 godziny. Pełny cykl doświadczenia trwał 72 godziny. Zakończenie hodowli następowało w momencie usunięcia doświadczalnego środowiska hodowlanego. Komórki, które pozostały w naczyniu hodowlanym, przemywano delikatnie 5 ml buforu „Pucks” zawierającym 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glukozę, pH środowiska 7.4. Następnie zbierano komórki z naczynia hodowlanego, używając w tym celu plastikowych skrobaczek. Otrzymaną w ten sposób zawiesinę komórek, wirowano przy 1200 obr./min (208 x g) przez 7 minut. Osadzone komórki zawieszano w 320 mM sacharozie zawierającej 5 mM bufor NaHEPES (pH 7.4) i 0.1



mM EDTA-Na, w objętości niezbędnej do uzyskania 10 mg białka komórkowego/ml (około 10 mln komórek/ml).

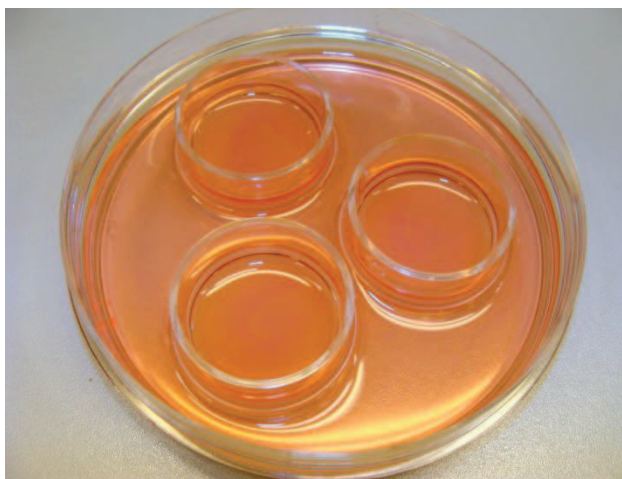


Ryc. 3. Komórkowy model neurotoksyczności i neuroprotekcji neuronów cholinergiczych

#### 4.4. Komórki mikroglejowe N9

W celu przeprowadzenia hodowli łączonych, wprowadzono do doświadczeń linię mysich mikroglejowych komórek N9. Uzyskano je przez transfekcję komórek mikroglejowych z mózgow 13-dniowych zarodków myszy, retrowirusem 3RV, zawierającym aktywny onkogen v-myc (Righi i wsp. 1989). Komórki N9 otrzymaliśmy dzięki uprzejmości prof. Janusza Suszkiwa (University of Cincinnati, OH, USA). Komórki N9 hodowane były w środowisku MEM z 10 % surowicą płodową cielęcą (FBS), 2mM L-glutaminą z dodatkiem 50 J.m/ml penicyliny, 50µg/ml streptomycyny oraz 0.25µg/ml amfoterycyny B. Stężenie glukozy w środowisku hodowlanym wynosiło 3.5g/L. Po rozmrożeniu, komórki N9 hodowano przez 7 dni w temperaturze 37°C, atmosferze 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie komórki N9 przygotowywano do przeprowadzenia hodowli łączonej z komórkami SN56.

Polegało ono na wysianiu komórek N9 na płytkę hodowlaną z półprzepuszczalnym dnem (tzw. wstawkę, insert, wielkość porów 0.4  $\mu\text{m}$ ) o średnicy 3 cm. (Millipore, Polska) (Ryc. 4). Komórki N9 były hodowane przez 24 godziny na wstawkach umieszczonych w 6-dołkowych płytkach. Po tym czasie, wstawki z komórkami N9, przenoszono do płytek hodowlanych, o średnicy 10 cm, w których od 24-godzin hodowano cholinergiczne komórki SN56 i prowadzono jako wstępną hodowlę łączoną przez następne 24 godziny. Po tym czasie na kolejne 24-godzin do hodowli łączonej dodawano związki cytoprotekcyjne lub/i cytotoksyczne. Wiadomo, że mikroglej stanowi około 10% wszystkich komórek mózgu (Verkhatsky i Butt 2007). Dlatego na 3 miliony komórek cholinergicznych SN56 hodowanych na płytkę o średnicy 10 cm wstawiano 3 inserty zawierające łącznie około 1 miliona komórek mikroglejowych N9 (Ryc. 4). Po trwającej 48-godzin hodowli łączonej usuwano wstawki z komórkami N9, a odpowiednie parametry pomiarowe komórek SN56 oznaczano tak jak opisano w podrozdziałach 4.8-4.9.



Ryc. 4. Hodowle łączone neuronalnych komórek cholinergicznych SN56 i mikroglejowych N9.

#### **4.5. Zamrażanie komórek**

Komórki przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pożywka zamrażająca zawierała: 63% DMEM, 30% FBS, 7% dimetylosulfotlenek (DMSO). Komórki zamrażano w krioampułkach w porcjach 0.5 ml przy gęstości zawiesiny komórek 2–2.5 mln/ml pożywki.

## **4.6. Czynniki neurotoksyczne**

### **4.6.1. Cynk**

Jako źródła jonów cynku użyto chlorku cynku. Przygotowywano roztwór wyjściowy o stężeniu 10 mM, który dodawano do pożywki wzrostowej tak, aby jego stężenie końcowe wynosiło od 0.175 mM. Komórki hodowano przez ostatnie 24 godziny pasażu doświadczalnego w obecności 0.175 mM cynku.

### **4.6.2. Tlenek azotu**

Jako donor tlenu azotu zastosowano nitroprusydek sodu (SNP). Świeżo sporządzony 100 mM roztwór wyjściowy SNP dodawano do pożywki wzrostowej, tak aby uzyskać końcowe stężenie 0.4 mM. W tych warunkach komórki hodowano przez ostatnie 16 godzin pasażu doświadczalnego.

## **4.7. Czynniki neuroprotektcyjne**

### **4.7.1. Resweratrol**

Reswertarol rozpuszczano w DMSO, otrzymując wyjściowe stężenie 10 mM. Następnie rozcieńczano do 1mM pożywką DMEM i dodawano do hodowli tak, aby uzyskać końcowe stężenia od 1μM do 50μM.

## **4.8. Oznaczanie aktywności enzymów**

Aktywności akonitazy, dehydrogenazy izocytrynianowej NADP, liazy ATP-cytrynianowej oznaczano bezpośrednio po zebraniu komórek w próbkach, utrzymywanych w temperaturze 4°C. Do oznaczania PDHC i ChAT, 0.05ml próbki komórek zawieszonych w 0.32M sacharozie, przechowywano w temperaturze -20°C. Aktywności tych enzymów oznaczano w okresie do dwóch tygodni od momentu zamrożenia. Przed przystąpieniem do oznaczenia, rozmrożoną zawiesinę komórek homogenizowano za pomocą mini homogenizatora teflonowego - „pellet pestle” (Sigma Chemicals Co., Poznań, Polska) w probówce typu „Eppendorf” 1.5 ml przez 5–10 sekund. Następnie, homogenaty rozcieńczano Tritonem X-100, tak aby uzyskać odpowiednie stężenie białka. Końcowe stężenie Tritonu X-100 w oznaczanej próbce wynosiło 0.2%.

#### **4.8.1. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) (Szutowicz i wsp. 1981)**

Aktywność PDHC oznaczano przez pomiar powstającego acetylowanego koenzymu A (acetylo-CoA), który przeprowadzano do cytrynianu za pomocą syntazy cytrynianowej. Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.25 ml zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl pH 8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiotreitol, 2 mM NAD, 10 mM pirogronian, 2 mM pirofosforan tiaminy, 0.20 mM CoA, 2.5 mM szczawiooctan, 0.15 JM syntazy cytrynianowej. Próby ślepe nie zawierały CoA. Reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej próbki 0.05 mg białka. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut. Reakcję przerywano przez umieszczenie próbki na 10 minut w temperaturze 99°C. Po przerwaniu reakcji próby wirowano przy 10'000 obrotów przez 1 minutę. W tak przygotowanych próbach mierzono ilość cytrynianu powstającego z acetylo-CoA w reakcji bakteryjnej liazy cytrynianowej (citrate (pro-3S) lyase, EC 4.1.3.6). Liazę cytrynianową rozpuszczano w środowisku zawierającym: 10 mM HN<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> i 20 mM ZnSO<sub>4</sub>, 50 mM bufor Tris/HCl bezpośrednio przed oznaczeniem. Środowisko inkubacyjne dla prób zerowych nie zawierało CoA. Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm. Środowisko do oznaczania cytrynianu w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 100 mM bufor Tris/HCl o pH 7.4, 0.1 mM NADH, 0.2 J.M. dehydrogenazy jabłczanowej i 0.2 ml próbki.

#### **4.8.2. Akonitaza (EC 4.2.1.3) (De Villafranca i Haines 1974)**

Środowisko inkubacyjne do oznaczania aktywności enzymu w końcowej objętości 0.8 ml zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl o pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM NADP, 1 J.M. dehydrogenazy izocytrynianowej oraz 0.1 ml badanej próbki zawierającej 0.1 mg białka. Próbki były preinkubowane w temp. 37°C przez 10 minut. Reakcję rozpoczynano dodając 0.01 ml 20 mM cis-akonitanu a następnie mierzono przyrost absorbancji w spektrofotometrze termostatowanym Ultrospec firmy Unicam. Długości fali wynosiła 340 nm a całkowity czas pomiaru 10 minut. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

#### **4.8.3. Dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od NADP (ICH-NADP, EC 1.1.1.42) (Plaut 1968)**

Środowisko inkubacyjne do oznaczania aktywności enzymu w końcowej objętości 0.5 ml zawierało: 50 mM Tris/HCl o pH 7.4, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NADP oraz 0.1 ml badanej próbki zawierającej 0.1 mg białka. Próbkę preinkubowano w temp. 37°C przez 10 minut. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 ml 10 mM DL-izocytrynianu a następnie mierzono wzrost absorbancji na termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec firmy Unicam przy  $\lambda=340$  nm przez okres 10 minut. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

#### **4.8.4. Liaza ATP-cytrynianowa (ACL, EC 2.3.3.8) (Szutowicz i Angielski 1970)**

Aktywność tego enzymu oznaczano przez pomiar ilości powstającego szczawiooctanu. Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 100 mM bufor Tris/HCl o pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM cytrynian trójpotasowy, 50 mM KCl, 0.2 mM NADH, 1 J.M. dehydrogenazy jabłczanowej. Do środowiska o temp. 37°C dodawano 0.1ml (0.1mg) próbki białka. Następnie mieszaninę preinkubowano w tej temperaturze przez 10 minut, po czym rozpoczynano reakcję, dodając ATP w końcowym stężeniu 5 mM. Spadek absorbancji mierzono w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec firmy Unicam przez okres 10 minut przy długości fali światła 340 nm. Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

#### **4.8.5. Acetylotransferaza cholinowa (ChAT, EC 2.3.1.6) (Fonnum 1969)**

Aktywność ChAT oznaczano wykorzystując w tym celu [1-<sup>14</sup>C] acetylo-CoA. Środowisko inkubacyjne w objętości 0.01ml zawierało: 50 mM bufor fosforanowo-sodowy pH 7.4, 1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 0.05 % albuminę wołową, 0.20 mM siarczan ezeryny, 0.24 mM [1-<sup>14</sup>C]-acetylo-CoA (0.025 mCi na próbę, 92.000 impulsów/próbę) oraz 0.05 mM chlorek choliny. Reakcję przeprowadzano w wąskich probówkach Eppendorfa (Medlab, nr kat.: 38.0350.0) o objętości 0.50 ml. Przy pomocy pipety typu Hamilton dodawano do probówek 0.005 ml próbki, zawierającej 0.05-0.10 mg białka a następnie roztwór lizujący, składający się z 0.2% Tritonu X-100 oraz 50 mM buforu sodowo-fosforanowego. Tak przygotowane

próby, inkubowano przez 15 min w temp. 4°C. Dodanie 0.01 mM środowiska inkubacyjnego do homogenatu komórek, rozpoczynało reakcję, którą prowadzono w temp. 37°C przez 30 minut a następnie przerywano przez odcięcie końca próbówki do naczynia scyntylicyjnego, zawierającego 4 ml zimnego 10 mM buforu fosforanowo-sodowego o pH 7.4 z 2.0 ml roztworu acetonitrylu. Roztwór acetonitrylu przygotowywano wcześniej, dodając do acetonitrylu czterofenylboran o stężeniu końcowym 0.5%. Następnie, otrzymaną mieszaninę wstrząsano przy pomocy mieszadła typu „Vortex”, po czym do naczynek scyntylicyjnych dodawano jeszcze 10 ml scyntylicatora toluenowego. Próby zerowe zawierały zamiast białka, 50 mM bufor fosforanowo-sodowy. W tak przygotowanych próbach mierzono ilość powstałej acetylocholiny znakowanej [<sup>14</sup>C] (kompleks z czterofenylboranem) rozpuszczonej w fazie organicznej. Całkowitą radioaktywność środowiska mierzono po jego rozpuszczeniu w scyntylicatorze dioksanowym. Aktywność enzymu wyliczano na podstawie ilości węgla [<sup>14</sup>C] wbudowanego do acetylocholiny po odjęciu prób zerowych, w odniesieniu do całkowitej radioaktywności środowiska reakcyjnego. Aktywność wyrażano w nmolach zsyntetyzowanej ACh/min/mg białka.

#### **4.8.6. Oznaczanie poziomu białka acetylotransferazy cholinowej (ChAT)**

Poziom białka ChAT oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA, wykorzystującą przeciwciała mysie przeciwko białku ChAT. Oznaczenie przeprowadzono na mikropłytkach opłaszczonych I-rzędowymi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko białku ChAT. II-rzędowe przeciwciała poliklonalne wyznakowane były biotyną. Następnie dodawano awidynę kowalencyjnie znakowaną peroksydazą chrzanową. Układ biotyna-awidyna w metodzie ELISA znacznie zwiększał czułość detekcji barwnego produktu reakcji, który mierzono na analizatorze płytkowym ETI-MAX (STRATEC Biomedical Systems AG), przy długości fali  $\lambda=450$  nm. Wynik obliczano z krzywej kalibracyjnej, którą sporządzano używając mysie białko ChAT w stężeniach od 0.312 do 20 ng/ml i wyrażano go w ng/mg białka.

#### **4.9. Oznaczanie wskaźników reakcji zapalnej**

##### **4.9.1. Oznaczanie stężenia interleukiny 6 (IL-6)**

Stężenie IL-6 oznaczono w pożywce wzrostowej, która pochodziła z ostatnich 24 godzin hodowli. Zastosowano w tym celu immunoenzymatyczną metodę ELISA, wykorzystującą mysie przeciwciała przeciw IL-6 i układ biotyna-streptawidyna (Biomedica, Piaseczno). Krzywą kalibracyjną sporządzono z użyciem mysiej interleukiny 6. Barwny produkt reakcji zmierzono na analizatorze płytkowym ETI-MAX 3000 (STRATEC Biomedical Systems AG) przy długości fali  $\lambda=450$  nm. Wynik wyrażano w pmolach IL-6/L pożywki.

##### **4.9.2. Oznaczanie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ )**

Stężenie TNF- $\alpha$  oznaczano w pożywce wzrostowej, pochodzącej z ostatnich 24 godzin hodowli. Oznaczenie wykonano z wykorzystaniem metody immunoenzymatycznej ELISA opierającej się o poliklonalne mysie przeciwciała przeciw TNF- $\alpha$ . Krzywą kalibracyjną wykonano z użyciem mysiego TNF- $\alpha$ . Za pomocą analizatora płytkowego ETI-MAX 3000 (STRATEC Biomedical Systems AG), przy długości fali  $\lambda=450$  nm zmierzono barwny produkt reakcji enzymatycznej.

#### **4.10. Badanie metabolizmu acetylo-CoA komórek SN56**

Metabolizm komórek SN56 badano w środowisku depolaryzującym, nie zawierającym surowicy bydlęcej, do którego przenoszono zawiesinę komórek bezpośrednio po zebraniu z naczyń hodowlanych. Środowisko to, w końcowej objętości 1 ml zawierało: 20 mM bufor HEPES o pH 7.4, 1.5 mM bufor fosforanowo-sodowy o pH 7.4, 90 mM NaCl, 30 mM KCl, 2.5 mM pirogronian, 2.5 mM jabłczan, 0.01 mM chlorek choliny, 0.1 ml zawiesiny komórek w 0.32 M sacharozie, zawierającej 10-15 mg białka/ml oraz RES w stężeniach od 5 do 50  $\mu$ M i 0.1mM Zn, który w naszych wcześniejszych badaniach nad ostrą neurotoksycznością, powodował 30-40% śmiertelność komórek neuronalnych SN56 (Ronowska i wsp., 2010). Reakcję rozpoczynano, dodając zawiesinę komórek do środowiska inkubacyjnego. Inkubację prowadzono w temp. 37°C przy ciągłym mieszaniu z częstotliwością 100 cykli/ min. Po 30 minutach inkubacji odbierano próbki zawiesiny w celu przeprowadzenia oznaczeń wymaganych parametrów pomiarowych (4.8.-4.9.).

## **4.11. Oznaczanie metabolitów**

### **4.11.1. Tlenek azotu (NO) (Miranda i wsp. 2001)**

Wydzielanie tlenku azotu przez cholinergiczne komórki SN56 mierzono metodą pośrednią, oznaczając stężenie azotynów ( $\text{NO}_2^-$ ), stanowiących stabilny produkt utleniania NO. W tym celu zastosowano metodę spektrofotometryczną opartą o reakcję Griessa-Hosvaya, która polega na diazowaniu pierwszorzędowych amin aromatycznych oraz sprzęganiu powstałych soli diazoniowych, co prowadzi do powstania fioletowego barwnika diazowego.

Pomiar  $\text{NO}_2^-$  był dokonywany w pożywce hodowlanej, która pochodziła z ostatnich 24 godzin hodowli. Próbę ślepą stanowiła woda. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej zastosowano azotan sodu ( $\text{NaNO}_2$ ) w stężeniach od 1 do 50  $\mu\text{M/L}$ . Do 200  $\mu\text{l}$  próby (pożywka lub woda lub wzorzec) dodawano 250  $\mu\text{l}$  wody i 450  $\mu\text{l}$  odczynnika Griessa (Sigma, Poznań). Następnie próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut i po tym czasie dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm. Wyniki podawano w nmolach  $\text{NO}_2^-$  wydzielonego do pożywki na 15 ml pożywki. W ten sam sposób oznaczono również poziom azotynów w czystej pożywce hodowlanej, do której dodano 0.4 mM SNP i/lub 0.175 mM Zn. Uzyskaną wartość odjęto następnie od całkowitej ilości uwolnionych azotynów i uzyskano wówczas endogenną produkcję azotynów w cholinergicznych komórkach SN56.

### **4.11.2. Całkowity acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk 1987)**

W doświadczeniach nad neurotoksycznością/neuroprotekcją ostrą, z mieszaniny inkubacyjnej odbierano 0.20 ml i wirowano przez 3 minuty przy 12000 obrotów/minutę. Nadsącz odrzucano a osad zawieszano w 0.20 ml 5 mM HCl i inkubowano próbkę w temp. 100°C przez 2 minuty w celu odbiałczenia. Natomiast w doświadczeniach nad neurotoksycznością/neuroprotekcją przewlekłą, peletę komórek zawieszano w środowisku inkubacyjnym opisanym w Rozdziale 4.5, tak aby stężenie białka wynosiło od 2 do 3 mg/ml. Z powyższej zawiesiny odbierano 0.4 ml, które następnie wirowano z prędkością 12000 obrotów/minutę przez 3 minuty a otrzymany po odwirowaniu osad, odbiałczano j.w. Następnie próbki zamrażano w temp. -20°C i oznaczano poziom acetylo-CoA w ciągu 7 dni od dnia zamrożenia. W dniu oznaczenia próbkę rozmrażano, wirowano przez 1 minutę przy 10000 obrotów/min. Nadsącz doprowadzano do pH 7.4 50 mM roztworem Tris. Acetylo-



CoA oznaczano zmodyfikowaną metodą cyklizacyjną z fosfotransacetylazą i syntazą cytrynianową (Szutowicz i Bielarczyk 1987). Dzięki tej metodzie, możliwy jest kilkutyśięczny obrót badanej substancji w cyklu pomiarowym i tym samym amplifikacja acetylo-CoA z kilkunastu pikomoli do kilkunastu nanomoli produktu końcowego reakcji, którym jest cytrynian. W celu oznaczenia acetylo-CoA usuwano z próbek wolny CoA-SH poprzez maleilację z bezwodnikiem kwasu maleinowego. W tym celu, do 0.04 ml próbki dodawano 0.01 ml buforu Tris/HCl o pH 7.4 i 0.01 ml świeżo sporządzonego 1 mM roztworu bezwodnika maleinowego w eterze etylowym i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 15 minut na wytrząsarce Eppendorf typ 3300, po czym inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej w celu usunięcia eteru (Szutowicz i Bielarczyk 1987).

Środowisko cyklizacyjne przygotowywano bezpośrednio przed rozpoczęciem reakcji. Zawierało ono w końcowej objętości 0.1 ml: 50 mM bufor Tris/HCl pH 7.4, 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01% (w/v) albuminę wołową, 1.2 mM szczawiooctan, 1 mM acetylofosforan, 1 J.M. syntazy cytrynianowej, 1 J.M. fosfotransacetylazy. W celu pozbycia się resztek eteru z próbek, próbki otwierano na około 1 godzinę przed rozpoczęciem cyklizacji. Cyklizację rozpoczynano przez dodanie 0.05 ml mieszaniny cyklizacyjnej do 0.05 ml próbek. Reakcję cyklizacji prowadzono w temperaturze 30°C przez 100 minut a następnie przerywano ją poprzez umieszczenie próbek w bloku termicznym w temperaturze 100°C na 10 minut. Następnie próbki odwirowywano i w nadsączu oznaczano ilość powstałego cytrynianu.

#### **4.11.3. Całkowity ATP (Gorman i wsp. 2003)**

Po usunięciu pożywki, płytki zalewano 1ml zimnego, 4%  $\text{HClO}_4$  a odbiałzone komórki zbierano przy użyciu plastikowych skrobaczek. Zawiesinę wirowano w temperaturze 4°C przy 10 000 x g przez 3 minuty. Nadsącz zbierano, zamrażano w temperaturze -20°C i przechowywano nie dłużej niż 14 dni do momentu oznaczenia. Osad komórek rozpuszczano w 1M NaOH i używano do oznaczenia stężenia białka. W dniu oznaczenia ATP, nadsącz rozmrażano i zobojętniano 7.5 N  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . ATP oznaczano metodą luminometryczną w obecności lucyferazy i jej substratu lucyferyny. ATP reaguje z lucyferyną w reakcji katalizowanej przez lucyferazę. W wyniku tej reakcji wygenerowane zostają fotony, których ilość była mierzona przy pomocy luminometru Junior (Berthold Technology, Bad Wild-bad, Niemcy).



Środowisko do oznaczania ATP było sporządzane bezpośrednio przed oznaczeniem i zawierało w końcowej objętości 0.2 ml: 0.01 ml buforu reakcyjnego zawierającego: 25 mM Tricine HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM ditiotreitol, 0.5 mM lucyferynę i 6 J.M. lucyferazy [EC 1.13.12.7].

Przed oznaczeniem, zubożnione próbki rozcieńczano od 5 do 20 razy zimną H<sub>2</sub>O. Do 0.2 ml środowiska inkubacyjnego dodawano 0.02 ml próbki i odczytywano emisję. Każda z próbek posiadała swój wzorzec wewnętrzny w postaci ATP w stężeniu dobranym w taki sposób, aby jego emisja była jak najbardziej zbliżona do emisji oznaczanej próby. Emisja wzorca wewnętrznego umożliwia obliczenie zawartości ATP w badanych próbach.

#### **4.12. Ocena uszkodzenia komórek (Butler, 1989)**

Ocenę przeżywalności komórek dokonywano przy użyciu błękitu trypanu. Komórki zawieszane w 320 mM sacharozie rozcieńczano 5 razy sacharozą i następnie 2 razy błękitem trypanu. Zawiesinę umieszczano w komorze hematologicznej Fuchs-Rosental. Za komórki uszkodzone uważano te, które zabarwiły się na niebiesko czyli niezdolne do usuwania 0.1% błękitu Trypanu. Oceny dokonywano po upływie nie więcej niż 2 minut od momentu dodania barwnika w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 200–krotnym.

#### **4.13. Liczba komórek**

W celu oznaczenia całkowitej liczby komórek, liczone były komórki, które zachowywały zewnętrzną błonę plazmatyczną, niezależnie od ich zdolności do wydalania błękitu trypanu.

#### **4.14. Białko (Bradford, 1976)**

Białko oznaczane było według metody Bradford (1976) względem krzywej kalibracyjnej zawierającej immunoglobulinę ludzką w stężeniach od 0.20 do 0.80 mg/ml.

#### **4.15. Metody statystyczne**

Wyniki przedstawiano jako średnie±standardowy błąd średniej (SEM). Istotność różnic między średnimi w doświadczeniach wielopunktowych określano testem ANOVA z testem *post hoc* Bonfferoni. Przy porównywaniu dwóch wartości średnich używano niesparowanego testu *t* Studenta. Za statystycznie istotną różnicę między wynikami uznawano wartość  $p < 0.05$ . Obliczenia wykonano za pomocą programu Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. WYNIKI

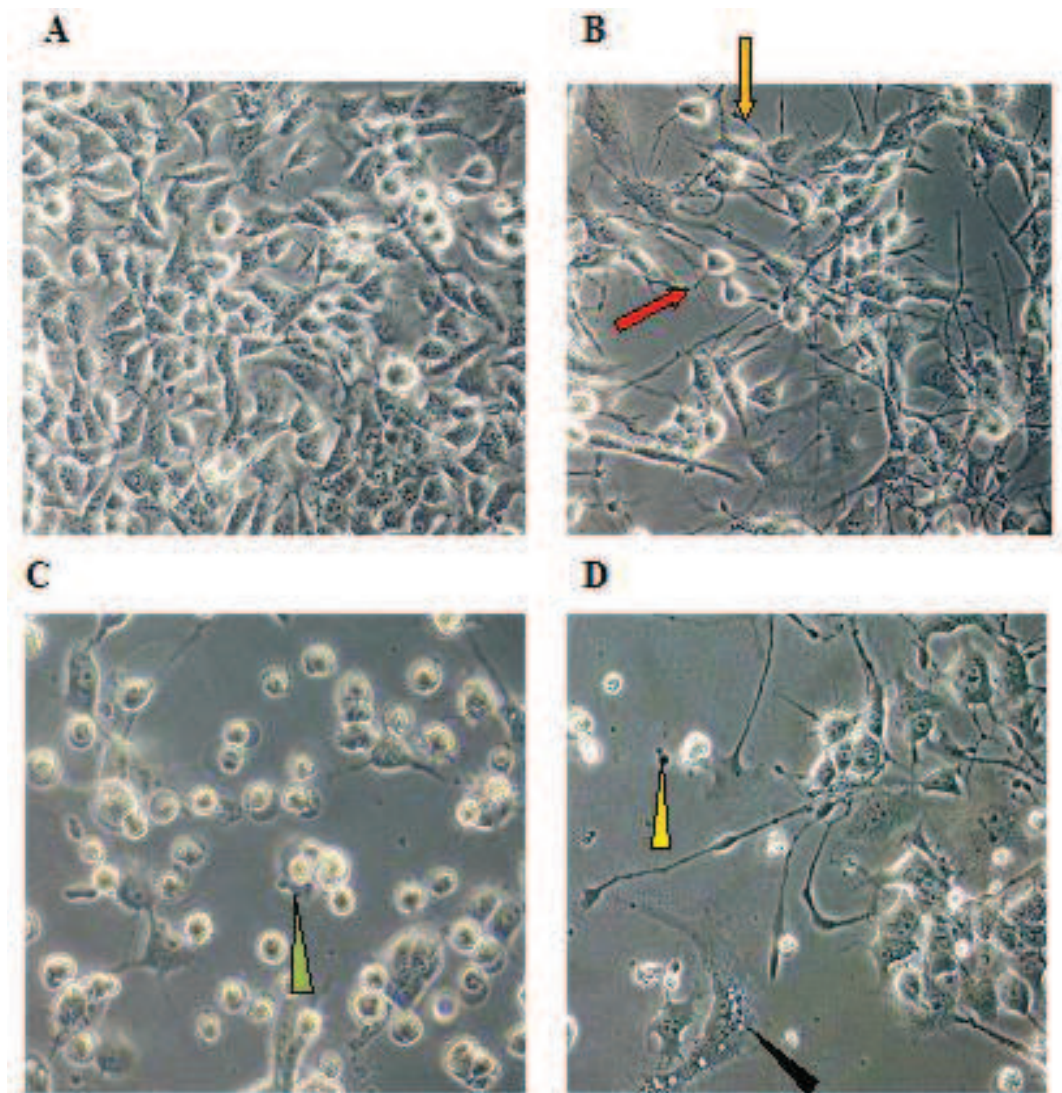
### 5.1. Charakterystyka komórek SN56 i N9

#### 5.1.1. *Neuronalne komórki SN56*

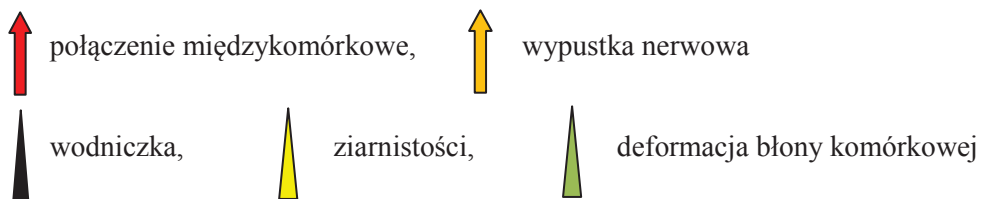
Wpływ SNP, Zn i RES na cholinergiczne komórki SN56 badano w dwóch układach doświadczalnych, odpowiednio w warunkach krótkotrwałej (30 min) i długotrwałej ekspozycji na czynniki neurotoksyczne i neuroprotektcyjne (16-24 godz.).

W badaniach neurotoksyczności/neuroprotekcji przewlekłej, komórki SN56 w środowisku hodowlanym, po 48 godzinach różnicującej hodowli wstępnej z cAMP i RA (Szutowicz i wsp. 1999), poddawane były ekspozycji na SNP i/lub Zn przez 16-24 godzin. RES dodawano jednocześnie z SNP i Zn lub 6 godzin przed dodaniem tych czynników neurotoksycznych. W części doświadczeń, w płytkach hodowlanych umieszczano wstawki z półprzepuszczalnym dnem, zawierające komórki mikroglejowe N9 (Ryc. 4). Ten wariant doświadczalny zastosowano w celu zbadania, jaki wpływ na neurony cholinergiczne mogą wywierać komórki mikrogleju, znajdujące się w ich sąsiedztwie w warunkach identycznej ekspozycji na czynniki neurotoksyczne. Modyfikacja ta pozwalała na zbadanie parakrynej aktywności mikrogleju w stosunku do komórek neuronalnych.

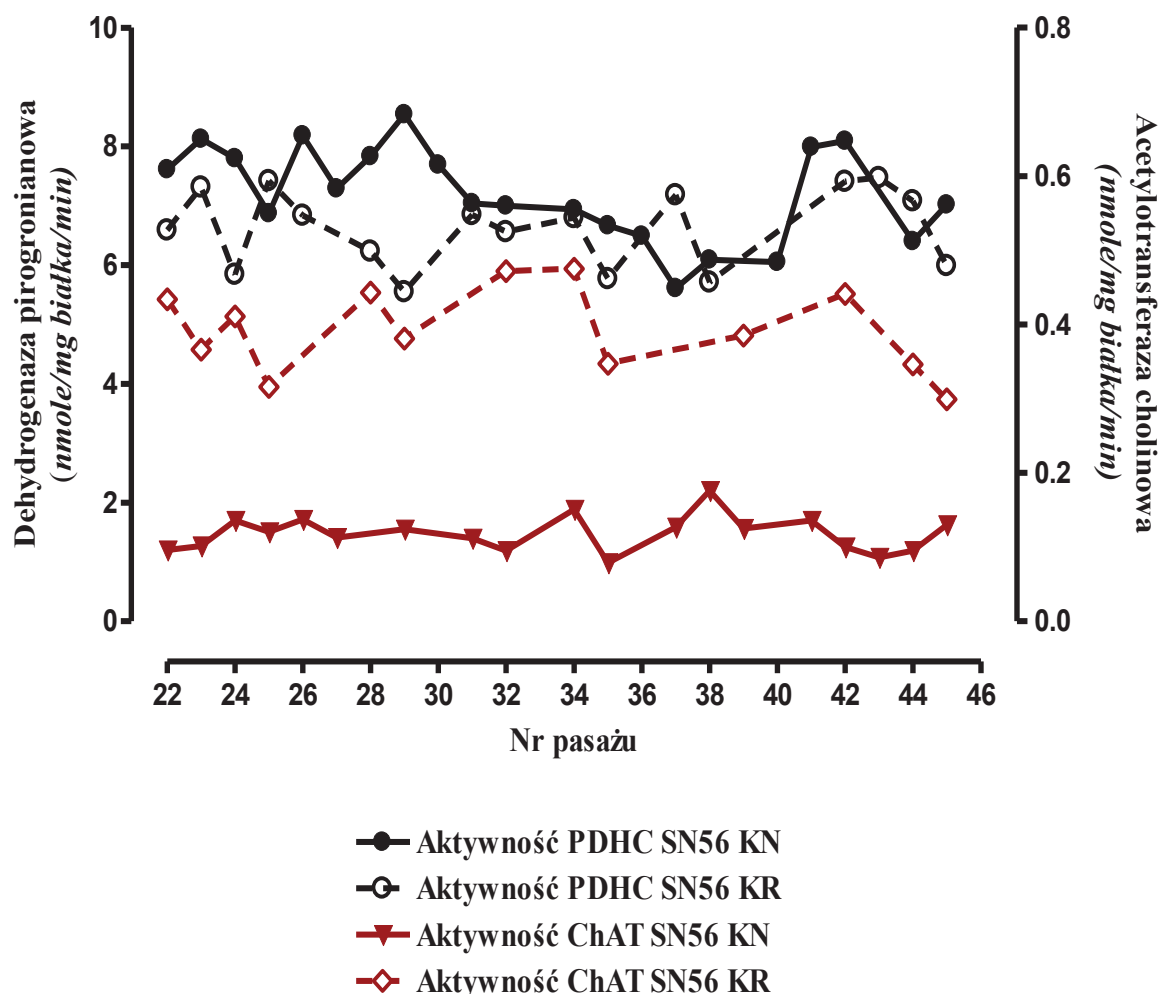
W wyniku zastosowania opisanego schematu hodowli, uzyskiwano neuronalne komórki cholinergiczne o wysoce zróżnicowanej morfologii. Większość z nich posiadała zarówno wypustkę osiową jak i wypustki dendrytyczne, tworzące sieć połączeń synapso-podobnych (Ryc. 5). Aktywności PDHC, syntetyzującego acetylo-CoA oraz ChAT zużywającego ten metabolit do syntezy ACh, pozostawały na względnie stałym poziomie w zakresie od 27 do 48 pasażu (Ryc. 6.). Wskazuje to, że w tych warunkach stosunek szybkości syntezy i potencjalnej szybkości zużycia acetylo-CoA do syntezy ACh pozostawały w stabilnym stosunku, niezależnie od używanego pasażu (Ryc. 6.).



Legenda:



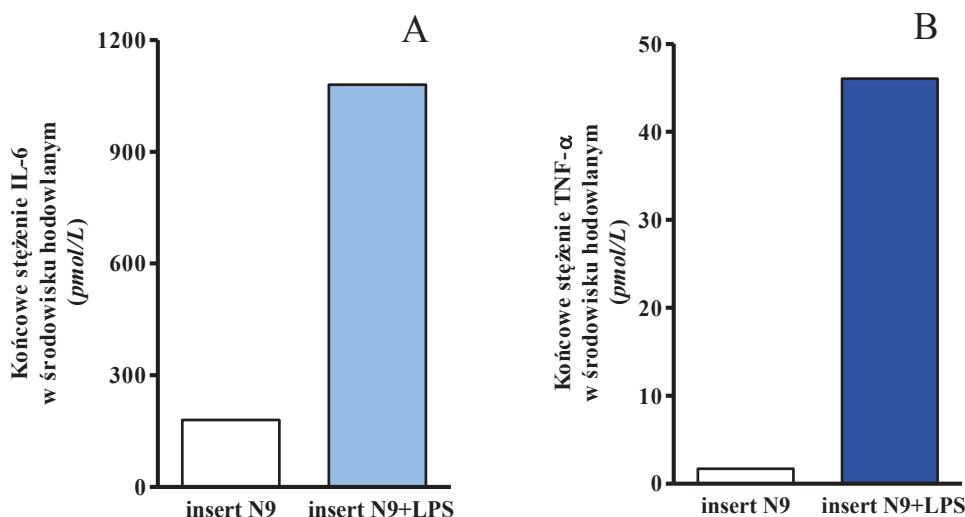
Ryc. 5. Niezróżnicowane (A) i zróżnicowane cAMP/RA (B) cholinergiczne komórki neuronalne SN56. Wpływ (C) 24 godzinnej inkubacji zróżnicowanych cholinergicznych komórek neuronalnych z 0.175 mM Zn i 16 godzinnej inkubacji z 0.4mM SNP (D). Obraz reprezentatywny dla doświadczeń wykonywanych w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej GUMed w latach 2006- 2012.



Ryc. 6. Stabilność aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i acetylotransferazy cholinowej w kolejnych pasażach niezróżnicowanych i zróżnicowanych cholinergicznym komórkom SN56.

### 5.1.2. Komórki mikroglejowe N9

Podstawowym wskaźnikiem wydolności czynnościowej mikrogleju jest jego aktywacja przez lipopolisacharyd bakteryjny (LPS, Lee and Lee, 2002). Przy stężeniu 100 ng/mL powodował on 6-krotny wzrost wydzielania IL-6 i 27-krotny wzrost wydzielania TNF- $\alpha$  (Ryc.7).

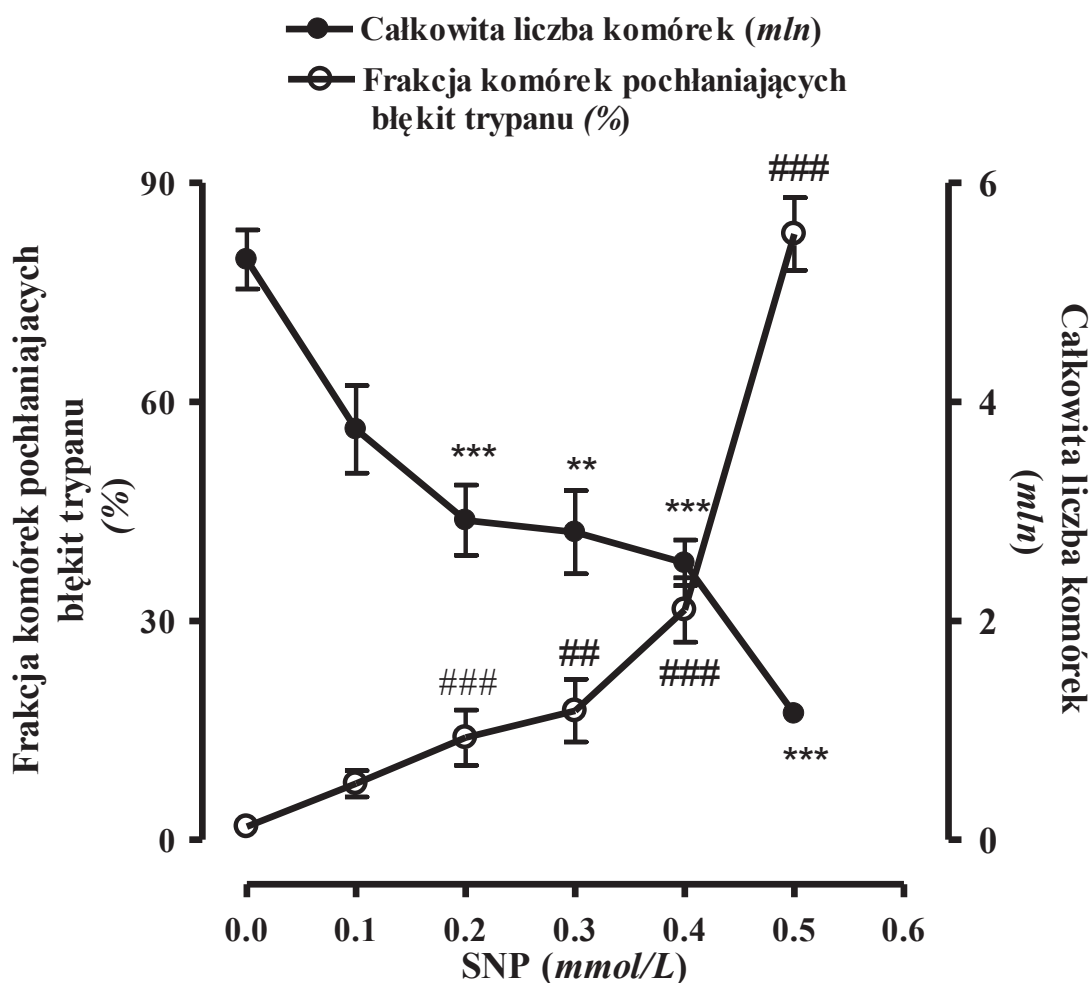


Ryc. 7. Wpływ LPS na wydzielanie (A) IL-6 i (B) TNF- $\alpha$  przez komórki mikrogleju hodowane na insertach. Dane są wartościami średnimi z dwóch pomiarów.

## 5.2. Neurotoksyczność przewlekła

### 5.2.1. Neurotoksyczność nitroprusydku sodu

W kontrolnym środowisku hodowlanym, nie zawierającym SNP, po 72 godzinach inkubacji, liczba komórek ulegała 2,5-krotnemu zwiększeniu, osiągając liczbę 5.8 mln/58 cm<sup>2</sup> (Ryc. 8.). Odpowiadało to stanowi subkonfluencji (Ryc. 5.). W takich warunkach frakcja komórek uszkodzonych, nie wydających błękitu trypanu wynosiła około 2% całej populacji (Ryc. 8.). Po 16 godzinnej inkubacji z 0.1 do 0.3 mM SNP, obserwowano tendencję spadkową całkowitej liczby komórek oraz tendencję wzrostową dla frakcji komórek uszkodzonych (Ryc. 8.). Natomiast dalsze zwiększanie stężenia SNP w środowisku hodowlanym do 0.4 i 0.5 mM, powodowało statystycznie znamiennej wzrost frakcji komórek niezdolnych do usuwania błękitu trypanu, odpowiednio do około 30 i 80% populacji przylegającej do podłoża płytki hodowlanej (Ryc. 8.). Jednocześnie całkowita liczba komórek ulegała dalszemu obniżeniu, osiągając 50% wartości kontrolnej przy stężeniu SNP równym 0.4 mM i tylko 20% przy stężeniu 0.5 mM (Ryc. 8.).

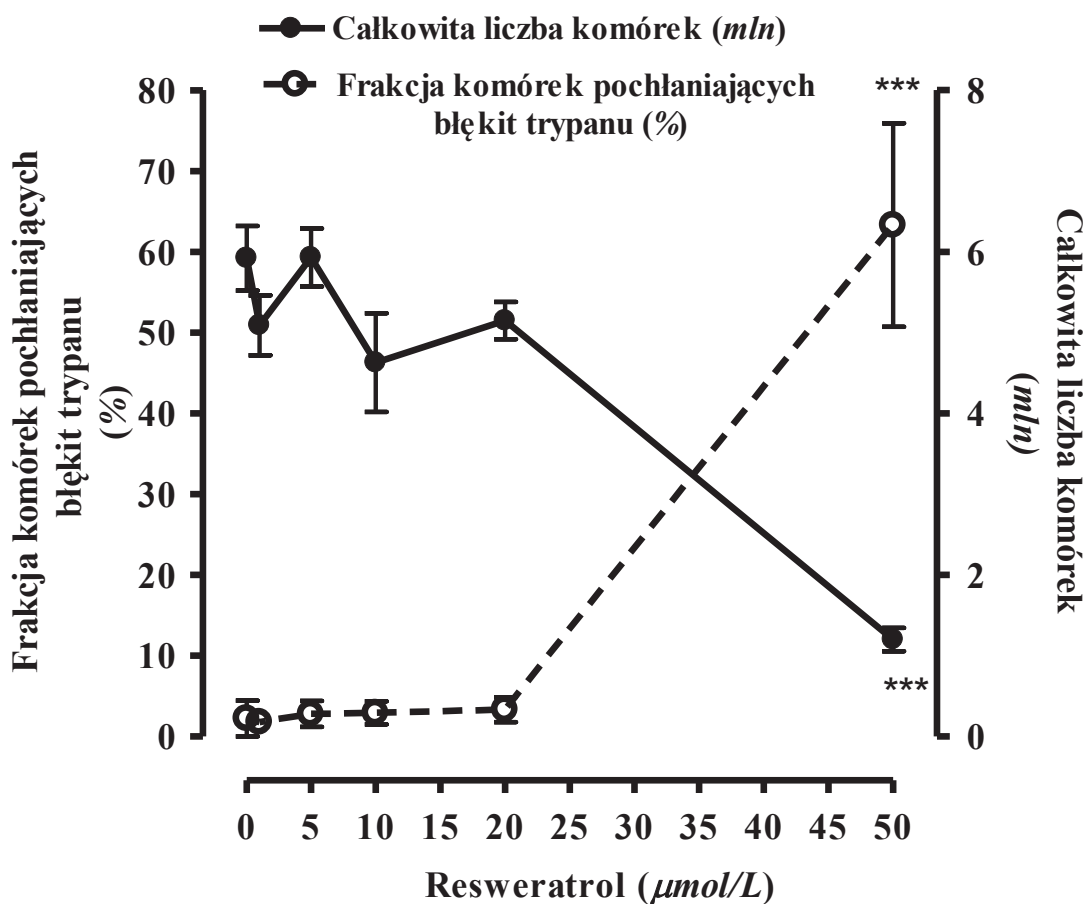


Ryc. 8. Zależny od stężenia wpływ 16 godzinnej ekspozycji na SNP, na szybkość wzrostu (●)zróżnicowanych komórek SN56 i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu (○). Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \* $p < 0.001$ , # $p < 0.001$ .

### 5.2.2. Przewlekły wpływ resweratrolu na żywotność komórek cholinergicznyc SN56

Podczas 24-godzinnej inkubacji, 1, 5, 10 i 20  $\mu$ M RES nie powodował znamienych statystycznie różnic w odsetku komórek wydalających błękit trypanu w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Natomiast podwyższenie stężenia RES do 0.05 mmol/L, powodowało zwiększenie odsetka komórek zatrzymujących błękit trypanu do około 60% (Ryc. 9.). Zarówno w warunkach kontrolnych jak i przy ekspozycji na 0.001, 0.005, 0.010 i 0.020 mmol/L RES, całkowita liczba komórek wynosiła około 6 mln (Ryc. 9.). Podobnie 0.05 mmol/L RES powodował spadek całkowitej liczby komórek do 1.2 mln (Ryc. 9.).

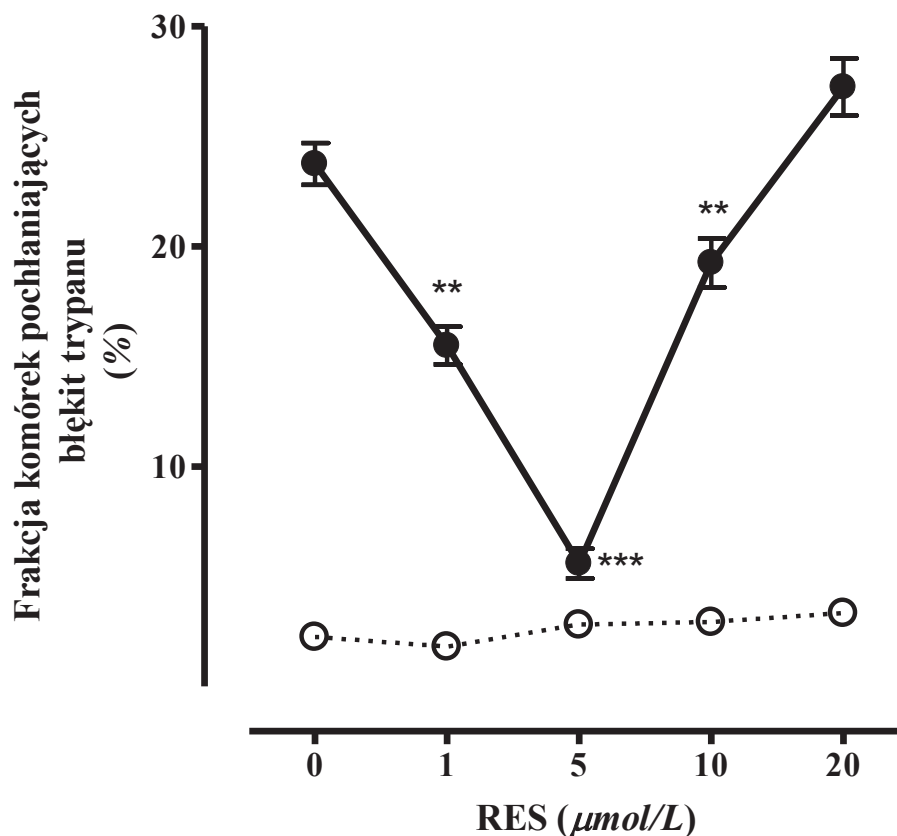




Ryc. 9. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ resweratrolu na wzrost komórek SN56 i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu. Wyniki są wartościami średnimi $\pm$ SEM z 5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\*\* $p$ <0.001.

### 5.2.3. Modyfikujący wpływ resweratrolu na przewlekłe cytotoksyczne działanie SNP w komórkach SN56

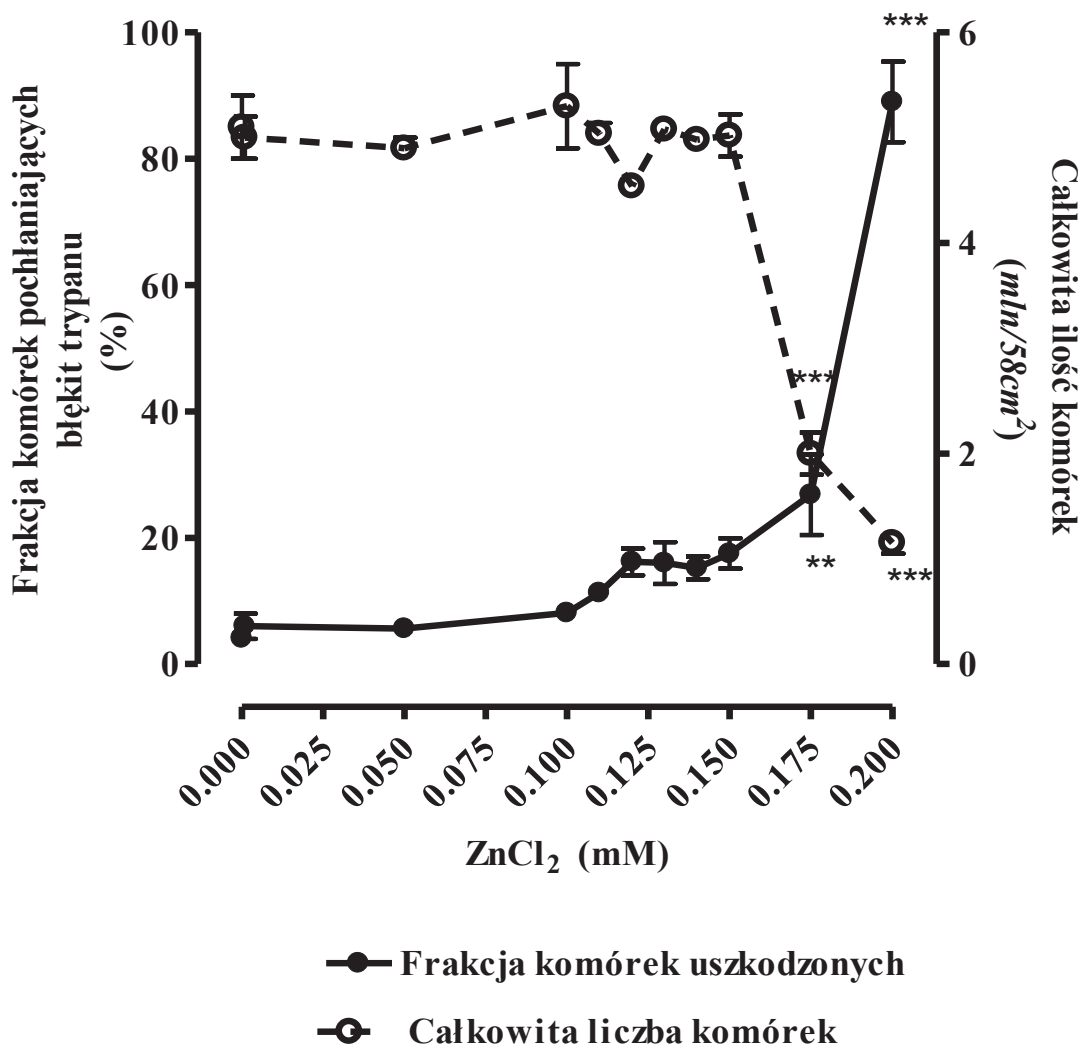
W środowisku bez czynników neurotoksycznych, RES w stężeniach do 20  $\mu\text{mol/L}$  nie zmieniał wielkości frakcji komórek uszkodzonych, która pozostawała na poziomie 2-3% (Ryc. 10). RES w stężeniach 1 i 5  $\mu\text{M}$  zmniejszał wielkość frakcji komórek uszkodzonych przez 0.4 mM SNP z 25% odpowiednio do 15 i 5% (Ryc. 10.). Jednakże zwiększenie stężenia RES do 10 i 20  $\mu\text{M}$  znosiło jego działanie cytoprotekcyjne, zwiększając frakcję komórek pochłaniających błękit trypanu do około 30%.



Ryc. 10. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ RES na komórki SN56 hodowane w warunkach kontrolnych i w obecności 0.4 mM SNP. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 8 doświadczeń. Znamienne różne od : kontroli,\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 5.2.4. Cytotoksyczność cynku

Podczas 24-godzinnej inkubacji z Zn w stężeniach od 0.001 do 0.1 mM nie dochodziło do zwiększenia odsetka komórek uszkodzonych oraz obniżenia całkowitej liczby komórek (Ryc. 11.). Wzrost stężenia Zn powyżej 0.1 mM, powodował spadek całkowitej liczby komórek do 50% wartości kontrolnej przy 0.175 mM stężeniu tego kationu. Jednocześnie frakcja komórek uszkodzonych, zatrzymujących błękit trypanu, wzrastała do około 30% (Ryc. 11.).

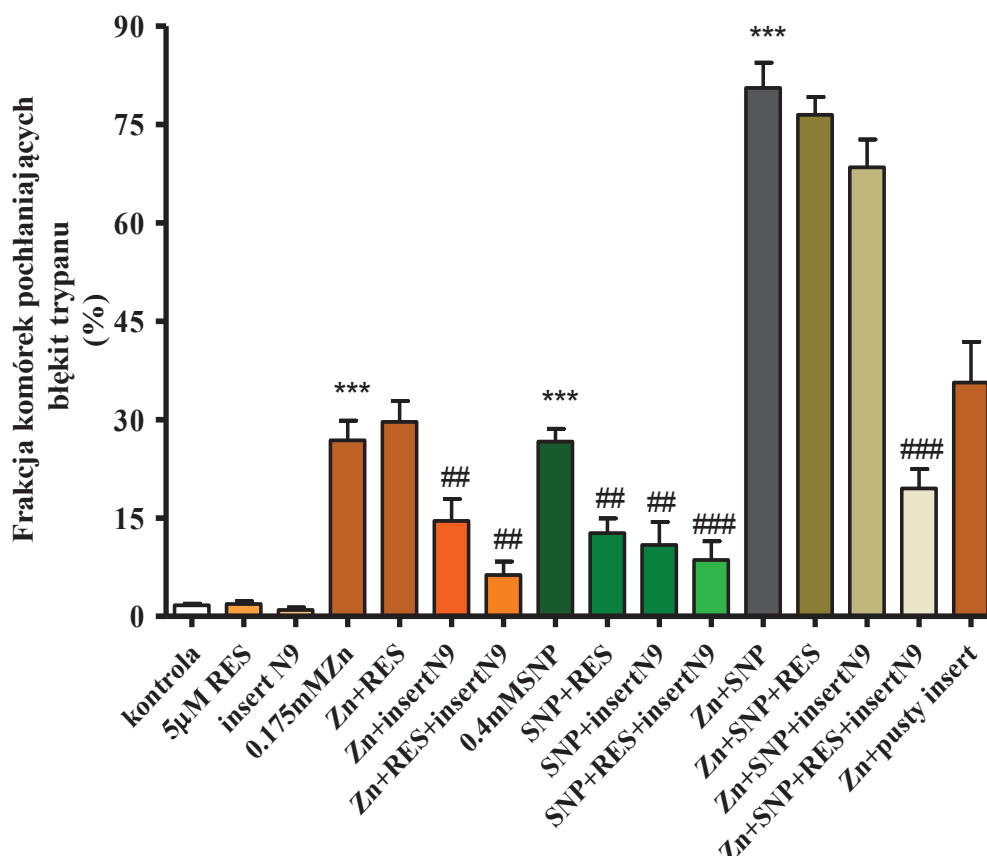


Ryc. 11. Przewlekły, zależny od stężenia wpływ Zn na wzrost komórek i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 5–9 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 5.2.5. Skojarzony, przewlekły wpływ cynku, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na żywotność komórek neuronalnych SN56

W warunkach kontrolnych, 48-godzinna hodowla komórek SN56 z wstawkami zawierającymi mikroglejowe komórki N9 nie powodowała ani zmiany ich liczby, ani wielkości frakcji komórek uszkodzonych. Przewlekła ekspozycja komórek SN56 czy to na 0.175 mM Zn czy też na 0.4 mM SNP zwiększała ich śmiertelność do około 25% (Ryc. 12.). Łączne dodanie do hodowli komórek SN56 0.175 mM Zn i 0.4 mM SNP powodowało synergistyczny wzrost odsetka komórek uszkodzonych powyżej 80% (Ryc.12). 24-godzinna ekspozycja komórek na 5 $\mu$ M RES dodany na 6 godzin przed 0.4mM SNP, powodowała obniżenie frakcji komórek pochłaniających błękit trypanu do około 12% (Ryc. 12.). Dodanie RES nie zapobiegało uszkodzeniu komórek SN56 przez 0.175 mM Zn (Ryc. 12.). Natomiast, 48-godzinna hodowla

komórek SN56 z komórkami N9 (na wstawkach) zabezpieczała częściowo te pierwsze przed toksycznym działaniem zarówno 0.175 mM Zn, jak i 0.4 mM SNP, obniżając frakcję neuronów uszkodzonych odpowiednio do 14 i 10% (Ryc. 12.). Co więcej, RES dodany na 24 godziny do hodowli SN56 z wstawkami mikrogleju N9, wzmacniał jego cytoprotekcyjne działanie, powodując dalsze zmniejszenie odsetka uszkodzonych komórek neuronalnych do 6-8% w warunkach 24 godzinnej ekspozycji na 0.175 mM Zn i do 8% po 16-godzinnej ekspozycji na 0.4 mM SNP (Ryc. 12.).



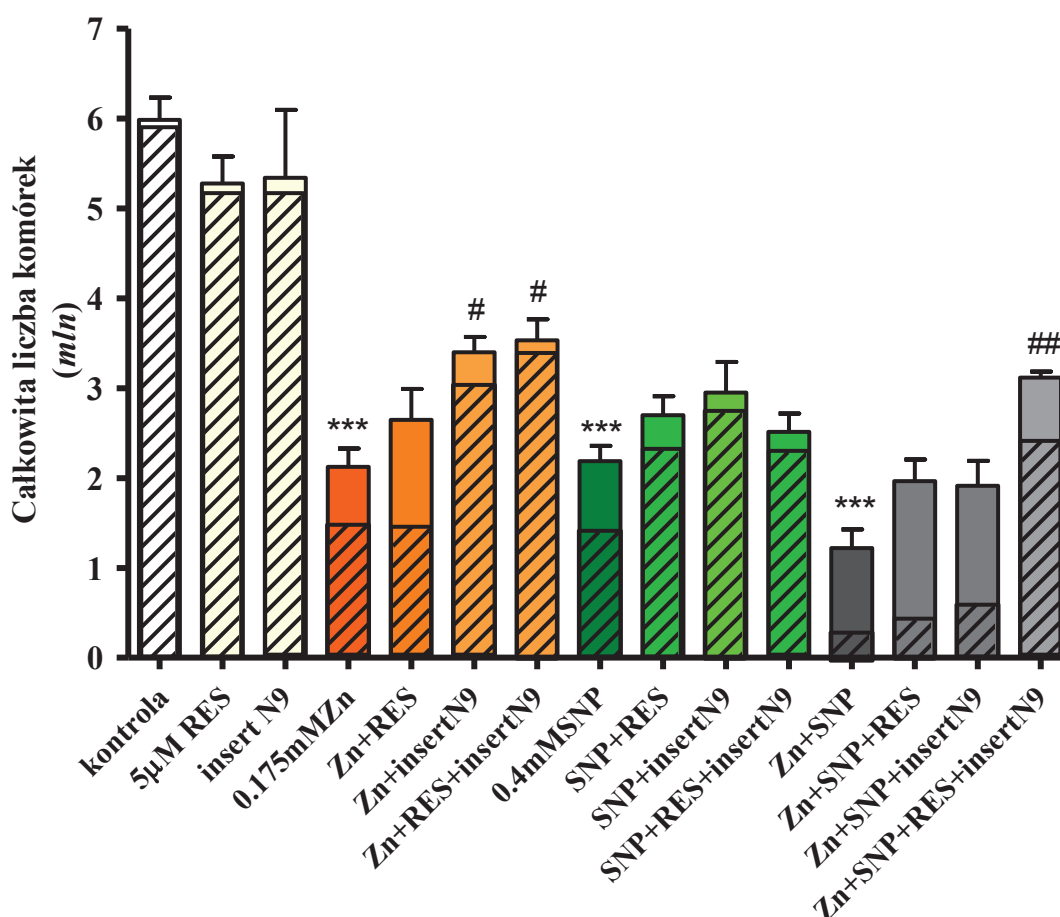
Ryc. 12. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejowych N9 na zdolność komórek neuronalnych SN56 do wydalania błękitu trypanu. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\*\* $p < 0.001$ ; od 0.175 mM Zn lub 0.4 mM SNP ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ .

To ochronne działanie mikrogleju zanikało w przypadku łącznego dodania do hodowli komórek SN56, Zn i SNP (Ryc. 12.). Również sam 5µM RES nie wykazywał ochronnego wpływu na komórki neuronalne hodowane w takich warunkach. Natomiast 5µM RES w obecności mikrogleju N9, zmniejszał frakcję komórek SN56, uszkodzonych łączną, przewlekłą ekspozycją na Zn i SNP, z 80 do 19% (Ryc. 12.). Wykazano również, że sama wstawka–bez mikrogleju N9 nie

wywierała ani uszkadzającego ani ochronnego wpływu na komórki SN56 hodowane przez 24-godziny z 0.175 mM Zn (Ryc. 12).

#### 5.2.6. Skojarzony, przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na całkowitą liczbę komórek neuronalnych SN56.

24-godzinna ekspozycja komórek SN56 zarówno na 0.175 mM Zn jak i 0.4 mM SNP powodowała spadek całkowitej liczby komórek z 5.8 odpowiednio do 2.0 i 2.5 mln/58 cm<sup>2</sup> (Ryc. 13). Łączne dodanie do hodowli 0.175 mM Zn i 0.4 mM SNP, wywoływało dalszy spadek całkowitej liczby komórek SN56 do 1.2 mln/58 cm<sup>2</sup>.

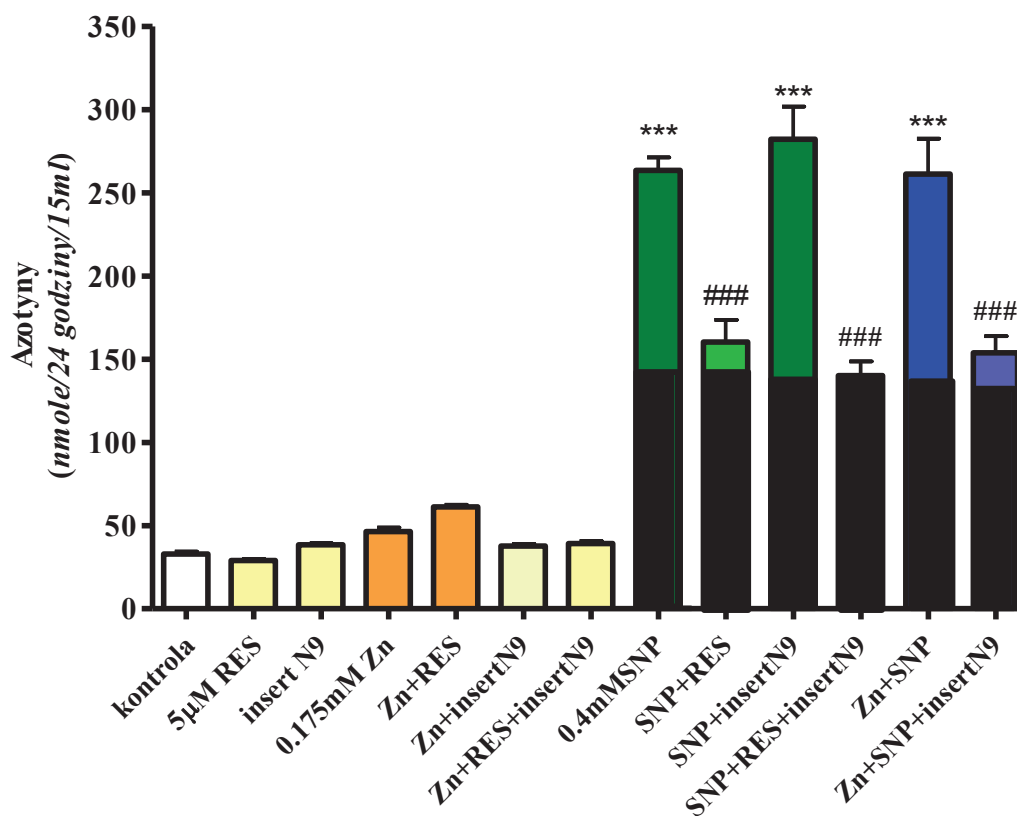


Ryc. 13. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na całkowitą liczbę komórek SN56 oraz całkowitą liczbę komórek nieuszkodzonych (pola zakreskowane). Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli \*\*\* $p < 0.001$ ; od 0.175mM Zn # $p < 0.5$ , ## $p < 0.01$ .

RES w 5 $\mu$ M stężeniu, dodany na 6 godzin przed łącznym bądź oddzielnym dodaniem 0.4 mM SNP i/lub 0.175 mM Zn nie zapobiegał spadkowi całkowitej liczby komórek (Ryc. 13). Również, w warunkach 48-godzinnej hodowli komórek SN56 z komórkami mikroglejowymi N9 zaobserwowano jedynie ich nieznaczny efekt cytoprotekcyjny, zarówno w obecności 0.175 mM Zn, czy też 0.4 mM SNP. To działanie ochronne mikrogleju nie występowało przy łącznym dodaniu Zn z SNP (Ryc. 13). RES, zarówno sam, jak i w obecności wstawek z komórkami N9, częściowo zapobiegał spadkowi całkowitej liczby komórek SN56. W tych warunkach zwiększała się ona z około 30% w obecności samych inhibitorów, do około 55% wartości kontrolnej przy dodanym RES z mikroglejem N9 (Ryc. 13).

#### ***5.2.7. Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na endogenną produkcję azotynów w komórkach neuronalnych SN56.***

NO jest związkiem sygnałowym, modulującym zarówno neuroprzebieżność, jak i aktywność komórek glejowych mózgu. W zależności od stężenia może on wywierać działanie zarówno cytoprotekcyjne, jak i cytotoksyczne. Komórki neuronalne i mikroglejowe mają zdolność do syntezy NO przez zlokalizowane w nich izoformy syntazy NO – nNOS (Wood i wsp. 1994) i iNOS (Murphy i wsp. 2000). Szybkość syntezy endogennego NO przez komórki SN56 nie ulegała zmianom po dodaniu Zn, RES czy też wstawek z mikroglejem N9 (Ryc. 14). Natomiast 0.4 mmol/L SNP dodawany do środowiska, generował egzogenne NO w ilości około 150 nmol/24 godziny/15 ml środowiska (Ryc. 14, czarne kolumny). Jednocześnie ponad czterokrotnie zwiększał syntezę endogennego NO przez komórki SN56 (Ryc. 14). W tych warunkach dodanie Zn lub wstawek mikrogleju nie zmieniało wysokiej szybkości syntezy NO. Natomiast RES obniżał syntezę endogennego NO do wartości kontrolnych. Z kolei, wstawki z mikroglejem powodowały podobne obniżenie w obecności SNP i Zn.

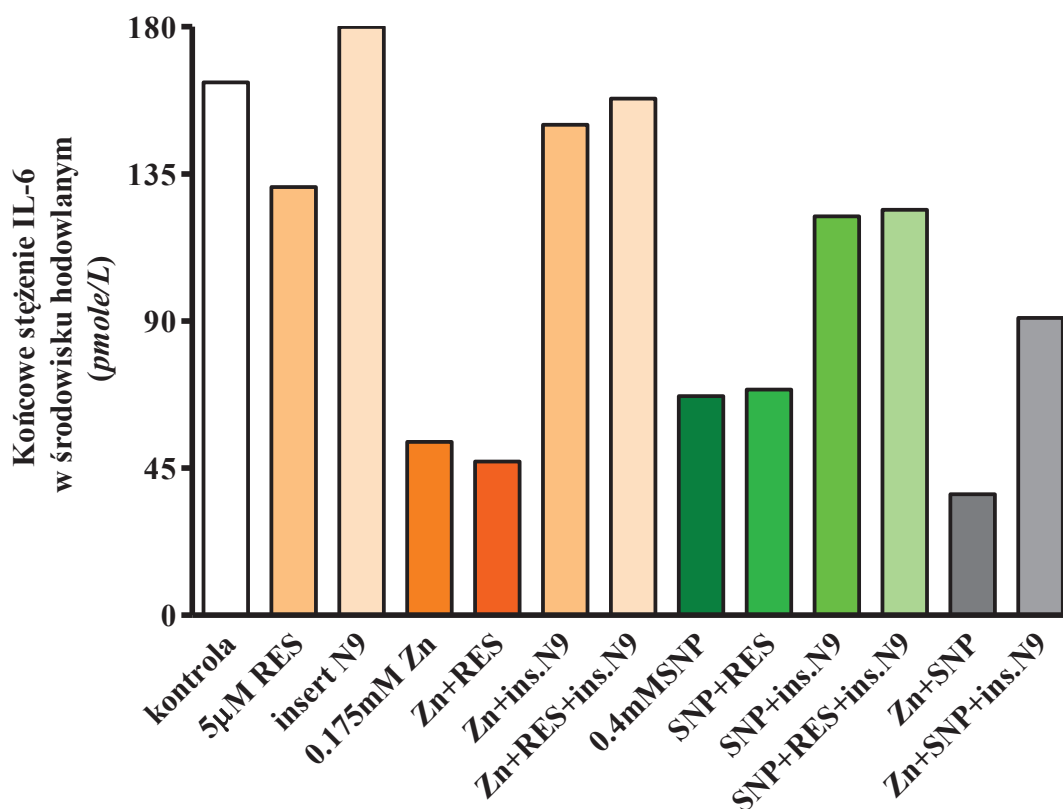


Ryc. 14. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na syntezę NO przez komórki neuronalne SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\*\* $p < 0.001$ ; od 0.175mM Zn # $p < 0.5$ , ## $p < 0.01$ . Czarne kolumny oznaczają wytwarzanie egzogenego NO z dodanego SNP.

#### 5.2.8. Skojarzony, przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na poziom IL-6 i TNF- $\alpha$ w środowisku hodowlanym.

Wiadomo, że wydzielane przez mikroglej cytokiny prozapalne mogą, w zależności od stężenia, wywierać wpływ cytotoksyczny lub cytoprotekcyjny na neurony (Carlson i wsp. 1999, Knezevic-Cuca i wsp. 2000, Bielarczyk i wsp. 2005). W warunkach kontrolnych same komórki SN56 wydzielały znaczne ilości IL-6 (około 53 ng/15 ml). Z kolei w czystej hodowli N9 wykazano obecność niskiego poziomu 0.3 ng/15 ml IL-6 w środowisku. Dlatego dodanie mikrogleju N9 do komórek SN56 nie powodowało istotnej zmiany poziomu IL-6 w środowisku (Ryc. 15).

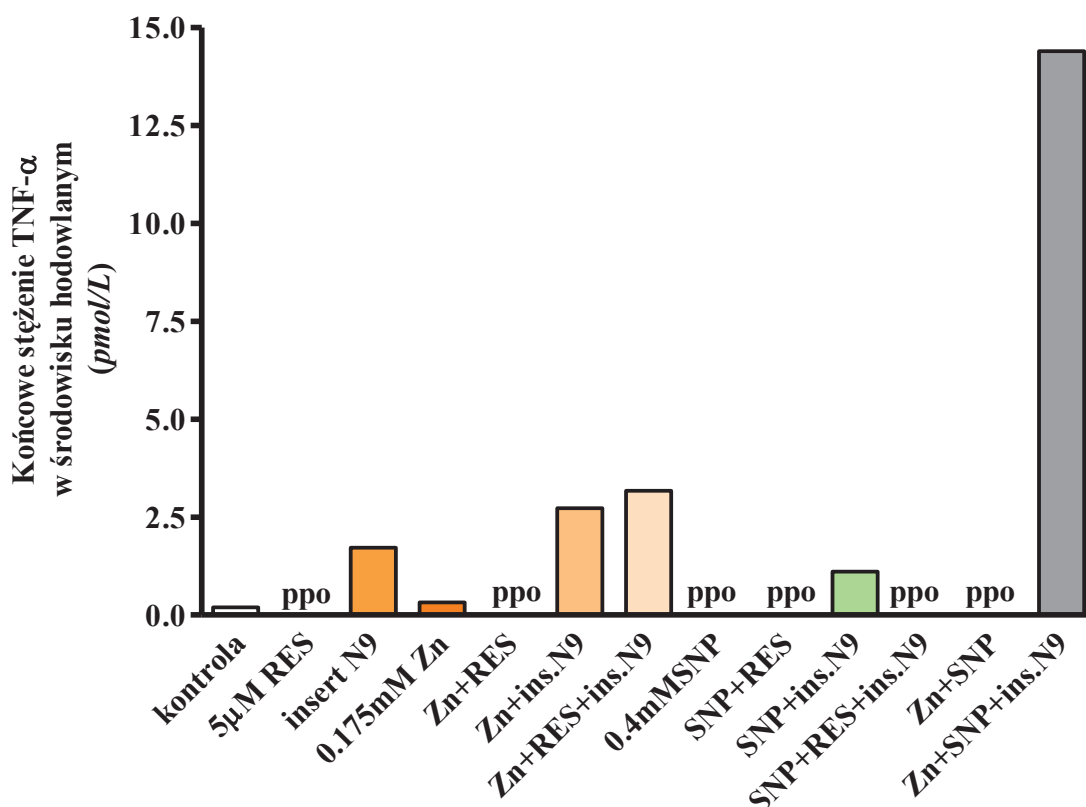
W czystej hodowli komórek SN56, Zn, SNP jak również Zn i SNP powodowały 60-80% spadek poziomu tej cytokiny. Dodanie RES nie odwracało tej inhibicji (Ryc. 15) We wszystkich przypadkach dodanie wstawek z mikroglejem N9, zwiększało poziom IL-6 do wartości zbliżonych do kontrolnych (Ryc. 15).



Ryc. 15. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na syntezę IL-6. Wyniki są wartościami średnimi z 2 doświadczeń.

Poziom TNF- $\alpha$  w środowisku zawierającym same komórki neuronalne SN56 był śladowy lub nieoznaczalny i nie ulegał zmianie po dodaniu Zn, SNP lub Zn z SNP (Ryc.16). Natomiast w czystej hodowli N9 akumulacja TNF- $\alpha$  wyniosła 1 ng/ml. Dlatego dodanie wstawek z mikroglejem N9 zwiększało 10-krotnie poziom TNF- $\alpha$  w środowisku kontrolnym oraz odpowiednio 6, 14 i 74 razy w środowiskach zawierających SNP, Zn i Zn z SNP (Ryc.16). Dodanie RES nie zapobiegało, wywołanemu Zn wzrostowi poziomu TNF- $\alpha$  w środowisku hodowlanym.



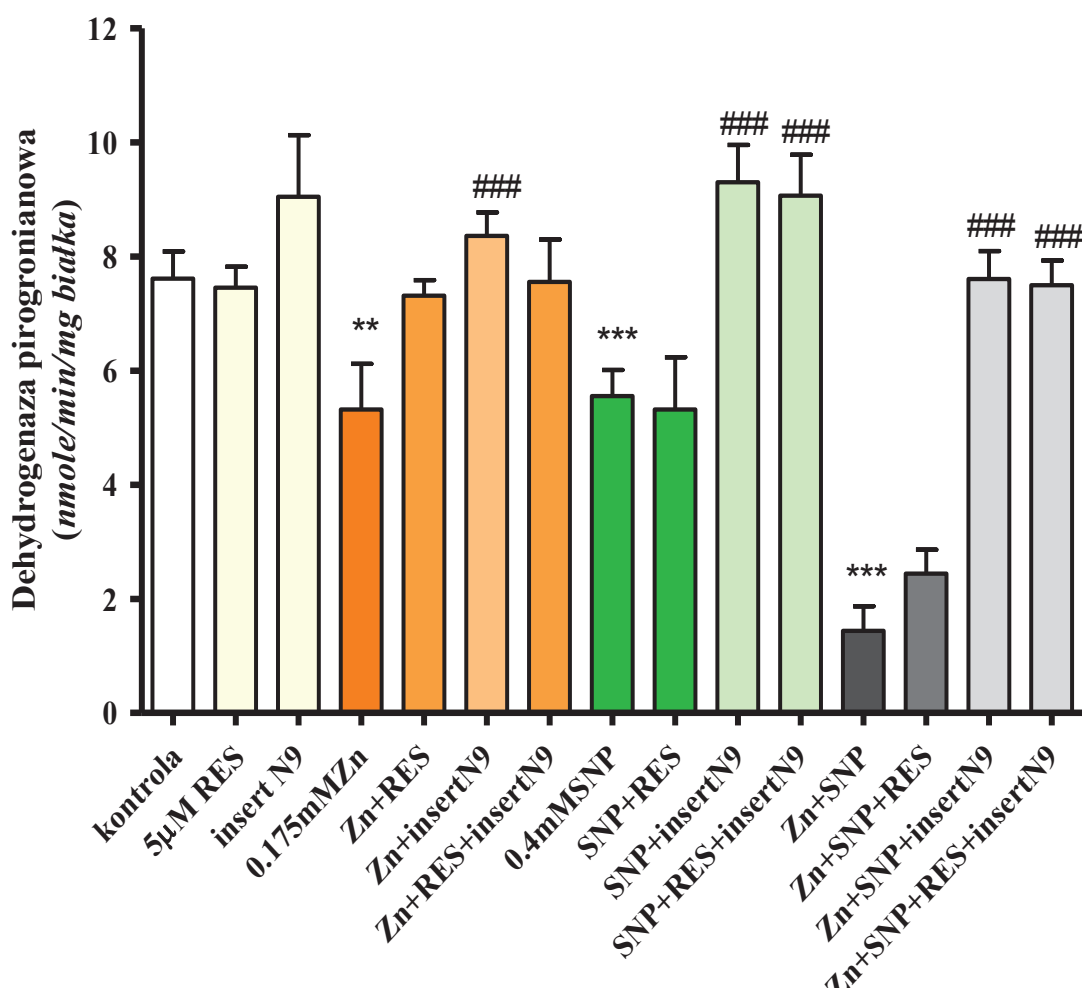


Ryc. 16. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i wstawek z komórkami N9 na syntezę TNF- $\alpha$ . Wyniki są wartościami średnimi z 2 doświadczeń. Skróty: ppo, poniżej poziomu oznaczalności.

### 5.2.9. Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9 na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach neuronalnych SN56

Aktywność PDHC w komórkach SN56 w warunkach kontrolnych wynosiła  $7.6 \pm 1.0$  nmol/min/mg białka i nie zmieniała się znamienne po ich 24-godzinnej ekspozycji na  $5 \mu\text{M}$  RES (Ryc. 17). Natomiast, po łącznej hodowli komórek SN56 w obecności wstawek z komórkami mikrogleju N9, aktywność PDHC, wynosiła  $9.1 \pm 1.1$  nmoli/min/mg białka. Z kolei, po 16-24-godzinnej hodowli komórek SN56 z  $0.4 \text{ mM}$  SNP lub  $0.175 \text{ mM}$  Zn aktywności PDHC wynosiły odpowiednio  $5.3 \pm 0.8$  i  $5.5 \pm 0.4$  nmol/min/mg białka (Ryc. 17). Łączne dodanie tych neurotoksyn powodowało synergistyczne obniżenie aktywności PDHC do  $1.4 \pm 0.4$  nmoli/min/mg białka (Ryc. 17). Z kolei,  $5 \mu\text{mol/L}$  RES, dodany do hodowli SN56 na 6 godzin przed  $0.4 \text{ mM}$  SNP lub równocześnie z  $0.175 \text{ mM}$  Zn, nie przeciwdziałał spadkowi aktywności PDHC, wywołanemu tymi czynnikami cytotoksycznymi (ryc. 17). Natomiast wstawki z komórkami N9, zarówno w obecności, jak i nieobecności RES, zapobiegały przewlekłemu, inhibicyjnemu wpływowi Zn, SNP oraz łącznemu- Zn z

SNP, na aktywność PDHC w komórkach SN56, utrzymując ją na poziomie 7.5-9.0 nmoli/min/mg białka (Ryc. 17). Zjawisko to występowało zarówno w obecności, jak i w nieobecności 5  $\mu$ M RES.

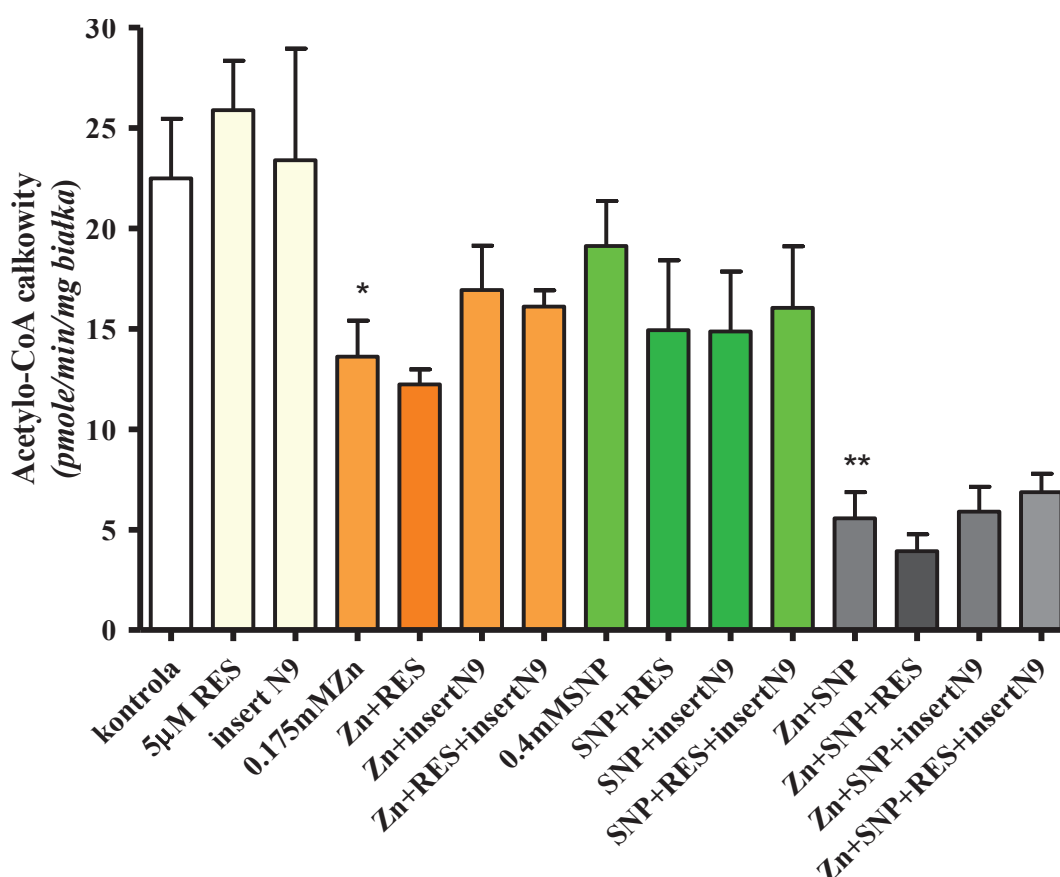


Ryc. 17. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i insertów z komórkami N9 na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w cholinergicznym komórkach neuronalnych SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Zn+SNP ### $p < 0.001$ .

#### 5.2.10. Skojarzony przewlekły wpływ Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikrogleju N9 na poziom acetylo-CoA w cholinergicznym komórkach neuronalnych SN56.

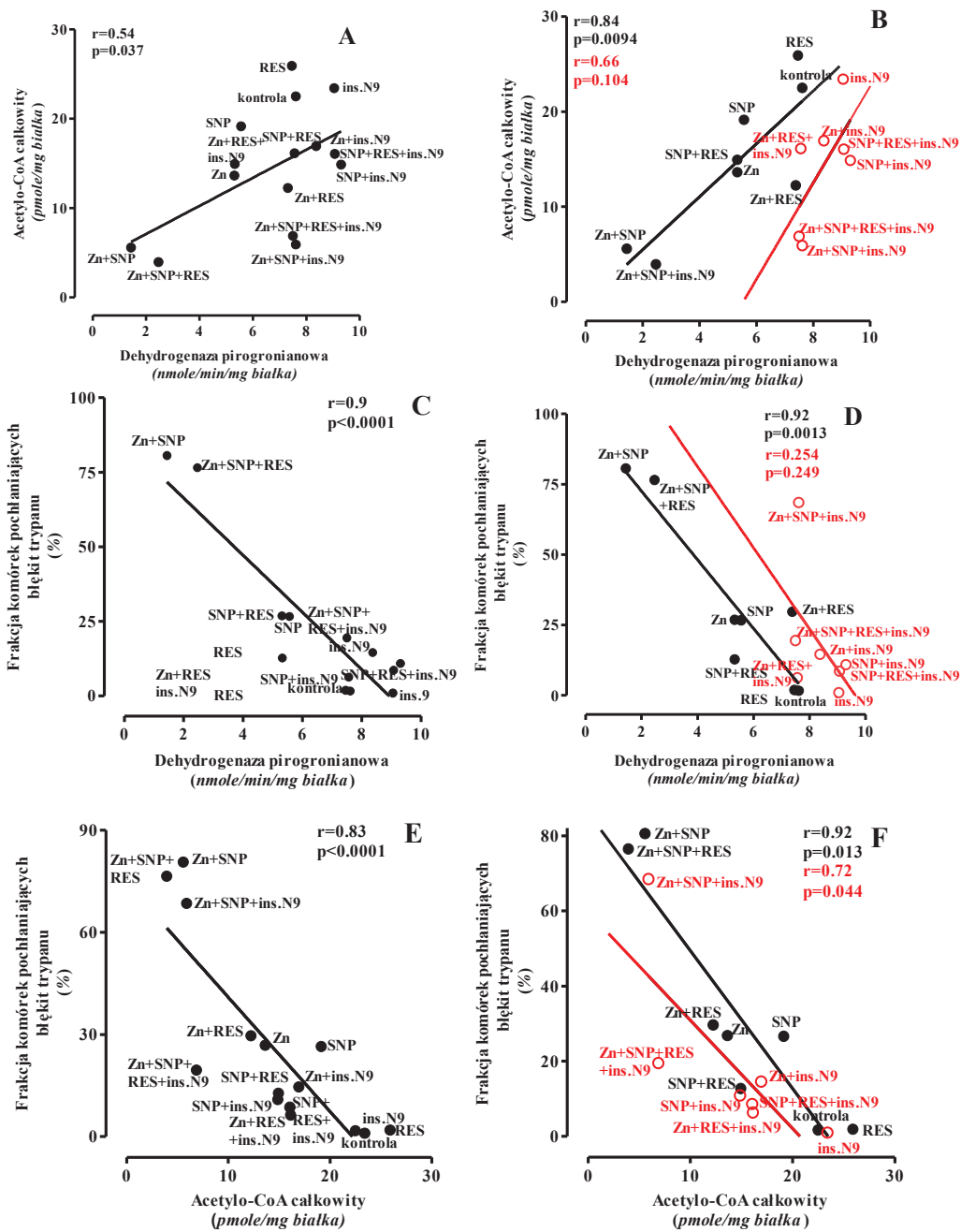
Całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56 hodowanych w warunkach kontrolnych wynosił  $22.5 \pm 3.0$  pmoli/mg białka. Hodowla komórek, zarówno w obecności 5  $\mu$ M RES, jak i insertów z komórkami N9 nie spowodowała istotnych statystycznie zmian poziomu tego metabolitu. 24-godzinna ekspozycja komórek SN56 na 0.175 mM Zn powodowała obniżenie poziomu całkowitego acetylo-CoA do  $13.6 \pm 1.8$  pmoli/mg białka. Natomiast 16-godzinna hodowla SN56 z 0.4 mM SNP

nie powodowała istotnego obniżenia poziomu acetylo-CoA (Ryc. 18). Łączne dodanie do hodowli tych dwóch czynników cytotoksycznych spowodowało synergistyczny spadek poziomu acetylo-CoA do wartości  $5.6 \pm 1.3$  pmola/mg białka (Ryc. 18). RES w stężeniu  $5 \mu\text{M}$  nie zapobiegał, ani supresyjnemu działaniu Zn, ani Zn z SNP, na poziom wewnątrzneuronalnego acetylo-CoA. Również hodowla komórek SN56 łącznie z komórkami mikrogleju N9 nie zabezpieczała ich przed, wywoływanym przez te cytotoksyny, spadkiem poziomu acetylo-CoA (Ryc. 18).



Ryc. 18. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i wstawek z mikroglejem N9 na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli \* $p < 0.5$ , \*\* $p < 0.01$ .

Stwierdzono istnienie słabej, lecz znamiennej statystycznie prostej korelacji pomiędzy całkowitą zawartością acetylo-CoA a aktywnością PDHC ( $p = 0.037$ ) (Ryc. 19A). Równocześnie istnieje wysoce znamienne odwrócona korelacja między tymi dwoma parametrami a śmiertelnością komórek SN56, eksponowanych na różne stężenia i połączenia neurotoksyn i czynników cytoprotekcyjnych ( $p = 0.0001$ , Ryc. 19 C, D).

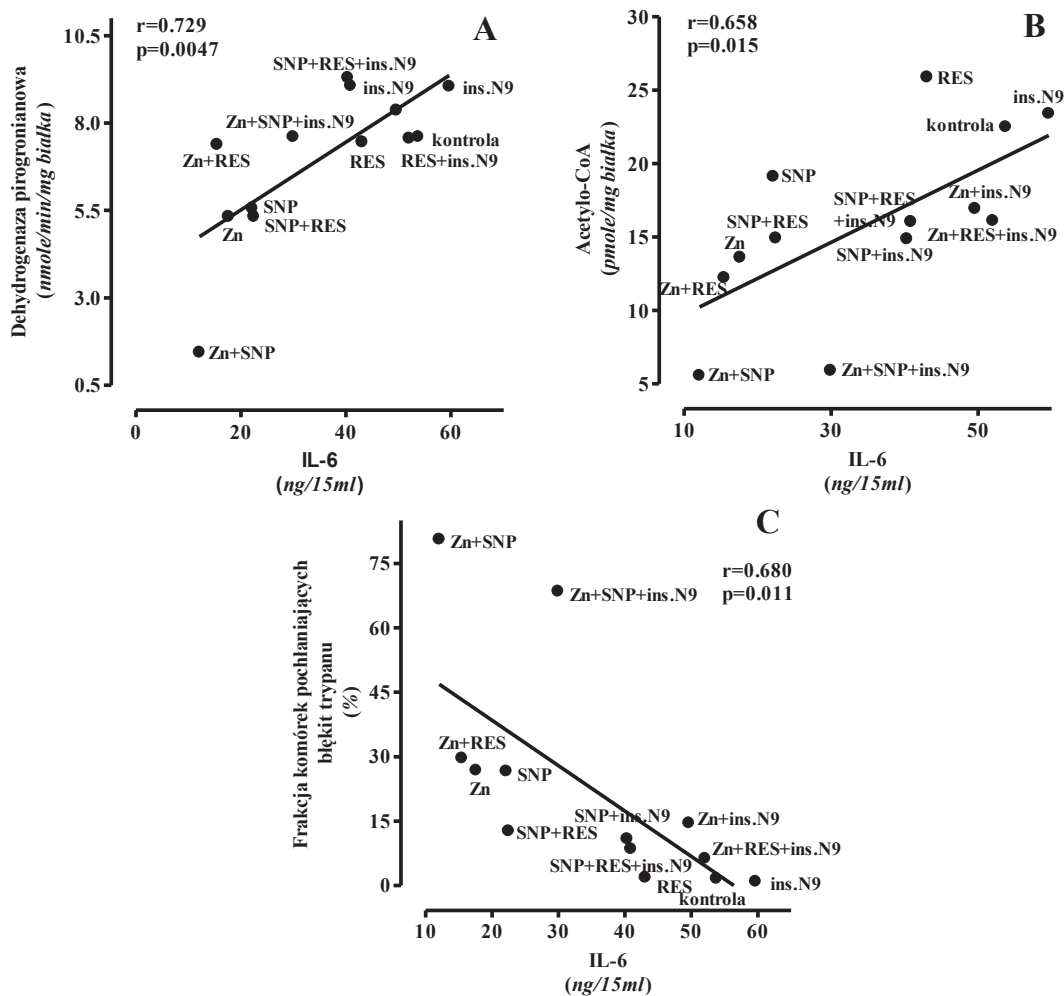


Ryc. 19. Prosta znamienna korelacja między poziomem acetylo-CoA i aktywnością PDHC (A). Wysoce znamienna prosta korelacja między aktywnością PDHC i poziomem acetylo-CoA w hodowli SN56 bez komórek N9 i jej brak w obecności komórek N9 (czerwone oznaczenia) (B). Wysoce znamienne odwrócone korelacje między frakcją komórek uszkodzonych a aktywnością PDHC (C). Wysoce znamienna odwrotna korelacja między śmiertelnością i aktywnością PDHC w SN56 w hodowli bez komórek N9 i jej brak w obecności komórek N9 (D). Wysoce znamienna odwrotna korelacja między frakcją komórek uszkodzonych i poziomem acetylo-CoA (E). Wysoce znamienna odwrotna korelacja między śmiertelnością i poziomem acetylo-CoA w SN56 w hodowli bez komórek N9 i jej brak w obecności komórek N9 (F), w obecności czynników neurotoksycznych i neuroprotencyjnych. Obliczone na podstawie danych z Ryc. 12 i 17 i 18).

Rozbieżności te mogą wskazywać na istnienie innych, niezależnych od zmian aktywności PDHC, czynników, odpowiedzialnych za regulację poziomu acetylo-CoA i żywotności neuronów cholinergiczych. Czynnikiem modyfikującym proste współzależności PDHC-acetylo-CoA okazało się parakrynnne działanie komórek mikrogleju. Powodowało ono podwyższenie aktywności PDHC, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności neurotoksyn lub resweratrolu (Ryc. 17) bez odpowiednich zmian poziomu acetylo-CoA (Ryc. 18). Co więcej, efektywność oddziaływania N9 była tym większa, im silniejsza była inhibicja PDHC (Ryc. 17). Dlatego punkty doświadczalne na wykresach korelacji obliczonych z Rycin 17 i 18 stworzyły dwie populacje odpowiadające warunkom doświadczalnym bez i z obecnymi komórkami N9 (Ryc. 19).

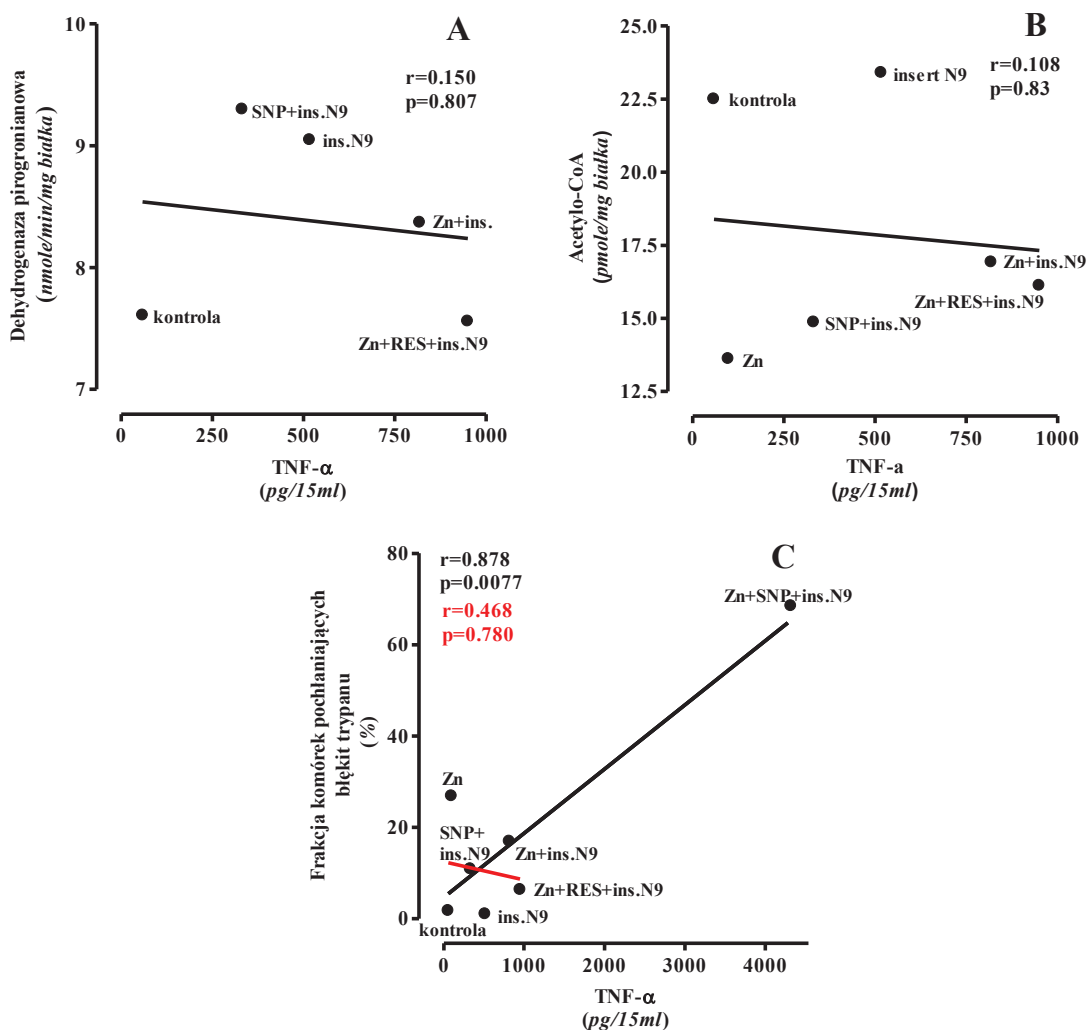
W środowisku bez komórek mikroglejowych N9 wykazano wysoce znamienne korelację między aktywnościami PDHC i poziomami acetylo-CoA w warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych ( $p=0.0094$ , Ryc. 19 B). Natomiast w obecności mikrogleju, który, niezależnie od warunków, utrzymywał wysoką aktywność PDHC, istotnej korelacji nie wykazano ( $p=0.104$ , Ryc. 19 B). Podobne zależności wykazano dla korelacji między śmiertelnością komórek a aktywnością PDHC w obu rodzajach środowisk (Ryc. 19 C, D). Wskazuje to, na zasadnicze różnice w mechanizmach neuroprotekcji zależnych od RES i parakrynnego wpływu mikrogleju.

Zarówno aktywności PDHC, jak i poziomy acetylo-CoA w SN56 wykazywały istotne proste korelacje z poziomami IL-6 w różnych warunkach doświadczalnych ( $p=0.0047$ ,  $p=0.015$ ) (Ryc. 20 A, B). Natomiast śmiertelność komórek SN56 wykazywała odwrotną korelację z poziomami tej cytokiny w warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych ( $p=0.011$ ,  $r=-0.680$ ) (Ryc. 20 C).



Ryc. 20. Wykresy prostych korelacji między aktywnościami PDHC (A) i poziomami acetylo-CoA (B) oraz odwrotnej korelacji między śmiertelnością komórek SN56 (C) i poziomem IL-6 w środowisku hodowlanym w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych. Obliczono na podstawie danych z Ryc. 12, 15, 16, 17, 18.

W odróżnieniu od IL-6 zmiany aktywności PDHC i poziomów acetylo-CoA nie korelowały ze zmianami stężenia TNF- $\alpha$  w środowisku hodowlanym (Ryc.21 A, B). Inna też była zależność śmiertelności komórek SN56 od poziomu TNF- $\alpha$  (Ryc. 21 C). W zakresie niskich stężeń TNF- $\alpha$ , nie obserwowano istotnych zmian śmiertelności (czewona linia) (Ryc. 21 C). Natomiast przy uwzględnieniu wysokich stężeń TNF- $\alpha$  wykazano istnienie prostej korelacji stopnia uszkodzenia komórek, z poziomem tej cytokiny (Ryc. 21 C).

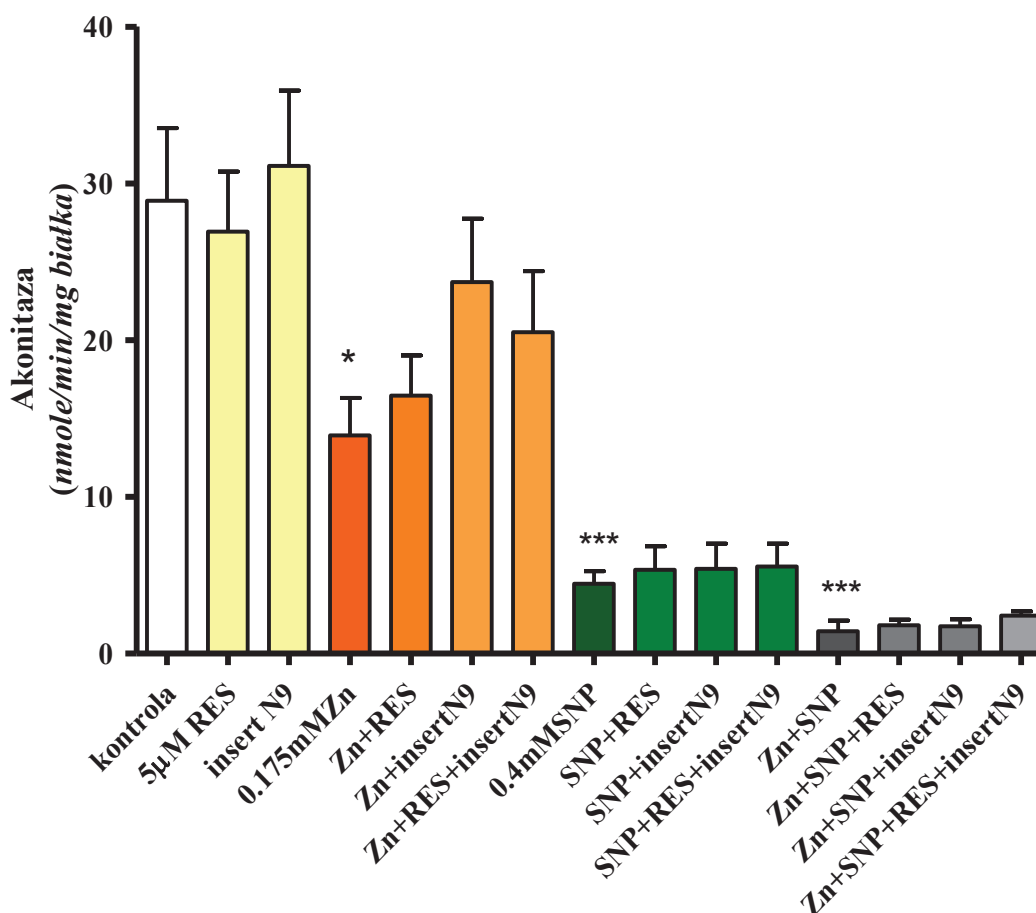


Ryc. 21. Wykresy nieznamiennej korelacji między aktywnościami PDHC (A) i poziomami acetylo-CoA (B) oraz prostej korelacji między śmiertelnością komórek SN56 (C) i poziomem TNF- $\alpha$  w środowisku hodowlanym w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych. Linia czerwona- nienamienna korelacja w zakresie niskich stężeń TNF- $\alpha$ . Obliczono na podstawie danych z Ryc. 12, 17,18,19.

### 5.2.11. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność akonitazy w komórkach SN56

Nasze poprzednie badania wykazały, że akonitaza jest enzymem szczególnie wrażliwym na inhibicyjne działanie metali i rodników nitrozylowych, któremu można zapobiec przez wcześniejsze podanie kwasu liponowego (Ronowska i wsp. 2007, Szutowicz i wsp. 2006). Dlatego w tej pracy zbadano, czy RES i związki wydzielane przez mikroglej mogą mieć podobne właściwości neutralizacji różnych sygnałów neurotoksycznych. Sam 5  $\mu$ M RES czy też mikroglej N9 nie wpływały na

aktywność akonitazy (Ryc. 22). Natomiast, Zn w stężeniu 0.175 mM oraz 0.4 mM SNP powodowały odpowiednio 50 i 75% inhibicję aktywności tego enzymu. Łączne dodanie Zn i SNP zwiększało tę inhibicję do 95% (Ryc. 22). Wcześniejsze dodanie, oddzielne lub łączne, RES lub mikrogleju, nie zapobiegało oddzielnemu lub skojarzonemu, inhibicyjnemu działaniu tych neurotoksyn (Ryc. 22).



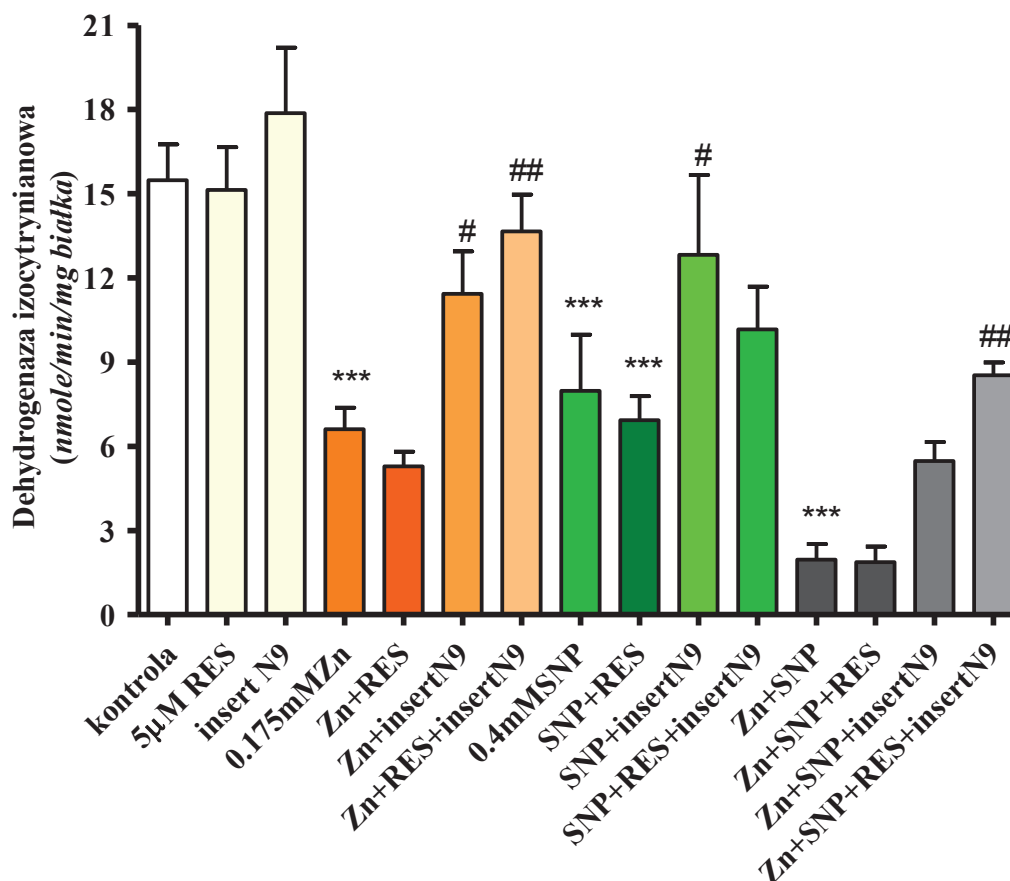
Ryc. 22. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność akonitazy w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 3-5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \* $p < 0.5$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 5.2.12. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej-NADP w komórkach SN56

Nasze badania wykazały, że Zn jest silnym, bezpośrednim inhibitorem ICDH-NADP w homogenatach komórek SN56 (Ronowska i wsp. 2010). Uzasadniało to podjęcie badań, dotyczących pośredniego wpływu związków neurotoksycznych na aktywność tego enzymu in situ w komórkach rosnących w ich obecności. Zn w stężeniu 0.175 mM oraz 0.4 mM SNP powodowały po 16-24 godzinnej hodowli, odpowiednio 57 i 50% inhibicję tego enzymu (Ryc. 23). Łączne dodanie obu

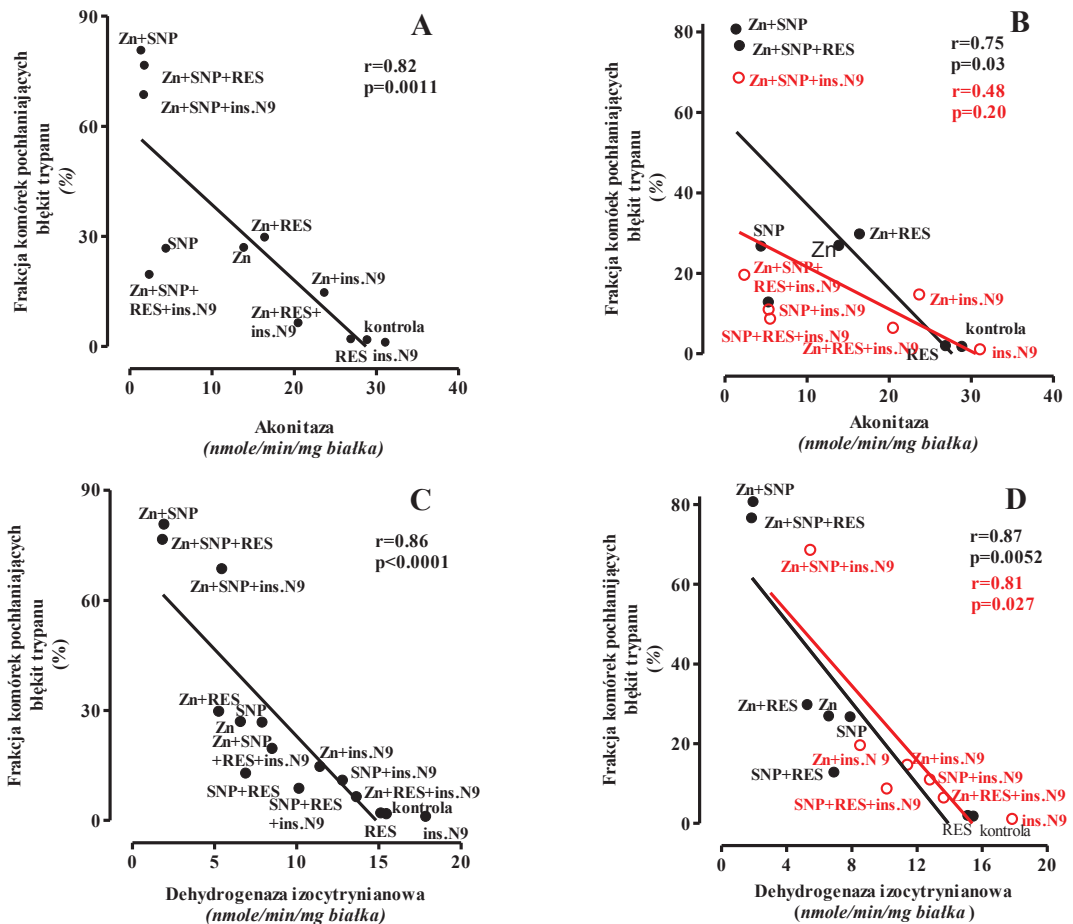


cytotoksyn zwiększało tę inhibicję do 87%. Natomiast, sam 5  $\mu$ M RES, czy też mikroglej N9, nie wpływały na aktywność ICDH-NADP (Ryc. 23). Oddzielne lub łączne dodanie 5  $\mu$ M RES i wstawek z komórkami mikrogleju N9, częściowo znosiło inhibicję poszczególnych, jak i łącznie zastosowanych cytotoxyn (Ryc. 23).



Ryc. 23. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 3-5 doświadczeń. Znamienne różnice od: kontroli \* $p < 0.5$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; 0.175mMZn # $p < 0.5$ , ## $p < 0.01$ ; 0.4mMSNP # $p < 0.05$ .

Wykazano również istnienie odwrotnej, znamiennej korelacji między śmiertelnością a aktywnościami akonitazy ( $r=0.82$ ,  $p=0.0011$ ) (Ryc. 24 A) i ICDH-NADP ( $r=0.86$ ,  $p<0.0001$ ) (Ryc. 24 B) w komórkach SN56, ekspozowanych na różne kombinacje czynników neurotoksycznych i neuroprotektynnych. W odróżnieniu od PDHC, wykresy korelacji między śmiertelnością komórek i aktywnościami akonitazy lub ICDH-NADP, w środowiskach bez i z obecnymi komórkami mikrogleju N9, nie wskazywały na jego modyfikujące działanie na inhibicję przez Zn lub/i SNP (Ryc. 24 B < D).



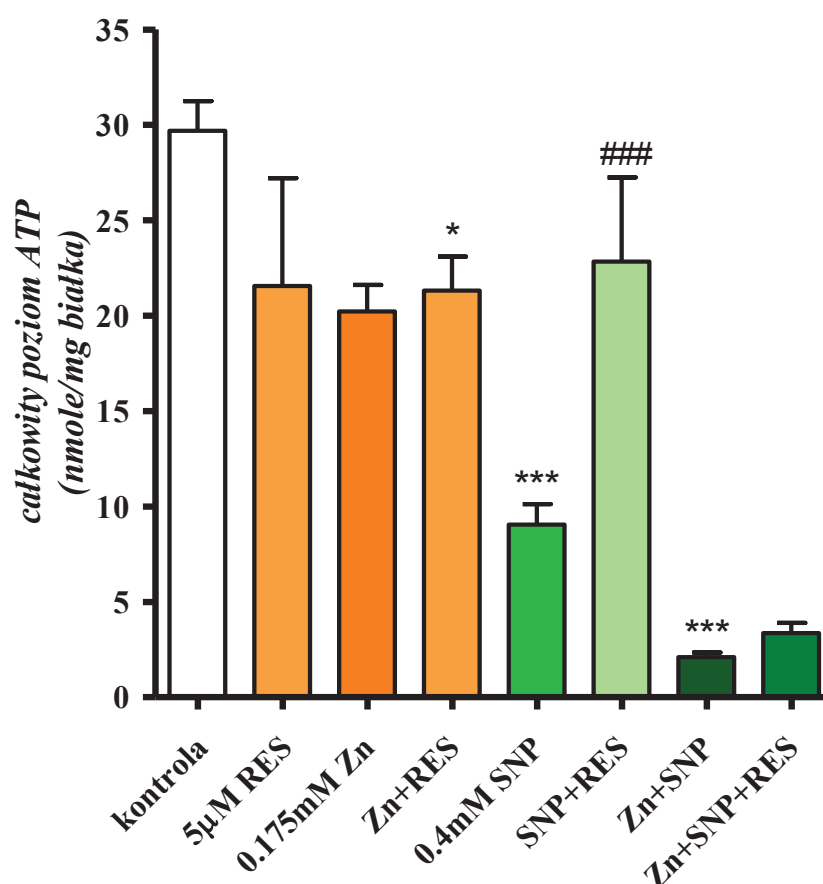
Ryc. 24. Wykresy odwrotnych, wysoce znamiennej korelacji między śmiertelnością a aktywnościami akonitazy ( $r=0.82$ ,  $p=0.00011$ ) (A) i ICDH-NADP ( $r=0.86$ ,  $p<0.0001$ ) (C) w komórkach SN56 po ich przewlekłej ekspozycji na różne zestawienia czynników neurotoksycznych i neuroprotektoryjnych. Odwrotne korelacje między śmiertelnością a aktywnościami akonitazy (B) i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP (D) w SN56 w hodowli bez komórek N9 (kolor czarny) i w obecności komórek N9 (kolor czerwony) w obecności czynników neurotoksycznych i neuroprotektoryjnych. Obliczono na podstawie danych z Ryc. 12, 22, 23).

### 5.2.13. Przewlekły wpływ Zn, SNP i RES na całkowity poziom ATP w komórkach SN56

Inhibicja aktywności licznych enzymów związanych z metabolizmem energetycznym komórek, przez Zn i SNP i jej związek ze śmiertelnością cholinergicznym komórek neuronalnych (Ryc. 19 A, B i C; Ryc. 24 A i B), stanowiły uzasadnienie dla oznaczenia poziomu ATP w komórkach SN56, w tych warunkach doświadczalnych. Niedobory energii są bowiem bezpośrednim, wykonawczym sygnałem, powodującym uszkodzenie i śmierć neuronów oraz innych komórek mózgu. Poziom ATP oznaczano tylko w komórkach SN56, hodowanych

bez wstawek, zawierających komórki N9. Było to spowodowane ograniczeniami metody oznaczania ATP metodą luminescencyjną. Metoda ta wymaga natychmiastowego odbiałczania komórek, jeszcze przed ich zebraniem z płytek hodowlanych (patrz 4.8.2.).

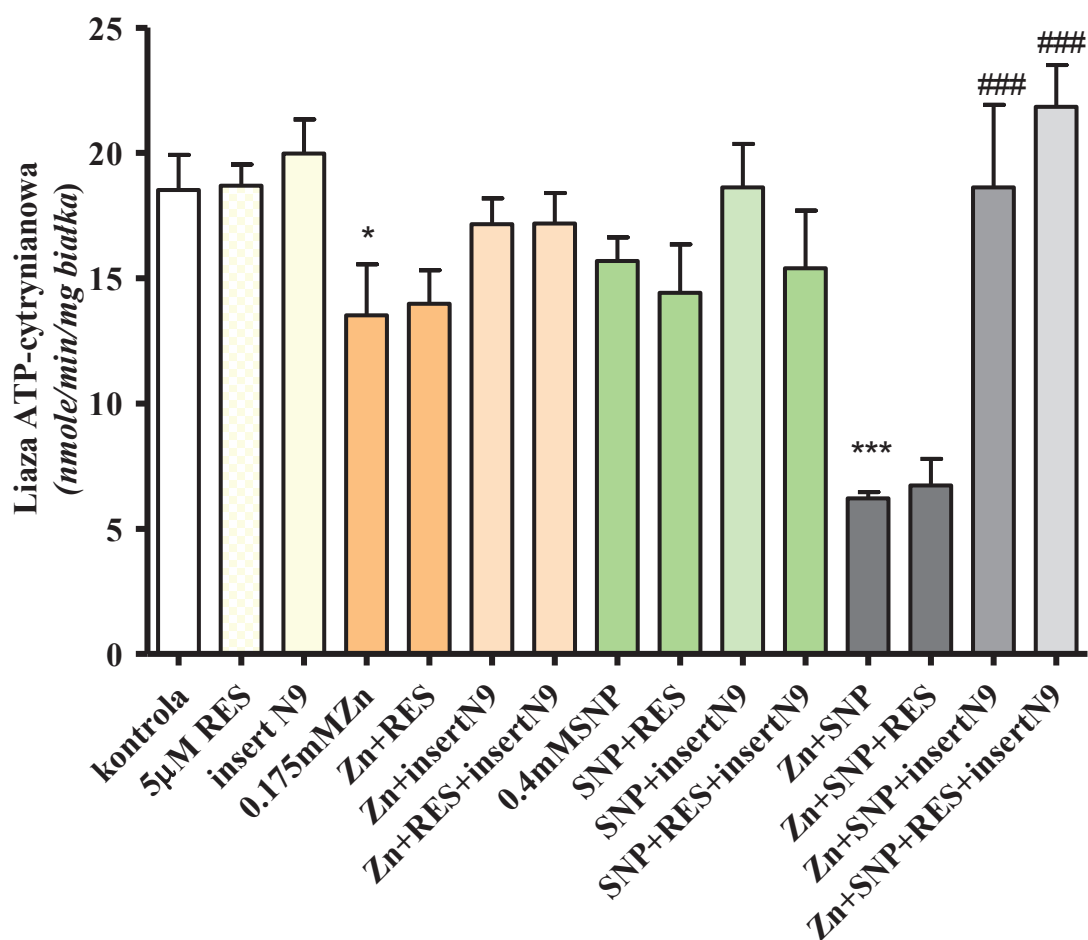
W warunkach kontrolnych, stężenie ATP wynosiło  $29.7 \pm 1.6$  nmola/mg białka całkowitego. SNP w stężeniu 0.4 mM powodował spadek poziomu ATP do  $9.1 \pm 1.1$ , a 0.175 mM Zn do  $20.2 \pm 1.4$  nmoli/mg białka (Ryc. 25). Łączne dodanie Zn i SNP powodowało synergistyczne obniżenie poziomu ATP do  $2.1 \pm 0.2$  nmoli/mg białka (Ryc. 25). RES w stężeniu 5  $\mu$ M nie zapobiegał obniżeniu poziomu ATP w obecności Zn oraz przy jednoczesnej ekspozycji komórek na Zn i SNP. Natomiast, niemal całkowicie, zapobiegał supresyjnemu działaniu SNP, utrzymując zawartość ATP w komórkach SN56 na poziomie  $22.8 \pm 4.4$  nmoli/mg białka (Ryc. 25).



Ryc. 25. Przewlekły wpływ Zn, SNP i RES na poziom całkowitego ATP w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 4-8 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; 0.4 mM SNP ### $p < 0.001$ .

#### 5.2.14. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność liazy ATP-cytrynianowej

ACL jest kluczowym enzymem głównej drogi pośredniego transportu reszt acetylo-CoA do cytoplazmy komórek nerwowych, za pośrednictwem cytrynianu (Szutowicz, Łysiak 1977, Szutowicz i wsp. 1982). W warunkach kontrolnych w środowisku DMEM, aktywność ACL wynosiła  $18.5 \pm 1.4$  nmola/min/mg białka. Hodowla komórek SN56 w obecności RES i komórek mikrogleju N9 nie miała wpływu na aktywność tego enzymu (Ryc. 26).



Ryc. 26. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejowych N9 na aktywność liazy ATP-cytrynianowej. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \* $p < 0.5$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Zn+SNP ### $p < 0.001$ .

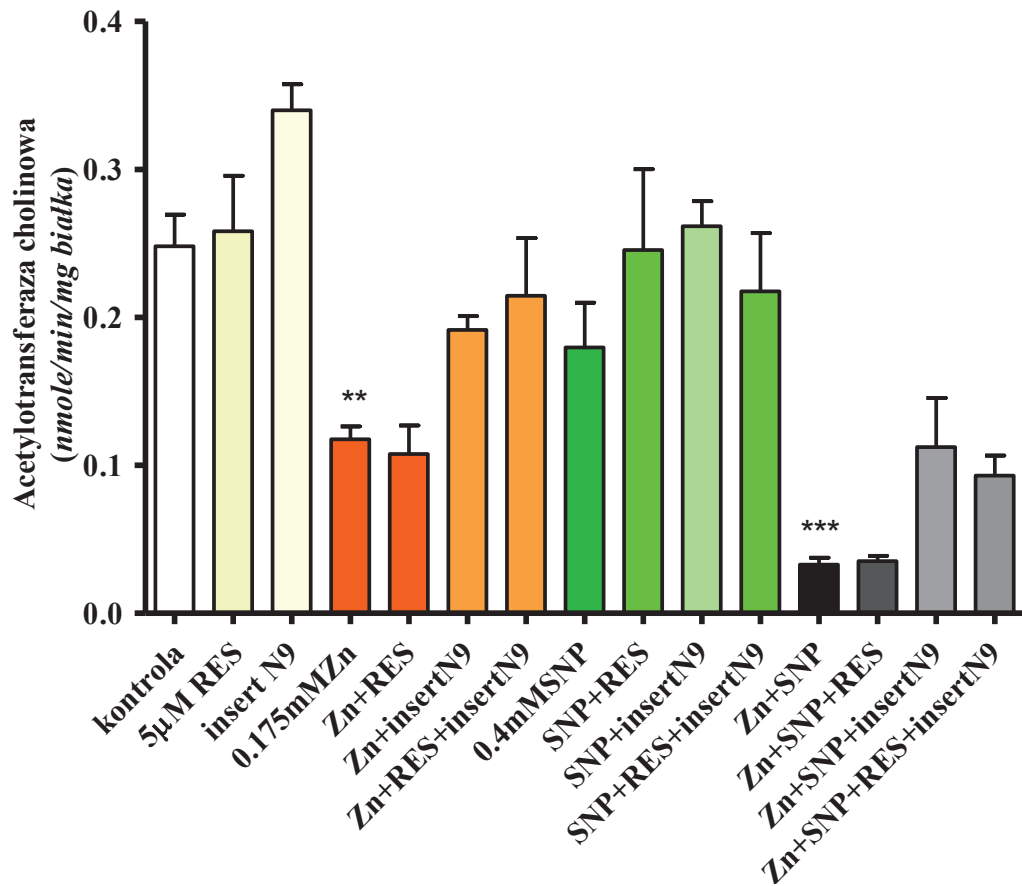
Przewlekła ekspozycja komórek SN56 na 0.175 mM Zn lub 0.4 mM SNP, powodowała niewielki spadek aktywności ACL odpowiednio do  $13.5 \pm 2.0$  i  $14.7 \pm 0.9$  nmoli/min/mg białka (Ryc. 26). Natomiast łączne dodanie do hodowli 0.175 mM Zn i 0.4 mM SNP wywołało synergistyczny efekt inhibicyjny, powodując spadek

aktywności ACL do  $6.2 \pm 0.2$  nmola/min/mg białka. Sam RES nie zapobiegał inhibicji ACL wywoływanej przez oddzielne lub łączne dodanie tych cytotoksyn (Ryc. 26). Natomiast, komórki mikroglejowe N9 zabezpieczały całkowicie przed inhibicją aktywności ACL w komórkach neuronalnych SN56, eksponowanych na Zn i SNP łącznie, niezależnie od obecności czy nieobecności RES (Ryc. 26). W tych warunkach RES wzmacniał ochronne działanie mikrogleju, podwyższając aktywność ACL do  $21.8 \pm 1.7$  nmola/min/mg białka. Mikroglej nie wywierał wyraźnego działania ochraniającego ACL przed nieznaczoną inhibicją, obserwowaną przy oddzielnej ekspozycji komórek na Zn lub SNP (Ryc. 26).

#### ***5.2.15. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikrogleju N9 na aktywność acetylotransferazy cholinowej w zróżnicowanych komórkach neuronalnych SN56***

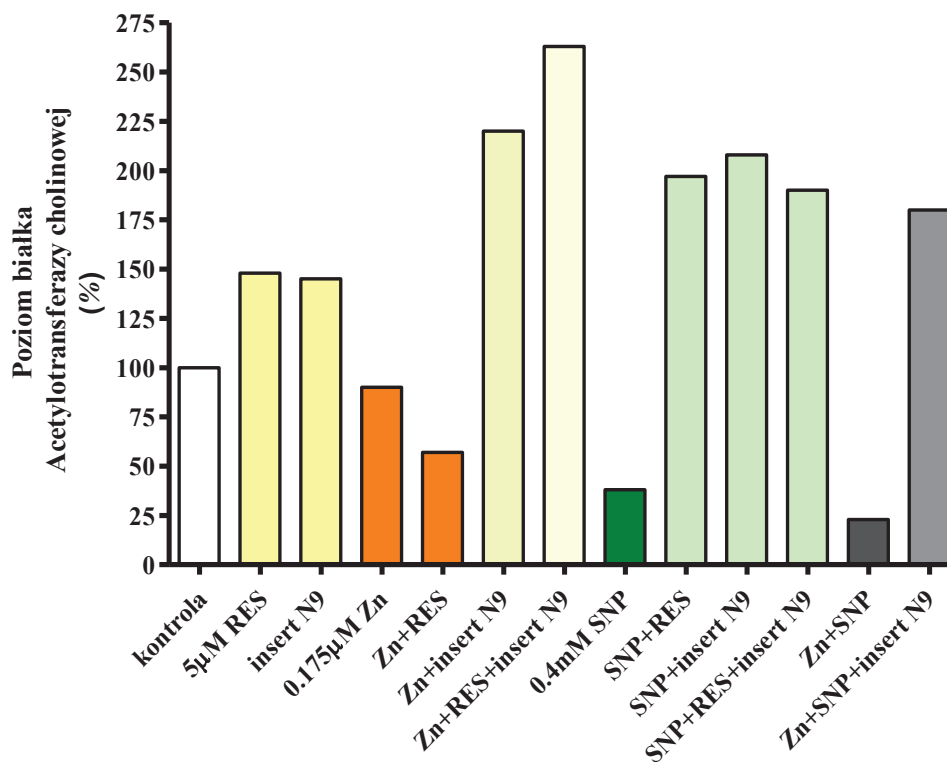
W doświadczeniach używano komórek SN56, różnicowanych cAMP/RA, które wykazywały kilkakrotnie wyższą ekspresję fenotypu cholinergicznego, dojrzałość morfologiczną (Ryc. 5) oraz większą wrażliwość na związki cytotoksyczne, niż komórki nie zróżnicowane, o niskiej ekspresji fenotypu cholinergicznego (Bizon-Zygmańska i wsp., 2011; Ronowska i wsp., 2010; Szutowicz, 2001; Szutowicz i wsp., 2006). W warunkach kontrolnych, w zróżnicowanych komórkach SN56 aktywność ChAT wynosiła 0.25 nmoli/min/mg białka (Ryc. 28). Była ona 2.5-krotnie wyższa od aktywności tego enzymu w komórkach nie zróżnicowanych.

RES nie zmieniał, natomiast komórki mikroglejowe N9 na wstawkach, zwiększały aktywność ChAT w zróżnicowanych komórkach SN56 o 37% (Ryc. 28). Hodowla zróżnicowanych komórek SN56 z Zn obniżała o 53%, a ekspozycja na SNP nie powodowała istotnego spadku aktywności ChAT (Ryc. 27). Obie cytotoksyny dodane łącznie, wykazywały działanie synergistyczne, zwiększając do 84% inhibicję aktywności tego enzymu. RES nie zapobiegał inhibicji ChAT przez Zn. Natomiast komórki mikrogleju N9 znosiły tę inhibicję częściowo, utrzymując aktywność ChAT na poziomie 77% wartości kontrolnych (Ryc. 27). RES nie znosił również łącznego inhibicyjnego działania Zn i SNP. Komórki mikrogleju N9 częściowo łagodziły tę inhibicję, zmniejszając ją do 45% (Ryc. 27).

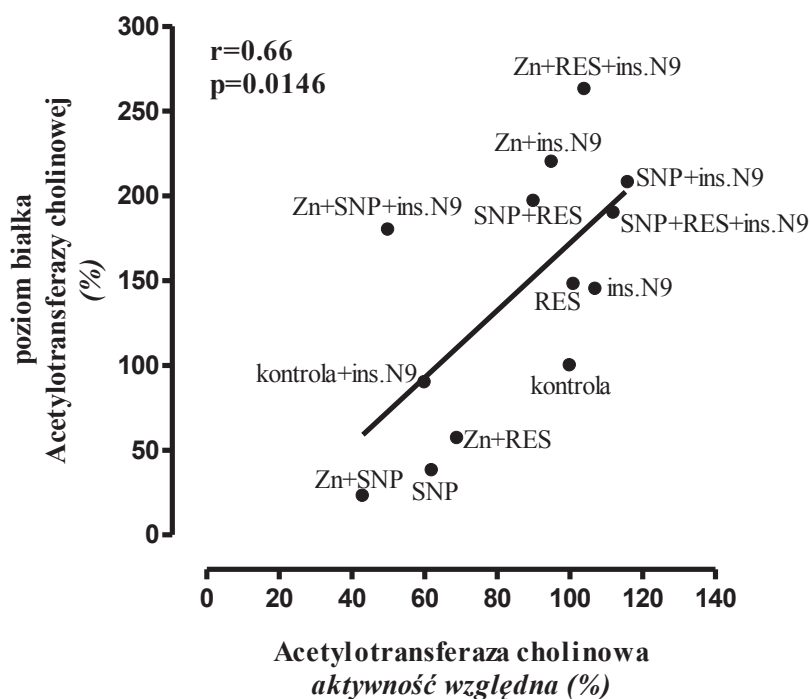


Ryc. 27. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejuN9 na aktywność ChAT w zróżnicowanych komórkach SN56. Dane są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 5-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

Podobny wzór odpowiedzi na wymienione wyżej czynniki neurotoksyczne i neuroprotecyjne wykazano dla poziomu specyficznego białka ChAT (Ryc. 28).



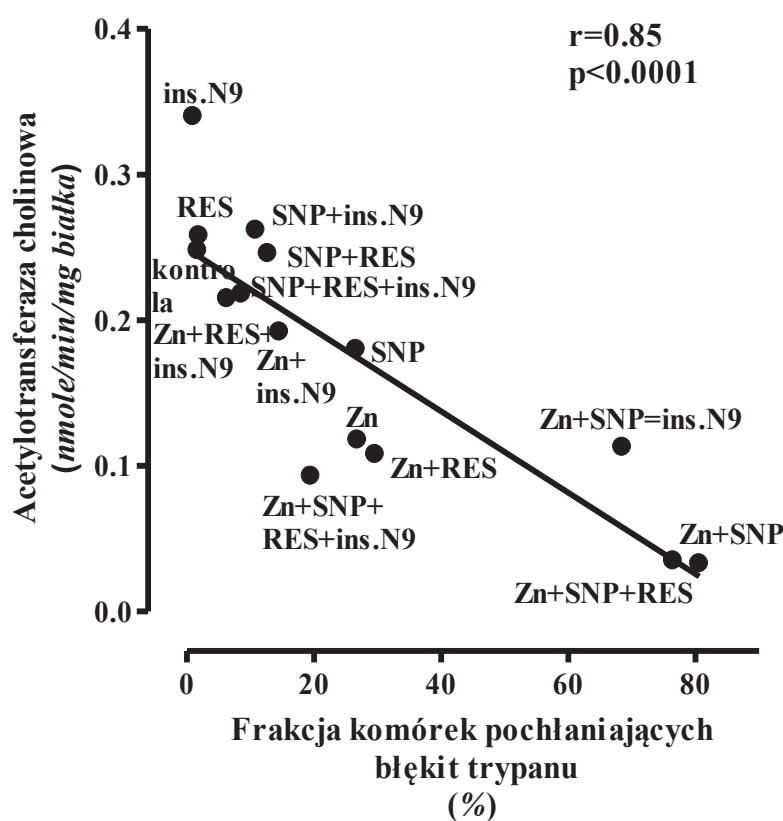
Ryc. 28. Przewlekły wpływ Zn, SNP, RES i komórek mikroglejuN9 na poziom białka ChAT w zróżnicowanych komórkach SN56. Dane są wartościami średnimi z 1 doświadczenia wykonanego podwójnie.



Ryc. 29. Wykres korelacji pomiędzy poziomem białka ChAT a aktywnością ChAT w komórkach SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikrogleju N9. (Obliczono na podstawie danych z Ryc. 27 i 28).

Poziomy białka ChAT wykazywały umiarkowaną dodatnią korelację z aktywnościami ChAT, mierzonymi po przewlekłej ekspozycji komórek SN56 na różne zestawy czynników neurotoksycznych i neuroprotektoryjnych ( $r=0.66$ ,  $p=0.0146$ ) (Ryc. 29).

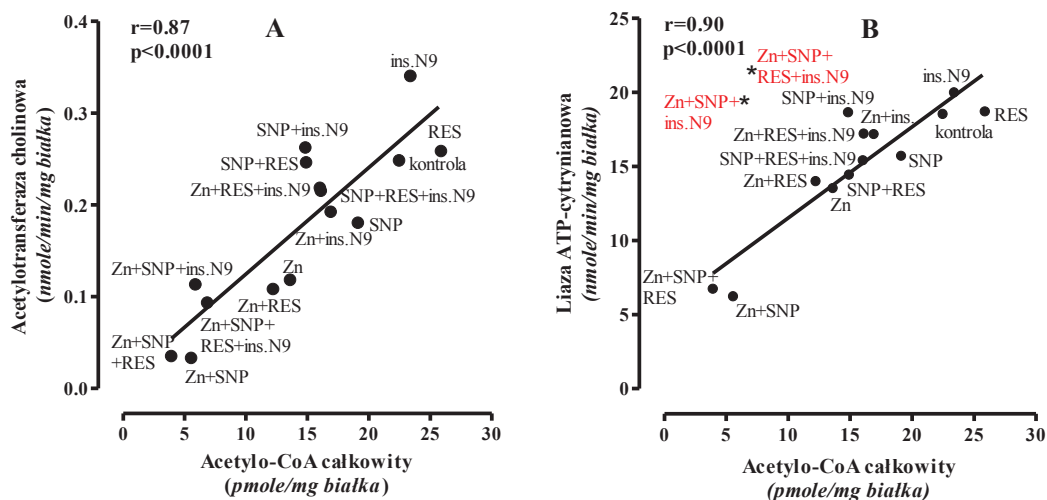
Wielkość frakcji uszkodzonych komórek SN56 wykazywała wysoce znamienne odwrotną korelację z aktywnością ChAT ( $r=0.85$ ,  $p<0.0001$ ) (Ryc. 30), po ich przewlekłej ekspozycji na różne zestawienia czynników cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych.



Ryc. 30. Wykres korelacji między wielkością frakcji uszkodzonych komórek SN56 a aktywnością ChAT. Obliczono na podstawie danych z Ryc. 12 i 28.

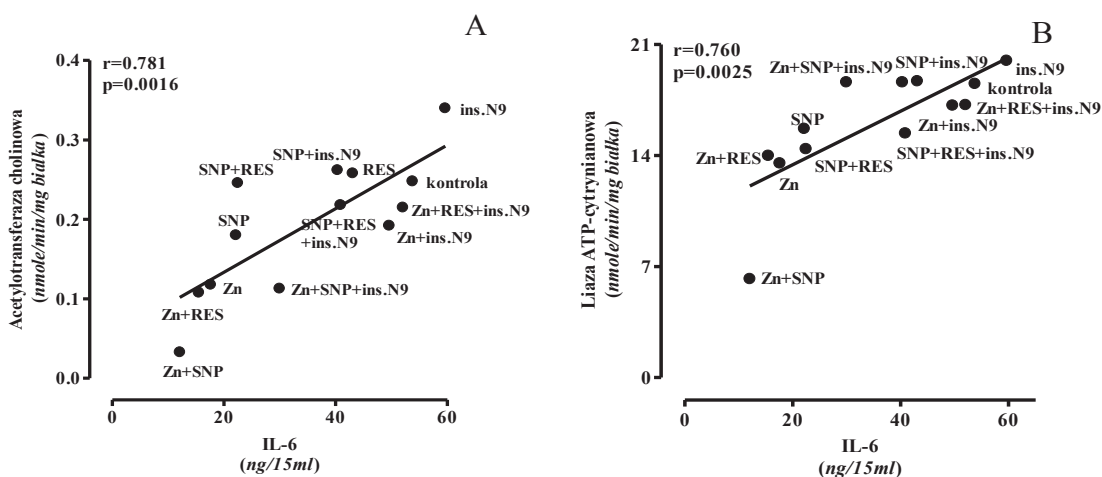
Zarówno aktywności ChAT, jak i ACL mierzone w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych wykazywały wysoce znamienne proste korelacje z zawartością acetylo-CoA w komórkach SN56 (Ryc. 31 A, B).





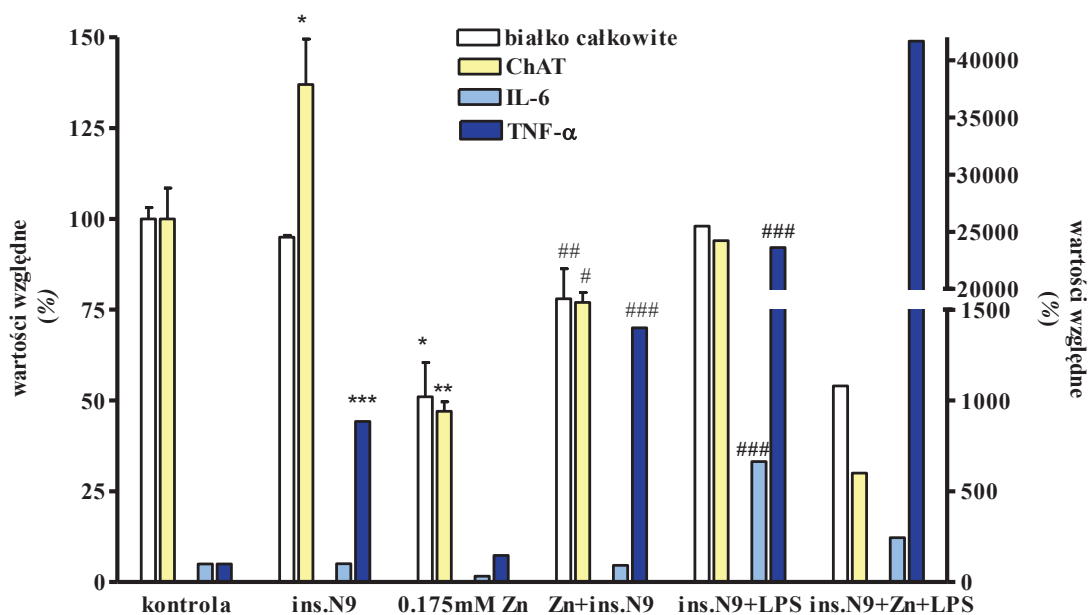
Ryc. 31. Korelacje pomiędzy (A): aktywnością ChAT i całkowitym poziomem acetylo-CoA (B): aktywnością ACL i całkowitym poziomem acetylo-CoA w komórkach SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9. Obliczono na podstawie danych z Ryc. 18, 26, 27).

Zarówno aktywność ACL, jak i ChAT wykazywały wysoce znamienne proste korelacje ze zmianami stężenia IL-6 w środowisku hodowlanym, zawierającym różne połączenia czynników neurotoksycznych i neuroprotekcyjnych (Ryc. 32).



Ryc. 32. Korelacje pomiędzy aktywnością ChAT i poziomem IL-6 w środowisku (A); aktywnością ACL i poziomem IL-6 w środowisku SN56 w obecności Zn, SNP, resweratrolu i komórek mikroglejowych N9. Obliczenia z danych Ryc.15, 26, 27.)

### 5.2.16. Neurotoksyczność mikrogleju.



Ryc. 33. Przewlekły wpływ Zn, wstawek z komórkami N9 oraz LPS na produkcję IL-6 i TNF- $\alpha$  na zawartość białka komórkowego i aktywność ChAT w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 2-5 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; 0.175mM Zn ### $p < 0.001$ . Wartości bezwzględne dla kontroli wynosiły: białko całkowite 76.2 mg/15 ml, ChAT 0,248 nmol/min/mg białka, IL-6 53.76 ng/15ml, TNF- $\alpha$  0.59 ng/15ml.

Zarówno inserty N9, jak i LPS z N9, nie zmieniały, ani liczby komórek mierzonych zawartością ich białka, ani ekspresji fenotypu cholinergicznego, mierzonej aktywnością ChAT. Natomiast w obecności insertów, zawartość TNF- $\alpha$  w środowisku, wzrastała 9-cio krotnie, przy niezmiennym poziomie IL-6 (Ryc. 33). Dodanie LPS w obecności N9 powodowało dalszy wzrost TNF- $\alpha$  do wartości 27 razy wyższych, a IL-6 6 razy wyższych od poziomów kontrolnych (Ryc. 33). Zn dodany do hodowli SN56 obniżał zarówno poziom białka komórek SN56, jak i aktywność specyficzną ChAT odpowiednio o 45 i 53%. W tych warunkach inserty N9 odwracały częściowo te supresyjne działania przy 14-krotnie podwyższonym poziomie TNF- $\alpha$  i niezmiennym poziomie IL-6. Dodanie LPS w obecności Zn i insertów z komórkami N9, znosiło cytoprotekcyjny wpływ tych ostatnich, obniżając zawartość białka SN56 i aktywność ChAT, do poziomów stwierdzanych w środowisku zawierającym Zn, bez insertów N9. Jednocześnie w tych warunkach stwierdzano obniżenie poziomu IL-6 o 56%, przy ponad 400-krotnym, w porównaniu z kontrolą, wzroście stężenia TNF- $\alpha$  w środowisku.

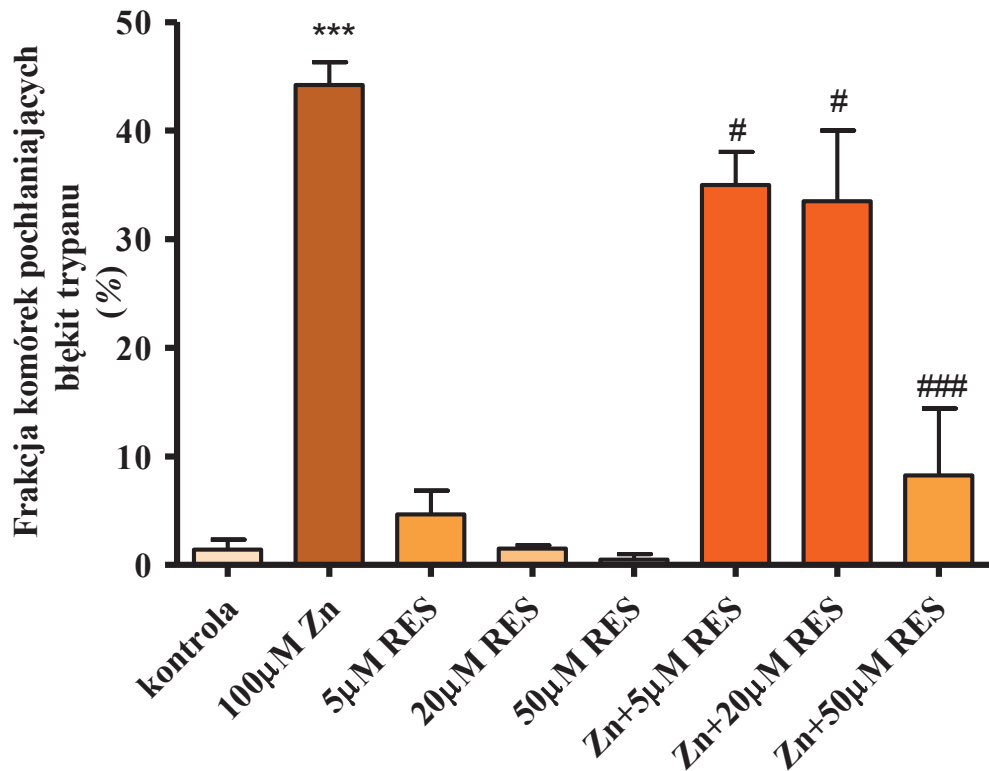
### 5.3. Neurotoksyczność ostra

Zmiany histopatologiczne, obserwowane w mózgach pacjentów z AD stanowią raczej zejście, niż przyczynę neurodegeneracyjnych uszkodzeń neuronów, głównie cholinergicznym (Selkoe 1994). Dlatego w przedstawianej rozprawie doktorskiej zweryfikowaliśmy hipotezę o ekscytotoksycznym mechanizmie wczesnych zmian neurodegeneracyjnych.

W badaniach neurotoksyczności/neuroprotekcji ostrej, komórki po zebraniu z płytki hodowlanej przenoszono do środowiska depolaryzującego, zawierającego 20 mM bufor HEPES, pH 7.4, 1.5 mM bufor fosforanowo-sodowy, pH 7.4, 90 mM NaCl, 30 mM KCl, 2.5 mM pirogronian, 2.5 mM jabłczan, 0.01 mM chlorek choliny. Środowisko nie zawierało płodowej surowicy wołowej. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, do badań neurotoksyczności ostrej używano niższego niż w badaniach toksyczności przewlekłej 0.1 mM stężenia Zn (Ronowska i wsp. 2010). Wynikało to z nieobecności w tym środowisku białek osocza, kompleksujących i przez to neutralizujących jony  $Zn^{2+}$ . Takie stężenie Zn w czasie 30 min ekspozycji w temperaturze 37°C, w środowisku nie zawierającym surowicy powodowało uszkodzenie około 40% komórek neuronalnych SN56 (Ronowska i wsp. 2010).

#### 5.3.1. Ostry wpływ Zn i RES na żywotność komórek SN56

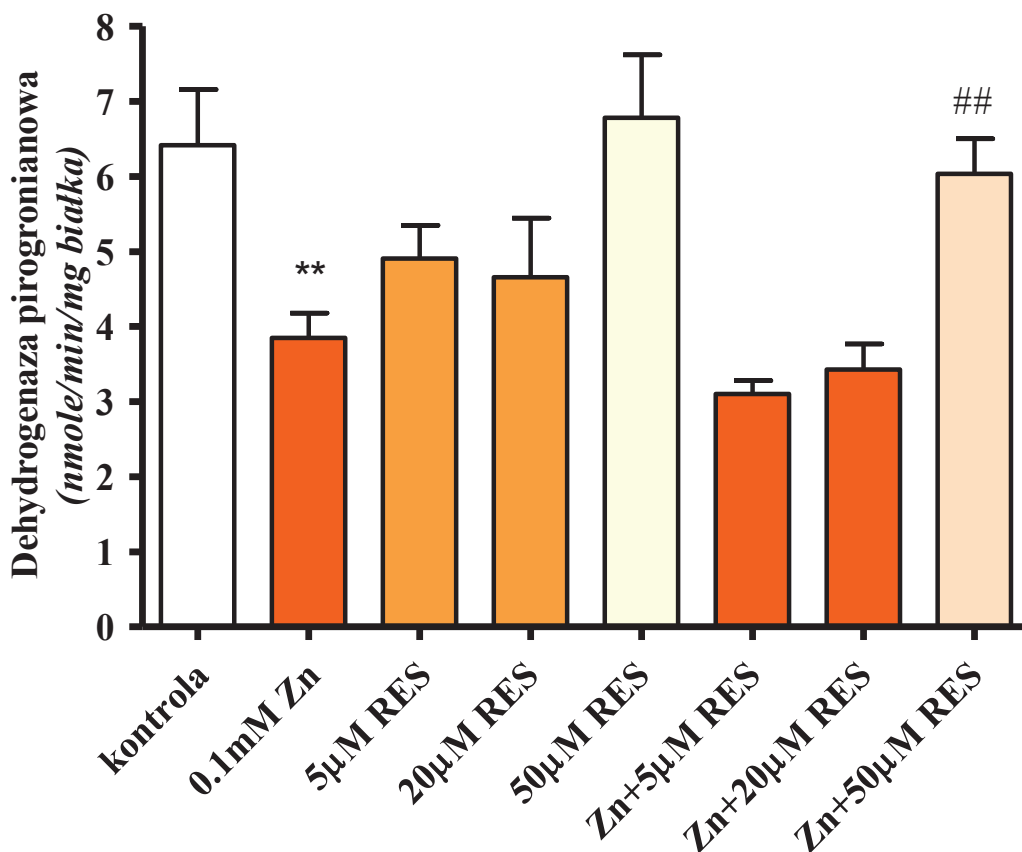
Inkubacja komórek SN56 w warunkach kontrolnych, przez 30 min w środowisku depolaryzującym, nie powodowała wzrostu frakcji komórek uszkodzonych. Natomiast dodanie do niego 0.1 mM Zn zwiększało ją do 44% (Ryc. 34). Zarówno 5, jak i 10  $\mu\text{mol/L}$  stężenia RES nie zapobiegały, wywołanemu przez Zn, ostremu wzrostowi śmiertelności komórek SN56. Natomiast 50  $\mu\text{M}$  RES znacząco zmniejszał wielkość frakcji komórek nie wydających błękitu trypanu w obecności Zn, obniżając ją do 8% (Ryc. 34).



Ryc. 34. Ostry wpływ Zn i RES na zdolność komórek SN56 do wydalania błękitu trypanu. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli \*\*\* $p < 0.001$ ; od 0.1mM Zn # $p < 0.5$ , ### $p < 0.001$ .

### 5.3.2. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56

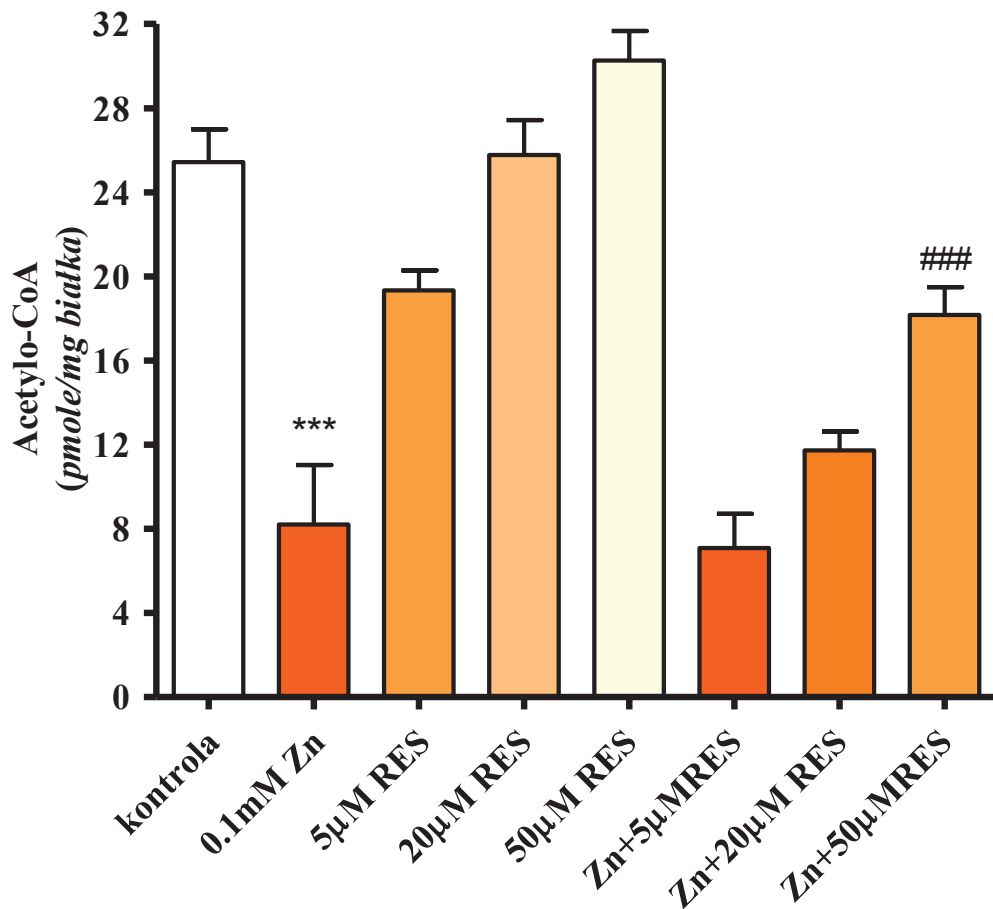
Po 30 minutowej inkubacji komórek SN56 w warunkach kontrolnych, aktywność PDHC wynosiła  $6.4 \pm 0.7$  nmola/min/mg białka całkowitego. Dodanie 0.1 mM Zn do środowiska inkubacyjnego, spowodowało spadek aktywności PDHC do  $3.8 \pm 0.3$  nmola/min/mg białka całkowitego (Ryc. 35). RES w stężeniu 5 i 20  $\mu$ M dodany do środowiska inkubacyjnego, zawierającego 0.1 mM Zn nie zabezpieczał komórek przed spadkiem aktywności PDHC. Natomiast 50  $\mu$ M RES utrzymywał aktywność PDHC na poziomie  $6.0 \pm 0.5$  nmola/min/mg białka (Ryc. 35).



Ryc. 35. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$ SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od : kontroli \*\* $p < 0.01$ ; 0.1mM Zn ## $p < 0.01$ .

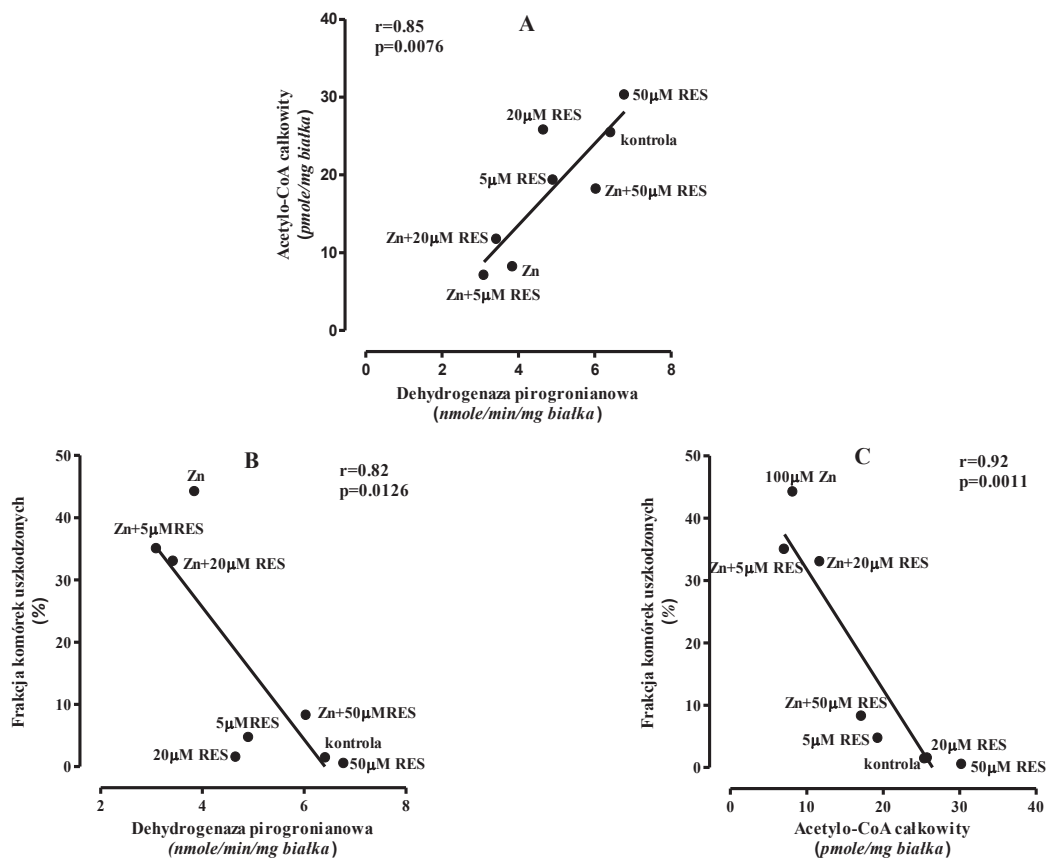
### 5.3.3. Ostry wpływ Zn i RES na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56

Zn dodany do środowiska depolaryzacyjnego w stężeniu 0.1 mM powodował po 30 min znaczny spadek poziomu acetylo-CoA całkowitego z  $25.4 \pm 1.7$  do  $8.2 \pm 2.8$  pmoli/mg białka (Ryc. 36). Zarówno 5, jak i 10  $\mu$ M RES dodany do środowiska inkubacyjnego łącznie z 0.1 mM Zn, nie odwracał supresyjnego działania tego kationu. Natomiast, bardzo wysokie, 50  $\mu$ M, stężenie RES, które w warunkach przewlekłej ekspozycji powodowało wzrost śmiertelności komórek i obniżenie poziomu acetylo-CoA (Ryc. 18), działało ochronnie na komórki SN56, zapewniając utrzymanie acetylo-CoA całkowitego na poziomie  $18.0 \pm 1.3$  pmoli/mg białka (Ryc. 36).



Ryc. 36. Ostre wpływy Zn i RES na poziom acetylo-CoA całkowitego w komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różnice od kontroli \*\*\* $p < 0.001$ ; 0.1mM Zn ### $p < 0.001$ .

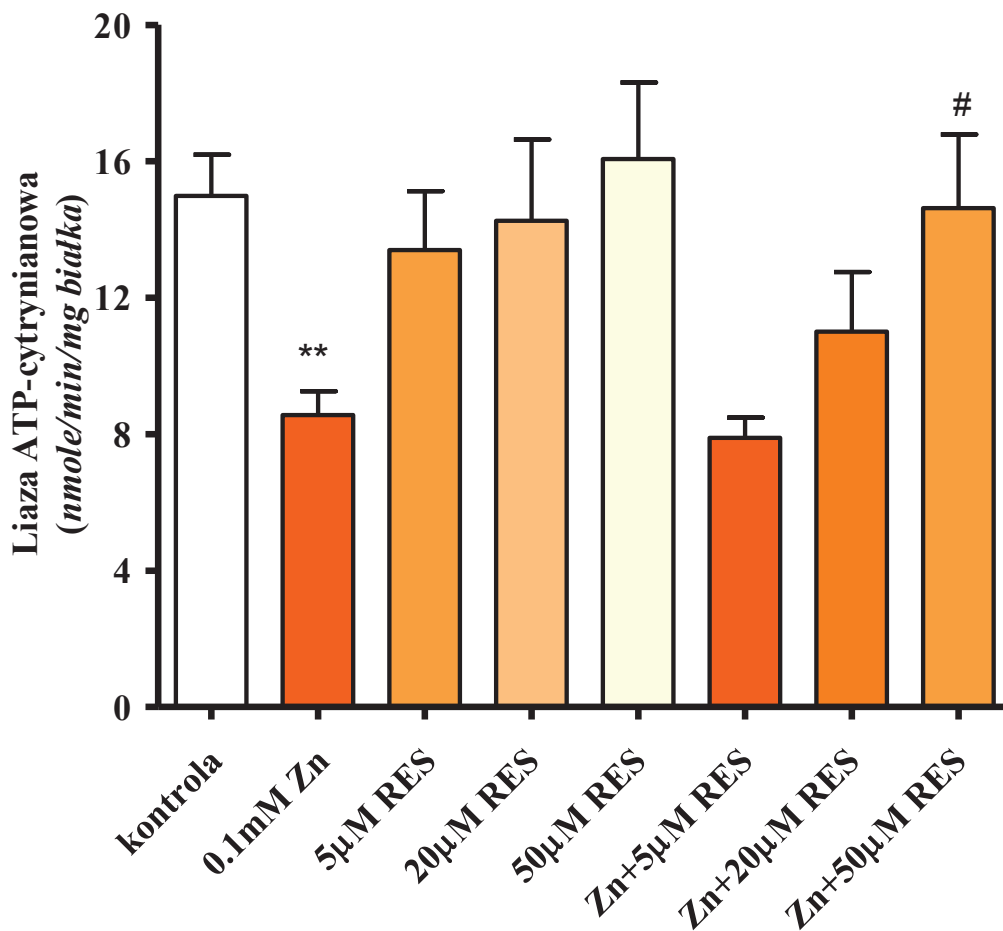
Zmiany poziomu acetylo-CoA w komórkach SN56 w opisywanych wyżej warunkach ostrej ekspozycji na Zn, wykazywał znamiennej statystycznie prostą korelację z ze zmianami aktywności PDHC (Ryc. 37 A). Również śmiertelność komórek zmieniała się bardzo szybko przy ostrych zmianach aktywności PDHC i poziomu wewnątrzneuronalnego acetylo-CoA. Wskazują na to wysoce znamienne odwrotne korelacje między tymi parametrami (Ryc. 37B, C).



Ryc. 37. Korelacje pomiędzy (A): całkowitym poziomem acetylo-CoA a aktywnością PDHC(B): śmiertelnością komórek SN56 a aktywnością PDHC (B) i poziomem acetylo-CoA (C) przy ich ostrej ekspozycji na Zn i resweratrol. Wykresy obliczone z danych zawartych w Ryc.27, 28 i 29).

#### 5.3.4. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność liazy ATP-cytrynianowej

W warunkach kontrolnych aktywność ACL wynosiła  $15.0 \pm 1.2$  nmola/min/mg białka. Aktywność tego enzymu oznaczona po 30 minutowej inkubacji w środowisku depolaryzującym, zawierającym 0.1mM Zn obniżała się do  $8.6 \pm 0.7$  nmoli/min/mg białka (Ryc. 38). RES dodany do środowiska inkubacyjnego w stężeniach 5 i 20  $\mu$ M nie zabezpieczał komórek przed spadkiem aktywności ACL, wywołanym 0.1 mM Zn. Natomiast RES 50  $\mu$ M znosił inhibicyjne działanie Zn, utrzymując aktywność enzymu na poziomie wykazywanym po inkubacji w warunkach kontrolnych tj. do  $14.6 \pm 2.1$  nmola/min/mg białka (Ryc. 38).



Ryc. 38. Ostry wpływ Zn i RES na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w komórkach SN56. Wyniki są wartościami  $\pm$ SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli \*\* $p < 0.01$ ; 0.1 mM Zn # $p < 0.05$ .

Dane te wskazują, że zmiany metabolizmu acetylo-CoA mogą pojawiać się już na wczesnych etapach działania sygnałów neurodegeneracyjnych.

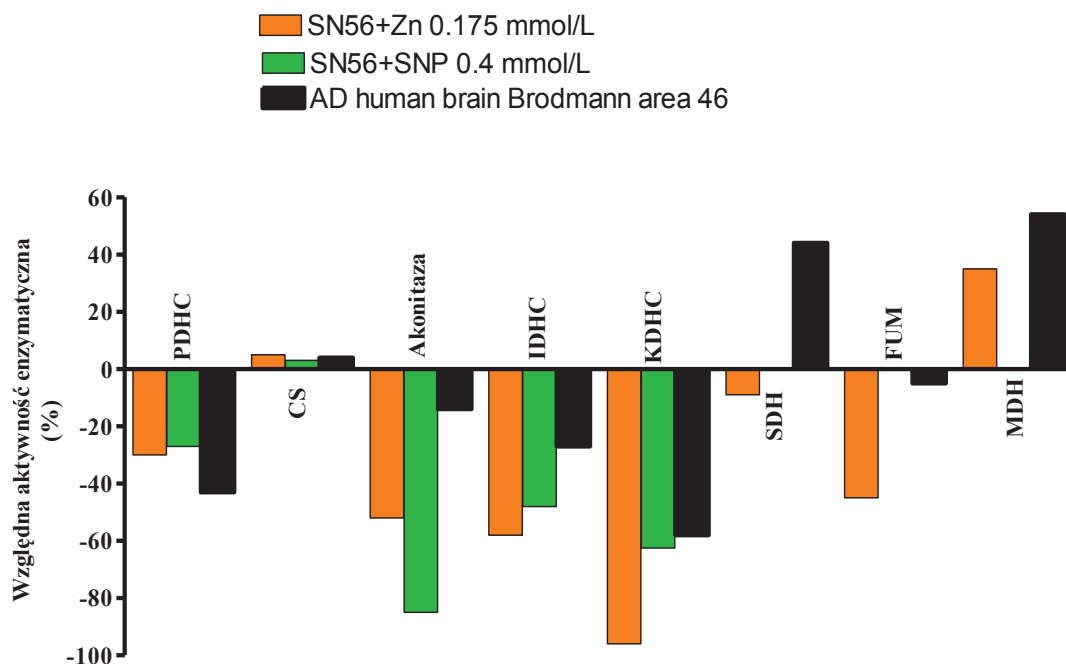


## 6. DYSKUSJA

### 6.1. Komórki neuronalne SN56 jako komórkowy model encefalopatii cholinergiczych

Badania przedstawione w przedkładanej rozprawie doktorskiej dotyczą, zależnych od acetylo-CoA, mechanizmów cytoprotekcyjnego działania RES i ochronnej, parakrynej aktywności komórek mikroglejowych. Do weryfikacji tej hipotezy użyto homogennej linii klonalnej, zróżnicowanych, neuronalnych, hybrydowych komórek cholinergiczych SN56 z przegrody mózgu myszy (Hammond i wsp. 1990). Stanowią one kontynuację ponad dziesięcioletnich badań nad mechanizmami preferencyjnego uszkodzenia neuronów cholinergiczych przegrody mózgu, w przebiegu różnych otępiennych chorób neurodegeneracyjnych – encefalopatii cholinergiczych. Wykazały one, że szczególna wrażliwość neuronów cholinergiczych na neurotoksyny, jest spowodowana wysoką ekspresją ich fenotypu cholinergicznego. Wysoka aktywność ChAT i związana z tym wysoka szybkość syntezy i kwantowego wydzielania ACh w tych neuronach, powoduje bowiem zmniejszenie puli mitochondrialnego acetylo-CoA, niezbędnego do produkcji energii (Tuček 1970, Szutowicz i wsp. 1996). Natomiast nie zróżnicowane komórki SN56, przy niskiej ekspresji fenotypu cholinergicznego, posiadały wyższą zawartość acetylo-CoA w mitochondriach, a co za tym idzie większą odporność na neurodegenerację. Jednocześnie jednak, wykazywały one względnie niski poziom funkcji neuroprzebieżniczych (Bielarczyk i wsp. 2003, 2005 Bizon-Zygmańska i wsp. 2011, Jankowska i wsp. 2000, Ronowska i wsp. 2010, Szutowicz 2001, Szutowicz i wsp. 2005, 2006). Dlatego w tej pracy, do badań cytotoxycywności/cytoprotekcyjności Zn i SNP używano wyłącznie komórek SN56, zróżnicowanych poprzez 48 godziną hodowlę z dbcAMP i RA (Szutowicz i wsp. 1999). Komórki te wykazywały dojrzałą neuronalną morfologię oraz odpowiednio wysoką aktywność ChAT (Ryc. 5, 27), jak również wysoką ekspresję receptora p75, o niskim powinowactwie do NGF, charakterystyczną dla kompetentnych neuroprzebieżniczo neuronów cholinergiczych przegrody mózgu (Szutowicz i wsp. 1999, 2006). Poza tym różnicowanie, jak również stan subkonfluencji, osiągnęty po 48 godzinach hodowli, w sposób istotny zwalniał tempo ich podziałów (Ryc. 5). Dzięki temu, w stosowanym w pracy modelu doświadczalnym, eliminowano jeden ze zmiennych parametrów, jakim jest wzrost (podziały), mogący niezależnie

wpływać na podatność na neurodegenerację. Komórki SN56 stanowią czystą populację neuronalnych komórek cholinergicznym (Hammond i wsp. Szutowicz i wsp. 2000, 2006). W związku z tym wszelkie zmiany aktywności enzymów czy też acetylo-CoA i ATP mogą być odnoszone do „czystego przedziału neuronów cholinergicznym” przegrody mózgu. Natomiast w preparatach całego mózgu lub w izolowanych zakończeniach synaptycznym kory mózgowym, udział „komponenty cholinergicznym” waha się w zależności od regionu mózgu od 1 do 10% (Richardson 1981). Z tego powodu liczne prace różnych badaczy, w tym i nasze, prowadzone na preparatach mózgowym, musiały przyjąć założenie, że zachodzące w warunkach neurodegeneracji zmiany metabolizmu acetylo-CoA, tak energetycznym, jak i związanym z nim enzymów w neuronach cholinergicznym i innych komórkach neuronalnym i glejowym, powinny być takie same (Bielarczyk i wsp. 1998, Bubber i wsp. 2004, 2005, Jankowska i wsp. 2010, Szutowicz i wsp. 1982). Jednakże, nasze poprzednie badania, jak i wykonane przez mnie w przedstawianej pracy, wykazały, że metabolizm acetylo-CoA w cholinergicznym i niecholinergicznym przedziale komórek mózgu, może być znacznie zróżnicowanym (Bielarczyk i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 1982, 2004). Z drugiej jednak strony, wzór zmian aktywności enzymów metabolizmu energetycznym w neuronach SN56 okazał się być zaskakująco podobnym do zmian obserwowanym w zmienionych chorobowo regionach mózgu chorych na AD (Ryc. 39). Dlatego, pomimo oczywistej wady jaką są klonalność i zdolność do podziałów, komórki neuronalne SN56, stanowią dość wierny model kompartmentu cholinergicznym mózgu, w szczególności po zwiększeniu ekspresji fenotypu cholinergicznym, poprzez różnicowanym cAMP, RA lub NGF (Szutowicz i wsp. 1999, Blusztajn i wsp. 1992).



Ryc. 39. Zmiany aktywności enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w zróżnicowanych komórkach SN56, wywoływane przez Zn i NO oraz w mózgu osób zmarłych, z chorobą Alzheimera wg. Ronowska i wsp., 2007; Bielarczyk i wsp., 2003; 2006; Bubber i wsp., 2005 oraz wyników własnych ( Ryc.17, 22, 23).

Dane przedstawione w tej pracy wykazały, że stosowane w niej hodowle komórek SN56 (z banku komórek Zakładu Medycyny Laboratoryjnej GUMed), w zakresie pasażu podanych na Ryc. 6., zachowywały stabilne cechy fenotypowe, charakterystyczne dla dojrzałych, cholinergicznyc komórek przegrody mózgu (Szutowicz i wsp. 2006). Zarówno ich morfologia, jak i parametry metabolizmu energetycznego i cholinergicznego były zbliżone do podawanych w poprzednich pracach z naszego i innych laboratoriów (Prasad i Kumar 1974, Berse i wsp. 1997, Bielarczyk i wsp. 2003, 2005, Szutowicz 2000, 2006, Szutowicz i wsp. 1999, Bielarczyk i wsp. 2003, Blusztajn i wsp. 1992, Schliebs 2006). Wiadomo, że aktywność PDHC odzwierciedla zdolność neuronów do syntezy acetylo-CoA (Szutowicz i wsp. 1982), natomiast aktywność ChAT zdolność do zużycia acetylo-CoA do syntezy acetylocholino (Szutowicz i wsp. 1982, Szutowicz i wsp. 1981). Nasze doświadczenia wykazały, że badane komórki cholinergiczne SN56, zachowywały zdolność do utrzymania stabilnej ekspresji fenotypu cholinergicznego, zarówno w warunkach podstawowych, jak i przy różnicowaniu cAMP i RA (Ryc. 6) (Prasad i Kumar 1974; Jankowska i wsp. 2000; Madziar i wsp. 2003). Podobnie stabilna była aktywność PDHC (Ryc. 6). Dane te są wskaźnikiem wiarygodności dalszych doświadczeń, w których stosunek szybkości zużycia acetylo-CoA do

syntezy ACh i jego zużycia w cyklu kwasów trójkarboksylowych, stanowi istotny element hipotezy dotyczącej wrażliwości neuronów cholinergicznym na czynniki neurodegeneracyjne (Szutowicz i wsp. 1996, Szutowicz 2001). W prawidłowych, pierwotnych neuronach cholinergicznym mózgu, zarówno aktywność PDHC jak i ChAT są wyższe niż, w badanych tutaj, komórkach SN56, jednakże stosunek aktywności tych dwóch enzymów do siebie w modelowej linii komórkowej, pozostaje podobny, jak w preparatach mózgu (Bielarczyk i wsp. 1998, Jankowska-Kulawy i wsp. 2010, Madziar i wsp. 2003). W związku z powyższym jest wysoce prawdopodobne, że ewentualne zmiany metabolizmu acetylo-CoA lub ACh pod wpływem różnych czynników cytotoksycznych, w komórkach tej linii, mogą być podobne do tych, które powstałyby w dojrzałych, prawidłowych neuronach cholinergicznym mózgu, w podobnych warunkach.

## **6.2. Ekscytotoksyczność cholinergiczna**

### **6.2.1. Zn i NO jako wczesne sygnały neurotoksyczne**

Różne sygnały neuropatogenne powodują nadmierną depolaryzację dominujących w mózgu (50% populacji) zakończeń glutaminianergicznym, co prowadzi do wzrostu wydzielania i zahamowania transportu zwrotnego glutaminianu (L-glu) ze szczeliny synaptycznej. Wskutek tego dochodzi do wzrostu stężenia L-glu i związanego z nim Zn w szczelinie synaptycznej. W takich warunkach nadmierna aktywacja receptorów NMDA w neuronach postsynaptycznym oraz okołosynaptycznym glejocytach, powoduje ich depolaryzując oraz aktywację syntezy NO. Prowadzi to do akumulacji rodników nadtlenu-azotynowych, wywierających wielokierunkowe działania cytotoksyczne (Ryc. 14).

W dalszej kolejności Zn, wydzielany do szczeliny synaptycznej wraz z glutaminianem, jest łatwo wychwytywany przez zdepolaryzowane neurony, wywierając bezpośredni wpływ inhibicyjny na kluczowe enzymy metabolizmu energetycznego (Ronowska i wsp. 2007, 2010). Doświadczenia z mikrodializą *in vivo* wykazały, że w PPK ekscytotoksycznie pobudzonego mózgu, stężenia Zn mieszczą się w granicach 0.1 – 0.5 mmola/L (Frederickson 1989, Cuajungto i Faget 2003). Użyte w tej pracy 0.175 mmol/L stężenie Zn, odpowiada więc warunkom panującym w patologicznie zmienionym mózgu. Jest ono również porównywalne ze stężeniami używanymi przez nas w poprzednich pracach badawczych (Ronowska i wsp. 2007, 2010) oraz przez innych autorów (Religa i wsp. 2006, Zatta i wsp. 2003).

Wyniki przedstawianej pracy wykazują, że przyczyną neurotoksycznego działania Zn jest jego inhibicyjne oddziaływanie na aktywności szeregu enzymów, odpowiedzialnych za produkcję energii, takich jak PDHC, akonitaza, NADP-ICDH, doprowadzające do spadku poziomu acetylo-CoA i ATP w zróżnicowanych neuronach cholinergicznym (Ryc. 18, 25). Wyniki te potwierdzają nasze wcześniejsze badania wykazujące, że Zn działa poprzez usuwanie liponianu z PDHC oraz interakcję z grupami SH centrów aktywnych akonitazy i ICDH (Ryc. 22,23) (Ronowska i wsp. 2007, 2010). Natomiast wydaje się, że Zn nie działał poprzez aktywację endogennej syntezy NO w neuronach cholinergicznym, ponieważ nie zmieniał on poziomu akumulacji azotynów w żadnych warunkach doświadczalnych (Ryc. 14) (Frederickson i wsp. 2000, Danbolt i wsp. 2001).

Zarówno nasze prace, jak i doniesienia innych autorów wykazywały wpływ nadmiaru NO/NOO<sup>-</sup> na różne elementy metabolizmu energetycznego (Szutowicz i wsp. 2006, Bolanos i wsp. 1997, Brown i wsp. 2010). Generatorem NO, który został zastosowany w przedstawianej pracy jest SNP (Ryc. 8). Nasze wcześniejsze prace wykazały, że ten typ donora NO, wywiera silnie cytotoksyczny efekt na cholinergiczne neurony SN56, poprzez zahamowanie aktywności PDHC oraz inaktywację/inhibicję akonitazy i dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranowej (Bielarczyk i wsp. 2006, Szutowicz i wsp. 2001, 2006). Zmiany te prowadziły do spadku szybkości syntezy oraz poziomu acetylo-CoA i syntezy ACh (Tomaszewicz i wsp. 1997, Szutowicz i wsp. 2000, Bielarczyk i wsp. 2003). Inne donory NO, takie jak S-nitroso-N-acetylo penicylamina (SNAP), czy też 3-morpholinosydonimina (SIN-1), okazały się słabszymi czynnikami cytotoksycznymi niż SNP. Przejawiało się to w przypadku SNAP, czy też SIN-1, słabszą, aniżeli w przypadku SNP, inhibicją aktywności ChAT i mniejszą śmiertelnością, mierzoną uwalnianiem dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przez cholinergiczne komórki SN56 (Fass i wsp. 2004, Bielarczyk i wsp. 2006). Doniesienia te pozostawały w zgodzie z wcześniejszymi danymi wykazującymi, że SNAP i SIN-1, w przeciwieństwie do SNP, nie powodują obniżenia poziomu zredukowanego glutationu (GSH) (Wink i wsp. 1996, Fass i wsp. 2004).

W przedstawianej pracy poziom akumulacji azotynów w bezkomórkowym środowisku hodowlanym zawierającym 0.4 mmol/L SNP, wskazuje na szybkość spontanicznego uwalniania NO, rzędu 10 nmol/ml/24 godz (Ryc. 14). Przy stosowanej w pracy gęstości hodowli komórek SN56, wynoszącej 0.33 mln/ml (0.33

mg białka komórkowego/ml) daje to szybkość powstawania NO rzędu 21 pmoli/min/mg białka neuronalnego (lub 21 pmol/min/1 mln komórek neuronalnych) (Ryc. 13, 14, 34). Wskazuje to, że szybkość wytwarzania, jak również stężenia NO w naszym układzie doświadczalnym były porównywalne z parametrami kinetycznymi tego związku, które stwierdzano w mózgach zwierząt pobudzonych ekscytotoksycznie przez domózgowe podanie związków aktywujących różne izoformy NOS. Podobne szybkości wytwarzania NO stwierdzano również w hodowlach innych komórek neuronalnych.

Wybór takiego stężenia SNP wynikał również z faktu, że przy 16 godzinnej ekspozycji powodowało ono ponad 50% spadek liczby, przy około 30% uszkodzeniu, pozostałych na płytce, cholinergicznym komórek SN56 (Ryc. 9, 12, 13). Takie warunki stwarzały dobrą podstawę do badań skuteczności czynników neuroprotekcyjnych.

W pracy tej zbadano również wpływ przewlekłej, jednoczesnej ekspozycji komórek cholinergicznym SN56 na zwiększone stężenia NO i Zn. Współistnienie zwiększonych stężeń obu tych czynników neurotoksycznych w przestrzeni pozakomórkowej, jest zjawiskiem typowym dla pobudzenia ekscytotoksycznego w mózgu (Frederickson i wsp. 2002). Synergistyczne działanie NO i Zn zostało wykazane w tej pracy w postaci wzrostu frakcji uszkodzonych komórek do 80% i jednoczesnego spadku ich całkowitej liczby do 20% wartości kontrolnej (Ryc. 12, 13). Wartości te znacznie wykraczały poza sumaryczne wyniki negatywnych indywidualnych oddziaływań poszczególnych neurotoksyn (Ryc. 12, 13). Obserwacja ta wskazuje, że współistnienie dwóch lub więcej sygnałów cytotoksycznych w patologicznie zmienionym mózgu, może amplifikować uszkodzenia neuronów, a w szczególności neuronów cholinergicznym. Taki synergizm działania różnych sygnałów neurotoksycznych pozwala sądzić, że w mózgu, podprogowe oddziaływania poszczególnych neurotoksyn mogą ulegać wzajemnemu wzmocnieniu, dając jawny efekt neurodegeneracyjny (Ryc. 12). Istotną rolę w tym zjawisku może odgrywać SNP, który oprócz generacji egzogennej NO powodował aktywację syntezy endogennej NO przez nNOS komórek neuronalnych SN56 (Ryc. 14). Sprzyjałby temu, wywoływany przez omawiane ekscytotoksyny, wzrost  $[Ca]$  wewnątrzkomórkowego (Ronowska i wsp. 2010, Szutowicz i wsp. 2000).

Dane te uzupełniają również wcześniejsze doniesienia, wykazujące wzrost uwalniania LDH z komórek SN56, w warunkach ekspozycji na SNP (Bielarczyk i wsp. 2006).

Tak wysoka śmiertelność komórek eksponowanych na skojarzone przewlekłe działanie SNP i Zn mogła wynikać, przede wszystkim z ponad 90% spadku poziomu ATP, obserwowanego w tych warunkach. Tak wysoki spadek poziomu ATP wskazywać może, że główną przyczyną śmiertelności neuronów są procesy nekrotyczne (Ryc. 5, 12, 25). Niedobory ATP są głównym, końcowym sygnałem powodującym uszkodzenie i śmierć, zarówno neuronów, jak i innych komórek mózgu (Ryc. 25). Wykazano, że poziom ATP obniża się już we wczesnych fazach neurodegeneracji (Vezzani i wsp. 1987, Tsuji i wsp. 1994, Kanq i wsp. 2012). Przedstawione wyniki wskazują, że spadek poziomu ATP jest zjawiskiem wtórnym, wynikającym z niedoborów acetylo-CoA. Te ostatnie powstawały wskutek spadku jego syntezy, spowodowanej inhibicją aktywności PDHC przez omawiane inhibitory metabolizmu energetycznego (Ryc. 17, 25). Taki wniosek opiera się na istnieniu znamiennej korelacji między poziomami acetylo-CoA i PDHC w różnych warunkach neurotoksycznych i neuroprotektcyjnych (Ryc. 19 A). Podobne znaczenie mają znamienne, odwrotne zależności między liczbą i stopniem uszkodzenia komórek, a aktywnością PDHC i poziomami acetylo-CoA zarówno w warunkach cytoprotektcyjnych jak i neurotoksycznych (Ryc. 19 C, E).

Należy jednak zaznaczyć, że przy podobnym stopniu inhibicji PDHC i wzroście śmiertelności przez SNP lub Zn, poziom acetylo-CoA był wyższy, a poziom ATP był niższy w obecności SNP niż po dodaniu Zn (Ryc. 18, 25). Może to wynikać z faktu, że SNP okazał dużo silniejszym inhibitorem akonitazy niż Zn (Ryc. 22). Jednocześnie wskazuje to, że zahamowanie aktywności PDHC ma kluczowe znaczenie dla stopnia nasilenia neurodegeneracji neuronów cholinergicznch (Ryc. 12, 17) (Martin i wsp. 2005). Z drugiej strony oprócz obniżenia dostępności acetylo-CoA oraz poziomu ATP, mogą występować dodatkowe czynniki, determinujące stopień uszkodzenia tych komórek.

Z kolei istnienie wysoce znamiennej korelacji między aktywnością PDHC i poziomem acetylo-CoA (Ryc. 19 A,  $p=0.0001$ ) a aktywnością ChAT (Ryc. 31 A  $p=0.0001$ ) w warunkach cytotoxycznych oraz w obecności cytoprotektantów jest zgodne z naszą hipotezą, że ekspresja fenotypu cholinergicznego i związana z tym funkcja neuroprzeznaczna, zależą od dostępności acetylo-CoA w przedziale

cytoplazmatycznym neuronów cholinergicznym. Również istnienie korelacji między poziomem acetylo-CoA a aktywnością ACL, przemawia za tym, że ta droga transportu pośredniego reszt acetylowych z mitochondriów do cytoplazmy podlega regulacji, ściśle skojarzonej z patologicznymi modyfikacjami fenotypu cholinergicznego (Ryc. 31 B). W ten sposób ACL regulowałaby podaż części reszt acetylowych do syntezy acetylo-CoA, w przedziale cytoplazmatycznym neuronów cholinergicznym, w warunkach patologicznych (Ryc. 26, 31 B). Co więcej enzym ten podlegałby również, pośrednio lub bezpośrednio, cytoprotekcyjnemu oddziaływaniu RES i mikrogleju N9 (Ryc. 26).

Zn jest uznaną neurotoksyną o udokumentowanej preferencyjnej cholinotoksyczności, która jednak jest raczej następstwem niż przyczyną znacznie wcześniejszych sygnałów neurodegeneracyjnych (Ronowska i wsp. 2007, 2010). Przedstawione, badania wykazują, że Zn może wywierać swoje działanie cholinotoksyczne już w pierwszych minutach wzrostu jego stężenia w przestrzeni pozakomórkowej, objawiające się obniżeniem zdolności komórek SN56 do utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowej, jeszcze przed pojawieniem się oznak ich rozpadu. Zwraca uwagę fakt, że stopień inhibicji aktywności PDHC, spadku żywotności i obniżenia poziomu acetylo-CoA był po 30 min ekspozycji podobny jak po ekspozycji 24 godz (Ryc. 17, 35). Wskazuje to, że inhibicja PDHC przez Zn była skutkiem bezpośredniego oddziaływania tego kationu na PDHC a nie następstwem inhibicji ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki tego enzymu. Wniosek taki pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami, wykazującymi że w mózгах osób z chorobą Alzheimera, spadkowi aktywności PDHC nie towarzyszył spadek poziomu białek poszczególnych podjednostek tego kompleksu (Sheu i wsp. 1985). Mechanizm tego inhibicyjnego działania polegałby na odwracalnym wiązaniu Zn z grupami -SH cysteiny w centrach aktywnych podjednostek E2 i E3 PDHC, będących miejscami wiązania lipoamidu (Ronowska i wsp. 2007,2010).

Wiadomo, że tak SNP-NO, jak i Zn hamują nie tylko aktywność PDHC ale zaburzają funkcję wielu białek istotnych dla produkcji energii i funkcji neuroprzekazniczych w neuronach cholinergicznym. Neurotoksyczne działanie SNP zależało od szybkości uwalniania NO jak również ze stymulacji endogennej syntezy NO przez nNOS (Ryc. 14). Dane te pozostają w zgodzie z oznaczeniem poziomu azotynów uwolnionych do pożywki po łącznej ekspozycji komórek SN56 na SNP i



Zn. Wykazano, że poziom ten był około 400 razy wyższy aniżeli w warunkach kontrolnych (Ryc. 14).

Jednym z istotnych celów dla czynników ekscytotoksycznych może być również akonitaza. Inhibicja akonitazy była silniejsza po ekspozycji komórek na SNP (75%) aniżeli Zn (50%) (Ryc. 22), co może wynikać z faktu, że enzym ten jest szczególnie wrażliwy na działanie wolnych rodników. Polega ono prawdopodobnie na uszkodzeniu przez wolne rodniki nitrozyłowe kompleksów żelazowo-siarkowych w centrum aktywnym akonitazy (Dawson i Dawson 1995), co skutkuje uwalnianiem z nich jonów  $Fe^{2+}$  (Keyer i Imlay 1997). Potwierdzają to wcześniejsze badania naszego zespołu, które wykazały zarówno pośredni, jak i bezpośredni hamujący wpływ Zn na aktywność akonitazy (Ronowska i wsp. 2007, 2010). Zahamowanie aktywności akonitazy przez Zn, obserwowano również w pierwotnych hodowlach komórek gruczołu krokowego (Costello i wsp. 2005). Stałe inhibitorowe dla akonitazy w stosunku do Zn i NO były o rząd wielkości niższe niż dla PDHC (Bielarczyk i wsp. 2006, Ronowska i wsp. 2007). Co więcej występowała silna synergistyczna inhibicja akonitazy przez NO i Zn. Wskazuje to, że enzym ten może być istotnym elementem w ekscytotoksycznych mechanizmach neurodegeneracji, zależnych od upośledzenia produkcji energii.

Z drugiej strony, aktywność akonitazy w neuronach jest o 4-10 razy wyższa niż aktywność PDHC (Ryc. 17, 22). W związku z tym, w warunkach fizjologicznych, nie jest ona czynnikiem regulującym/ograniczającym zużycie acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Dlatego mimo dużej wrażliwości akonitazy na neurotoksyny, metaboliczne następstwa jej inhibicji ujawniają się dopiero przy znacznym zahamowaniu jej aktywności (Ryc. 22).

Przewlekłe niedobory acetylo-CoA, spowodowane inhibicją PDHC przez neurotoksyny, wywołują reakcje adaptacyjne manifestujące się spadkiem poziomu/ekspresji białka specyficznego oraz aktywności acetylotransferazy cholinowej (Ryc. 27, 28).

Z drugiej strony działanie ekscytotoksyczne, ujawnia się niemal natychmiast po zadziałaniu bodźca patogenicznego, takiego jak hipoksja, hipoglikemia czy neurotoksyczne ksenobiotyki, w wyniku których dochodzi do nadmiernego wzrostu glutaminianu i Zn w szczelinie synaptycznej (Briz i Suñol, 2011). W takich warunkach wykazywana wcześniej inhibicja syntezy ACh, zależałaby nie od spadku ekspresji ACL ale od jej bezpośredniej inhibicji przez Zn (Ryc. 38). Jej mechanizm

polegałyby prawdopodobnie na tworzeniu nieaktywnego kompleksu Zn-ATP, konkurującego z właściwym substratem, jakim jest kompleks Mg-ATP. Możliwe jest również wiązanie z grupami –SH centrum aktywnego ACL. Upośledzeniu ulegała również dostępność acetylo-CoA, wskutek bezpośredniej inhibicji PDHC przez Zn. W ten sposób dochodziłoby do zahamowania, zarówno bezpośredniego, jak i pośredniego ACL-zależnego transportu reszt acetylowych do cytoplazmatycznego przedziału syntetyzującego ACh (Ryc. 35, 36, 38). W dalszej kolejności dochodziłoby do omówionych wyżej zmian adaptacyjnych. Tak więc, przy przewlekłych zmianach neurodegeneracyjnych, supresja neuroprzekaznictwa cholinergicznego byłaby wypadkową bezpośredniego działania cytotoksycznego i zmian adaptacyjnych, związanych z obniżeniem ekspresji enzymów i białek metabolizmu cholinergicznego.

### **6.3. Resweratrol – neuroprotekcja?**

Użycie RES jako zmiatacza wolnych rodników wynikało z licznych doniesień, że jest on uważany za istotny czynnik, powodujący zmniejszenie ryzyka wystąpienia chorób układu naczyniowego u osób, które zwyczajowo używają czerwonego wina (w ilościach od 150 do 300 ml dziennie), jako składnika codziennej, często wysokotłuszczowej diety. Ta obserwacja, znana również jako „francuski paradoks” (Renaud i wsp. 1992), znalazła potwierdzenie w naszych obserwacjach, wykazujących nieobecność cytotoksyczności nawet wysokich stężeń RES w krótkoczasowym działaniu na komórki cholinergiczne w warunkach podstawowych (Ryc. 34). Dane te jednak pozwalają jedynie na wniosek, że RES jest związkami bezpiecznym lub obojętnym, w szerokim zakresie stężeń, dla „zdrowych” neuronów cholinergicznym w kontrolnych warunkach doświadczalnych, lub u zdrowych zwierząt. Wynikałoby to z faktu, że RES nie zmieniał aktywności kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego, ani poziomu acetylo-CoA i ATP (Ryc. 17, 18, 22, 23, 24, 25). Z drugiej jednak strony w warunkach ekscytotoksycznych wywołanych nadmiarem NO, przedział cytoprotekcyjnego działania RES, mierzony wzrostem liczby całkowitej i spadkiem frakcyjnej zawartości komórek uszkodzonych, okazał się wąski – około 0.005 mmol/L (Ryc. 10). Wskazuje to, że w warunkach neurodegeneracyjnych, stosowanie RES jako zmiatacza wolnych rodników może być obarczone znacznymi działaniami ubocznymi. Taką tezę zdają się potwierdzać badania, wykazujące wzrost szybkości powstawania tlenu

singletonowego w synaptosomach eksponowanych na mikromolowe stężenia resweratrolu (Fotiou i wsp. 2010).

Tymczasem badania farmakokinetyczne na ludziach wykazują, że przy dawkach dziennych rzędu 0.03 mg/kg m.c., stężenie RES w osoczu osiągało wartości około 0.005 mmol/L, a więc podobne do tych, które wykazywały działanie neuroprotektcyjne przed cytotoxycnością SNP w warunkach *in vitro* (Alarcon i wsp. 2005). Dlatego obserwowane przez nas neuroprotektcyjne działanie 0.005 mmol/L RES odpowiada rzeczywistym warunkom farmakoterapeutycznym *in vivo* u zwierząt i człowieka. Jednym z mechanizmów tego zjawiska byłoby zahamowanie endogennej nadprodukcji NO wywołanej przez SNP (Ryc. 14). Natomiast RES nie miał zdolności zapobiegania inhibicyjnemu działaniu SNP (NO) na aktywności PDHC i enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (Ryc. 17, 22, 23, 26). Tłumaczyłoby to jedynie częściowe odwracanie przez RES neurotoksycznego efektu SNP (ryc. 12).

Z kolei, badania ostrego wpływu Zn na cholinergiczne neurony SN56 wykazały, że w jego obecności RES nie wykazywał efektu cholinotoksycznego aż do stężenia 0.05 mmol/L (Ryc. 34). Co więcej w tym stężeniu wykazywał on działanie cholinoprotektcyjne przed Zn, wynikające z jego zdolności do zapobiegania inhibicji PDHC i utrzymania zawartości acetylo-CoA na poziomie kontrolnym (Ryc. 35, 36). Co więcej, to wysokie stężenie RES może mieć również krótkoczasowy wpływ protektcyjny na fenotyp neuroprzebieżniczy SN56, ponieważ zapobiegało spadkowi aktywności ACL, która dostarcza reszty acetylowe do cytoplazmatycznego przedziału syntezy ACh (Ryc. 38). Jednakże przyczyna cholinotoksyczności długoczasowego stosowania wysokich stężeń RES pozostaje niewyjaśniona (Ryc. 10, 12, 13, 26). Dane te są jednak zgodne z doniesieniami wykazującymi cytotoxyczne działania wysokich stężeń i dawek resweratrolu w stosunku do różnych nowotworów zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (Zhang i wsp. 2013).

Podobny mechanizm protektcyjny miałby miejsce przy 10-cio krotnie niższych stężeniach RES przy długoczasowej ekspozycji SN56 na Zn (Ryc. 18, 19). Mniejszy zakres cytoprotektcyjnego działania RES w stosunku do SNP wynikałby prawdopodobnie z jego niższego, 0.005 mmol/L, stężenia używanego w doświadczeniach nad toxycnością długoczasową. Z kolei całkowity brak ochronnego działania 0.005 mmol/L RES w stosunku do przewlekłego ekscytotoxycznego wpływu Zn na komórki SN56 można tłumaczyć niezdolnością

do zapobieżenia inhibicji, powodowanej przez ten kation, kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego, przy nieobecności zmian w syntezie NO (Ryc. 10, 11, 13.). Tak więc w warunkach *in vivo* w mózgu, przy istnieniu kilku sygnałów ekscytotoksycznych może być niemożliwe znalezienie skutecznego stężenia terapeutycznego dla RES. Wynika to z faktu, że stężenie RES skuteczne w zapobieganiu neurotoksyczności Zn, byłoby jednocześnie neurotoksyczne w przypadku współobecności zwiększonego poziomu NO (Ryc. 12). RES nie modyfikował również przewlekłych, parakrynych efektów mikrogleju N9, ponieważ nie nasilał cytoprotekcyjnego działania IL-6 (Ryc. 12, 16).

Nasze poprzednie badania wykazały, że inhibicję PDHC, przez badane tu neurotoksyny, można odwrócić lub jej zapobiec za pomocą względnie wysokich stężeń liponianu bądź lipoamidu (Ronowska i wsp. 2007). Natomiast RES okazał się związkiem nieskutecznym w niwelowaniu przewlekłego inhibicyjnego wpływu tak Zn, jak i SNP zarówno na aktywności PDHC, akonitazy czy też ICDH-NADP (Ryc. 17, 22, 23). Wskazuje to, że RES nie może zabezpieczać PDHC przed spadkiem aktywności w warunkach neurodegeneracyjnych, poprzez ochronę grup –SH centrów aktywnych (Ryc. 17, 23). Z tego wynikałby również brak jego wpływu na przewlekłe obniżony przez te neurotoksyny poziom acetylo-CoA (Ryc. 19). Nasze dane wskazują również, że RES nie wzmacniał parakrynego cholinoprotekcyjnego działania mikrogleju, ponieważ nie zmieniał poziomu IL-6 w środowisku w warunkach cytotoksycznych (Ryc. 15).

#### **6.4. Mikroglej N9 a neuroprotekcja.**

Liczne doniesienia ostatnich lat wskazują na zaangażowanie mikrogleju w mechanizmy neuroprotekcji (Bernardino i wsp. 2005, Carlson i wsp. 1999). Parametry czynnościowe mikrogleju N9, użytego w tej pracy, odpowiadały ogólnej charakterystyce tych komórek, które w warunkach kontrolnych wydzielają 20 razy wyższe ilości TNF- $\alpha$  i 20 razy niższe ilości IL-6 (Ryc. 15, 16.) W związku z tym, zmiany w komórkach neuronalnych, obserwowane po dodaniu komórek mikroglejowych N9, mogą być odnoszone do skutków działania mikrogleju w mózgu w różnych warunkach patologicznych i fizjologicznych (17, 18, 22, 23, 26, 27, 28, 33).

#### **6.4.1. Wpływ na przeżywalność komórek cholinergiczych**

W naszym modelu doświadczalnym, komórki mikrogleju N9, zabezpieczały komórki neuronalne SN56 przed, wywoływany przez neurotoksyny (NO, Zn), wzrostem ich śmiertelności i spadkiem potencjału wzrostowego (Ryc. 12, 13). Przedstawione dane potwierdzają nasze poprzednie obserwacje, że warunkach cytotoksycznych, spadek aktywności PDHC i wynikające z tego niedobory acetylo-CoA, były kluczowymi czynnikami zwiększającymi śmiertelność zróżnicowanych komórek cholinergiczych (Ryc. 17, 18) (Szutowicz i wsp. 2006). Nie wyklucza to możliwości, że inhibicja lub ochrona innych enzymów cyklu kwasów trojkarboksylowych również mają pewien wpływ na śmiertelność, czy też przeżywalność neuronów cholinergiczych w warunkach patologicznych (Ryc. 22, 23) (Bielarczyk i wsp. 2006, Ronowska i wsp. 2007; 2010). Wskazują na to wysoce znamienne korelacje między śmiertelnością komórek SN56 a aktywnościami PDHC, ICDH-NADP i akonitazy (Ryc. 19 C, E, Ryc. 24 A, C). Ustalenie frakcyjnego udziału zmian aktywności poszczególnych enzymów w ogólnym efekcie cytotoksycznym, czy też cytoprotekcyjnym, wymagałoby dalszych badań.

Niemniej dane kliniczne i doświadczenia na zwierzętach i innych modelach uszkodzeń neuronów cholinergiczych wskazują, że podstawowe znaczenie dla przeżywalności i funkcji neuronów cholinergiczych ma synteza acetylo-CoA przez PDHC (Bubber 2004, Sheu i wsp. 1986, Jakowska-Kulawy i wsp. 2010, Bizon-Zygmańska i wsp. 2011, Szutowicz i wsp. 1996, 2006). Można więc przypuszczać, że w tej pracy, cytoprotekcyjne działanie mikrogleju N9 mogło wynikać z jego ochronnego działania na aktywność PDHC w komórkach SN56 (Ryc. 17). To cholinoprotekcyjne oddziaływanie mikrogleju N9 miało przy tym charakter wyłącznie parakryny, ze względu na jego hodowlę na półprzepuszczalnych insertach, których dno było oddalone od powierzchni zajmowanej przez neurony o 1-2 mm (Ryc. 4). Wiadomo, że związkami tymi są liczne cytokiny i neurotrofiny wydzielane przez pobudzony mikroglej (Nakajima i Kohsak, 2004, Walz i wsp. 1993). Zatem można przypuszczać, iż zmniejszenie stopnia uszkodzenia i spadku liczby komórek SN56 hodowanych z mikroglejem w warunkach cytotoksycznych, wynikało z wydzielania przez nie związków o charakterze cytoprotekcyjnym (Ryc. 12, 13, 15, 16). Poprzednie badania wykazały, między innymi, że egzogenne IL-6 i IL-1 $\beta$  w niskich stężeniach wywierały działanie ochronne na komórki neuronalne, eksponowane na NMDA lub amyloid- $\beta$  (Bielarczyk i wsp. 2005, Wang i wsp. 2009).

Ten mechanizm ochronny polegałby na aktywacyjnej fosforylacji białek drogi sygnałowej STAT3 i MAPK (Wang i wsp. 2009). Z kolei wysokie stężenia cytokin wykazywałyby działanie neurotoksyczne (Bielarczyk i wsp. 2005).

Również dane przedstawione w tej pracy wykazują, że cholinergiczne komórki neuroblastoma SN56 mają zdolność do syntezy znaczących funkcjonalnie ilości IL-6 oraz, że w warunkach spoczynkowych, mikroglej N9 wydzielają tylko nieznaczne ilości tej cytokiny (Ryc. 15). Wyniki te pozostają w zgodzie z badaniami na mózgu szczura, wykazującymi wysoką zawartość IL-6 w neuronach i komórkach neuronalnych Neuro-2a (Acarin i wsp. 2000, Cheng i wsp. 2009). Wykazano również, że obniżenie ekspresji IL-6 przez specyficzne miRNA w neuroblastoma NB41A3 i Neuro-2a powodowało wzrost ich wrażliwości na amyloid- $\beta$  (Cheng i wsp. 2009). Dlatego obserwowane przez nas obniżenie wydzielania IL-6 z cholinergicznych komórek SN56 przez SNP i Zn, może być, oprócz obniżenia zawartości acetylo-CoA, dodatkowym czynnikiem zwiększającym ich śmiertelność w tych warunkach (Ryc. 12, 15, 18). Nie wyklucza to możliwości syntezy dodatkowych i prawdopodobnie cytotoksycznych ilości IL-6 przez pobudzony mikroglej (Ryc. 33) (Bielarczyk i wsp. 2005). Dane te są również zgodne z obserwacjami na komórkach niecholinergicznych NIE115, w których niskie stężenia egzogennej IL-6 działały stymulująco, a wyższe ( $>100\text{pg/ml}$ ) hamowały ich proliferację (Knezevic-Cuca i wsp. 2000). Podobny efekt obserwowano również w komórkach neuroblastoma PC12 (Sato i wsp. 1988, Marz i wsp. 1997).

Z kolei cytoprotekcyjne działanie N9 może wynikać ze zdolności przywracania prawidłowego wydzielania IL-6 w środowisku, prawdopodobnie przez SN56 (Ryc. 15). Zwiększenie dobrostanu komórek SN56 w tych warunkach mogłoby powodować utrzymanie wysokiej aktywności PDHC (Ryc. 17). Na taką możliwość wskazuje istnienie istotnych dodatnich korelacji między aktywnością PDHC, poziomem acetylo-CoA oraz odwrotnej korelacji ze śmiertelnością komórek SN56 a stężeniem IL-6 w środowisku hodowlanym (Ryc. 20 A B C). Z drugiej strony działanie IL-6, odbywające się za pośrednictwem drogi JAK-STAT3,5 uruchamiałoby mechanizmy cytoprotekcji niezależne od zmian aktywności enzymów metabolizmu energetycznego. Wskazuje na to brak korelacji między śmiertelnością i zawartością acetylo-CoA w komórkach SN56 hodowanych w obecności komórek mikroglejowych (Ryc. 19 B, D). Z drugiej strony, przesunięcie wykresów w prawo wskazuje na wyraźne działanie cytoprotekcyjne komórek N9. Jednocześnie w

izolowanych hodowlach SN56, wymienione wyżej zależności wykazywały wysoce znamienne korelacje (Ryc. 19 B, D).

Stwierdzane w tej pracy stężenia TNF- $\alpha$  w środowisku, w warunkach kontrolnych rzędu 0.2 pmol/L były podobne do tych wykazywanych dla hodowli komórek PC12 o podobnej gęstości (Ryc. 7, 16) (Kogo i wsp. 2006). Poziomy TNF- $\alpha$  w mikrogleju są o rząd wielkości niższe niż IL-6 (Ryc. 7) (Harms i wsp. 2012). Podobne stosunki stężeń [IL-6]/[TNF- $\alpha$ ] istniały w naszym łączonym układzie doświadczalnym (Ryc. 15, 16). Jednak w naszym układzie doświadczalnym nie obserwowaliśmy cytotoksycznego działania IL-6, a wyłącznie cytotoksyczność TNF- $\alpha$  (Ryc. 20, 21, 33). To silniejsze działanie cholinotoksyczne TNF- $\alpha$  można wytłumaczyć jego wysokim powinowactwem do specyficznego receptora FasR, uruchamiającego bezpośrednio drogę apoptozy zależną od kaspazy 8 (Ryc. 22, 33) (Fan i wsp. 2005).

Głównym źródłem TNF- $\alpha$  pozostawał mikrogleń, który reagował na neurotoksyny kilkukrotnym, a na LPS 27-krotnym zwiększeniem jego wydzielania w warunkach podstawowych i ponad 300-krotnym w warunkach cytotoksycznych (Ryc. 16, 33). Jednocześnie, brak wyraźnej korelacji między aktywnościami PDHC, poziomem acetylo-CoA i śmiertelnością SN56, a niskimi stężeniami TNF- $\alpha$  wskazywałby na jego nieistotną cytotoksyczność w tych warunkach (Ryc. 21 A, B, C). Z drugiej strony wyraźna cytotoksyczność wysokich stężeń TNF wynikałaby, nie tylko z jego bezpośredniego działania proapoptotycznego, lecz również z obniżania poziomu IL-6 w tych warunkach (Ryc. 33). Tak więc, za graniczne stężenie TNF- $\alpha$ , tolerowane przez komórki cholinergiczne, należałoby uznać poziom 40 pmol/L. Natomiast poziomy około 75 pmol/L należałoby traktować jako cholinotoksyczne (Ryc. 21, 33). Zatem, wykazywana przez nas cholinergiczna neurotoksyczność TNF- $\alpha$  byłaby znacznie niższa od jego toksyczności w stosunku do obwodowych paraneuronalnych komórek PC12, eksponowanych na ekscytotoksyczne stężenia L-glutaminianu (Ryc. 21, 33) (Kogo i wsp. 2006). Jednakże, w tej ostatniej pracy, różnica między kontrolnymi a deklarowanymi, „cytotoksycznymi” stężeniami TNF- $\alpha$  wynosiła zaledwie 50%, co jest niekompatybilne ze znanym patomechanizmem działania cytokin w ogóle (Kogo i wsp. 2006). Dlatego też obserwowany efekt L-glutaminianu był prawdopodobnie spowodowany innymi, powszechnie uznanymi NMDA-Ca-zależnymi mechanizmami ekscytotoksyczności (Ronowska i wsp. 2010). Za taką możliwością przemawiają również wyniki naszych badań, wykazujące, że Zn czy też

nadmiar NO powodowały zwiększenie śmiertelności SN56 przy obniżonych lub tylko nieznacznie podwyższonych poziomach TNF- $\alpha$  w środowisku (Ryc. 12, 13, 16, 33).

Z drugiej strony, przedstawione wartości wydają się być zgodne, a nawet niższe od wartości cytotoksycznych stężeń endogennego lub egzogenego TNF- $\alpha$  w stosunku do neuronalnych komórek niecholinergicznymi (Alvarez i wsp. 2011). Dane te świadczą, że komórki cholinergiczne są, bardziej niż inne układy neuroprzekaźników, wrażliwe na cytotoksyczne działanie TNF- $\alpha$ , wydzielanego przez mikroglej. To potwierdzałoby naszą hipotezę o mechanizmie szczególnej wrażliwości neuronów cholinergicznymi na bodźce neurodegeneracyjne, w którym decydującą rolę odgrywa ograniczenie podaży acetylo-CoA i jego zużycia w cyklu kwasów trójkarboksylowych, wskutek inhibicji PDHC i enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (Ryc. 17, 18) (Szutowicz 2001, Szutowicz i wsp. 1996, 2006). Jednakże drogi przekazywania sygnałów, łączące zmiany stężeń cytokin w przestrzeni pozakomórkowej z zahamowaniem czy też pogłębieniem inhibicji PDHC i uszkodzeń neuronów cholinergicznymi, pozostały niewyjaśnione.

Niemniej można postulować, że przy niskiej aktywności mikrogleju, wywiera on działanie ochronne, przez utrzymanie wysokiego poziomu metabolizmu acetylo-CoA i produkcji energii. Natomiast w stanach wysokiej aktywacji działałby on cytotoksycznie poprzez mechanizmy zależne od TNF- $\alpha$  i niezależne od acetylo-CoA.

#### **6.4.2. Wpływ na fenotyp cholinergiczny**

Istotną funkcją neuronów cholinergicznymi jest utrzymanie funkcji neuroprzekaźnicznymi, które w znacznym stopniu zależą od podaży acetylo-CoA do ich przedziału cytoplazmatycznymi. Poziom acetylo-CoA w cytoplazmie jest wypadkową szybkości jego syntezy w mitochondriach i wydajności mechanizmów transportu przez błonę mitochondrialną (Szutowicz i wsp, 1976, Tuček i wsp. 1993, Szutowicz i wsp. 1994).

Komórki mikrogleju N9 wykazywały również aktywność cholinoprotekcyjną, przejawiającą się utrzymaniem wysokiej ekspresji białka ChAT (Ryc. 28), z czego wynikało również częściowe przywróceniem aktywności tego enzymu (Ryc. 27, 33). Dane te pozostają w zgodzie z naszymi wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że niskie stężenia (10 ng/ml) egzogennej IL-1 $\beta$  odwracały inhibicję ChAT i wydzielania ACh w zróżnicowanych komórkach SN56, wywołane amyloidem- $\beta$ ,



(Bielarczyk i wsp. 2005). Wiązało się to z utrzymaniem prawidłowego poziomu acetylo-CoA zarówno w przedziale mitochondrialnym, jak i cytoplazmatycznym (Bielarczyk i wsp. 2005). Przedstawione dane wykazują, że parakrylna aktywność mikrogleju N9 może utrzymać właściwą ekspresję fenotypu cholinergicznego, poprzez utrzymanie właściwej podaży acetylo-CoA do przedziału cytoplazmatycznego komórek SN56 (Ryc. 27, 28). Świadczy o tym istnienie wysoce znamiennej korelacji pomiędzy aktywnością ChAT a poziomem acetylo-CoA w różnych warunkach cytotoksycznych i cytoprotekcyjnych (Ryc. 31 A). Z poprzednich prac wiadomo, że wielkość puli wewnątrzneuronalnej ACh, jak i szybkość jej wydzielania, korelują z aktywnością ChAT (Bielarczyk i wsp. 1989, Blusztajn i wsp. 1992, Berse i Blusztajn 1995, Szutowicz i wsp. 2000). Można zatem przypuszczać, że zależny od cytokin wzrost tego markera neuronów cholinergicznym może być zjawiskiem wtórnym, wynikającym ze zwiększonej podaży acetylo-CoA do przedziału cytoplazmatycznego, dzięki podwyższaniu przez nie aktywności PDHC (Ryc. 17).

Za cholinotropowym działaniem cytokin przemawiają również badania Jonakait i wsp.(2012), w których media pochodzące z hodowli mikrogleju stymulowały ekspresję fenotypu cholinergicznego w hodowli prekursorów komórek cholinergicznym, pochodzących z 15-dniowych zarodków szczura. Zatem, podwyższona ekspresja białka ChAT i aktywność tego enzymu w obecności insertów N9 może być również spowodowana różnicującym wpływem komórek mikrogleju na neuronalne komórki SN56 (Ryc. 27) ( Marz i wsp. 1997, Kunz i wsp. 2009). I tak Zn, powodował 60% spadek poziomu IL-6, nie zmieniając stężenia TNF- $\alpha$  (Ryc. 15, 16). Natomiast dodanie insertu z komórkami N9 powodowało wzrost poziomu IL-6 oraz aktywności i białka ChAT do wartości kontrolnych (Ryc. 15, 16, 27, 28, 33). Tak więc, niezaktywowany mikroglej, zabezpieczałby komórki SN56 przed utratą ich funkcji cholinergicznym w warunkach cytotoksycznych. Jednakże, w tych warunkach, dodatkowe pobudzenie mikrogleju powodowałoby, poprzez wzrost TNF- $\alpha$  i spadek IL-6, supresję fenotypu cholinergicznym (Ryc. 33).

Wiadomo, że ekspresja ACL w neuronach cholinergicznym jest wyższa niż w niecholinergicznym w związku z jej rolą w pośrednim transporcie reszt acetylowych do syntezy ACh (Szutowicz i wsp. 1982, 1980). Również aktywność tego enzymu podlega ochronnemu wpływowi IL-6. Świadczy o tym zapobieganie przez N9 supresji ACL przez Zn i SNP (Ryc. 26) oraz istnienie wysoce znamiennej korelacji

między aktywnością ACL i poziomem tej cytokiny w warunkach neurotoksycznych i neuroprotekcyjnych (Ryc. 32 B).

Przedstawione dane wskazują, że wczesne sygnały neurodegeneracyjne o charakterze ekscytotoksycznym mogą być znoszone przez parakrynną aktywność niepobudzonych komórek mikroglejowych, która zapobiega inhibicji kluczowych enzymów związanych z mitochondrialnym i cytoplazmatycznym metabolizmem acetylo-CoA. Wydaje się, że RES może wspomagać to cytoprotecyjne działanie za pośrednictwem mechanizmu(ów) niezależnych od acetylo-CoA. Tak więc oprócz liponianów i acetylo-L-karnityny, zwiększających wydajność syntezy i zużycia acetylo-CoA do produkcji energii i syntezy acetylocholíny, IL-6 byłby dodatkowym czynnikiem o tym samym punkcie uchwytu. Należy jednak podkreślić, że w warunkach *in vivo* działanie IL-6, jak i resweratrolu może być modyfikowane przez inne cytokiny o różnym zakresie aktywności cytotoxycznych i cytoprotecyjnych.

## 7. WNIOSKI

Wyniki przedstawione w pracy potwierdzają hipotezę dotyczącą wpływu potencjalnych czynników cytoprotekcyjnych na integralność strukturalną i funkcjonalną neuronów cholinergiczych, poprzez poprawę ich metabolizmu energetycznego.

1. Cholinotoksyczne działanie Zn i nadmiaru NO polega na inhibicji aktywności dehydrogenazy pirogronianowej i kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego, co wiąże się z jednoczesnym spadkiem poziomu acetylo-CoA i ATP.
2. Łączne oddziaływania Zn z NO mają charakter synergistyczny i pogłębiają niedobory energetyczne, prowadząc do supresji funkcji neuroprzebieżniczych i żywotności neuronów cholinergiczych.
3. Współistnienie dwóch lub więcej sygnałów cytotoksycznych w patologicznie zmienionym mózgu *in vivo*, może amplifikować uszkodzenia neuronów, a w szczególności neuronów cholinergiczych.
4. W warunkach krótkoczasowej ekspozycji na Zn i SNP, wysokie stężenia resweratrolu, wykazywały działanie cytoprotekcyjne, zapobiegając cytotoksycznym wpływom Zn na wszystkie parametry metabolizmu energetycznego i cholinergicznego.
5. W warunkach przewlekłej ekspozycji, wysokie stężenia resweratrolu wywierały działanie cholinotoksyczne. Natomiast cytoprotekcyjne działanie niskich stężeń resweratrolu odbywało się poprzez inne, niezidentyfikowane, niezależne od metabolizmu energetycznego drogi wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału.
6. Niepobudzone komórki mikroglejowe mogą wywierać parakrynnne działanie cholinoprotekcyjne poprzez hamowanie inhibicyjnych oddziaływań Zn i NO na kluczowe enzymy metabolizmu energetycznego w neuronach cholinergiczych.
7. Ochronna funkcja komórek mikrogleju polegała na zwiększaniu poziomu endogennej IL-6 pochodzenia neuronalnego i mikroglejocytarnego w środowisku, który zapewniał utrzymanie funkcjonalnej integralności neuronów cholinergiczych w warunkach cytotoksycznych.

8. Parakrynną aktywność mikrogleju, poprzez IL-6, oraz egzogenne resweratrol, mogą wzajemnie wspomagać swoje działania cholinoprotekcyjne w warunkach patologicznych, dzięki modyfikacji różnych dróg metabolicznych, wpływających na funkcję i żywotność neuronów cholinergicznym.

## 8. PIŚMIENICTWO

- Acarin L, González B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 3505-20.
- Alvarez S, Blanco A, Fresno M, Muñoz-Fernández MÁ. TNF- $\alpha$  contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT. *PLoS One.* 2011.
- Anekonda TS, Reddy PH. Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2006; 96: 305-13.
- Ashwell K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990; 55: 219-30.
- Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, Shen HF, Xie LP. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci.* 2010; 101: 88-93.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* 1995; 168: 342-57.
- Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 9328-32.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 1982; 17: 408-14.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006 16; 444: 337-42.
- Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53: 1347-55.
- Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 2005; 25: 6734-44
- Berse B, Blusztajn JK. Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22101-4.
- Berse B, Blusztajn JK. Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *FEBS Lett.* 1997; 410: 175-9.

- Bielarczyk H, Szutowicz A. Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Biochem J.* 1989; 262: 377-80.
- Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Szutowicz A. Effect of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J Neurochem.* 1998; 70: 1175-81.
- Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Madziar B, Ćwikowska J, Pawełczyk T, Szutowicz A. Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J Neurosci Res.* 2003; 73: 717-21
- Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Gul S, Pawełczyk T, Szutowicz A. Phenotype dependent differential effects of interleukin-1beta and amyloid-beta on viability and cholinergic phenotype of T17 neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2005; 47: 466-73.
- Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Bizon-Zygmanska D, Pawełczyk T, Szutowicz A. RS-alpha-lipoic acid protects cholinergic cells against sodium nitroprusside and amyloid-beta neurotoxicity through restoration of acetyl-CoA level. *J Neurochem.* 2006; 98: 1242-51.
- Birrell MA, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J.* 2005; 19: 840-1.
- Bizon-Zygmańska D, Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Ronowska A, Marszałł M, Szutowicz A. Acetyl-CoA metabolism in amprolium-evoked thiamine pyrophosphate deficits in cholinergic SN56 neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2011; 59: 208-16.
- Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH. Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J Neurosci.* 1992; 12: 793-9.
- Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 9191-4.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanko LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol.* 2003; 60: 1745-8.
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 1997; 68: 2227-40.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 7162-6.

- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 1976; 99: 459-96.
- Bowen DM, White P, Spillane JA, Goodhardt MJ, Curzon G, Iwangoff P, Meier-Ruge W, Davison AN. Accelerated ageing or selective neuronal loss as an important cause of dementia? *Lancet*. 1979; 1: 11-4.
- Briz V, Suñol C. Homeostatic regulation of glutamate neurotransmission in primary neuronal cultures. *Methods Mol Biol*. 2011; 758: 253-65
- Brooks CL, Gu W. Anti-aging protein SIRT1: a role in cervical cancer? *Aging (Albany NY)*. 2009; 1: 278-80.
- Brorson JR, Schumacker PT, Zhang H. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. The Committees on Neurobiology and Cell Physiology. *J Neurosci*. 1999; 19: 147-58.
- Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanism of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol*. 2010; 41: 242-247
- Browning ET, Schulman MP. (14C) acetylcholine synthesis by cortex slices of rat brain. *J Neurochem*. 1968; 15: 1391-405.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med*. 1996; 2: 788-94.
- Bubber P, Ke ZJ, Gibson GE. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int*. 2004; 45: 1021-8
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol*. 2005 May; 57 (5): 695-703.
- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean ME, Duthie GG, Crozier A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 220-30
- Bush AI, Pettingell WH Jr, de Paradis M, Tanzi RE, Wasco W, Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2003; 17: 641-52.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8: 766-75.
- Carbó N, Costelli P, Baccino FM, López-Soriano FJ, Argilés JM. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 254: 739-43.

- Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol.* 1999; 163: 3963-8.
- Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L, Colivicchi MA, Fausone-Pellegrini MS, Pepeu G. Interleukin-1beta activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release in vivo: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1999; 91: 831-42.
- Casper D, Davies P. Stimulation of choline acetyltransferase activity by retinoic acid and sodium butyrate in a cultured human neuroblastoma. *Brain Res.* 1989; 478: 74-84.
- Castellani RJ, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis.* 2008; 14: 377-83.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon.* 2010; 56: 484-546.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 1996; 10: 940-54.
- Chen Q, Ganapathy S, Singh KP, Shankar S, Srivastava RK. Resveratrol induces growth arrest and apoptosis through activation of FOXO transcription factors in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2010; 5: e15288.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron.* 1994; 12: 139-53.
- Cheng YC, Liang CM, Chen YP, Tsai IH, Kuo CC, Liang SM. F-spondin plays a critical role in murine neuroblastoma survival by maintaining IL-6 expression. *J Neurochem.* 2009; 110: 947-55.
- Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.* 1998; 21: 347-75.
- Choi DW. Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 747: 162-71.
- Clagett-Dame M, Verhalen TJ, Biedler JL, Repa JJ. Identification and characterization of all-trans-retinoic acid receptor transcripts and receptor protein in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300: 684-93.
- Clément MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood.* 1998; 92: 996-1002.
- Collerton D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1986; 19: 1-28.
- Colton C, Wilt S, Gilbert D, Chernyshev O, Snell J, Dubois-Dalcq M. Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Mol Chem Neuropathol.* 1996; 28: 15-20.



- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2001; 21: 1179-88.
- Conlon D, O'Malley K, Kilfeather SA. The effect of donor age on human fibroblast beta-adrenergic receptor response and agonist-induced desensitization. *Mech Ageing Dev.* 1992; 62: 155-65.
- Constant J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coron Artery Dis.* 1997; 8: 645-9.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; 261: 921-3.
- Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology.* 1998; 19: 339-45.
- Costello LC, Franklin RB, Feng P. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. *Mitochondrion.* 2005; 5: 143-5.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 1983; 219: 1184-90.
- Crescente M, Jessen G, Momi S, Höltje HD, Gresele P, Cerletti C, de Gaetano G. Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 336-46.
- Crino P, Khodakhah K, Becker K, Ginsberg S, Hemby S, Eberwine J. Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 2313-8.
- Cuajungco MP, Lees GJ. Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link? *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 23: 219
- Cuajungco MP, Lees GJ. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis.* 1997; 4: 137-69.
- Cuajungco MP, Fagét KY. Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003; 41: 44-56
- Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res.* 1999; 25: 115-20.
- Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci.* 1996; 143: 137-42.

- Deshpande A, Kawai H, Metherate R, Glabe CG, Busciglio J. A role for synaptic zinc in activity-dependent A $\beta$  oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci.* 2009; 29: 4004-15.
- Dickson TC, Saunders HL, Vickers JC. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997; 23: 483-91.
- Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, Perry G, Carey PR. Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry.* 2003; 42: 2768-73.
- Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB. Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2003 24; 278: 2081-4.
- Erdö SL, Schäfer M. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol.* 1991 6; 198: 215-7.
- Fan W, Ha T, Li Y, Ozment-Skelton T, Williams DL, Kelley J, Browder IW, Li C. Overexpression of TLR2 and TLR4 susceptibility to serum deprivation-induced apoptosis in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 337: 840-8
- Fass U, Panickar K, Williams K, Nevels K, Personett D, McKinney M. The role of glutathione in nitric oxide donor toxicity to SN56 cholinergic neuron-like cells. *Brain Res.* 2004; 1005: 90-100
- Farlow MR, Graham SM, Alva G. Memantine for the treatment of Alzheimer's disease: tolerability and safety data from clinical trials. *Drug Saf.* 2008; 31 :577-85.
- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* 1997; 61: 2103-10.
- Feinstein DL, Galea E, Cermak J, Chugh P, Lyandvert L, Reis DJ. Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *J Neurochem.* 1994; 62: 811-4.
- Fonnum F. Radiochemical micro assays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem J.* 1969; 115: 465-72.
- Fotiou S, Fotiou D, Alamanou A, Deliconstanitinos G. Resveratrol activation of nitric oxide synthase in rabbit brain synaptosomes: Singlet oxygen ( $^1O_2$ ) formation as a causative factor of neurotoxicity. *In vivo* 2010; 24: 49-54.
- Fratiglioni L, De Ronchi D, Agüero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging.* 1999; 15: 365-75.
- Frederickson CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol.* 1989; 31: 145-238.

- Frederickson CJ, Danscher G. Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog Brain Res.* 1990; 83: 71-84.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 2000; 130: 1471S-83S.
- Frederickson CJ, Suh SW, Koh JY, Cha YK, Thompson RB, LaBuda CJ, Balaji RV, Cuajungco MP. Depletion of intracellular zinc from neurons by use of an extracellular chelator in vivo and in vitro. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50: 1659-62.
- Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66: 663-73.
- Fotiou S, Fotiou D, Alamanou A, Deliconstantinos G. Resveratrol activation of nitric oxide synthase in rabbit brain synaptosomes: singlet oxygen ( $^1O_2$ ) formation as a causative factor of neurotoxicity. *In Vivo.* 2010; 24: 49-53.
- Fuwa K, Wacker WE, Druyan R, Bartholomay AF, Vallee BL. Nucleic acids and metals, II: transition metals as determinants of the conformation of ribonucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1960; 46: 1298-307
- Gatouillat G, Balasse E, Joseph-Pietras D, Morjani H, Madoulet C. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *J Cell Biochem.* 2010; 110: 893-902.
- Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell.* 1999; 97: 395-406.
- Giannini F, Maestro R, Vukosavljevic T, Pomponi F, Boiocchi M. All-trans, 13-cis and 9-cis retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines: implications for in vivo retinoic acid use. *Int J Cancer.* 1997; 70: 194-200.
- Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, Mohs RC, Sheu RK, Blass JP. Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol.* 2000; 48: 297-303.
- Gibson GE, Shimada M. Studies on the metabolic pathway of the acetyl group for acetylcholine synthesis. *Biochem Pharmacol.* 1980; 29: 167-74.
- Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis.* 2002; 11: 257-74.

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 21; 349: 704-6.
- Goldberg DM, Hahn SE, Parkes JG. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta*. 1995 Jun 15;237(1-2):155-87. *Clin Chim Acta*. 1995; 237: 155-87.
- Gryglewski RJ. Endothelial nitric oxide, prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and tissue plasminogen activator (t-PA): alliance or neutrality? *Pol J Pharmacol*. 1995; 47: 467-72.
- Hahn P, Mahler L. The control of cholesterol metabolism and plasma lipid levels in infant rats. *Physiol Res*. 1992; 41: 407-10.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res*. 1990; 512: 190-200.
- Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002; 40: 140-55.
- Hardy J. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 2095-7.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992; 256: 184-5.
- Harms AS, Lee JK, Nguyen TA, Chang J, Ruhn KM, Treviño I, Tansey MG. Regulation of microglia effector functions by tumor necrosis factor signaling. *Glia*. 2012; 60: 189-202.
- Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 1995; 131: 193-202.
- Haskell BE, Stach RW, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. Effect of retinoic acid on nerve growth factor receptors. *Cell Tissue Res*. 1987; 247: 67-73.
- Hefti F, Knusel B. Chronic administration of nerve growth factor and other neurotrophic factors to the brain. *Neurobiol Aging*. 1988; 9: 689-90.
- Hefti F, Will B. Nerve growth factor is a neurotrophic factor for forebrain cholinergic neurons; implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1987; 24: 309-15.
- Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol*. 2001; 114: 8-18.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol*. 2001; 238: 274-88.

- Hewson QC, Lova PE, Malcolm AJ, Pearson AD, Redfern CP. Receptor mechanisms mediating differentiation and proliferation effects of retinoids on neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2000; 279: 113-6.
- Hill DP, Robertson KA. Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retinoic acid. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997; 102: 53-67.
- Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. *Cancer Res.* 2000; 60: 3477-83.
- Hölscher C, Rose SP. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci Lett.* 1992; 145: 165-7.
- Holst A, Heller S, Junghans D, Geissen M, Ernsberger U, Rohrer H. Onset of CNTFR $\alpha$  expression and signal transduction during neurogenesis in chick sensory dorsal root ganglia. *Dev Biol.* 1997; 191: 1-13.
- Ignatowicz E, Rybczyńska M. Some biochemical and pharmacological aspects of free radical-mediated tissue damage. *Pol J Pharmacol.* 1994; 46: 103-14.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A $\beta$  42(43) and A $\beta$  40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$  42(43). *Neuron.* 1994; 13: 45-53.
- Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science.* 1992; 257: 1273-6.
- Izumi Y, Zorumski CF. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport.* 1993; 4: 1131-4.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997; 275: 218-20.
- Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M, Szutowicz A. Acute and chronic effects of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in differentiated and nondifferentiated SN56 cholinergic cells. *J Neurosci Res.* 2000; 62: 615-22.
- Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Wróblewska M, Szutowicz A. Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain. *J Neurochem.* 2010; 115: 333-42.
- Jonakait GM, Pratt L, Acevedo G, Ni L. Microglial regulation of cholinergic differentiation in the basal forebrain. *Dev Neurobiol.* 2012; 72: 857-64.

- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 2642-7.
- Kaltschmidt B, Uherek M, Wellmann H, Volk B, Kaltschmidt C. Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 9409-14.
- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2009; 54: 111-8.
- Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 2001; 410: 988-94.
- Keyer K, Imlay JA. Inactivation of dehydratase [4Fe-4S] clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite. *J Biol Chem*. 1997; 272: 27652-9
- Knezevic-Cuca J, Stansberry K.B., Johnston G., Zhang J., Keller E.T., Vinik A.I., Pittenger G.L. Neurotrophic role of interleukin-6 and receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neuroimmunol*. 2000; 102: 8-16.
- Kogo J, Takeba Y, Kumai T, Kitaoka Y, Matsumoto N, Ueno S, Kobayashi S. Involvement of TNF-alpha in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res*. 2006; 1122: 201-8
- Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*. 2002; 40: 175-83.
- Kovacs DM, Wasco W, Witherby J, Felsenstein KM, Brunel F, Roeder RG, Tanzi RE. The upstream stimulatory factor functionally interacts with the Alzheimer amyloid beta-protein precursor gene. *Hum Mol Genet*. 1995; 4: 1527-33.
- Krasnow MN, Murphy TM. Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 3467-72.
- Kreuzer J, Lloyd MB, Bok D, Fless GM, Scanu AM, Lusic AJ, Haberland ME. Lipoprotein (a) displays increased accumulation compared with low-density lipoprotein in the murine arterial wall. *Chem Phys Lipids*. 1994; 67-68: 175-90.
- Kunz D, Walker G, Bedoucha M, Certa U, März-Weiss P, Dimitriadis-Schmutz B, Otten U. Expression profiling and Ingenuity biological function analyses of interleukin-6- versus nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *BMC Genomics*. 2009
- Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977; 33: 151-2.
- Lefresne P, Guyenet P, Glowinski J. Acetylcholine synthesis from (2- 14 C) pyruvate in rat striatal slices. *J Neurochem*. 1973; 20: 1083-97.

- Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci.* 1992; 17: 427-33.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996; 2: 1146-50.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996 2:1146-50.
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science.* 1995; 269: 970-3.
- Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J, Wiltfang J. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging.* 2004; 25: 273-81.
- Liu J, Head E, Gharib AM, Yuan W, Ingersoll RT, Hagen TM, Cotman CW, Ames BN. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 2356-61.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998; 158: 47-52.
- Lovell MA, Smith JL, Xiong S, Markesbery WR. Alterations in zinc transporter protein-1 (ZnT-1) in the brain of subjects with mild cognitive impairment, early, and late-stage Alzheimer's disease. *Neurotox Res.* 2005; 7: 265-71.
- Maden M, Holder N. Retinoic acid and development of the central nervous system. *Bioessays.* 1992; 14: 431-8.
- Maden M. Retinoids in patterning: chimeras win by a knockout. *Curr Biol.* 1996; 6: 790-3.
- Madziar B, Tomaszewicz M, Matecki A, Bielarczyk H, Szutowicz A. Interactions between p75 and TrkA receptors in differentiation and vulnerability of SN56 cholinergic cells to beta-amyloid. *Neurochem Res.* 2003; 28: 461-5.
- Malik MA, Greenwood CE, Blusztajn JK, Berse B. Cholinergic differentiation triggered by blocking cell proliferation and treatment with all-trans-retinoic acid. *Brain Res.* 2000; 874: 178-85.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature.* 1990; 345: 224-9.

- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. IFN-alpha suppresses activation of nuclear transcription factors NF-kappa B and activator protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis. *J Immunol.* 2000; 165: 4927-34.
- Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem.* 2005; 280: 3737-82.
- Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2005; 79: 240-7.
- März P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S. Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *Eur J Neurosci.* 1997; 9: 2765-73
- Matsuda H, Kagerura T, Toguchida I, Ueda H, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitory effects of sesquiterpenes from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction. *Life Sci.* 2000; 66: 2151-7.
- McGeer EG, McGeer PL. Abeta immunotherapy and other means to remove amyloid. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4: 569-73.
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia.* 1993; 7: 84-92.
- Mesulam MM, Volicer L, Marquis JK, Mufson EJ, Green RC. Systematic regional differences in the cholinergic innervation of the primate cerebral cortex: distribution of enzyme activities and some behavioral implications. *Ann Neurol.* 1986 ; 19: 144-51.
- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* 2002; 958: 210-21.
- Minger SL, Esiri MM, McDonald B, Keene J, Carter J, Hope T, Francis PT. Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology.* 2000; 55: 1460-7.
- Miura T, Muraoka S, Ikeda N, Watanabe M, Fujimoto Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacol Toxicol.* 2000; 86: 203-8.
- Mizuno T. The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012
- Mocchegiani E, Provinciali M, Di Stefano G, Nobilini A, Caramia G, Santarelli L, Tibaldi A, Fabris N. Role of the low zinc bioavailability on cellular immune effectiveness in cystic fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 75: 214-24.



- Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunen DA, Smith RA, Brand MD. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48534-45.
- Murphy MP, Smith RA. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 41: 235-50.
- Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004; 4: 65-84
- Nelson PT, Abner EL, Schmitt FA, Kryscio RJ, Jicha GA, Santacruz K, Smith CD, Patel E, Markesbery WR. Brains with medial temporal lobe neurofibrillary tangles but no neuritic amyloid plaques are a diagnostic dilemma but may have pathogenetic aspects distinct from Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68: 774-84.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 11285-9
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2003; 87: 172-81.
- Ossenkoppele R, van Berckel BN, Prins ND. Amyloid imaging in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2011; 3: 26.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997; 8: 389-404.
- Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology.* 1993; 32: 1337-50.
- Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry.* 1999; 38: 9728-34.
- Pedersen WA, Berse B, Schüler U, Wainer BH, Blusztajn JK. All-trans- and 9-cis-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor-alpha. *J Neurochem.* 1995; 65: 50-8.
- Perry EK, Perry RH, Tomlinson BE. Dietary lecithin supplements in dementia of Alzheimer type. *Lancet.* 1977; 2: 242-3.

- Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985; 15: 13-26.
- Personett D, Fass U, Panickar K, McKinney M. Retinoic acid-mediated enhancement of the cholinergic/neuronal nitric oxide synthase phenotype of the medial septal SN56 clone: establishment of a nitric oxide-sensitive proapoptotic state. *J Neurochem*. 2000; 74: 2412-24.
- Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*. 2003; 17: 1975-85.
- Prasad K. N., Kumar S. Cyclic AMP and the differentiation of neuroblastoma cells in culture. W. Control of proliferation in animal cells, (red. Clarkson B., Baserga R.), Cols Spring Harbor Laboratory, 1974, 581-94.
- Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem*. 1998; 71: 266-73.
- Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011; 59: 177-87.
- Rana B, Pearson AD, Redfern CP. RXR beta isoforms in neuroblastoma cells and evidence for a novel 3'-end transcript. *FEBS Lett*. 2001; 506: 39-44.
- Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J*. 2003; 374: 157-63.
- Religa D, Strozyk D, Cherny RA, Volitakis I, Haroutunian V, Winblad B, Naslund J, Bush AI. Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. *Neurology*. 2006 Jul 11; 67: 69-75.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339: 1523-6.
- Renaud SC, Ruf JC. Effects of alcohol on platelet functions. *Clin Chim Acta*. 1996; 246: 77-89.
- Rezaie P, Male D. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci*. 2002; 11: 325-74.
- Rezk BM, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Lipoic acid protects efficiently only against a specific form of peroxynitrite-induced damage. *J Biol Chem*. 2004; 279: 9693-7.
- Richardson PJ. Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. *J Neurochem*. 1981; 37: 258-60.

- Rícný J, Tucek S. Acetylcoenzyme A and acetylcholine in slices of rat caudate nuclei incubated with (-)-hydroxycitrate, citrate, and EGTA. *J Neurochem.* 1982; 39: 668-73.
- Rodriguez-Tébar A, Rohrer H. Retinoic acid induces NGF-dependent survival response and high-affinity NGF receptors in immature chick sympathetic neurons. *Development.* 1991; 112: 813-20.
- Roman LJ, Martásek P, Masters BS. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem Rev.* 2002; 102: 1179-90.
- Ronowska A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Szutowicz A. Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 2007; 103: 972–983.
- Ronowska A, Dyś A, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Bielarczyk H, Romianowski P, Pawełczyk T, Szutowicz A. Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2010; 56: 143-51.
- Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 618-25.
- Rylett RJ, Williams LR. Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci.* 1994; 17: 486-90.
- Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol.* 1988; 8: 3546-9
- Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology.* 2003; 49: 380-3.
- Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 1991; 254: 1503-6.
- Selkoe DJ. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1996; 271: 18295-8.
- Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature.* 1993; 361: 260-3.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Perikicak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995; 375: 754-60.
- Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006; 113: 1625-44

- Sheu KF, Kim YT, Blass JP, Weksler ME. An immunochemical study of the pyruvate dehydrogenase deficit in Alzheimer's disease brain. *Ann Neurol.* 1985; 17: 444-9.
- Shin YA, Eichhorn GL. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. XI. The reversible unwinding and rewinding of deoxyribonucleic acid by zinc (II) ions through temperature manipulation. *Biochemistry.* 1968; 7: 1026-32.
- Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 449-66.
- Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD, McRae TD, Morris JC, Oakley F, Schneider LS, Streim JE, Sunderland T, Teri LA, Tune LE. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA.* 1997; 278: 1363-71.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress *Curr Med Chem.* 2004; 11: 1135-46.
- Smith JW 2nd, Tokach MD, Goodband RD, Nelssen JL, Richert BT. Effects of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early-weaned pigs. *J Anim Sci.* 1997; 75: 1861-6.
- Srere PA. Spectral evidence for complex formation between oxaloacetate and citrate-condensing enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1965; 99: 197-200
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320: 915-24.
- Steinert JR, Chernova T, Forsythe. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.* 2010; 16: 435-52.
- Sterling GH, McCafferty MR, O'Neill JJ. Beta-hydroxybutyrate as a precursor to the acetyl moiety of acetylcholine. *J Neurochem.* 1981; 37: 1250-9.
- Sterling GH, O'Neill JJ. Citrate as the precursor of the acetyl moiety of acetylcholine. *J Neurochem.* 1978; 31: 525-30.
- Stewart VC, Sharpe MA, Clark JB, Heales SJ. Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem.* 2000; 75: 694-700.
- Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 391: 79-89.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J Neural Transm Suppl.* 2000;59:81-9.

- Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 1999; 58: 233-47.
- Strijbos PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *J Neurosci.* 1995; 15: 3468-74.
- Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 4725-7.
- Szutowicz A, Stepień M, Łysiak W, Angielski S. Purification and kinetic properties of ATP: citrate oxaloacetate lyase from rat brain. *J Neurochem.* 1975; 25: 11-20.
- Szutowicz A, Stepień M, Łysiak W, Angielski S. Effect of (-)hydroxycitrate on the activities of ATP citrate lyase and the enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *Acta Biochim Pol.* 1976; 23: 227-34.
- Szutowicz A, Łysiak W. Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *J Neurochem.* 1980; 35: 775-85.
- Szutowicz A, Stepień M, Piec G. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal Biochem.* 1980; 115: 81-7.
- Szutowicz A, Kabata J, Bielarczyk H. The contribution of citrate to the synthesis of acetyl units in synaptosomes of developing rat brain. *J Neurochem.* 1982; 38: 1196-204.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Skulimowska H. Effect of dichloroacetate on acetyl-CoA content and acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 1994; 19: 1107-12.
- Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H. Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1996; 56: 323-39.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Kisielewski Y, Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M. Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 1998; 71: 2447-53.
- Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H, Jankowska A. Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbances of cholinergic transmission in brain. *Dev Neurosci.* 1998; 20: 485-92.
- Szutowicz A, Jankowska A, Blusztajn JK, Tomaszewicz M. Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J Neurosci Res.* 1999; 57: 131-6
- Szutowicz A, Tomaszewicz M, Jankowska A, Madziar B, Bielarczyk H. Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis.* 2000; 15: 29-44.

- Szutowicz A. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J Neurosci Res.* 2001; 66: 1009-18.
- Szutowicz A, Madziar B, Pawełczyk T, Tomaszewicz M, Bielarczyk H. Effects of NGF on acetylcholine, acetyl-CoA metabolism, and viability of differentiated and non-differentiated cholinergic neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2004; 90: 952-61.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Zieliński P, Pawełczyk T, Tomaszewicz M. Nerve growth factor and acetyl-L-carnitine evoked shifts in acetyl-CoA and cholinergic SN56 cell vulnerability to neurotoxic inputs. *J Neurosci Res.* 2005; 79: 185-92.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawełczyk T, Jankowska-Kulawy A. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis.* 2006;21: 149-61.
- Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 34: 137-48
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 1996; 3: 159-68.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306: 821-7.
- The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem.* 1994; 269: 2618-21.
- Tomaszewicz M, Bielarczyk H, Jankowska A, Szutowicz A. Pathways of beta-hydroxybutyrate contribution to metabolism of acetyl-CoA and acetylcholine in rat brain nerve terminals. *Folia Neuropathol.* 1997; 35: 244-6.
- Tomaszewicz M, Rossner S, Schliebs R, Cwikowska J, Szutowicz A. Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *J Neurochem.* 2003; 87: 318-24.
- Tran MH, Yamada K, Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides.* 2002; 23: 1271-83.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 1999; 126: 673-80.
- Tsuji K, Nakamura Y, Ogata T, Shibata T, Kataoka K. Rapid decrease in ATP content without recovery phase during glutamate-induced cell death in cultured spinal neurons. *Brain Res.* 1994; 662: 289-92.
- Tuček S. Subcellular distribution of acetyl-CoA synthetase, ATP-citrate lyase, citrate synthase, choline acetyltransferase, fumarate hydratase and lactate dehydrogenase in mammalian brain tissue. *J. Neurochem.* 1967a; 14: 531-545

- Tuček S. The use of choline acetyltransferase for measuring the synthesis of acetyl-coenzyme A and its release from brain mitochondria. *Biochem J.* 1967b; 104: 749-56.
- Tuček S, Cheng SC. Precursors of acetyl groups in acetylcholine in the brain in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1970; 208: 38-40.
- Tuček S, Cheng SC. Provenance of the acetyl group of acetylcholine and compartmentation of acetyl-CoA and Krebs cycle intermediates in the brain in vivo. *J Neurochem.* 1974; 22: 893-914.
- Tuček S, Dolezal V, Sullivan AC. Inhibition of the synthesis of acetylcholine in rat brain slices by (-)-hydroxycitrate and citrate. *J Neurochem.* 1981; 36: 1331-7.
- Tuček S. The synthesis of acetylcholine: twenty years of progress. *Prog Brain Res.* 1990; 84: 467-77.
- Tuček S. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1993. 59-60.
- Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csizsar A. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H1876-81.
- Verkhatsky A, Butt A. *Glial Neurobiology. A Textbook.* John Wiley & Sons, Ltd 2007
- Vezzani A, Sangalli L, Wu HQ, Schwarcz R. ATP as a marker of excitotoxin-induced nerve cell death in vivo. *J Neural Transm.* 1987; 70: 349-56
- Vitek MP, Brown C, Xu Q, Dawson H, Mitsuda N, Colton C. Characterization of NO and cytokine production in immune-activated microglia and peritoneal macrophages derived from a mouse model expressing the human NOS2 gene on a mouse NOS2 knockout background. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 893-901.
- Wadsworth TL, Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 941-9.
- Walz W, Klimaszewski A, Paterson IA. Glial swelling in ischemia: a hypothesis. *Dev Neurosci.* 1993; 15: 216-25
- Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS, Talcott ST, Pasinetti GM. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2006; 20: 2313-20.
- Wang S, Wang X, Yan J, Xie X, Fan F, Zhou X, Han L, Chen J. Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: correlated with NO-cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2007; 567: 26-35.

- Wang XQ, Peng YP, Lu JH, Cao BB, Qiu YH. Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA attack and its signal transduction by JAK and MAPK. *Neurosci Lett.* 2009; 450: 122-6
- White A.R., Zheng H., Galatis D., Maher F., Hesse L., Multhaup G., Beyreuther K., Masters C.L., Cappi R. Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta peptide toxicity and oxidative stress. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 6207-6217
- Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL. Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Ann Neurol.* 1982; 12: 494.
- Williams LR, Rylett RJ. Exogenous nerve growth factor increases the activity of high-affinity choline uptake and choline acetyltransferase in brain of Fisher 344 male rats. *J Neurochem.* 1990; 55: 1042-9.
- Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology.* 1994; 33: 1235-44.
- Wróblewska M, Kortas-Stempak B, Szutowicz A, Badzio T. Phospholipids mediated conversion of HDLs generates specific apoA-II pre-beta mobility particles. *J Lipid Res.* 2009; 50: 667-75.
- Wróblewska M, Czyżewska M, Wolska A, Kortas-Stempak B, Szutowicz A. Apo A-II participates in HDL-liposome interaction by the formation of new pre- $\beta$  mobility particles and the modification of liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 1323-9.
- Xiu J, Nordberg A, Zhang JT, Guan ZZ. Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42). *Neurochem Int.* 2005; 47: 281-90.
- Yu W, Fu YC, Zhou XH, Chen CJ, Wang X, Lin RB, Wang W. Effects of resveratrol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *J Cell Biochem.* 2009; 107: 741-7.
- Zatta P, Lain E, Cagnolini C. Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 3049-55.
- Zatta P, Lucchini R, van Rensburg SJ, Taylor A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull.* 2003 Nov 15; 62: 15-28.
- Zhang L, Xing GQ, Barker JL, Chang Y, Maric D, Ma W, Li BS, Rubinow DR. Alpha-lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci Lett.* 2001; 312: 125-8.



Zhang M, Zhou X, Zhou K. Resveratrol inhibits human nasopharyngeal carcinoma cell growth via blocking pAkt/p70S6K signaling pathways. *Int J Mol Med.* 2013; 31: 621-7

Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res.* 1999; 25: 87-97.