



Aleksandra Dyś

Cytotoksyczne działanie cynku na komórki cholinergiczne i astroglejowe

Rozprawa doktorska

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

Promotor:

Dr hab. n. med. Hanna Bielarczyk

Kierownik Zakładu Medycyny Laboratoryjnej:

Dr hab. n. med. Hanna Bielarczyk

Kierownik Katedry Biochemii Klinicznej

Prof. dr n. med. Tadeusz Pawełczyk

Gdańsk 2014

Część wyników dotycząca krótkoczasowego wpływu cynku na jego akumulację oraz poziom Ca w cholinergicznym komórkach SN56 została opublikowana w artykule:

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.

Pani dr hab. Hannie Bielarczyk,

Składam serdeczne podziękowania;

Za opiekę promotorską nad przebiegiem pracy, pełną zaangażowania pomoc metodyczną i merytoryczną w trakcie jej realizacji, za nieocenioną pomoc podczas wykonywania i redagowania niniejszej pracy oraz okazaną mi życzliwość i wyrozumiałość na wszystkich etapach tworzenia niniejszej rozprawy doktorskiej

*Składam również serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Andrzejowi Szutowiczowi;
za poświęcony mi czas i wszystkie wskazówki udzielone w trakcie
powstawania i analizy wyników rozprawy doktorskiej,
zaangażowanie w dyskusję nad wynikami badań, jak również za
nieocenioną pomoc podczas wykonywania i redagowania
niniejszej pracy*

Serdecznie dziękuję:

dr Annie Ronowskiej

dr Joannie Klimaszewskiej-Łata

dr Sylwii Gul-Hinc

dr hab. Monice Sakowicz-Burkiewicz

dr Agnieszce Piwkowskiej

mgr Monice Młotkowskiej

dr Annie Michno

dr hab. Agnieszce Janowskiej-Kulawy

dr Dorocie Bizon-Zygmańskiej

mgr Lenie Zyśk

mgr Katarzynie Gruzewskiej

mgr Beacie Gapys

*za wszelką pomoc w trakcie realizacji tej pracy
i wspaniałą atmosferę*

*Dziękuję Mojej Rodzinie i Przyjaciółom za
motywację oraz wspieranie mnie we wszelkich
działaniach*

Spis treści

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli	10
Wykaz rycin i tabel	12
1 STRESZCZENIE.....	17
2 WSTĘP	19
2.1 Cynk.....	19
2.1.1 Rola cynku w organizmie	19
2.1.2 Fizjologiczna rola cynku w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).....	21
2.1.3 Neurotoksyczność cynku	25
2.2 Neurony cholinergiczne, charakterystyka i rola w OUN	29
2.3 Astrocyty, charakterystyka i rola w OUN	31
2.3.1 Funkcje astrocytów w OUN	32
2.3.2 Metabolizm energetyczny astrocytów	34
2.3.3 Przepływ metaboliczny między astrocytami a neuronami	35
2.4 Choroba Alzheimer (AD)	38
2.4.1 Amyloid- β	40
2.4.2 Cynk w chorobie Alzheimer	42
2.4.3 Rola astrocytów w chorobie Alzheimer.....	44
2.5 Hodowle linii astrocytów i neuronów cholinergicznych jako komórkowe modele neurodegeneracji	45
2.5.1 Astrocyty.....	45
2.5.2 Neurony cholinergiczne.....	46
3 CEL PRACY	48
4 MATERIAŁY I METODY	49
4.1 Model doświadczalny	49
4.1.1 Badania długoczasowego wpływu Zn w komórkach cholinergicznych SN56 i astroglejowych C6	49

4.1.2	Badania krótkoczasowego wpływu Zn w komórkach cholinergicznyc	51
	astroglejowych C6	
4.1.3	Badania bezpośredniego wpływu Zn na aktywność enzymów w lizatac	52
	komórkowych C6.....	
4.2	Czynniki neurotoksyczne.....	52
4.2.1	Cynk.....	52
4.2.2	Oznaczanie aktywności enzymów	52
4.2.3	Dehydrogenaza mleczanowa (LDH, EC 1.1.1.27)	53
4.2.4	Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; EC 1.2.4.1, EC 2.3.1.12,	53
	EC 1.6.4.3).....	
4.2.5	Akonitaza (EC 4.2.1.3)	54
4.2.6	Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna (IDH; EC 1.1.1.42)	54
4.3	Oznaczanie poziomu Zn całkowitego w komórkach.....	54
4.4	Oznaczanie poziomu Ca w komórkach SN56	55
4.4.1	Oznaczanie poziomu Ca całkowitego.....	55
4.4.2	Oznaczanie poziomu Ca we frakcji mitochondrialnej.....	56
4.5	Ocena poziomu białka transportera cynkowego ZnT1 metodą Western Blot..	56
4.6	Ocena poziomu białek transporterów cynkowych ZnT1 (SLC30A1) metodą	57
	ELISA	
4.7	Ocena przeżywalności komórek.....	58
4.8	Metoda immunocytochemiczna barwienia różnicowego komórek z	58
	zastosowaniem jodku propidyny (PI) i dioctanu karboksyfluoresceiny (6-	
	CFDA)	
4.9	Analiza obrazu mikroskopowego	59
4.10	Oznaczenie zawartości białka (Bradford, 1976).....	59
4.11	Metody statystyczne	59
4.12	Odczynniki i materiały zużywalne	60
5	WYNIKI	61
5.1	Opracowanie i walidacja metody oznaczania wewnątrzkomórkowego cynku	61
	całkowitego.....	

5.1.1	Wybór optymalnych warunków pomiaru	61
5.1.2	Powtarzalność i odtwarzalność	64
5.2	Charakterystyka parametrów enzymatycznych i metabolicznych nieróżnicowanych cholinergicznych komórek SN56 i astroglajowych C6	67
5.3	Wpływ cynku na morfologię komórek SN56 i C6	68
5.3.1	Komórki cholinergiczne neuroblastoma SN56	68
5.3.2	Komórki astroglajowe C6	68
5.4	Akumulacja cynku w warunkach długoczasowych i jego cytotoksyczny wpływ na komórki SN56 i C6	70
5.4.1	Zróżnicowana akumulacja Zn w różnych fenotypach komórek SN56 i C6	70
5.4.2	Cytotoksyczny wpływ akumulacji Zn na komórki SN56 i C6	72
5.5	Długoczasowy wpływ Zn na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach cholinergicznych SN56 i astroglajowych C6 ..	77
5.5.1	Długoczasowy wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogrońianowej (PDHC) w komórkach astrocytarnych i neuronalnych	77
5.5.2	Długoczasowy wpływ Zn na aktywność akonitazy	78
5.5.3	Długoczasowy wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (IDH-NADP) w komórkach C6	79
5.6	Krótkoczasowy cytotoksyczny wpływ Zn na cholinergiczne komórki SN56 ..	80
5.6.1	Krótkoczasowy wpływ Zn na poziom Ca w przedziałach subkomórkowych cholinergicznych komórek SN56	83
5.7	Wpływ krótkoczasowej ekspozycji komórek cholinergicznych SN56 na Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego	86
5.7.1	Wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogrońianowej	86
5.7.2	Wpływ Zn na aktywność akonitazy	86
5.7.3	Wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej ..	87
5.8	Krótkoczasowa akumulacja Zn i jej wpływ na komórki astrocytarne C6	88
5.8.1	Wpływ na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogrońianowej	88
5.8.2	Wpływ na aktywność akonitazy	89
5.8.3	Wpływ na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej	90

5.9	Bezpośredni wpływ Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach astroglowych C6	91
5.9.1	Bezpośredni wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w lizatach komórek astroglowych C6	91
5.9.2	Bezpośredni wpływ Zn na aktywność akonitazy w lizatach komórek astrocytarnych C6	92
5.9.3	Bezpośredni wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w lizatach komórek astrocytarnych C6	93
5.10	Wpływ komórek astrocytarnych C6 na cytotoksyczne działanie Zn na neuronalne komórki cholinergiczne SN56	94
5.11	Wpływ komórek astrocytarnych C6 na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach SN56	96
6	DYSKUSJA	98
6.1	Charakterystyka modelu doświadczalnego	98
6.1.1	Komórki cholinergiczne SN56	98
6.1.2	Komórki astroglowe C6	100
6.2	Akumulacja cynku	102
6.2.1	Mechanizmy akumulacji Zn w komórkach	102
6.2.2	Wpływ Zn na dystrybucję Ca	106
6.3	Wpływ Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego w cholinergicznych komórkach neuronalnych SN56 i astroglowych C6	107
6.4	Wpływ astroglu C6 na neurotoksyczność Zn w cholinergicznych komórkach SN56	112
7	WNIOSKI	114
8	PIŚMIENNICTWO	115

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli

ACh	acetylocholina (ang. <i>acetylcholine</i>)
AD	choroba Alzheimera (ang. <i>Alzheimer's disease</i>)
AMPA	receptor α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4 isoksazolepropionowy/ kainianowy (ang. <i>2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl) propionate receptor</i>)
APP	białko prekursorowe amyloidu beta (ang. <i>Amyloid Precursor Protein</i>)
BACE1	β -sekretaza (ang. <i>β-site APP-cleaving enzyme 1</i>)
BCIP	bromo-chloro-indolilofosforan, (ang. <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate</i>)
BDNF	neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
dbcAMP	dwumaślan cyklicznego adenozymonofosforanu (ang. <i>dibutyryl cyclic adenosine monophosphate</i>)
ChAT	acetylotransferaza cholinowa, (ang. <i>choline acetyltransferase</i>)
CREB	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP, (ang. <i>cAMP response element binding</i>)
CRIP	białko jelitowe bogate w reszty cysteiny, (ang. <i>cysteine-rich intestinal protein</i>)
DMEM	środowisko wzrostowe Eagle zmodyfikowane wg Dulbecco, (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DCT-1	transporter kationów dwuwartościowych, (ang. <i>divalent cation transporter</i>)
EAAT	transporter glutaminianu (ang. <i>excitatory amino-acid transporter</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny, (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FBS	płodowa surowica bydłęca, (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GABA_A	kwas γ -aminomasłowy, (ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GFAP	kwaśne białko włókienkowe (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLUT	transporter glukozy (ang. <i>glucose transporters</i>)
IDH-NADP	dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna (ang. <i>isocitrate dehydrogenase-NADP</i>)
KA	receptor kainianowy (ang. <i>kainate receptor</i>)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i>)
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>long-term potentiation</i>)

MCT	transporter kwasów jednokarboksylowych (ang. <i>monocarboxylate transporter</i>)
mPTP	megakanał mitochondrialny (ang. <i>mitochondria permeability transition pore</i>)
MT	metalotioneiny (ang. <i>metallothioneins</i>)
NBT	błękit nitrotetrazolowy, (ang. <i>nitro blue tetrazolium</i>)
NF-κB	czynnik jądrowy- κ B, (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NGF	czynnik wzrostu nerwów (ang. <i>nerve growth factor</i>)
NMDA	receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. <i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>)
PARP	polimeraza poli(ADP-rybozy) (ang. <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>)
PDHC	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (ang. <i>Pyruvate dehydrogenase complex</i>)
PI	jodek propidyny (ang. <i>propidium iodide</i>)
PKA	kinaza białkowa A, (ang. <i>protein kinase A</i>)
RA	kwas retinowy (ang. <i>retinoic acid</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
SDS	sól sodowa dodecyłu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza na żelu polakrylamidowym w warunkach denaturujących z SDS (ang. <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SLC30	transporter cynkowy ZnT (ang. <i>soluble-linked carrier 39</i>)
SLC39	transporter cynkowy ZIP (ang. <i>soluble-linked carrier 30</i>)
TBS	roztwór soli fizjologicznej buforowany Tris (ang. <i>Tris buffered saline</i>)
TNFα	czynnik martwicy nowotworu α , (ang. <i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TPEN	(ang. <i>N,N,N',N',-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediammine</i>)
TSQ	6-metoksy-(8- <i>para</i> -toluenosulfonamido)-chinolina, (ang. <i>6-methoxy-(8-p-toluenesulfonamido)quinoline</i>)
VGCC	kanał wapniowy zależny od napięcia (ang. <i>voltage-gated calcium channel</i>)
ZIP	transporter cynkowy, (ang. <i>zinc regulated transporter (ZRT1) i iron regulated-like proteins (IRT1)</i>)
ZnT	transporter cynkowy, (ang. <i>zinc transporter</i>)

Wykaz rycin i tabel

Ryciny:

Ryc. 1. Hipotetyczny mechanizm toksycznego działania Zn na neurony postsynaptyczne synaps glutaminianergicznych w warunkach ekscytotoksycznego pobudzenia cholinergicznego (zmodyfikowany wg Colvin 2003)	26
Ryc. 2. Model przepływu metabolicznego i cyklu glutaminian-glutamina między neuronami i astrocytami (zmodyfikowany wg Escartin 2006)	37
Ryc. 3. Struktura białka prekursorowego amyloidu- β (APP) (zmodyfikowany wg Strosznajder 2001)	41
Ryc. 4. Ilustracja przedstawiająca model hodowli łączonej komórek cholinergicznym SN56 i astroglejowych C6.....	51
Ryc. 5. Wzór strukturalny barwnika fluorescencyjnego TSQ utworzony za pomocą programu ChemDrew	61
Ryc. 6. Widmo wzbudzenia TSQ w obecności wzrastających stężeń Zn (0-50 $\mu\text{mol/L}$) przy długości fali 495 nm (maksimum emisji) mierzone w 100 mmol/L buforze HEPES pH 7.4.	62
Ryc. 7. Widmo emisyjne TSQ w obecności wzrastającego stężenia Zn (0-50 μM) przy długości fali wzbudzenia 335 nm mierzone w 100 mmol/L buforze HEPES pH 7.4.....	62
Ryc. 8. Krzywe kalibracyjne do oznaczania całkowitego Zn wewnątrzkomórkowego przy różnych stężeniach TSQ.....	66
Ryc. 9. Wpływ Zn na morfologię neuronalnych komórek cholinergicznym SN56 A) kontrola, komórki nieróżnicowane (KN SN56), B) kontrola, komórki różnicowane dbcAMP/RA (KR SN56), C) KN SN56 z 0.15 mmol/L Zn, D) KR SN56 z 0.15 mmol/L Zn	68
Ryc. 10. Wpływ Zn na morfologię komórek astrocytarnych C6 A) kontrola, komórki astrocytarne nieróżnicowane (KN C6), B) kontrola, komórki astrocytarne różnicowane dbcAMP i RA (KR C6), C) KN C6 z 0.20 mmol/L Zn, D) KR C6 z 0.20 mmol/L Zn, E) KN C6 z 0.22 mmol/L Zn, F) KR C6 z 0.22 mmol/L Zn	69
Ryc. 11. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na jego akumulację w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 oraz C6....	70
Ryc. 12. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom białka ZnT1 w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 (A, B) oraz C6 (C, D)	71

Ryc. 13. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom białka ZnT1 w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach cholinergicznym SN56 (oznaczenie metodą ELISA)	72
Ryc. 14. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na frakcyjną zawartość pozakomórkowego LDH nieróżnicowanych i różnicowanych komórek SN56 i C6.73	
Ryc. 15. Przykładowe obrazy komórek astrocytarnych KN C6 w warunkach kontrolnych A) obraz w mikroskopie świetlnym, B) komórki C6 wybarwione diocetanem karboksylfluoresceiny (6-CFDA); przewlekły wpływ 0.22 mmol/L Zn na komórki KN C6 C) obraz w mikroskopie świetlnym, D) barwienie jodkiem propidyny (PI)	74
Ryc. 16. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a LDH uwolnionym z komórek nieróżnicowanych i różnicowanych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn	75
Ryc. 17. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a uwalnianiem LDH z komórek nieróżnicowanych i różnicowanych SN56 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn	75
Ryc. 18. Korelacje pomiędzy frakcjami komórek pochłaniających błękit trypanu i LDH uwolnionego z komórek neuronalnych: nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) SN56 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn.	76
Ryc. 19. Aktywność PDHC w nieróżnicowanych (KN SN56) i różnicowanych (KR SN56) cholinergicznym neuroblastoma SN56 oraz nieróżnicowanych (KN C6) i różnicowanych (KR C6) komórkach astroglowych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn	78
Ryc. 20. Aktywność akonitazy w nieróżnicowanych (KN SN56) i różnicowanych (KR SN56) cholinergicznym neuroblastoma SN56 oraz nieróżnicowanych (KN C6) i różnicowanych (KR C6) komórkach astroglowych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn	79
Ryc. 21. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach astroglowych C6 eksponowanych 24 godziny na wzrastające stężenia Zn.	80
Ryc. 22. Krótkoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na wzrost komórek (A) i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu (B).....	81
Ryc. 23. Krótkoczasowa, zależna od stężenia akumulacja Zn w zdepolaryzowanych komórkach cholinergicznym SN56 i astroglowych komórkach C6.....	82

Ryc. 24. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a frakcją komórek uszkodzonych KN i KR SN56 eksponowanych przez 30 min w środowisku depolaryzacyjnym na wzrastające stężenia Zn.....	83
Ryc. 25. Krótkoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom Ca w przedziale cytoplazmatycznym i mitochondrialnym A. nieróżnicowanych; B. różnicowanych komórek cholinergicznym SN56.....	84
Ryc. 26. Korelacje pomiędzy akumulacją Zn i poziomem Ca w cytoplazmie i mitochondriach w komórkach nieróżnicowanych (A) i różnicowanych (B) SN56...	84
Ryc. 27. Odwrotne korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu a poziomem Ca w mitochondriach (A) oraz proste korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu, a poziomem Ca w cytoplazmie (B) KN i KR SN56 po 30 minutowej inkubacji w obecności wzrastającego stężenia zewnątrzkomórkowego Zn.....	85
Ryc. 28. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich PDHC	86
Ryc. 29. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich akonitazy...	87
Ryc. 30. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich IDH-NADP	88
Ryc. 31. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność PDHC	89
Ryc. 32. A. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność akonitazy B. Wykresy Dixona dla wpływu Zn na akonitazę.....	90
Ryc. 33. A. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność IDH-NADP B. Wykresy Dixona dla wpływu Zn na IDH-NADP	91
Ryc. 34. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność PDHC w lizatach KN i KR komórek astroglajowych C6.....	92
Ryc. 35. A. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność akonitazy w lizatach KN i KR komórek astroglajowych C6. B. Wykres Dixona dla wpływu Zn na aktywność akonitazy	93
Ryc. 36. A. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność IDH-NADP w lizatach KN i KR komórek astroglajowych C6. B. Wykres Dixona dla wpływu Zn na aktywność IDN-NADP	94

Ryc. 37. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasowe, zależne od stężenia cytotoksyczne działanie Zn na nieróżnicowane (A) i różnicowane (B) komórki cholinergiczne SN56	95
Ryc. 38. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia akumulację Zn w nieróżnicowanych (A) i różnicowanych (B) neuronalnych komórkach cholinergicznych SN56	95
Ryc. 39. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia Zn aktywność kompleksu PDHC w KN (A) i KR (B) cholinergicznych SN56	96
Ryc. 40. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia Zn aktywność akonitazy w KN (A) i KR (B) cholinergicznych SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-6 doświadczeń	97
Ryc. 41. Zależność akumulacji Zn od obliczonych stężeń wolnego Zn w neuronalnych komórkach cholinergicznych SN56 (A) i astroglejowych C6 (B). Stężenie wolnego Zn obliczono z różnicy między całkowitym stężeniem dodawanego Zn, a jego hipotetycznym wiązaniem przez 10% FBS na poziomie 0.1-0.15 mmol/L.....	104
Ryc. 42. Wywołana przez Zn inhibicja kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego jest podobna do zmian obserwowanych w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera. Dane z ryc. 19, 20, Ronowska i wsp. 2007 (KDHC) oraz Bubber i wsp. (Ch. Alzheimera)	110

Tabele:

Tabela 1. Sposób przygotowania standardów krzywej kalibracyjnej do oznaczania całkowitego Zn wewnątrzkomórkowego	55
Tabela 2. Schemat wykonania pomiaru krzywej kalibracyjnej do oznaczania Zn	63
Tabela 3. Dobór optymalnego składu środowiska pomiarowego	63
Tabela 4. Powtarzalność oznaczania Zn we wzorcu metodą spektrofluorymetryczną – seria jednoczesna.....	64
Tabela 5. Wartości Δ RLU dla krzywej wzorcowej do oznaczania Zn – seria niejednoczesna	65
Tabela 6. Powtarzalność oznaczeń zawartości Zn w komórkach SN56 metodą spektrofluorymetryczną – seria jednoczesna	66
Tabela 7. Odtwarzalność oznaczeń zawartości Zn w komórkach SN56 metodą spektrofluorymetryczną – seria niejednoczesna.....	67
Tabela 8. Poziomy badanych w pracy parametrów pomiarowych w nieróżnicowanych neuronalnych komórkach cholinergicznym SN56 i astroglajowych C6.....	67
Tabela 9. Porównanie aktywności enzymów metabolizmu acetylo-CoA w komórkach cholinergicznym SN56 i preparatach całego mózgu.....	99
Tabela 10. Porównanie właściwości komórek astrocytarnych C6 używanych w przedstawianej pracy i przez innych autorów	101
Tabela 11. Porównanie wartości K_i wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w lizatach cholinergicznym komórek SN56 i astroglajowych C6	111

1 STRESZCZENIE

Wspólną cechą wielu chorób degeneracyjnych mózgu związanych z podeszłym wiekiem jest upośledzenie ich metabolizmu energetycznego. Badania pośmiertne wykazały inhibicję aktywności szeregu enzymów mitochondrialnych, w dotkniętych zmianami patologicznymi regionach mózgu. Co więcej, zmiany te korelowały, z ubytkami funkcji poznawczych oraz obniżeniem aktywności enzymów metabolizmu energetycznego i markerów przekaźnictwa cholinergicznego stwierdzanymi po śmierci pacjenta.

Zaburzenia otępienie w encefalopatiach wieku podeszłego wiążą się z preferencyjnym uszkodzeniem neuronów cholinergiczych przegrody mózgu odpowiedzialnych za formowanie pamięci i inne procesy poznawcze. Dużą rolę w powstawaniu środowiska neurotoksycznego w encefalopatiach cholinergiczych odgrywać może również uszkodzenie astrogleju. Astrocyty pełnią bowiem kluczową rolę w kontroli środowiska pozakomórkowego neuronów. Wykazano, że astrocyty wychwytyują glutaminian wydzielany przez zakończenia glutaminianergiczne zapobiegając jego ekscytotoksycznemu działaniu. W stanach niedotlenienia istnieje również redystrybucja metabolitów pośrednich przemian energetycznych pomiędzy poszczególnymi typami komórek mózgu. I tak, w neuronach 30% energii jest dostarczane z mleczanu produkowanego przez astrocyty, a kilka procent z deaminacji oksydacyjnej glutaminianu wychwytywanego za szczeliny synaptycznej lub wytwarzanego z glutaminy syntetyzowanej, a następnie wydzielanej przez astrocyty.

Jednym z bodźców neurotoksycznych odpowiedzialnych za rozwój choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych jest cynk. W wyniku ekscytotoksycznego pobudzenia, cynk uwolniony do szczeliny synaptycznej może osiągać stężenie 0.3 mmol/L. Jego nadmierna akumulacja w neuronach postsynaptycznych może powodować natychmiastowe zahamowanie metabolizmu energetycznego, a tym samym kaskadę zmian prowadzących do utraty funkcji przekaźniczych i integralności strukturalnej tych komórek.

Dlatego też, celem pracy było porównanie cytotoksycznego działania Zn na metabolizm energetyczny neuronów cholinergiczych i komórek astroglejowych. Zbadano akumulację Zn oraz wpływ zewnątrzkomórkowego stężenia tego kationu na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC), akonitazy oraz

dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (IDH-NADP) w obu typach komórek oraz wewnątrzkomórkową dystrybucję Ca w neuronach cholinergicznym. Zbadano również wzajemne interakcje komórek neuronalnych i astroglejowych poddanych cytotoksycznemu działaniu Zn.

W przedstawianej pracy wykazano, że nadmierna akumulacja Zn w neuronach cholinergicznym, jak i przyległych astrocytach prowadzi do inhibicji lub inaktywacji enzymów metabolizmu energetycznego, takich jak PDHC, akonitazy czy IDH-NADP, co może być jedną z przyczyn wczesnego uszkodzenia tych komórek w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych.

Ekspozycja obu typów komórek na cytotoksyczne stężenia Zn, niezależnie od czasu ekspozycji, prowadziło do mniejszej akumulacji tego kationu w komórkach C6 niż w komórkach neuronalnych SN56. Wykazano również istnienie znamiennych korelacji pomiędzy akumulacją Zn w neuronach cholinergicznym i komórkach astroglejowych, a upośledzeniem ich funkcji i przeżywalności, zarówno w warunkach długoczasowych, jak i krótkoczasowego wpływu cytotoksycznego stężenia tego kationu. Jednakże w doświadczeniach krótkoczasowego wpływu Zn uzyskano wyższą jego akumulację niż w warunkach długoczasowych, zarówno w komórkach SN56, jak i C6. Cytotoksyczne stężenie zewnątrzkomórkowego Zn prowadziło również do obniżenia gęstości transportera ZnT1 w neuronach cholinergicznym SN56.

W przedstawianej pracy zaobserwowano istnienie znamiennej korelacji między akumulacją Zn i poziomem Ca w cytoplazmie (SN56 $r=0.99$, $p<0.0001$) i odwrotnie proporcjonalną korelacją między akumulacją Zn i poziomem Ca w mitochondriach (SN56 $r=0.90$, $p<0.05$).

Udowodniono po raz pierwszy neuroprotektoryjny wpływ komórek astroglejowych poprzez wychwyt nie tylko glutaminianu, ale również Zn z przestrzeni pozakomórkowej, co jednocześnie prowadziło do polepszenia metabolizmu energetycznego neuronów cholinergicznym i ich przeżywalności w warunkach oddziaływania czynników neurodegeneracyjnych.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że mniejsza wrażliwość astrogleju na czynniki cytotoksyczne może zwiększać szanse na przeżycie neuronów poprzez dostarczanie do przestrzeni przyneuralnych prekursorów energetycznych, takich jak mleczan.

2 WSTĘP

2.1 Cynk

Cynk to jeden z niezbędnych składników diety, odgrywający istotną rolę w różnorodnych procesach biochemicznych (Hambidge, 2000). Znaczenie cynku, jako niezbędnego pierwiastka śladowego w żywych organizmach, opisał po raz pierwszy Raulin w 1869. Na podstawie swoich badań, udowodnił, że cynk jest konieczny dla wzrostu *Aspergillus Niger* (Prasad, 1991; Raulin, 1869). Jednakże specyficzna, biologiczna funkcja cynku w organizmach eukariotycznych została zdefiniowana dopiero w 1940 roku, kiedy okazało się, że metal ten jest kofaktorem anhidrazy węglanowej (Keilin i Mann, 1940). W ludzkim proteomie około 10% białek posiada miejsca wiążące cynk. Zn jest kofaktorem ponad 300 enzymów, niezbędny jest również do funkcjonowania ponad 2000 czynników transkrypcyjnych, jako element strukturalny tzw. palców cynkowych (Jeong i Eide, 2013).

2.1.1 Rola cynku w organizmie

U dorosłego człowieka całkowita zawartość cynku waha się od około 2.3 mmol (1.5g) u kobiet do 3.8 mmol (2.5 g) u mężczyzn (King i Keen 2006). Stężenie cynku w poszczególnych tkankach waha się od 11 $\mu\text{g/g}$ w mózgu do około 100 $\mu\text{g/g}$ w tkance kostnej. Prawidłowe wartości cynku w osoczu wynoszą 12–18 $\mu\text{mol/L}$ (78–117 $\mu\text{g/dL}$), natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym 0.15 $\mu\text{mol/L}$. We krwi 60% cynku związane jest z albuminą, 30% z α_2 -makroglobuliną oraz 10% z transferyną (Scott i Bradwell, 1983). Stężenie Zn wewnątrzkomórkowego jest 10-100-krotnie wyższe, dlatego konieczny jest aktywny transport tego metalu do wnętrza komórki (Hajo Haase i Wolfgang Maret, 2010). Około 30-40% wewnątrzkomórkowej puli cynku znajduje się w jądrze komórkowym, 50% w cytosolu, a pozostała frakcja związana jest z błonami (Vallee i Falchuk, 1993). Rekomendowane dzienne spożycie cynku różni się w zależności od wieku, płci, fazy wzrostu oraz stopnia utraty cynku przez jelita, pęcherzyk żółciowy, trzustkę, nerki i skórę. U zdrowych, dorosłych osób podaż cynku powinna wynosić 8-11 mg/dobę (Trumbo i wsp., 2001). Wydajność absorpcji wynosi poniżej 50%. Dlatego zapotrzebowanie netto wynosi około 3-4 mg/dobę (King i wsp., 2000). Wchłanianie cynku jest zależne od stężenia tego jonu w świetle jelita. Proces ten zachodzi głównie w dystalnym odcinku dwunastnicy oraz proksymalnym jelita

czego, gdzie frakcyjna absorpcja tego metalu jest najwyższa (Lee i wsp., 1989). Wychwyt Zn z przestrzeni pozakomórkowej odbywa się przy udziale transportera kationów dwuwartościowych (DCT-1) (Gunshin i wsp., 1997). Wewnątrzkomórkowy transport do boczno-przypodstawnej błony komórkowej enterocytów zachodzi poprzez wiązanie z białkiem zawierającym cysteinę (CRIP), natomiast wydzielanie do przestrzeni międzykomórkowej zachodzi przy udziale transportera cynkowego ZnT1, skąd cynk poprzez krążenie wrotne transportowany jest do wątroby, a następnie do innych tkanek, głównie w postaci kompleksu z albuminą (Krebs, 2000; McMahon i Cousins, 1998). Zarówno niedobór cynku, jak i jego nadmiar jest szkodliwy. Dlatego organizmy eukariotyczne posiadają mechanizmy odpowiadające za utrzymanie homeostazy tego kationu. Frakcyjna absorpcja Zn z jelit jest zależna od jego poziomu w diecie i waha się zwykle od 20 do 30%. W przypadku ciężkich niedoborów cynku poziom białek transportowych w enterocytach znacznie się zwiększa. Dzięki temu wydajność absorpcji Zn może wzrastać nawet powyżej 90% (King i wsp., 2000; Krebs, 2000). Istotnym mechanizmem zabezpieczającym względną stałość puli Zn w organizmie, w przypadku długotrwałego niskiego spożycia, jest zmniejszenie jego wydalania z moczem. Dochodzi również do wewnątrzustrojowej redystrybucji Zn uwalnianego z niektórych tkanek, takich jak kości, do innych tkanek, takich jak mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy, w celu utrzymania odpowiedniej zawartości tego metalu (King i wsp., 2000).

Zn stabilizuje strukturę błon i innych organelli subkomórkowych (Ireini i wsp., 2006). Jest on elementem strukturalnym wielu białek i enzymów różnych dróg wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału przez co spełnia kluczową rolę w utrzymaniu ich prawidłowej aktywności biologicznej (Prasad, 1995; Vallee i Falchuk, 1993). Ponadto Zn pełni funkcję katalityczną wielu enzymów należących do klas: oxydoreduktaz (dehydrogenaza alkoholowa EC 1.1.1.1, oksydaza glukozowa EC 1.1.3.4, dysmutaza ponadtlenkowa EC 1.15.1.1), transferaz (polimeraza RNA II EC 2.7.7.6), hydrolaz (karboksypeptydaza A EC 3.4.17.1, karboksypeptydaza T EC 3.4.17.18, β -laktamazy EC 3.5.2.6, fosfataza alkaliczna EC 3.1.3.1, deaminaza adenozyiny EC 3.5.4.4, fosfolipaza C EC 3.1.4.3), liaz/izomeraz (anhydraza węglanowa II EC 4.2.1.1), ligaz (karboksylaza pirogronianowa EC 6.4.1.1) (Coleman, 1992; Vallee i Auld, 1993).

Cynk reguluje ekspresję genów i wpływa na stabilność genomu komórek m.in. jako element struktury chromatyny oraz polimeraz DNA i RNA biorących udział w syntezie kwasów nukleinowych (Prasad, 1995; Vallee i Falchuk, 1993). Między innymi Zn stabilizuje domeny palców cynkowych SP1F3, SWI5 wiążących się z promotorowymi i supresorowymi sekwencjami DNA. Ponadto jest on niezbędny do procesu replikacji DNA, transkrypcji i syntezy białek przez co wpływa na podziały i różnicowanie komórek (Coleman, 1992).

Zn jest również potrzebny do utrzymania optymalnej aktywności hormonu wzrostu oraz zwiększa jego powinowactwo do zewnątrzkomórkowej domeny receptora prolaktyny (Vallee i Falchuk, 1993).

Zn jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Jego niedobór obniża liczbę limfocytów $CD8^+CD73^+$, zmniejsza wydzielanie $IFN-\gamma$ i IL2 przez komórki TH1 ($CD4^+$), obniża fagocytozę, zmniejsza cytotoksyczność komórek NK oraz redukuje chemotaksję neutrofilii (Ibs i Rink, 2003). Kation Zn jest kofaktorem tymuliny - hormonu grasicy, który bierze udział w dojrzewaniu limfocytów T (Dardenne i wsp., 1982). Jony cynku indukują także uwalnianie IL-1, IL-6, $TNF-\alpha$ oraz pobudzają monocyty. Zn niezbędny jest również do translokacji kinazy białkowej C (PKC) do błony komórkowej (Fukada i wsp., 2011).

Objawy kliniczne u osób z umiarkowanym niedoborem cynku to opóźnienie wzrostu, hipogonadyzm u mężczyzn, zaburzenia smaku i zapachu, opóźnione gojenie się ran, ślepotą zmierzchowa, zaburzenia pamięci. Ciężki niedobór charakteryzuje się częstymi infekcjami spowodowanymi zaburzeniami odporności, pęcherzykowym zapaleniem skóry, biegunką, łysieniem oraz psychozami (Walsh i wsp., 1994).

2.1.2 Fizjologiczna rola cynku w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)

Obecność Zn w mózgu została wykazana po raz pierwszy przez Maske (1955). Zaobserwował on jasno-czerwone kompleksy cynku z ditizonem w obrębie hipokampa szczura, które dokładnie pokrywały się z aksonami mszystymi, łączącymi zakręt zębaty z rogiem Amona (Frederickson i wsp., 1989; Maske, 1955). Średnie stężenie cynku w mózgu wynosi 150 $\mu\text{mol/kg}$. Najwyższe poziomy tego kationu występują w hipokampie, ciele migdałowatym i korze mózgu (Frederickson i wsp., 1989; Takeda, 2000). Haug po raz pierwszy odkrył pęcherzyki presynaptyczne zawierające cynk w zakończeniach synaptycznych włókien mszystych hipokampa, zakrętu zębatego i ciała migdałowatego (Haug, 1967; Frederickson i wsp., 2000).

Wykazano, że około 8% całkowitej puli Zn hipokampa znajduje się w pęcherzykach zakończeń synaptycznych (Frederickson i wsp. 1983). W pęcherzykach presynaptycznej części zakończeń glutaminianergicznych cynk występuje w kompleksie z glutaminianem osiągając tam stężenie 1.4 mmol/L. Wielkość puli uwalnianego Zn zależy więc od aktywności neuronów glutaminianergicznych, co może mieć istotne znaczenie w regulacji funkcji neuronów postsynaptycznych w warunkach fizjologicznych i patologicznych (Ronowska i wsp. 2007, 2010, Sensi i wsp., 2009).

W mózgu, w warunkach fizjologicznych, całkowite stężenie Zn wewnątrzkomórkowego wynosi około 210 $\mu\text{mol/L}$, natomiast całkowite stężenie w przestrzeni pozakomórkowej około 3 $\mu\text{mol/L}$. Wskazuje to na istnienie w neuronach i komórkach astrocytarnych zależnego od energii wychwytu Zn (Palmiter i Findley, 1995).

Homeostaza Zn^{2+} w neuronach i astrocytach kontrolowana jest dzięki równowadze pomiędzy napływem, wiązaniem i transportowaniem tego kationu do poszczególnych przedziałów komórkowych lub przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Sensi i wsp., 1997; Weiss i wsp., 2000). Metalotioneiny (MT) oraz dwie rodziny transporterów cynkowych: SLC30 (ZnT) i SLC39 (ZRT/IRT-related protein, ZIP) regulują stężenie cynku na poziomie komórkowym. MT są białkami o niskiej masie cząsteczkowej (6-7 kDa), nie zawierającymi aminokwasów aromatycznych, posiadającymi wysokie powinowactwo do jonów Zn^{2+} ($K_{\text{Zn}}=3.2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, pH 7.4). MT w organizmie człowieka zbudowane są z 61-68 aminokwasów, spośród których 20 to reszty cysteiny, tworzące strukturę drugorzędową dwóch domen wiążących łącznie siedem atomów Zn (Mocchegiani i wsp., 2005). MT obecne w ośrodkowym układzie nerwowym, występują w postaci trzech izoform (MT-1, MT-2 i MT-3). Pełnią one funkcję ochronną przed toksycznym działaniem zewnątrzkomórkowego Zn oraz stanowią jego rezerwuar (Hidalgo i wsp., 2001). MT-1 oraz MT-2, syntetyzowane głównie w astrocytach, pełnią funkcję ochroną przed niekorzystnym działaniem interleukin oraz kwasu kainowego (Aschner, 1996). MT-3 syntetyzowana jest wyłącznie w mózgu. W neuronach zawierających cynk (ZEN) pełni ona funkcję detoksykacyjną. Zn uwalniany do szczeliny synaptycznej może poprzez wpływ na opisane receptory i transportery modulować aktywność najpowszechniejszych neuroprzekaźników w mózgu jakimi są L-glutaminian i GABA (Masters i wsp., 1994).

Transportery cynkowe ZnT regulują wypływ Zn z komórki lub jego transport do wnętrza pęcherzyków. Natomiast transportery ZIP pośredniczą w transporcie cynku z przestrzeni pozakomórkowej lub z pęcherzyków do cytoplazmy (Cousins i wsp., 2006; McMahon i Cousins, 1998).

W ludzkim genomie zostało zidentyfikowanych 10 genów kodujących białko ZnT oraz 14 genów kodujących białko ZIP (Huang i Tepasamordech, 2013; Jeong i Eide, 2013). Zmiany w ekspresji transporterów cynkowych to mechanizmy, dzięki którym neurony i astrocyty mogą regulować wielkość wewnątrzkomórkowej puli Zn oraz utrzymywać stężenie wolnego Zn^{2+} w wąskich granicach, optymalnych dla ich wzrostu i przeżycia (Colvin i wsp., 2003). W mózgu wykryto obecność transporterów cynku takich jak: ZnT1, ZnT3, ZnT4, ZnT6, ZnT10 o zróżnicowanej lokalizacji i funkcji.

ZnT1 znajduje się w błonie komórkowej neuronów i astrocytów. Odpowiada on za wyrzut Zn z komórki, reguluje stężenie wewnątrzkomórkowego Zn^{2+} uniemożliwiając nadmierną jego akumulację (Qin i wsp., 2009). Regiony mózgu zawierające synapsy bogate w Zn, wykazują jednocześnie wysoką gęstość ZnT1. Znajdują się one min. w warstwach II/III oraz V kory mózgu, oraz w dendrytach w regionie opuszki węchowej i hipokampa (Sekler i wsp., 2002). Wykazano również, że w astrocytach zwiększenie poziomu białka ZnT1 obniża poziom wewnątrzkomórkowego Zn (McMahon i Cousins, 1998; Nolte i wsp., 2004).

Jony Zn^{2+} są transportowane do pęcherzyków synaptycznych neuronów glutaminianergicznych przy pomocy specyficznego transportera ZnT3 zlokalizowanego w ich błonie. Wysoki poziom białka ZnT3 występuje w hipokampie, ciele migdałowatym i korze mózgowej (Palmiter i wsp., 1996; Wenzel i wsp., 1997). Uważa się, że Zn jest neuronalnym ko-przebieźnikiem i modulatorem transmisji oraz plastyczności synaptycznej mózgu. Dlatego pełni on kluczową rolę w procesach uczenia się i konsolidacji pamięci. Transporter ten poprzez zależną od Zn interakcję z receptorami NMDA, p75, TrkA wpływa również na funkcje poznawcze (Paoletti i wsp., 2009; Smart i wsp., 2004). Wykazano, że myszy pozbawione genu kodującego ZnT3 nie posiadają cynku histochemicznie reaktywnego w pęcherzykach synaptycznych (Frederickson i wsp., 2000). Badania na ludziach wykazały również, że poziom ZnT3 ulega obniżeniu z wiekiem oraz znacząco spada w tkance mózgowej osób z chorobą Alzheimera (Adlard i wsp., 2010).

ZnT4 transportuje Zn do wnętrza endosomów/lizosomów. Z kolei ZnT6 bierze udział w przemieszczeniu Zn cytoplazmatycznego do aparatu Golgiego oraz do pęcherzyków, co może przyczyniać się do magazynowania i/lub zapobiegania toksyczności tego metalu (Huang i Tepasamordech, 2013). ZnT10 zlokalizowany został w aparacie Golgiego ludzkich cholinergicznym komórek neuroblastoma linii SH-SY5Y. Po dodaniu 100 $\mu\text{mol/L}$ Zn, transporter ten ulegał przemieszczeniu do błony komórkowej (Bosomworth i wsp., 2012).

W mózgu wykryto również wewnątrzkomórkowe zasoby Zn, które nie znajdują się w pęcherzykach synaptycznych. W napadzie padaczkowym wywołanym podaniem kwasu kainowego, zaobserwowano akumulację Zn^{2+} w neuronach regionu CA1 oraz CA3 hipokampa myszy z wyciszonym genem *Znt3*, które prowadziło do ich uszkodzenia. Nie ustalono jak dotąd źródła „niepęcherzykowej” puli Zn^{2+} . Badania dowodzą, że białka wiążące cynk oraz zasoby Zn mitochondrialnego w neuronach postsynaptycznych mogą być źródłem cytotoksycznego działania tego kationu (Lee i wsp., 2000).

Neurony glutaminianergiczne tworzą około 50% zakończeń nerwowych mózgu, a stężenie L-glutaminianu w mózgu jest rzędu 10-20 mmol/L. W warunkach fizjologicznego pobudzenia glutaminianergicznych zakończeń nerwowych do szczeliny synaptycznej uwalnia się L-glutaminian i skompleksowany z nim Zn. Stężenie tego kationu w szczeliny synaptycznej osiąga poziomy 10-30 $\mu\text{mol/L}$ (Frederickson i wsp., 2005). Rola sygnalizacyjna cynku synaptycznego polega na hamowaniu lub pobudzaniu różnych klas postsynaptycznych glutaminianergicznych receptorów jonotropowych poprzez specyficzne oddziaływanie Zn^{2+} z ich allosterycznymi miejscami wiązania (Mayer i wsp., 1989). Zn^{2+} wywiera również antagonistyczne działanie na receptor GABA_A (Ruiz i wsp., 2004; Smart, 1992). Hamuje on aktywację receptorów NMDA poprzez dwa mechanizmy: niezależny od napięcia, o wysokim powinowactwie ($\text{IC}_{50} \approx 5 \text{ nmol/L}$) oraz zależny od napięcia o niskim powinowactwie ($\text{IC}_{50} \approx 20 \mu\text{mol/L}$, -40 mV). W pierwszym przypadku Zn^{2+} działa poprzez allosteryczną interakcję z miejscem wiążącym na podjednostce GluN2A. Natomiast w drugim przypadku Zn bezpośrednio blokuje kanał receptora (Mayer i wsp., 1989; Peters i wsp., 1987; Vogt i wsp., 2000). Cynk jest również modulatorem receptorów AMPA oraz KA. W niskich mikromolowych stężeniach Zn zwiększa ich aktywność, natomiast w wyższych – milimolowych hamuje je poprzez bezpośrednią blokadę kanału jonowego (Rassendren i wsp., 1990).

Uwolnienie synaptycznego cynku waha się w zakresie częstotliwości 10-200 Hz, które wymagane jest do wywołania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP). Zatem przemieszczenie cynku może być ważnym sygnałem pośredniczącym w plastyczności synaps (Li i wsp., 2001).

Istnienie złożonych procesów wychwyty i transportu cynku jest niezbędne do utrzymania optymalnego stężenia wolnego cynku w neuronach i astrocytach, gdyż zarówno zbyt niskie jak i zbyt wysokie stężenia tego kationu w komórkach nerwowych mogą prowadzić do ich uszkodzenia (Mocchegiani i wsp., 2005).

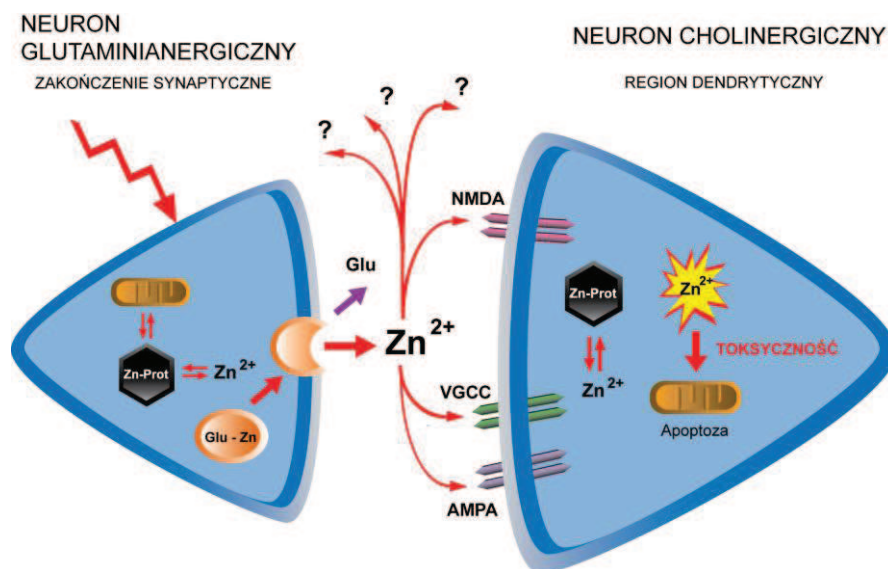
2.1.3 Neurotoksyczność cynku

W warunkach pobudzenia ekscytotoksycznego, wolne jony Zn^{2+} uwalniane są w nadmiernych ilościach wraz z L-glutaminianem z zakończeń glutaminianergicznych do szczeliny synaptycznej. W tych warunkach stężenie Zn w szczeliny synaptycznej może osiągać poziom 300 $\mu\text{mol/L}$ (Assaf i Chung, 1984). Nadmierna akumulacja cynku w warunkach ekscytotoksycznych prowadzi do śmierci zarówno neuronów, jak i astrocytów (E. Y. Kim i wsp., 1999; Ryu i wsp., 2002). W astrocytach toksyczne działanie Zn zaobserwowano przy jego stężeniu 200 $\mu\text{mol/L}$, a 100% śmiertelność przy 300 $\mu\text{mol/L}$ (Nolte i wsp., 2004). Takie zewnątrzkomórkowe stężenie cynku występowało w regionie włókien mszystych po stymulacji ekscytotoksycznej (Assaf i Chung, 1984; Choi i Koh, 1998; Vogt i wsp., 2000). W badaniach *in vitro* wykazano, że komórki neuronalne są bardziej wrażliwe na działanie Zn niż komórki astrocytarne (Choi i Koh, 1998; Choi i wsp., 1988; Dineley i wsp., 2000). Jednakże mechanizmy zróżnicowanej wrażliwości neuronów i astrocytów na cytotoksyczne stężenie Zn nie zostały jak dotąd poznane. Zn uwolniony do szczeliny synaptycznej transportowany jest do neuronów postsynaptycznych przez:

- receptory AMPA przepuszczalne dla jonów Ca i Zn (receptory nie posiadające podjednostki GluR2) (Ryc. 1),
- kanały wapniowe zależne od napięcia (VGCC),
- receptor NMDA oraz wymiennik Na^+/Zn^{2+} (Harrison i Gibbons, 1994; Smart i wsp., 1994) (Ryc. 1).

Badania kinetyki wychwyty Zn wskazują, że istnieją przynajmniej dwa systemy transportu tego metalu działające równolegle. Analiza kinetyki wychwyty metodami Eadie-Scatchard'a i Linewear-Burk'a dała podobne wyniki wskazując na istnienie

układu transportowego o wysokim powinowactwie do Zn i małej pojemności ($K_m=12-18 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}}=5.8-9.2 \text{ ng/mg/h}$) oraz o niskim powinowactwie do tego kationu ($K_m=320-402 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}}=103-113 \text{ ng/mg/h}$) (Howell i wsp., 1984).



Ryc. 1. Hipotetyczny mechanizm toksycznego działania Zn na neurony postsynaptyczne synaps glutaminianergicznnych w warunkach ekscytotoksycznego pobudzenia cholinergicznego (zmodyfikowany wg Colvin 2003)

W stanach patologicznych, takich jak przejściowe niedokrwienie mózgu, niedotlenienie, padaczka, uraz mózgu obserwuje się wzrost stężenia Zn^{2+} w cytosolu komórek, co prowadzi do selektywnej i odroczonej degeneracji komórek mitralnych opuszki węchowej, neuronów piramidalnych kory nowej w warstwie III, V i VI, prążkowie oraz neuronów piramidalnych w obszarze CA1 i CA3 hipokampa (Choi i Koh, 1998; Weiss i wsp., 2000). W wyniku pobudzenia ekscytotoksycznego następuje uwolnienie cynku z metalotionein, powodując wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Zn^{2+} od 10 do 100 nmol/L (Sensi i wsp., 2009).

Nadmiar jonów Zn^{2+} w cytoplazmie komórek neuronalnych może być obniżony poprzez transport i magazynowanie tego kationu w innych przedziałach komórkowych takich jak pęcherzyki presynaptyczne, mitochondria czy lizosomy. Transport jonów Zn^{2+} do macierzy mitochondrialnej może zachodzić poprzez aktywację uniportera wapniowego, co z kolei prowadzi do spadku potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) i zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), doprowadzając do martwiczej degeneracji neuronów

(Kim i wsp., 1999; Sensi i wsp., 2009). Submikromolowe stężenia Zn^{2+} w macierzy mitochondrialnej mogą aktywować powstawanie nieselektywnych megakanałów PTP (ang. permeability transition pores) w wewnętrznej błonie mitochondriów. Ich otwarcie powoduje uwolnienie proapoptotycznych białek mitochondrialnych m.in. cytochromu c i czynnika indukującego apoptozę (AIF) (Jiang i wsp., 2001).

Wewnątrzkomórkowa redystrybucja endogennego cynku może aktywować szlak sygnałowy RAS/ERK/MAPK. Odbywa się ona poprzez zwiększenie przez Zn ekspresji genu *egr-1*, skutkujące wzrostem poziomu ERK1/2, co prowadzi do śmierci neuronów i astrocytów w stanach niedokrwienia mózgu (Liao i wsp., 2011; Park i Koh, 1999).

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cynku w neuronach i astrocytach indukuje również stres oksydacyjny poprzez aktywację błonowej oksydazy NADPH, a następnie kinazy białkowej C (Sensi i wsp., 2009). Ekspozycja na cytotoksyczne stężenie jonów Zn^{2+} zwiększa aktywność neuronalnej syntazy tlenku azotu (NOS). Nadmiar tlenku azotu (NO) może wchodzić w reakcję z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\bullet O_2^-$) tworząc nadtlenoazotyn (ONOO⁻), który jest jednym z bardziej cytotoksycznych wolnych rodników. Indukowany przez Zn^{2+} stres nitrooksydacyjny powoduje uszkodzenie DNA, przyczyniając się do aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP). Prowadzi to do zmniejszenia zasobów NAD^+ , zahamowania syntezy i obniżenia poziomu ATP co wywołuje nekrotyczną śmierć neuronów (Kim i Koh, 2002).

Nadmierna akumulacja cynku w astrocytach również powoduje zwiększenie stresu oksydacyjnego i/lub zmniejszenie ochrony antyoksydacyjnej poprzez obniżenie poziomu glutationu (GSH), z jednoczesnym wzrostem GSSG, co prowadzi do śmierci tych komórek (Ryu i wsp., 2002). Wykazano, że cynk hamuje reduktazę glutationu (GR, EC 1.8.1.7) i peroksydazę glutationową (GPx, EC 1.11.1.9), główne enzymy odpowiedzialne za mechanizmy obronny antyoksydacyjnej w astrocytach (Bishop i wsp., 2007; Ryu i wsp., 2002). Reduktaza glutationu jest flawoproteina, która wykorzystuje NADPH jak substrat do redukcji GSSG, zapewniając utrzymanie prawidłowego wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu (GSH). Natomiast główna funkcja GPx to redukcja nadtlenu wodoru oraz nadtlenu organicznych (Bishop i wsp., 2007).

W neuronach hipokampa Zn zwiększa poziom 4-hydroksynonenalu (HNE) w lizosomach, co z kolei indukuje wzrost przepuszczalności błony lizosomalnej.

W wyniku tego procesu do cytoplazmy zostają uwolnione między innymi Zn^{2+} oraz enzym lizosomalny katepsyna D. Mechanizm ten może odgrywać istotną rolę w oksydacyjnej śmierci neuronów *in vivo*. Wykazano, iż dodanie TPEN związku chelatującego HNE całkowicie blokowało zarówno jego akumulację, jak i śmierć neuronów (Hwang i wsp., 2008). Podobny działanie TPEN obserwowano również w astrocytach (Lee i wsp., 2009).

Cytotoksyczne stężenia zewnątrzkomórkowego Zn^{2+} indukowały apoptozę neuronów poprzez zwiększenie wydzielania czynnika wzrostu nerwów (NGF), który poprzez wiązanie z receptorem p75 o niskim powinowactwie ($p75^{NTR}$) i z związaną z $p75^{NTR}$ domeną śmierci (NADE), powodował aktywację kinazy c-Jun N-końcowej (JNK), NF- λ B i kaspaz (Park i wsp., 2000). Dokomorowe podanie EDTA przed podaniem kwasu kainowego zapobiegało zależnym od Zn^{2+} neurotoksycznym skutkom napadu padaczkowego (Yi i wsp., 2003).

Jony Zn^{2+} poprzez redukcję NAD^+ w cytoplazmie zmniejszają wydajność szlaku glikolitycznego na etapie dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego. Prowadzi to do zahamowania syntezy pirogronianu, a w efekcie do obniżenia poziomu ATP i nekrozy neuronów (Sheline i wsp., 2000).

Zwiększone stężenie Zn^{2+} w mitochondriach może indukować produkcję ROS poprzez zahamowanie aktywności kompleksów I i III łańcucha oddechowego (Dineley i wsp., 2003). Zn może również hamować dehydrogenazę dihydrolipoamidową (LADH, podjednostka E3) kompleksów dehydrogenazy pirogronianowej i α -ketoglutaranowej, co prowadzi do zahamowania przepływu metabolicznego w cyklu kwasów trójkarboksylowych i spadku produkcji energii (Gazaryan i wsp., 2002).

Wykazano również, że akumulacja Zn w neuronalnych komórkach cholinergicznym przegrody mózgu myszy hamowała aktywności dehydrogenazy pirogronianowej dehydrogenazy α -ketoglutaranowej, akonitazy oraz dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (Ronowska i wsp., 2010, 2007). Prowadziło to do obniżenia poziomu acetylo-CoA i ATP oraz zahamowanie neuroprzebieżnictwa acetylocholinergicznego w tych neuronach (Ronowska i wsp., 2007; Szutowicz i wsp., 2013).

Przedstawione dane literaturowe wskazują, że wzrost stężenia Zn i/lub jego nieprawidłowa redystrybucja w neuronach i astrocytach mogą być jedną z przyczyn

ich uszkodzenia w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Kawahara i wsp., 2013; Ronowska i wsp., 2007; Sensi i wsp., 2009; Szutowicz i wsp., 2013).

2.2 Neurony cholinergiczne, charakterystyka i rola w OUN

Neurony cholinergiczne stanowią 1% wszystkich komórek nerwowych mózgu oraz tworzą w zależności od regionu do 10% zakończeń nerwowych (Richardson, 1981). Ich charakterystyczną cechą jest zdolność do syntezy neuroprzekaźnika-acetylocholino (ACh), jej akumulacji w pęcherzykach synaptycznych oraz kwantowego wydzielania z presynaptycznych zakończeń nerwowych do szczeliny synaptycznej (Fonnum, 1975).

Neurony cholinergiczne charakteryzują się obecnością markerów cholinergicznych takich jak:

- acetylotransferaza cholinowa (ChAT, EC 2.3.1.6), enzym syntetyzujący ACh
- układ wychwytu o wysokim powinowactwie do choliny dostarczający ją do miejsca syntezy ACh
- transporter pęcherzykowy ACh (VACHT) akumulujący ten neuroprzekaźnik w pęcherzykach synaptycznych (Sarter i Parikh, 2005).

Neurony cholinergiczne odpowiedzialne za funkcje poznawcze u zwierząt i u człowieka zlokalizowane są w przegrodzie mózgu (*septum*) w jądrach podstawy Meynerta przodomózgowia, paśmie ukośnym Broca i środkowym przegrody. Znajdujące się w nich neurony, to główne źródło projekcji cholinergicznych do kory mózgu i hipokampa. Odgrywają one istotną rolę w formowaniu pamięci krótko- i długoterminowej, oraz funkcjach kojarzeniowych i poznawczych (Mesulam, 1995). ACh syntetyzowana jest w cytoplazmie cholinergicznych zakończeń nerwowych z choliny i acetylo-CoA w reakcji katalizowanej przez ChAT. W warunkach spoczynkowych występuje równowaga pomiędzy cytoplazmatycznym poziomem ACh i pulą pęcherzykową tego neuroprzekaźnika. W warunkach depolaryzacji następuje fuzja pęcherzyków z błoną presynaptyczną i wydzielenie ACh, co prowadzi do zmiany stałej równowagi dla reakcji ChAT i stymulacji syntezy neuroprzekaźnika. Zawartość ACh w cholinergicznych zakończeniach nerwowych utrzymuje się na dość stabilnym poziomie, pomimo znacznych zmian w ich aktywności (Szutowicz i wsp., 1996; Tucek, 1993). Aktywność acetylotransferazy cholinowej w neuronach cholinergicznych jest wystarczająco wysoka, aby zapobiec

wyczerpaniu ACh w trakcie ich zwiększonej aktywności, pod warunkiem zabezpieczenia podaży substratów reakcji (Szutowicz i wsp. 1996).

Szybkość syntezy ACh w warunkach depolaryzacji zakończeń nerwowych może być regulowana zarówno przez poziom białka ChAT, jak i dostępność substratów. Poziomy białek ChAT i VAcHT zależą od ekspresji genów *Chat* i *VAcHT* zajmujących wspólne *locus* cholinergiczne pozostające pod kontrolą promotorów aktywowanych przez CREB i kwas *all-trans* retinowy (RA) (Eiden, 1998).

Ważnym czynnikiem wpływającym na wydajność przekaźnictwa cholinergicznego jest dostępność choliny, której transport odbywa się przy udziale specyficznego układu transportowego o wysokim do niej powinowactwie (Sorimachi i Kataoka, 1975). Depolaryzacja neuronów prowadzi do inhibicji tego transportu, a następnie zahamowania syntezy ACh, co uważa się za jeden z czynników zwiększających podatność neuronów cholinergicznym na neurodegenerację (Blusztajn i Wurtman, 1983).

Drugim, niezbędnym substratem do syntezy ACh jest acetylo-CoA. W neuronach cholinergicznym źródłem reszt acetylowych do syntezy tego neuroprzekaźnika jest acetylo-CoA, powstający w reakcji utleniania pirogronianu w mitochondriach. Błona mitochondrialna komórek neuronalnych jest nieprzepuszczalna dla CoA i jego acetylowych pochodnych. Dlatego ich transport przez błonę mitochondrialną odbywa się z udziałem metabolitów pośrednich (Srere, 1965; Szutowicz i Lysiak, 1980). Wykazano obecność kilku równoległych dróg przezbłonowego transportu acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy.

Jedną z nich jest transport pośredni za pomocą cytrynianu. W mitochondriach acetylo-CoA metabolizowany jest przez syntazę cytrynianową (EC 2.3.3.1) do cytrynianu, który następnie poprzez wymianę z L-jabłczanem transportowany jest do cytoplazmy. W cytoplazmie z cytrynianu w reakcji katalizowanej przez liazę ATP-cytrynianową (ACL, EC 2.3.3.8) następuje odtworzenie acetylo-CoA i szczawiooctanu (Szutowicz i wsp., 1981a, 1977). Aktywność liazы ATP-cytrynianowej (ACL) w neuronach cholinergicznym jest w przybliżeniu 10-krotnie wyższa niż w neuronach niecholinergicznym (Szutowicz, 1978). W mózgu około 30% reszt acetylowych do syntezy acetylocholinы jest dostarczane za pośrednictwem tej drogi (Bielarczyk i Szutowicz, 1989). Nasze badania wykazały również istnienie bezpośredniego transportu acetylo-CoA do cytoplazmy za pośrednictwem kanałów hydrofilowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej aktywowanych

przez wapń i depolaryzację (Bielarczyk i Szutowicz, 1989). Do innych metabolitów pośrednich uczestniczących w przenoszeniu reszt acetylowych do cytoplazmy należą acetylo-L-karnityna oraz octan (Carroll, 1997; Rícný i wsp., 1992; Tucek, 1985). Wydaje się, że nie mają one większego znaczenia dla syntezy tego neuroprzekaźnika w mózgach ssaków.

W stanach depolaryzacji zakończeń nerwowych synteza ACh może wykorzystywać kilka procent puli acetylo-CoA syntetyzowanego w mitochondriach. Mitochondrialna synteza i transport acetylo-CoA do cytoplazmy odgrywa istotną rolę w zachowaniu funkcji neuroprzekaźniczych neuronów cholinergicznym. Z badań pośmiertnych wynika, że w chorobie Alzheimera spadkowi liczby tych neuronów, w dotkniętych zmianami regionach mózgu, towarzyszyło proporcjonalne obniżenie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej i liazy ATP-cytrynianowej (Sheu i wsp., 1985; Szutowicz i wsp., 1996).

2.3 Astrocyty, charakterystyka i rola w OUN

Komórki glejocytarne znajdują się w ścisłym związkach strukturalnych i funkcjonalnych z komórkami neuronalnymi. Zostały one scharakteryzowane po raz pierwszy przez Rudolfa Virchowa, który opisywał je jako materiał wypełniający przestrzeń między elementami nerwowymi używając sformułowania „Nervenkitz” czyli dosłownie „klej nerwów” (Virchow, 1846). Do komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego należą astrocyty, komórki wyściółki (ependymocyty), komórki gleju skąpowypustkowego (oligodendrocyty) i komórki mikrogleju. Komórki neuronalne obwodowego układu nerwowego są otoczone przez komórki glejowe zwojów (komórki płaszczkowe) i limfocyty (komórki Schwanna) (Narkiewicz, 2007).

Astrocyty stanowią ponad 50% populacji komórek glejowych w korze mózgowej (Montgomery, 1994). Astrocyty to wyspecjalizowane, gwiaździste komórki tkanki glejowej (8-15 μm) o licznych rozgałęzionych i promienistych wypustkach. Ich liczba dziesięciokrotnie przewyższa liczbę neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym (Montgomery, 1994). Astrocyty mają duże kuliste jądro oraz dość liczne mitochondria w cytoplazmie. Swoimi wypustkami cytoplazmatycznymi stykają się one na znacznej przestrzeni z komórkami nerwowymi, natomiast zakończeniami oplatają naczynia krwionośne, tworząc graniczną błonę glejową okołonaczyniową (Narkiewicz, 2007).

W ośrodkowym układzie nerwowym rozróżnia się astrocyty protoplazmatyczne występujące w istocie szarej, z wieloma drobnymi wypustkami (<50 μm), zróżnicowane pod względem budowy i funkcji oraz astrocyty włókniste znajdujące się głównie w istocie białej, posiadające długie wypustki (do 300 μm) (Kettenmann i Ransom, 2005). Wypustki astrocytów protoplazmatycznych przylegają do perikarionów neuronów, ścian naczyń krwionośnych oraz opony miękkiej tworząc tzw. stopki końcowe (ang. endfeet) (Kettenmann i Ransom, 2005). Kwaśne białko włóknikowe (GFAP) i białko S100 β (cytosolowe białko wiążące Ca^{2+}) są powszechnie stosowane jako markery astrocytów (Ludwin i wsp., 1976). GFAP to specyficzne białko filamentów pośrednich, którego ekspresja jest niezbędna dla zachowania prawidłowych funkcji astrocytów włóknistych obejmujących utrzymanie istoty białej OUN oraz integralności bariery krew-mózg. Białko to bierze również udział w procesie reaktywnej astrogliozy i tworzeniu blizn glejowych (Chen i Swanson, 2003).

2.3.1 Funkcje astrocytów w OUN

Astrocyty z powodu liczebności i powiązań z innymi elementami komórkowymi takimi jak endotelium naczyń krwionośnych, różne części wielu typów neuronów, odgrywają różnorodną i ważną rolę w rozwoju oraz prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego (Montgomery, 1994; Sofroniew i Vinters, 2010).

W rozwijającym się mózgu, we wczesnych stadiach embriogenezy, rozgałęzione, prostoliniowe włókna komórek gleju promienistego (ang. radial glial cells) zapewniają migrację młodych neuronów z miejsca ich powstania w strefie przykomorowej do ich docelowego położenia w płycie korowej (Gasser i Hatten, 1990). Komórki gleju promienistego jako pierwsze rozwijają się z neuronalnych komórek progenitorowych, a badania immunocytochemiczne wykazują obecność białek filamentów pośrednich m.in. GFAP, wimentyny i nestyny w ich włóknach. W wyniku dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego, po zakończonej migracji neuronów komórki te tracą wimentynę i nestynę i różnicują się w dojrzałe astrocyty (Kettenmann i Ransom, 2005).

Astrocyty odgrywają również ważną rolę w powstawaniu i utrzymaniu bariery krew-mózg. Uważa się, że są one odpowiedzialne za powstawanie szczelnych połączeń pomiędzy komórkami śródbłonna (Montgomery, 1994). Komórki mogą również

modyfikować właściwości transportowe komórek śródbłonna w mózgu poprzez wydzielenie czynników zwiększających wydajność transportu glukozy (Maxwell i wsp., 1989).

Glej astrocytarny pełni funkcję tkanki podporowej ośrodkowego układu nerwowego. Szacuje się, że w hipokampie i korze mózgowej wiele drobnych rozgałęzień jednego astrocyta może kontaktować się z kilkuset dendrytami wielu neuronów i otaczać 100.000 lub więcej synaps (Sofroniew i Vinters, 2010).

Komórki astrocytarne wydzielają glikoproteiny macierzy pozakomórkowej lamininę, fibronektynę, cytotaktynę J1, które biorą udział w rozwoju embrionalnym mózgu i w procesach naprawczych OUN po zranieniach oraz pośredniczą w interakcji neuron-astrocyt (Montgomery, 1994). Komórki te odgrywają również ważną rolę w powstawaniu i wydłużaniu neurytów poprzez wydzielanie czynników neurotropowych (NGF, BDNF, czynnik wzrostu pochodzenia glejowego (GDNF)), białka S-100 β , lamininy lub poprzez swoją fizyczną obecność (Prochiantz i Mallat, 1988).

Astrocyty utrzymują homeostazę jonową w mózgu, kontrolując stężenie H⁺, K⁺, Na⁺ w szczelinie synaptycznej oraz regulują przepływ wody z udziałem kanału aquaporyny-4 zlokalizowanego w błonie stopek końcowych (Aoyama i wsp., 2012; Montgomery, 1994). Komórki astrocytarne biorą udział w aktywnym buforowaniu jonów potasu podczas ekscytotoksycznego pobudzenia neuronów (Leis i wsp., 2005). Astrocyty usuwają nadmiar pozakomórkowego K⁺ poprzez "przestrzenne buforowanie" (Leis i wsp., 2005). Komórki te zmniejszają również zewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasowych przez zwiększenie aktywności Na⁺/K⁺-ATP-azy (Leis i wsp., 2005).

Badania wykazały, że fale wapniowe mogą rozchodzić się w sieci utworzonej przez astrocyty w neutrofilu (astrocytic syncytium) przez połączenia szczelinowe, co wskazuje na istnienie niesynaptycznego systemu przekaźnictwa w mózgu (Cornell-Bell i wsp., 1990). Komórki astrocytarne mogą jednocześnie przetwarzać i integrować informacje z wielu synaps, odbierać informacje o składzie przestrzeni pozakomórkowej i w naczyniach krwionośnych. Dlatego komórki te pomimo niezdolności do przewodzenia potencjału czynnościowego, mogą pełnić integracyjną rolę w funkcjonowaniu mózgu (Perea i Araque, 2005). I tak, pełnią one rolę modulatora w przekaźnictwie synaptycznym, reagując na wzrost wewnątrzastrocytarnego stężenia Ca²⁺ czy aktywację neuronalną poprzez

niekwantowe uwalnianie substancji neuroprzekąźnikowych takich jak: ATP, adenozyne, GABA, D-seryna (Sofroniew i Vinters, 2010).

Astrocyty odgrywają kluczową rolę w metabolizmie amoniaku powstającego w procesie amidacji glutaminianu do glutaminy z udziałem syntetazy glutaminowej (EC 6.3.1.2), zapobiegając nagromadzeniu się tych jonów, których nadmiar jest szczególnie toksyczny dla OUN (Cooper i Plum, 1987). Obraz histopatologiczny mózgu w przewlekłej encefalopatii wątrobowej (EW) charakteryzuje się zmianami morfologicznymi takimi jak przerost cytoplazmy w astrocytach, powiększone nagie jądra komórkowe z chromatyną zlokalizowaną na obwodzie. Z kolei ostrą postać tej choroby cechuje obrzęk astrocytów prowadzący do upośledzenia ich metabolizmu (Norenberg, 1987). Sugeruje się, że to akumulacja glutaminy powoduje obrzęk komórek astrocytarnych prowadzący do obrzęku mózgu w przebiegu hiperamonemii (Albrecht i Dolińska, 2001).

Detoksykacyjna rola komórek astrocytarnych polega także na zdolności wychwytu i metabolizmu neurotransmitera pobudzającego - glutaminianu. Zapobiega to powstawaniu ekcytotoksycznych stężeń tego aminokwasu w szczelinie synaptycznej (Waagepetersen i wsp., 2007). Komórki astrocytarne zawierają również białka wiążące metale (MT-I i MT-II), zaangażowane w sekwestrację istotnych ilości Zn^{2+} . Dzięki temu, powyższe białka pełnią funkcję ochronną wobec astrocytów, które wychwytyują Zn^{2+} ze szczeliny synaptycznej (Aschner, 1996).

2.3.2 Metabolizm energetyczny astrocytów

W warunkach fizjologicznych głównym źródłem energii dla wszystkich komórek ośrodkowego układu nerwowego, w tym astrocytów jest glukoza. Substrat ten jest transportowany do przestrzeni pozakomórkowej mózgu przez transportery GLUT 1 (izoforma 55 kDa) zlokalizowane w śródbłonku naczyniowym. Astrocyty wychwytyują glukozę za pośrednictwem transporterów GLUT1 (izoforma 45 kDa) zlokalizowanych na ich wypustkach końcowych (Lee i wsp., 2000). W astrocytach glukoza przy udziale heksokinazy jest fosforylowana do glukozo-6-fosforanu, a następnie ulega glikolitycznej przemianie do pirogronianu, który po przetransportowaniu do mitochondriów przekształcany jest do acetylo-CoA w reakcji dekarboksylacji oksydacyjnej. Proces ten katalizowany jest przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; dehydrogenaza pirogronianowa, E1, EC 1.2.4.1; acetylotransferaza dihydroliponianowa, E2, EC 2.3.1.12; dehydrogenaza

dihydroliponianowa, E3, EC 1.8.1.4). Pirogronian może również ulegać przekształceniu w szczawiooctan w reakcji anaplerotycznej z udziałem karboksylazy pirogronianowej (PC, EC 6.4.1.1), enzymu obecnego wyłącznie w astrocytach (Shank i wsp., 1985). Szczawiooctan w reakcji katalizowanej przez syntazę cytrynianową (EC 2.3.3.1) ulega kondensacji z acetylo-CoA do cytrynianu, który wchodzi w cykl kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa, TCA). Jednym z metabolitów pośrednich tego cyklu jest α -ketoglutaran ulegający częściowo przemianie do glutaminianu zarówno w astrocytach, jak i neuronach (Hertz i Kala, 2007).

Przy wysokich stężeniach glukozy w płynie pozakomórkowym, astrocyty magazynują ją w postaci ziaren glikogenu, który może ulec natychmiastowemu przekształceniu do glukozy w hipoglikemii, niedokrwieniu lub w okresie zwiększonego zapotrzebowania energetycznego neuronów (Brown i Ransom, 2007). W warunkach hipoksji lub w innych stanach patologicznych powodujących wzmożoną depolaryzację neuronów, aktywacja glikolizy lub/i glikogenolizy w astrocytach prowadzi do powstawania mleczanu, który stanowi substrat energetyczny dla neuronów. Mleczan uwalniany jest z astrocytów przez transportery MCT1 i MCT4 do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, skąd wychwytywany jest przez neurony przy udziale MCT2, a następnie utleniany do pirogronianu, co w konsekwencji prowadzi do powstawania cząsteczek ATP (Benarroch, 2005; Pellerin i wsp., 1998). Należy jednak podkreślić, że mleczan nie jest w stanie całkowicie pokryć zapotrzebowania energetycznego neuronów (Wyss i wsp., 2011).

2.3.3 Przepływ metaboliczny między astrocytami a neuronami

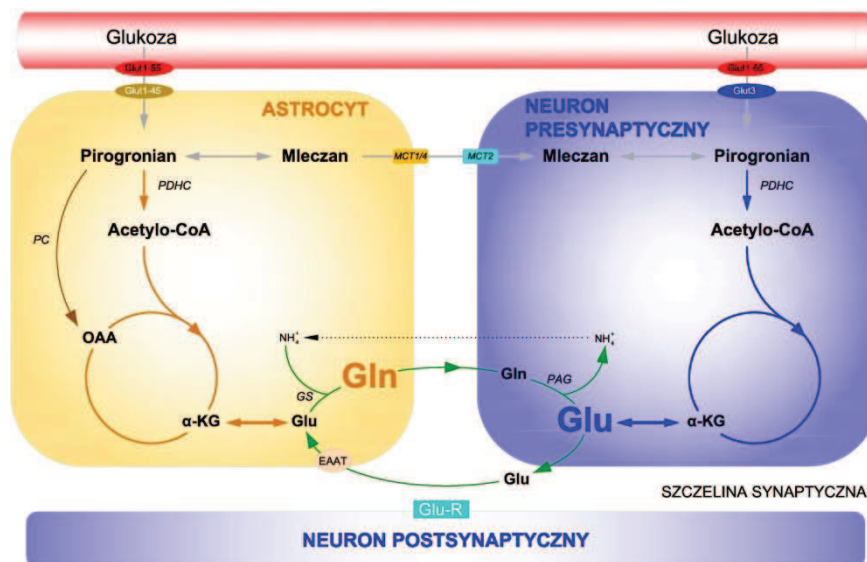
Astrocyty regulują syntezę, wydzielanie i wychwyt neuroprzekaźników takich jak: glutaminian, glutamina oraz GABA (Bak i wsp., 2006). Neuroprzekaźnictwo glutaminianergiczne obejmuje procesy kosztowne energetycznie związane z akumulacją glutaminianu do pęcherzyków presynaptycznych, jego uwolnienie z puli neuroprzekaźnikowej, następnie wychwyt przez astrocyty i metabolizm do glutaminy, która transportowana jest z powrotem do neuronów. Procesy te zużywają 3% całkowitej puli ATP potrzebnej do odtwarzania i utrzymania potencjału błonowego w neuronach OUN (Attwell i Laughlin, 2001).

Astrocyty są głównym źródłem glutaminianu w mózgu. Synteza *de novo*, tego metabolitu odbywa się dzięki obecności w astrogleju karboksylazy pirogronianowej

metabolizującej pirogronian do szczwiooctanu, który w cyklu kwasów trójkarboksylowych ulega przemianie do α -ketoglutaranu. Część puli tego metabolitu jest w astrocytach przekształcana do glutaminianu przez dehydrogenazę glutaminianową. Glutaminian ulega następnie przemianie do glutaminy z równoczesną asymilacją amoniaku w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową (EC 6.3.1.2). Z kolei L-glutamina, po wydzieleniu poprzez błonowe transportery SN-1 do przestrzeni międzykomórkowej jest wychwytywana przez neurony glutaminianergiczne, za pośrednictwem transporterów SAT-2, i wykorzystywana do resyntezy glutaminianu w procesie deaminacji z udziałem neuronalnej, glutaminazy mitochondrialnej, aktywowanej fosforanem (EC 3.5.1.2) (Coulter i Eid, 2012; Hertz i wsp., 1999; Waagepetersen i wsp., 2007) (Ryc. 2).

Neurony glutaminianergiczne tworzą około 50% synaps w mózgu. W tych neuronach L-glutaminian może być magazynowany w pęcherzykach synaptosomalnych, dzięki czemu pełni rolę podstawowego neuroprzekaźnika w mózgu. Z kolei w neuronach GABA-ergicznych L-glutaminian jest substratem do syntezy neurotransmitera GABA z udziałem dekarboksylazy glutaminianowej (GAD, EC 4.1.1.15) (Bak i wsp., 2006).

W wyniku depolaryzacji neuronów glutaminianergicznych następuje wydzielenie do i wzrost stężenia L-glutaminianu w szczelinie synaptycznej, który następnie jest wychwytywany przez neurony postsynaptyczne i/lub astrocyty. Transport glutaminianu do wnętrza astrocytów zachodzi przy udziale Na^+ -zależnych transporterów GLAST (EAAT1) i GLT-1 (EAAT2). Glutaminian w komórkach astrocytarnych może być również przekształcony w substrat energetyczny, α -ketoglutaran w reakcji deaminacji oksydacyjnej przy udziale dehydrogenazy glutaminianowej (GDH, EC 1.4.1.2) lub transaminacji (aminotransferaza asparaginianowa, AST, EC 2.6.1.1) (Van den Berg i wsp., 1969; Waagepetersen i wsp., 2007). Z α -ketoglutaranu w dalszych procesach cyklu kwasów trójkarboksylowych powstaje jabłczan, który następnie transportowany jest do cytoplazmy. W astrocytach NADP-zależny cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy (c-NADP-ME, EC 1.1.1.40) w reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji przekształca jabłczan do pirogronianu, który jest następnie utleniany w cyklu TCA (Kurz i wsp., 1993; McKenna i wsp., 1995).



Ryc. 2. Model przepływu metabolicznego i cyklu glutaminian-glutamina między neuronami i astrocytami (zmodyfikowany wg Escartin 2006). Skróty: α -KG- α -ketoglutaran, EAAT-transporter glutaminianu, Gln-glutamina, Glu-glutaminian, Glu-R-receptory glutaminianergiczne, GS-syntetaza glutaminowa, GLUT1-45, GLUT1-55-transporter glukozy typ 1, GLUT3-transporter glukozy typ 3, MCT-transporter kwasów jednokarboksylowych, OAA-szczawiooctan, PAG-glutaminaza aktywowana fosforanem, PC-karboksylaza pirogronianowa, PDHC-kompleks dehydrogenazy pirogronianowej

Konwersja glutaminianu do glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminy stanowi podstawowy mechanizm detoksykacji amoniaku w mózgu (Cooper i Plum, 1987). Wszystkie genetycznie uwarunkowane defekty cyklu mocznikowego prowadzą do zwiększonego stężenia jonu amonowego (Brusilow i Horwich, 1995). Nie wiadomo, jak dotąd, dlaczego wysokie stężenia tego jonu są dla człowieka toksyczne. Jedną z możliwości jest zwiększone stężenie glutaminy, powstającej z NH_4^+ i glutaminianu, które wywołuje efekt osmotyczny bezpośrednio prowadzący do obrzęku mózgu (Brusilow, 2002). Albrecht i Norenberg sformułowali hipotezę „konia trojańskiego” iż w neurotoksyczności amoniaku pośredniczy glutamina. Glutamina powstająca w nadmiarze jako produkt detoksykacji amoniaku, ulega w mitochondriach rozkładowi do glutaminianu i amoniaku przez astrocytarną glutaminazę, aktywowaną fosforanem (EC 3.5.1.2). Według tej hipotezy amoniak generowany w mitochondriach przyczynia się bezpośrednio do upośledzenia metabolizmu energetycznego komórek astrocytarnych (Albrecht i Norenberg, 2006; Hertz i Kala, 2007).

Przez wiele dziesięcioleci po ich odkryciu, rola astrocytów w mózgu była niedoceniana. Ostatnie dwadzieścia lat przyniosło szereg odkryć wskazujących na istotną rolę tej grupy komórek w metabolizmie mózgu (Volterra i Meldolesi, 2005). Dzisiaj wiadomo, że zaburzenia prowadzące do dysfunkcji astrocytów i/lub interakcji neuron-astroglej odgrywają kluczową rolę w wielu chorobach neurologicznych i neurodegeneracyjnych takich jak stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera (Escartin i wsp., 2006).

2.4 Choroba Alzheimera (AD)

Choroba Alzheimera jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, o postępującym przebiegu, powodującym nasilające się z czasem zaburzenia pamięci i upośledzenie zdolności poznawczych, spowodowane stopniową utratą neuronów przegrody mózgu, kory śródwęchowej oraz hipokampa (Castellani i wsp., 2010). AD jest najczęściej występującą encefalopatią wieku podeszłego, uważaną za przyczynę 60 do 80 % przypadków otępień starczych. Liczbę chorych na AD na świecie szacuje się na 15 – 29 milionów, w Polsce na ok. 350 tysięcy. Istnieją zarówno sporadyczne, jak i genetycznie uwarunkowane postaci tej choroby. Około 1% przypadków choroby Alzheimera ma charakter rodzinny, uwarunkowany genetycznie, pojawiający się we wczesnym wieku. Przyczyną tej postaci choroby mogą być autosomalne, dominujące mutacje genu *APP* na chromosomie 21, genu *PSEN1* na chromosomie 14 oraz *PSEN2* na chromosomie 1. Konsekwencją tych mutacji jest zwiększenie wytwarzania amyloidu β 1-42 przez neurony i inne komórki mózgu, który następnie odkłada się w postaci złogów amyloidowych w przestrzeniach międzykomórkowych tkanki i ścian naczyń mózgu. Najważniejszym czynnikiem etiopatogenetycznym sporadycznej postaci AD jest wiek, i związane z nim narastające wielokierunkowe uszkodzenia komórek mózgu. Częstość jej występowania wzrasta z wiekiem, od kilku procent na początku ósmej dekady do 24-46% w populacji ludzi po 85 roku życia (Castellani i wsp., 2010). Jednym z najistotniejszych czynników ryzyka rozwoju późnej postaci AD jest występowanie jednego z allelu genu *ApoE* ϵ 4 na chromosomie 19 kodującego białko osocza, biorące udział w transporcie cholesterolu, wytwarzane i wydzielane w układzie nerwowym przez astrocyty. W chorobie Alzheimera apo-E ϵ 4 wiąże się z pozakomórkowymi płytkami starczymi, wewnątrzkomórkowymi zwłóknieniami

neurofibryli i miejscami kongofiliowej angiopatii naczyń mózgowych (Namba i wsp., 1991).

Błaszki starcze, zwyrodnienia neurofibrylarne, dystroficzne neuryty, utrata neuronów korowych i synaps, zaktywowane astrocyty i mikroglej wokół złogów amyloidowych to zmiany histopatologiczne, które występują zarówno w sporadycznej, jak i rodzinnej postaci choroby Alzheimera (Li i wsp., 2007). Podstawowymi składnikami wchodzącymi w skład rdzenia blaszek starczych są peptydy β -A42/43, które powstają przez proteolizę przezłonowego białka prekursorowego amyloidu- β (APP). Mają one zdolność tworzenia pozakomórkowych, włóknkowatych złogów amyloidowych (Sisodia i Price, 1995). Udowodniono, że stosunek A β 42:A β 40 w osoczu może być wczesnym wskaźnikiem predykcyjnym rozwoju sporadycznej AD (Koyama i wsp., 2012).

Drugą charakterystyczną zmianą histopatologiczną występującą w mózgach z AD są wewnątrzneuronalne zwyrodnienia neurofibrylarne składające się z parzystych, spiralnie skręconych filamentów (PHF), w których głównym składnikiem jest ufosforylowane białko tau. Do hiperfosforylacji tau dochodzi w wyniku aktywacji cyklino-zależnej kinazy (Cdk5) oraz kinazy syntazy glikogenu (GSK3 β). Konsekwencją tego procesu jest osłabienie wiązania białka tau z tubuliną, co prowadzi do rozerwania cytoszkieletu, zaniku transportu aksonalnego, a następnie śmierci neuronów. Zmiany te dominują w korze śródwęchowej, hipokampie, zakręcie zębatym i ciele migdałowatym (Kosik i wsp., 1986).

W przebiegu AD może dochodzić do utraty do około 30% zakończeń synaptycznych w III i V warstwie kory czołowej, skroniowej i ciemieniowej. Wykazano znaczącą korelację między spadkiem liczby synaps i nasileniem otępienia w przypadkach umiejscowienia zmian w korze czołowej (Samuel i wsp., 1994; Scheff i Price, 2006). W 1982 roku Whitehouse i wsp. stwierdzili selektywną (>70%) degenerację neuronów cholinergicznym u pacjentów z AD (Castellani i wsp., 2010; Whitehouse i wsp., 1982). Utrata neuronów w obrębie jąder podstawnych Meynerta oraz jądra pnia mózgu (miejsce sinawe) prowadzi do spadku poziomu markerów cholinergicznym i noradrenergicznym (Nestor i wsp., 2004). W AD dochodzi do obniżenia aktywności ChAT, co prowadzi do zmniejszenia syntezy i uwalniania acetylocholinym w mózgu (Gibson i Peterson, 1981; Gil-Bea i wsp., 2005). Dysfunkcję cholinergiczną uznaje się za główną przyczynę zaburzeń pamięci i funkcji poznawczych w tej chorobie.

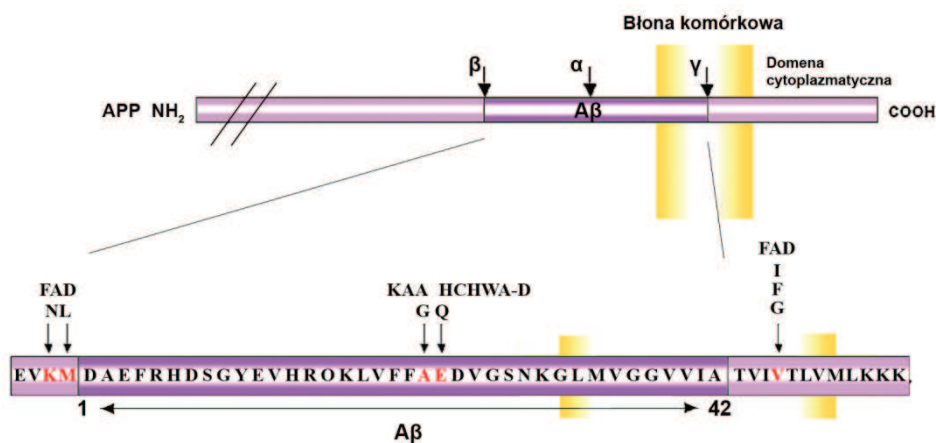
W badaniach pośmiertnych mózgu osób cierpiących na AD stwierdzono, że stopień utraty markerów cholinergiczných korelował dodatnio ze stopniem otępienia występującym przez śmiercią tych pacjentów (Bierer i wsp., 1995; Gil-Bea i wsp., 2005).

W AD dochodzi również do zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego w mózgu, co udowodniono w pośmiertnych badaniach tych chorych. Analizy badań z użyciem mikroskopii elektronowej ujawniły znaczące zmiany morfologiczne mitochondriów w komórkach Purkiniego i włóknach mszystych kory mózdzku, w neuronach wzgórza, gałki bladej, jądra czerwienego, jądra przedstonkowego i miejsca sinawego jak również w ciałach astrocytów, wypustkach astrocytarnych okołonaczyniowych i osłonkach astrocytarnych (Baloyannis, 2006). W tkankach mózgowych pobranych po śmierci pacjentów z rozpoznaną *ante mortem* AD, stwierdzono również spadek aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC), dehydrogenazy α -ketoglutaranowej (KDH) oraz dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH) i akonitazy (Bubber i wsp., 2005; Sheu i wsp., 1985). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że spadek aktywności PDHC powoduje inhibicję syntezy acetylo-CoA, co wraz z obniżoną aktywnością ChAT powoduje zahamowanie syntezy ACh (Szutowicz i wsp., 1996). Nasze badania wykazały, że patogeny alzheimerowskie takie jak: wysokie stężenia Zn lub NO wywołują podobne zmiany aktywności tych enzymów w hodowlach neuronalnych komórek cholinergiczných SN56 (Bielarczyk i wsp., 2003a; Ronowska i wsp., 2007; Szutowicz i wsp., 2013). Wskazują one również, że szczególna wrażliwość neuronów cholinergiczných na czynniki cytotoksyczne, może wynikać z faktu, że neurony te wykorzystują acetylo-CoA, zarówno do produkcji energii w cyklu kwasów trójkarboksylowych, jak i do syntezy acetylocholin. Niedobory tego metabolitu w stanach ekscytotoksycznego pobudzenia neuronalnego mogą być jednym z czynników odpowiedzialnych za zahamowanie neuroprzeżyźnictwa i uszkodzenie neuronów cholinergiczných (Szutowicz i wsp., 2013, 1996).

2.4.1 Amyloid- β

Złogi amyloidowe w przestrzeniach międzykomórkowych kory nowej i ścian naczyń mózgowych są charakterystycznym elementem zmian histopatologiczných w AD (Sisodia i Price, 1995). Głównym ich składnikiem jest 39-43 aminokwasowe peptydy amyloidu β (A- β), które powstają w wyniku proteolizy białka

prekursorowego amyloidu beta (APP). APP jest glikozylowanym, integralnym białkiem transbłonowym typu I, posiadającym długi zewnątrzkomórkowy fragment N-końcowy, domenę transbłonową oraz krótki, hydrofobowy fragment C-końcowy umiejscowiony w cytosolu komórki. W szlaku nieamyloidogennej proteolizy w wyniku działania α -sekreazy uwalniany jest N-końcowy fragment, zwany rozpuszczalnym α -APPs. Aktywność α -sekreazową posiadają dezintegryny zawierające domenę metaloproteinazową tj: TACE (enzym konwersji TNF α , ADAM17), ADAM9 oraz ADAM10 (Allinson i wsp., 2003). W wyniku ich działania w błonie plazmatycznej pozostaje C-końcowy fragment, który ulega dalszemu cięciu przez γ -sekreazę, co powoduje uwolnienie amyloidu β 17-42 (p3, 3 kDa), w błonie pozostaje wewnątrzkomórkowa domena białka APP (AICD). W skład kompleksu γ -sekreazy wchodzi: presenilina 1 lub presenilina 2, nikastryna oraz Aph-1 i Pen-2 (De Strooper, 2003). W szlaku amyloidogennym, zachodzącym w endosomach i lizosomach, białko APP hydrolizowane jest przez β -sekreazę (BACE1). Prowadzi to do powstania białka β -APPs oraz peptydu CT99, który również ulega proteolizie przez γ -sekreazę do peptydów o długościach łańcucha od A β 39 do A β 43 (p4, 4.2 kDa) oraz domeny wewnątrzkomórkowej AICD (Ryc. 3) (Cole i Vassar, 2008).



Ryc. 3. Struktura białka prekursorowego amyloidu- β (APP). FAD – rodzinna postać choroby Alzheimera, KAA – rodzinna postać β -amyloidozy naczyńkowej, HCHWA-D – holenderska wrodzona postać β -amyloidozy naczyńkowej z krwotokami mózgowymi. Zaznaczono miejsca mutacji w obrębie APP (zmodyfikowany wg Strosznajder 2001)

Mechanizmy cytotoksyczności amyloidu- β mogą być związane m.in. z: aktywacją proteaz lizosomalnych, indukcją procesu hiperfosforylacji białka tau, stymulacją mikrogleju i astrogleju, oraz aktywacją apoptozy. Zaagregowany A- β zaburza homeostazę jonów wapnia, tworząc kanały wapniowe o wysokiej przewodności. Prowadzi to do wzrostu jego wewnątrzkomórkowego stężenia, rozprężenia mitochondriów a w efekcie do zwiększenia syntezy reaktywnych rodników tlenowych uszkadzających wrażliwe neurony (Daschil i wsp., 2013; Li i wsp., 2007). Amyloid- β akumulujący się w mózгах chorych na AD zwiększał syntezę cytokin prozapalnych (Giovannini i wsp., 2002).

W doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* amyloid- β powodował obniżenie aktywności PDHC, poziomu acetylo-CoA oraz aktywności enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, jak również syntezy i uwalniania ACh (Bielarczyk i wsp., 2003a; Hoshi i wsp., 1997; Schliebs i Arendt, 2006).

Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia amyloidu w mózгах w przypadkach rzadkiej rodzinnej postaci choroby Alzheimera, koreluje ze stopniem nasilania ubytków poznawczych. Z drugiej strony nie wykazano takiej zależności w znacznie liczniejszych przypadkach sporadycznej AD (99%) (Sensi i wsp., 2011). Co więcej, złogi amyloidu w formie blaszek starczych obserwuje się również podczas starzenia bez objawów demencji. Istnieją zatem dodatkowe czynniki, które wywołują neurotoksyczne działanie amyloidu- β w przebiegu tej i podobnych chorób neurodegeneracyjnych (Hulette i wsp., 1998; Price i Morris, 1999).

2.4.2 Cynk w chorobie Alzheimera

W latach 90-tych ubiegłego stulecia sformułowano hipotezę, że zaburzenia w homeostazie jonów cynku mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie AD oraz procesach ekscytotoksyczności w innych patologiach mózgu (niedokrwienie, atak padaczkowy, mechaniczne uszkodzenie mózgu) poprzez ich udział w propagacji oligomeryzacji amyloidu- β i tworzenia płytek starczych (Cuajungco i Lees, 1997; Frederickson i Bush, 2001). Autopsje mózgov pacjentów z chorobą Alzheimera wykazały wysoką zawartość Zn^{2+} (~1 mM) w zewnątrzkomórkowych płytkach starczych (Lovell i wsp., 1998; Suh i wsp., 2000b). Wykazano, że Zn zwiększa agregację amyloidu- β , co prowadzi do powstawania złogów amyloidowych. W warunkach *in vitro* stawały się one bardziej odporne na proteolityczne działanie

neprylizyny czy enzymu degradującego insulinę (IDE) (Bush i wsp., 1994; Sensi i wsp., 2009).

W warunkach nadmiernej depolaryzacji wzrost stężenia Zn w neuronach postsynaptycznych może aktywować wiele ścieżek sygnałowych, w tym wytwarzanie reaktywnych form tlenu w mitochondriach oraz aktywację enzymów, prowadzących do inicjacji procesów apoptozy i/lub nekrozy, a następnie śmierci komórki (Mocchegiani i wsp., 2005). Wykazano, że w AD oraz w stanach pobudzenia ekscytotoksycznego pojawia się intensywna fluorescencja dla Zn w regionach mózgu, w których doszło do zmian spowodowanych procesem chorobowym (Frederickson i wsp., 1989). W obu przypadkach dochodziło do preferencyjnego uszkodzenia neuronów w regionach kory mózgowej (hipokamp, ciało migdałowe, kora czołowa), gdzie normalnie występuje największa liczba aksonów zawierających Zn (Frederickson i wsp., 2000, 1989; Suh i wsp., 2000a). W wyniku prostej strategii leczenia związkami chelatującymi Zn^{2+} następowało złagodzenie ubytków poznawczych zarówno u ludzi z AD jak i myszy transgenicznych ze zmutowanymi genami APP/presenilin (Frederickson i wsp., 2000; Koh i wsp., 1996; Regli i wsp., 2001). Chelatowanie Zn^{2+} sprzyjało deagregacji i lizie płytek starczych (Cherny i wsp., 1999). Lee i wsp. (2002) w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na myszach transgenicznych Tg2576 z delecją *ZnT3* wykazali, że Zn uwolniony z pęcherzyków synaptycznych odgrywa ważną rolę w agregacji amyloidu- β i powstawaniu blaszek starczych. Z badań tych wynika, że niedobory synaptycznego Zn silnie korelują z wyraźnym obniżeniem nierozpuszczalnego amyloidu- β i z jego zmniejszonym nagromadzeniem się w korze i hipokampie (J.-Y. Lee et al., 2002). Badania przeprowadzone na mózgach myszy transgenicznych z AD APP^{swe}/PSEN11dE9 wykazały wzrost ekspresji transporterów cynkowych ZnT-4 oraz ZnT-6 (Zhang i wsp., 2010). Z kolei badania pośmiertne pacjentów z AD wykazały spadek ekspresji ZnT-1 w łagodnych zaburzeniach poznawczych, oraz jej zwiększenie we wczesnym i późnym stadium AD, zarówno w hipokampie, jak i korze. Wykazano również spadek ekspresji ZnT-3 w tych regionach, co wskazuje na ogniskowe/lokalne zaburzenia homeostazy Zn (Adlard i wsp., 2010; Lovell i wsp., 2005).

Sensi i wsp. (2008) w badaniach neuronów kory mózgowej myszy transgenicznych (3xTg-AD) wykazali, że zmutowane postacie białka prekursorowego (APP), preseniliny-1 (PS1) oraz białka tau mogą powodować nadmierne wytwarzanie

reaktywnych form tlenu. Te z kolei uwalniały Zn^{2+} z metalotionein, przyczyniając się tym samym do agregacji amyloidu- β (Sensi i wsp., 2008). Obniżenie zewnątrzkomórkowego poziomu MT3 obserwowane w chorobie Alzheimera może także sprzyjać przyśpieszonej oligomeryzacji/agregacji amyloidu- β przez zwiększające się stężenie wewnątrzkomórkowych jonów Zn^{2+} (Deshpie i wsp., 2009; Duri i wsp., 2010). Udowodniono również, że jony Zn mogą wywoływać hiperfosforylację białka tau w neuronalnych liniach komórkowych SH-SY5Y i N2a (Björkdahl i wsp., 2005).

2.4.3 Rola astrocytów w chorobie Alzheimera

Badania na myszach transgenicznym 3xTG-AD dowodzą, że reaktywne astrocyty otaczają płytki starcze, natomiast komórki astrocytarne w innych regionach mózgu ulegają zanikowi, co może być przyczyną wczesnych zmian w plastyczności synaptycznej i zaburzeń poznawczych związanych z AD (Rodríguez i wsp., 2009). U młodych myszy zaobserwowano zmienioną morfologię astrocytów: znaczne zmniejszenie liczby włókien astrocytarnych, powierzchni (12,62%) i objętości (14,25%) astocytów znakowanych GFAP mimo, że nie wykazywały one żadnych objawów patologicznych korelujących z AD (Rodríguez i wsp., 2009). Ponadto dystroficzne astrocyty lub ich zanik mogły powodować upośledzenie wychwytu glutaminianu ze szczeliny synaptycznej, co prowadzi do ekscytotoksycznego pobudzenia neuronów (Rodríguez i wsp., 2009).

Reakcją astrogleju na czynniki neurotoksyczne jest astroglejoza (Sofroniew i Vinters, 2010). Uszkodzone astrocyty nie mają zdolności do degradacji amyloidu- β , co powoduje jego nagromadzenie w postaci płytek starczych (Nagele i wsp., 2003). Oprócz tego aktywacja astrocytów przez zakumulowany A- β zwiększa wydzielanie przez nie czynników prozapalnych (takich jak IL1, TNF α). Może to przyczyniać się do wywołania stresu oksydacyjnego i uszkodzenia neuronów w AD (Johnstone i wsp., 1999). Ponadto, amyloid- β zakłóca metabolizm glukozy w astrocytach, co z kolei może prowadzić do ograniczonego dostarczania neuronom substratów energetycznych, głównie mleczanu i glutaminy (Allaman i wsp., 2010).

2.5 Hodowle linii astrocytów i neuronów cholinergicznycy jako komórkowe modele neurodegeneracji

2.5.1 Astrocyty

Linie komórkową C6 glejaka szczurzego wytworzyli Brenda i wsp. (1968) poprzez, seryjny pasaż komórek glejaka, guza mózgu wywołanego przez wielokrotne iniekcje N-nitrozometylomocznika przez okres 8 miesięcy u dorosłego szczura szczepu Wistar (Benda i wsp., 1968). Linie komórkową C6 sklonowano z glejaka „numer 6” i wykazano, że komórki te produkują białka markerowe astrocytów: S-100 i GFAP (Benda i wsp., 1968; De Vries i Boullerne, 2010). W warunkach hodowlanych dodanie kwasu all-trans-retinowego powodowało zahamowanie ich proliferacji oraz zwiększenie ekspresji genu *Slc1a1*, prowadzące do wzrostu poziomu białka EAAC1. Poziom transporterów GLAST oraz GLT-1 nie ulegał zmianie (Bianchi i wsp., 2008).

Pod wpływem 1 mM dbcAMP astrocyty wykazywały zahamowanie proliferacji oraz większe zróżnicowanie morfologiczne w postaci bardziej licznych i dłuższych wypustek. Zmiany te nie były związane ze wzrostem ekspresji genów dla białek cytoszkieletu aktyny, jak i tubuliny (Hu i wsp., 2008).

Linia komórkowa C6 została dobrze scharakteryzowana i może być użytecznym modelem badawczym (Haase i Beyersmann, 2002; Haghghat i wsp., 2000). Komórki C6 posiadają cechy charakterystyczne dla astrocytów: aktywność syntetazy glutaminy oraz obecność transporterów GLAST i GLT1 (Baber i Haghghat, 2010). Transport aminokwasów w komórkach C6 i astrocytach pierwotnych wykazuje podobną charakterystykę wychwyty argininy i seryny (Hayashi i wsp., 1997; Schmidlin i Wiesinger, 1994). Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że linia komórkowa C6 była wykorzystywana jako model komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego w wielu laboratoriach (Dolińska i wsp., 2000; Imura i wsp., 1999; Kocki i wsp., 2002; Quincozes-Santos i wsp., 2013; Ryu i wsp., 2002; Vanhoutte i Hermans, 2008). Właściwości tej linii komórkowej uzasadniały wykorzystanie jej przez nas jako modelu komórkowego dla cytotoksyczności astrocytarnej Zn.

2.5.2 Neurony cholinergiczne

Neurony cholinergiczne stanowią zaledwie 1–2% wszystkich komórek występujących w mózgu, lecz ich zakończenia stanowią 10% frakcji izolowanych z zakończeń nerwowych (Richardson, 1981). Badania skrawków mózgu lub zakończeń nerwowych pozwoliły jedynie na pośrednie wykazanie możliwych ilościowych zmian w metabolizmie acetylo-CoA zachodzących w neuronach cholinergicznym w warunkach neurodegeneracyjnych (Szutowicz i wsp., 1998, 1994; Tomaszewicz i wsp., 2003). W związku z powyższym, odpowiednim modelem doświadczalnym do zbadania tego zagadnienia okazały się hodowle neuronów cholinergicznym (Szutowicz i wsp., 1999, 1983). W naszych badaniach w ostatnich 15 latach były to hybrydowe komórki SN56B5.G4 utworzone przez fuzję cholinergicznym neuronów przegrody mózgu 21-dniowej myszy z niecholinergicznymi komórkami neuroblastoma N18TG2 (Hammond i wsp., 1990). W hodowli *in vitro*, komórki te mogą być pobudzone do różnicowania w kierunku fenotypu cholinergicznym poprzez dodanie dbcAMP i kwasu all-trans-retinowego (Blusztajn i wsp., 1992; Pedersen i wsp., 1995). Pod wpływem działania tych czynników dochodzi do wzrostu ekspresji fenotypu cholinergicznym: powstają wypustki dendrytyczne i połączenia synaptyczne, następuje wzrost wielkości komórki i jądra komórkowego, jak również spowolnienie tempa podziałów komórkowych. Z drugiej strony następuje wzrost aktywności markera cholinergicznym ChAT, co skutkuje zwiększeniem poziomu wewnątrzkomórkowego poziomu ACh i szybkości jej wydzielania (Pedersen i wsp., 1995; Szutowicz i wsp., 1999).

Nasze badania na komórkach cholinergicznym wykazały, że wysoka ekspresja fenotypu cholinergicznym powodowała obniżenie poziomu acetylo-CoA w mitochondriach (Bielarczyk i wsp., 2003b; Szutowicz i wsp., 2013, 2006). Mogło to być spowodowane większym zużyciem acetylo-CoA do syntezy ACh i jej kwantowego i niekwantowego wydzielania (Szutowicz i wsp., 2000, 1999). Powyższa modyfikacja fenotypu neuroprzekaźnicznym może prowadzić do zwiększonej wrażliwości tych neuronów na czynniki neurotoksyczne. Nasze doświadczenia na wysoko zróżnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 dowodzą, że były one bardziej wrażliwe na egzogenne działanie amyloidu- β , tlenku azotu, glinu, interleukiny-1 β niż komórki nieróżnicowane SN56 (Bielarczyk i wsp., 2005, 2003a; Szutowicz i wsp., 2006, 2013). Wyniki te są zgodne z badaniami,

w których klonalne komórki pochodzące ze szwu mózgu po zróżnicowaniu cAMP do fenotypu cholinergicznego, stawały się bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie amyloidu- β , niż te same, które zróżnicowano do fenotypu serotonicznego (Olesen i wsp., 1998).

Astrocyty i neurony tworzą bardzo dynamiczny i interaktywny układ komórkowy który wpływa na rozwój, morfologię, zachowanie, zdolności regeneracyjne i starzenie się układu nerwowego.

Przypuszcza się, że podwyższony poziom jonów Zn w mózгах osób w podeszłym wieku może przyczynić się do większej śmiertelności komórek nerwowych, a tym samym być jednym z czynników patogennych w AD (Mocchegiani i wsp., 2005).

Niniejsza praca ma na celu zbadanie cytotoksycznego wpływu Zn^{2+} na neurony cholinergiczne i komórki astroglajowe oraz ich ewentualnego wzajemnego oddziaływania w warunkach ekscytotoksycznych.

Niezbędne wydaje się uzupełnienie naszych dotychczasowych badań poprzez zbadanie fizjopatologii akumulacji jonów cynku w komórkach glejowych i uwzględnienie wpływu tych zmian na interakcje neuronalno-glejocytarne. Tym samym mogą zostać znalezione warunki i czynniki, które umożliwiłyby utrzymanie odpowiedniego poziomu tego kationu zarówno w neuronach cholinergicznym jak komórkach astroglaju w obecności sygnałów cytotoksycznych.

3 CEL PRACY

Celem pracy było porównanie cytotoksycznego działania Zn na metabolizm energetyczny neuronów cholinergiczych i komórek astroglowych.

W tym celu zbadano wpływ zewnątrzkomórkowego stężenia Zn na:

- zawartość wewnątrzkomórkowego Zn w obu typach komórek
- aktywność PDHC, enzymu syntetyzującego acetylo-CoA oraz kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego w obu typach komórek
- wewnątrzkomórkową dystrybucję Ca w neuronach cholinergiczych

Zbadano również wzajemne interakcje komórek neuronalnych i astroglowych poddanych działaniu cytotoksycznym stężeniom Zn.

4 MATERIAŁY I METODY

4.1 Model doświadczalny

Modelem doświadczalnym była hybrydowa linia komórek cholinergicznym SN56.B5.G4 podarowanych przez prof. J.K. Blusztajna (Boston, USA) oraz linia klonalnych szczurzych astroglioma C6 podarowanych przez prof. Jana Albrechta (Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN). Komórki SN56 zostały utworzone przez fuzję niecholinergicznym mysich komórek neuroblastoma N18TG2 z cholinergicznymi neuronami z przegrody mózgu 21-dniowej myszy C57BL/6 (Hammond i wsp., 1990).

Komórki SN56 i C6 hodowano w pożywce Eagle zmodyfikowanej według Dulbecco (DMEM) zawierającej 3 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 , 25 mmol/L glukozę, 2 mmol/L L-glutaminę, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny, 50 j.m/ml penicyliny, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ amfoterycyny B oraz 10% płodową surowicę wołową (FBS); pożywka zamrażająca dla komórek SN56 i C6 zawierała: 63% DMEM, 30% FBS, 7% DMSO; komórki zamrażano w krioampułkach w ilości 2–2.5 mln/ml w temperaturze -80°C .

Komórki hodowano w atmosferze 95% O_2 i 5% CO_2 w temperaturze 37°C . Komórki wysiewano w ilości 2.32×10^6 na płytkę o powierzchni 58 cm^2 ($0,04 \times 10^6/\text{cm}^2$) oraz 3×10^6 do butelki o powierzchni 75 cm^2 ($0,04 \times 10^6/\text{cm}^2$) i hodowano do stanu subkonfluencji (80% pokrycia powierzchni, ocena mikroskopowa). Ilość komórek określano w komorze zliczeniowej Fuchs-Rosenthala. Doświadczenia przeprowadzano na pasażach od 23 do 52 komórek SN56 oraz od 61 do 72 komórek astrocytarnych C6.

W celu zwiększenia ekspresji fenotypu cholinergicznym komórek SN56 oraz fenotypu astrocytarnego komórek C6 dodawano do pożywki wzrostowej 1 mmol/L dwumaślanu-cAMP (dbcAMP) i 0.001 mmol/L kwasu all-*trans*-retinowego (RA).

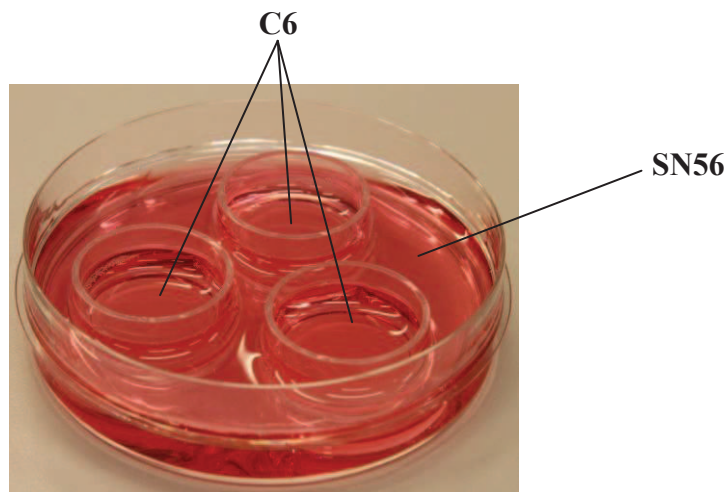
Komórki te zostały wykorzystane do badań nad długoczasowym, krótkoczasowym i bezpośrednim wpływem cynku na metabolizm komórkowy, jego akumulację i poziom Ca.

4.1.1 Badania długoczasowego wpływu Zn w komórkach cholinergicznym SN56 i astroglejowych C6

W celu zbadania długoczasowego wpływu Zn na metabolizm energetyczny oraz jego akumulację, komórki cholinergiczne i astroglejowe hodowano przez 48 godzin w pożywce DMEM bez lub w obecności czynników różnicujących

(dbcAMP/RA). Następnie wymieniano środowisko wzrostowe na środowisko doświadczalne, do którego dodawano różne stężenia Zn (0-300 $\mu\text{mol/L}$) na kolejne 24 godz. Po tym czasie, środowisko doświadczalne zbierano w celu oznaczenia uwalniania LDH. Komórki przepłukiwano schłodzonym buforem Puck's zawierającym 137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 5.55 mmol/L glukoza, 5 mmol/L bufor fosforanowo-sodowy (pH 7.4), 2.7 mM EDTA w celu usunięcia kationów Zn^{2+} zaabsorbowanych na ich powierzchni, a następnie przepłukiwano dwukrotnie buforem Puck's bez EDTA. Komórki z naczynia hodowlanego zbierano używając plastikowych skrobaczek i zawieszano w buforze Puck's. Zawiesinę komórek wirowano przy 1200 obr./min (208xg) przez 7 minut. Do badań metabolicznych osad komórek zawieszano w 0.32 mol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES pH 7.4 i 0.1 mmol/L EDTA w objętości niezbędnej do uzyskania 10 mg białka/mL (10 mln komórek/mL). W celu oznaczenia akumulacji Zn osad komórek denaturowano 4% HClO_4 (patrz 4.4).

W badaniach długoczasowego wpływu Zn w hodowli łączonej pełny cykl doświadczenia trwał 72 godziny. Komórki cholinergiczne SN56 hodowano w ilości 2.32×10^6 na płytkach 10 cm^2 . Komórki astrocytarne C6 hodowano wstępnie przez 24 godziny na poliwęglanowych insertach z półprzepuszczalnym dnem o średnicy 3 cm i porowatości 4 μm , umieszczonych w 6-dołkowych płytkach. Na każdy insert nanoszono 3.2×10^5 komórek C6. Na płytkę z komórkami SN56 (hodowanych 24 godziny) przenoszono 3 inserty z komórkami C6 (Ryc. 4), ponieważ astrocyty stanowią 25% komórek OUN (Eng i wsp., 1992), i prowadzono hodowlę przez następne 24 godziny. Warunki cytotoksyczne wywoływano dodając do hodowli łączonej wzrastające stężenie zewnątrzkomórkowego cynku na kolejne 24 godziny. Po tym czasie, środowisko doświadczalne zbierano w celu oznaczenia uwalniania LDH. Komórki przepłukiwano buforem Puck's zawierającym 2.7 mM EDTA w celu usunięcia kationów Zn^{2+} zaabsorbowanych na ich powierzchni, a następnie przepłukiwano dwukrotnie buforem Puck's bez EDTA. Komórki SN56 z naczynia hodowlanego zbierano buforem Puck's używając plastikowych skrobaczek. Zawiesinę komórek wirowano przy 1200 obr./min (208xg) przez 7 minut. Do badań metabolicznych osad komórek zawieszano w 0.32 mol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES pH 7.4 i 0.1 mmol/L EDTA w objętości niezbędnej do uzyskania 10 mg białka/mL (10 mln komórek/mL). W celu oznaczenia akumulacji Zn osad komórek SN56 denaturowano 4% HClO_4 (patrz 4.4).



Ryc. 4. Ilustracja przedstawiająca model hodowli łączonej komórek cholinergicznym SN56 i astroglejowym C6.

4.1.2 Badania krótkoczasowego wpływu Zn w komórkach cholinergicznym SN56 i astroglejowym C6

Krótkoczasowy wpływ Zn na jego akumulację, poziom Ca oraz metabolizm komórek badano inkubując komórki w środowisku depolaryzacyjnym bez i w obecności wzrastających stężeń $ZnCl_2$. W tym celu komórki hodowano w środowisku wzrostowym DMEM bez i w obecności czynników różnicujących przez 48 godz., przez następne 24 godziny komórki te hodowano w środowisku wzrostowym bez czynników różnicujących. Po tym czasie komórki przepłukiwano dwukrotnie schłodzonym buforem Puck's. Komórki z naczynia hodowlanego zbierano w/w buforem używając plastikowych skrobaczek. Zawiesinę komórek wirowano przy 1200 obr./min (208xg) przez 7 minut. Do badań metabolicznych osad komórek zawieszano w 0.32 mol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES pH 7.4.

Podstawowe środowisko depolaryzacyjne w końcowej objętości 1.0 ml zawierało: 20 mmol/L bufor HEPES pH 7.4; 1.5 mmol/L bufor fosforanowo-sodowy pH 7.4; 90 mmol/L NaCl; 30 mmol/L KCl; 2.5 mmol/L pirogronian; 2.5 mmol/L jabłczan; 1 mmol/L $CaCl_2$; 0.1 mL zawiesiny komórek w 0.32 mol/L sacharozie zawierającej 1.5-2.5 mg białka komórkowego. Ewentualne zmiany w składzie środowiska inkubacyjnego zamieszczono w tekście. Inkubację rozpoczynano dodaniem zawiesiny komórek do środowiska i prowadzono w temp. 37°C przez 30 minut w łaźni wodnej, przy ciągłym mieszaniu o szybkości 100 cykli/min. Po inkubacji próby odwirowywano przez 3 min przy 12000 obr./min. W celu oznaczenia aktywności enzymów osad komórek zawieszano w 0.32 mol/L sacharozie

zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES pH 7.4. W celu oznaczenia akumulacji Zn osad komórek denaturowano 4% HClO₄ (patrz 4.4).

4.1.3 Badania bezpośredniego wpływu Zn na aktywność enzymów w lizatach komórkowych C6

Bezpośredni wpływ Zn na aktywność enzymów metabolizmu komórkowego zbadano w lizatach komórkowych C6. W tym celu komórki hodowano w środowisku wzrostowym DMEM bez i w obecności czynników różnicujących przez 48 godz., następnie hodowlę prowadzono w środowisku wzrostowym bez czynników różnicujących przez następne 24 godz. Po tym czasie komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem Puck's. Komórki z naczynia hodowlanego zbierano w/w buforem używając plastikowych skrobaczek. Zawiesinę komórek wirowano przy 1200 obr./min (208xg) przez 7 minut, zawieszano w 0.32 mol/L sacharozy zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES pH 7.4, a następnie lizowano przy użyciu Tritonu X-100 o końcowym stężeniu 0.2% i poddawano 10 minutowej preinkubacji w środowisku pomiarowym dla poszczególnych enzymów zawierającym wzrastające stężenia Zn (patrz rozdz. 4.3).

4.2 Czynniki neurotoksyczne

4.2.1 Cynk

Podstawowy roztwór ZnCl₂ sporządzano ex tempore w stężeniu 10 mmol/L, dodawano do pożywek wzrostowych tak aby jego stężenie końcowe wynosiło od 0.05 do 0.30 mmol/L.

4.2.2 Oznaczanie aktywności enzymów

Komórki do oznaczeń enzymatycznych rozcieńczano Tritonem X-100, tak aby uzyskać odpowiednie stężenie białka i inkubowano 20-30 min w lodzie. Końcowe stężenie Tritonu X-100 w oznaczanej próbce wynosiło 0.2%. Aktywność enzymów oznaczano w temp. 37°C. Oznaczanie aktywności akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej wykonywano bezpośrednio po zebraniu komórek, przechowywanych w temperaturze 4°C. Oznaczanie aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej wykonywano w próbkach zamrożonych w temperaturze -20°C w ciągu 24 do 72 godzin od momentu zebrania komórek z płytek lub butelek hodowlanych.

4.2.3 Dehydrogenaza mleczanowa (LDH, EC 1.1.1.27) (Kornberg, 1955)

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem cytosolowym, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Oznaczenie aktywności LDH pozwala w prosty i jednoznaczny sposób określić czy badana substancja powoduje uszkodzenie błony plazmatycznej komórek, a w konsekwencji ich śmierć. LDH redukuje pirogronian w obecności NADH, w wyniku czego powstaje mleczan i NAD^+ . Szybkość zmian absorbancji jest proporcjonalna do aktywności dehydrogenazy mleczanowej.

Środowisko w objętości końcowej 1.0 mL zawierało: 100 mmol/L bufor Tris/HCl o pH 7.4, 0.2 mmol/L NADH oraz 0.2 mL pożywki hodowlanej DMEM, po 24 godz. inkubacji z Zn. Próbki preinkubowano w temp. 37°C przez 10 minut. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 mL 100 mmol/L pirogronianu i mierzono spadek absorbancji przy długości fali 340 nm w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec 3100 pro (Amersham, UK). Aktywność obliczano w nmolach utlenionego NADH/min/objętość całkowitą na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

W celu uzyskania 100% śmierci komórek do środowiska hodowlanego dodawano Triton X-100 o stężeniu końcowym 0.1% i inkubowano 2 godz. w atmosferze 95% O_2 i 5% CO_2 w temperaturze 37°C (Nolte i wsp., 2004).

4.2.4 Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; EC 1.2.4.1, EC 2.3.1.12, EC 1.6.4.3) (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 mmol/L bufor Tris/HCl pH 8.3, 2 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L dithiotreitol, 2 mmol/L NAD, 10 mmol/L pirogronian, 2 mmol/L pirofosforan tiaminy, 0.20 mmol/L CoA, 2.5 mmol/L szczawiooctan, 0.15 j.m. syntazy cytrynianowej. Środowisko inkubacyjne prób zerowych nie zawierało CoA. Reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej 0.05 mg białka komórkowego. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut. Reakcję przerywano przez umieszczenie próbki na 10 minut w temperaturze 99°C. Następnie próby wirowano przy 10000 obrotów przez 1 minutę. W nadsącu mierzono ilość cytrynianu powstającego z acetylo-CoA w reakcji katalizowanej przez bakteryjną

liazę cytrynianową (EC 4.1.3.6). Środowisko do oznaczania cytrynianu w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 100 mmol/L bufor Tris/HCl o pH 7.4, 0.1 mmol/L NADH, 0.2 j.m. dehydrogenazy jabłczanowej i 0.1 mL próbki. Reakcję rozpoczynano dodawaniem 0.1 j.m. bakteryjnej liazy cytrynianowej rozpuszczonej w środowisku zawierającym: 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 20 mmol/L ZnSO_4 oraz 50 mmol/L bufor Tris/HCl pH 7.4. Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

4.2.5 Akonitaza (EC 4.2.1.3) (Villafranca, 1974)

Środowisko inkubacyjne do oznaczania aktywności enzymu w końcowej objętości 1.0 ml zawierało: 50 mmol/L bufor Tris/HCl o pH 7.4, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L NADP, 1 j.m. dehydrogenazy izocytrynianowej oraz 0.1 mL badanej próbki zawierającej 0.1 mg białka. Próbkę były preinkubowane w temp. 37°C przez 10 minut. Reakcję rozpoczynano dodając 0.01 mL 20 mmol/L cis-akonitanu, a następnie mierzono przyrost absorbancji przy długości fali 340 nm w spektrofotometrze termostatowanym Ultrospec 3100 pro (Amersham, UK). Całkowity czas pomiaru wynosił 10 minut. Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

4.2.6 Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna (IDH; EC 1.1.1.42) (Plaut, 1963)

Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.7 mL zawierało: 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4), 0.5 mmol/L NADP, 0.6 mmol/L MgCl_2 oraz 0.1 mL badanej próbki o zawartości białka 0.1 mg. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.01 mL 10 mmol/L DL-izocytrynianu, a następnie mierzono przyrost absorbancji przez okres 10 minut przy długości fali 340 nm. Pomiaru dokonywano w temperaturze 37°C, w termostatowanym spektrofotometrze Ultrospec 3100 pro (Amersham, UK). Aktywność obliczano w nmolach zredukowanego NADP/min/mg białka przy współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

4.3 Oznaczanie poziomu Zn całkowitego w komórkach

Zawartość całkowitego Zn oznaczano zmodyfikowaną metodą spektrofluorymetryczną (Prat i wsp., 1991) na spektrofluorymetrze LS 55 firmy

PerkinElmer (Massachusetts, USA) przy użyciu oprogramowania FL Winlab Software. Oryginalna metoda była dostosowana do pomiaru wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Zn^{2+} w żywych komórkach, przy czułości wynoszącej 10^{-10} mol/L (Frederickson i wsp., 1987). Wprowadzona przeze mnie modyfikacja przystosowuje tą metodę do oznaczania całkowitej zawartości Zn w komórkach (patrz rozdz. 5.1.2).

W celu oznaczenia całkowitego wewnątrzkomórkowego Zn komórki hodowano i postępowano wg procedury 4.1.1, 4.1.2. Następnie komórki zawieszono w 0.3 ml 4% $HClO_4$, zobojętniano 7.5N K_2CO_3 do pH 6.0. Do kuwety reakcyjnej, zawierającej 1800 μ L 100 mmol/L buforu HEPES pH 7.4, dodawano 0-200 μ L próby badanej oraz 20 μ L TSQ (2 mg/mL). Intensywność fluorescencji odczytywano po 20 minutach przy długości fali wzbudzenia 335 nm oraz emisji 495 nm. Zawartość Zn odczytywano z wykresu kalibracyjnego dla standardów, od 0.2 do 4.0 nmoli Zn/próbę (Tabela 1, Ryc. 8).

Tabela 1. Sposób przygotowania standardów krzywej kalibracyjnej do oznaczania całkowitego Zn wewnątrzkomórkowego

Zawartość Zn (nmole/próbę)	0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
0.1 mmol/L $ZnCl_2$ (μ L)	-	20	40	100	200	400
4% $HClO_4$ zobojętniony 7.5N K_2CO_3 , do pH 6.0 (μ L)	2000	1980	1960	1900	1800	1600

4.4 Oznaczanie poziomu Ca w komórkach SN56 (Brown i wsp., 1975)

4.4.1 Oznaczanie poziomu Ca całkowitego

Po zakończeniu inkubacji (patrz 4.1.2) 0.4 mL mieszaniny inkubacyjnej przenoszono do probówki typu Eppendorf i wirowano przez 3 minuty przy 1300 obr./min. Nadsącz odrzucano, a osad zawieszano w proporcji 150 μ g białka w 100 μ L 4% $HClO_4$. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej próbkę wirowano przez 3 minuty przy 12 000 obr./min. Nadsącz przechowywano w temperaturze $-20^\circ C$ nie dłużej niż 2 tygodnie. W dniu oznaczania nadsącz zobojętniano 7.5N K_2CO_3 do pH 7.0 i oznaczano poziom Ca całkowitego. Zawartość Ca oznaczano metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem arsenazo III (Brown i wsp., 1975). Roztwór wyjściowy odczynnika w końcowej objętości 100 mL zawierał: 14 mg arsenazo III, 100 mmol/L KCl, 40 mmol/L MOPS o pH 7.4. Roztwór roboczy przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem przez rozcieńczenie roztworu

wyjściowego dwukrotnie 20 mmol/L buforem MOPS o pH 7.4. Do 0.1 mL badanej próbki dodawano 1.0 mL roztworu roboczego i mierzono absorbancję w ciągu 2-5 minut na spektrofotometrze Shimadzu przy długości fali 650 nm. Zawartość Ca odczytywano z krzywej standardowej, zawierającej od 3 do 25 nmoli Ca/próbę.

4.4.2 Oznaczanie poziomu Ca we frakcji mitochondrialnej

Kolejne 0.4 mL zawiesiny komórkowej poinkubacyjnej (patrz 4.1.2) przenoszono do probówki typu Eppendorf zawierającej 0.4 mL zimnego roztworu o składzie: 125 mmol/L KCl, 20 mmol/L HEPES pH 7.4, 3 mmol/L EDTA, 0.014 mg digitoniny. Próbkę mieszano, inkubowano 15 sek., a następnie 0.7 mL roztworu nawarstwiano na 0.5 mL mieszaniny olejów silikonowych (AR20:AR200 w stosunku 2:1). Po 30 sek. od momentu wymieszania z digitoniną, próbki wirowano przez 40 sek. przy 12000 obr./min. Po odwirowaniu odbierano górną warstwę cytosolową i oznaczano w niej stężenie białka. Po zebraniu oleju, oczyszczeniu ścianek probówki z oleju i odciążeniu delikatnie sacharozy, denaturowano frakcję mitochondrialną 100 µl 4% HClO₄. Po 10 minutach inkubacji, próbki wirowano przez 3 min. przy 12000 obr./min. Nadsącz zobojętniano 7.5N K₂CO₃ do pH 7.0, w którym oznaczano poziom Ca mitochondrialnego (patrz rozdz. 4.5.1).

4.5 Ocena poziomu białka transportera cynkowego ZnT1 metodą Western Blot (Towbin i wsp., 1979)

W celu oceny poziomu białka ZnT1 komórki hodowano wg procedury opisanej w rozdziale 4.1.1. Osad komórek zawieszano w objętości 300 µl buforu lizującego zawierającego 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton-X 100, 5% glicerol, 10 mmol/L KH₂PO₄, 0.1% SDS, inhibitory proteaz (AEBSF, aprotynina, bestatyna, E-64, leupeptyna, pepstatyna A) i inkubowano w lodzie przez 30 min. Zawiesinę wirowano przy 12000 obr./min w 4°C przez 5 minut. Nadsącz po oznaczeniu stężenia białka wykorzystywano do rozdziału elektroforetycznego. W pierwszym etapie przeprowadzano elektroforezę badanego lizatu białkowego (50 µg) w gradientowym 4-20% żelu poliakrylamidowym. Badaną próbkę zawieszoną w buforze lizującym, rozcieńczano w stosunku 1:1 buforem Laemmli (62.5 mmol/L Tris/HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% błękit bromofenolowy, 5% β-merkaptioetanol) i denaturowano w temperaturze 98°C przez 5 min, a następnie wirowano przy 12000 obr./min przez 30 sekund. Tak przygotowane próbki oraz 5 µl markera masowego (Sigma-Aldrich)

nanoszono do kieszonek elektroforetycznych. Elektroforezę prowadzono w buforze SDS-PAGE pH 8.3 (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L glicyna, 0.1% SDS) przy napięciu 90V przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej w aparacie Mini-Protean III (BioRad, CA, USA). Po zakończeniu rozdziału przeprowadzono suchy elektrotransfer na błonę PVDF przy użyciu aparatu iBlot® Gel Transfer. Po jego zakończeniu błonę inkubowano przez 2.5 godziny w temperaturze pokojowej w 1.5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze zawierającym 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 134 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl oraz 0.1% Tween-20 (TBST). W kolejnym etapie błonę inkubowano z poliklonalnymi, króliczymi, specyficznymi przeciwciałami przeciw ZnT1 (1:500, Synaptic Systems, Goettingen, Niemcy) oraz monoklonalnymi przeciwciałami przeciw β -aktynie (1:5000, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) przez całą noc w temperaturze 4°C. Następnie błonę płukano w buforze TBST 4-krotnie przez 10 minut. Inkubację z drugorzędowymi, poliklonalnymi przeciwciałami znakowanymi fosfatazą alkaliczną, w rozcieńczeniu 1:5000 w buforze TBST z dodatkiem 1.5% roztworu mleka odtłuszczonego, prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Błonę płukano 4-krotnie przez 10 minut w buforze TBST. W celu wizualizacji prążków, błonę przenoszono do buforu zawierającego 100 mmol/L Tris/HCL, 5 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl oraz substraty dla alkalicznej fosfatazy NBT i BCIP. Reakcję fosfatazy na błonie przerywano 20 mmol/L EDTA w buforze TBST. Otrzymane prążki archiwizowano za pomocą aparatu UVITEC Alliance 4.7 (Cambridge, UK). Analizę densytometryczną ilości produktów przeprowadzano przy pomocy oprogramowania UViband (Cambridge, UK).

4.6 Ocena poziomu białek transporterów cynkowych ZnT1 (SLC30A1) metodą ELISA (Voller, 1978)

Poziom białka ZnT1 mierzono testem ELISA (Wuxi Donglin Sci&Tech Development, Wuxi, Chiny) przy użyciu automatycznego analizatora mikropłytkowego ETI-MAX, 3000 (DiaSorin, Saluggia, Włochy). W tym celu komórki hodowano wg procedury opisanej w rozdziale 4.1.1. Osad komórek zawieszano w objętości 300 μ l buforu lizującego zawierającego 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Igepal i inkubowano w lodzie przez 30 min. Zawiesinę wirowano przy 12000 obr./min w 4°C przez 5 minut. Nadsącz odbierano i oznaczano w nim stężenie białka, a następnie próby

rozcieńczano do 250 µg białka/100 µL. Do kolejnych mikrostudzienek, płytki mikrotitracyjnej 96-dółkowej opłaszczonej specyficznymi przeciwciałami przeciw ZnT1, dodawano po 100 µL próby zerowej (roztwór do rozcieńczania stiardów), stiardów i lizatu komórkowego, a następnie inkubowano w temp. 37°C przez 2 godziny. Po tym czasie usuwano całą zawartość z każdej mikrostudzienki i dodawano 100 µL przygotowanego *ex tempore* odczynnika A do wszystkich studzienek i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Następnie usuwano zawartość studzienek, każdą z nich przepłukiwano, przy użyciu automatycznej płuczki, 3-krotnie 350 µL buforu do płukania. W kolejnym etapie dodawano 100 µL przygotowanego *ex tempore* odczynnika B i inkubowano w temp. 37°C przez 30 min. Następnie usuwano zawartość studzienek, każdą z nich przepłukiwano 5-krotnie 350 µL buforu do płukania. Wywołanie reakcji barwnej prowadzono dodając do każdego dołka 90 µL substratu TMB (tetrametylobenzydyna). Inkubację z substratem prowadzono przez 20 min. w temp. 37°C w ciemności. Reakcję enzymatyczną przerywano dodając po 50 µL 0.12 mol/L HCl do wszystkich studzienek. Absorbancję prób mierzono przy długości fali 450 nm. Zawartość ZnT1 odczytywano z krzywej stiardowej, zawierającej od 0.156 do 10 ng/mL ZnT1.

4.7 Ocena przeżywalności komórek (Manford i Patterson, 1979)

Ocenę przeżywalności komórek SN56 dokonywano przy użyciu błękitu trypanu. Komórki zawieszono w 0.32 mol/L sacharozie rozcieńczano sacharozą, a następnie 2-razy 0.4% błękitem trypanu. Komórki zliczano w komorze Fuchs-Rosenthal, za uszkodzone uważano te, które zabarwiły się na niebiesko. Oceny dokonywano w mikroskopie świetlnym (Axiovert 25, Zeiss) przy powiększeniu 100-krotnym, po czasie nie przekraczającym 2 minut od momentu dodania barwnika.

4.8 Metoda immunocytochemiczna barwienia różnicowego komórek z zastosowaniem jodku propidyny (PI) i diocjanu karboksylfluoresceiny (6-CFDA) (Breeuwer i wsp., 1995)

6-CFDA jest niepolarną i niefluoryzującą pochodną fluoresceiny, która posiada zdolność do przenikania przez błonę komórkową. Po wnikięciu do komórki 6-CFDA hydrolyzowany jest przez wewnątrzkomórkowe esterazy do fluoresceiny. Komórki żywe, posiadające dużą aktywność esteraz, kumulują znaczne ilości fluoresceiny, co prowadzi do otrzymania intensywnej zielonej fluorescencji. PI jest

związkiem oddziaływującym z jądrowym DNA, w specyficzny sposób wybarwia komórki z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną emitując czerwone światło. Do barwienia komórki hodowano wg procedury opisanej w rozdziale 4.1.1, na okrągłych szkiełkach o średnicy 22 mm umieszczonych w sterylnych 35 mm płytkach Petrie'go. Na 1 szkiełko wysiewano około 6.0×10^4 komórek. Po 24 godzinnej hodowli w obecności różnych stężeń Zn, komórki hodowane na szkiełkach przepłukiwano 2-krotnie buforem Puck's, a następnie dodawano 0.5 mmol/L 6-CFDA oraz 1 $\mu\text{g/mL}$ PI w buforze zawierającym 10 mmol/L HEPES pH 7.5, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L i inkubowano 10 minut w ciemności w temp. 37°C. Następnie komórki hodowane na szkiełkach przepłukano 5-krotnie buforem (w/w) i utrwalono 4% paraformaldehydem.

4.9 Analiza obrazu mikroskopowego

Ocenę morfologiczną komórek oraz zdjęcia wykonano z użyciem 400-krotnego powiększenia mikroskopu świetlnego w technice kontrastu fazowego (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Germany) oraz kamery cyfrowej DP10 (Olympus, Tokyo, Japan). Fluorescencję obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX51 (Tokyo, Japan).

4.10 Oznaczenie zawartości białka (Bradford, 1976)

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

4.11 Metody statystyczne

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm standardowy błąd średniej (SEM). Istotność różnic między średnimi w doświadczeniach wielopunktowych wyznaczano testem ANOVA (*ang. analysis of variance*) z testem *post hoc* Bonferroni. Przy porównywaniu dwóch wartości średnich używano niesparowanego testu *t* Studenta. Za statystycznie istotną różnicę między wynikami uznawano taką, dla której miano błędu osiągało wartość $p < 0.05$. Współzależność pomiędzy analizowanymi parametrami oceniano z użyciem współczynnika korelacji liniowej Pearsona. Wymienione obliczenia statystyczne były wykonane za pomocą programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.12 Odczynniki i materiały zużywalne

Odczynniki pochodzące z Sigma-Aldrich (Poznań, Polska): β -aktyna, albumina wołowa, amfoterycyna B, ATP, azydek sodu, BCIP, błękit trypanu, chlorek magnezy, chlorek potasu, chlorek sodu, dehydrogenaza mleczanowa, digitonina, dimetyloformamid, dimetylosulfotlenek (DMSO), dioctan karboksylfluoresceiny (6-CFDA), dwumaślan cAMP, glukoza, L-glutamina, glicyna, HEPES, immunoglobulina ludzka, inhibitory proteaz, jabłczan, jodek propidyny, kwas *all-trans* retinojowy, kwas ortofosforowy 85%, lucyferyna, lucyferaza, lipoamid, marker do elektroforezy, β -merkaptoetanol, MOPS, NADH, NBT, oleje silikonowe AR20 i AR200, pirogronian sodu, płodowa surowica wołowa (FBS), podłoże do hodowli komórkowych Eagle zmodyfikowane według Dulbecco (DMEM), przeciwciała anti-mouse IgG-AP, węglan potasu, wodorowęglan potasu, roztwór penicyliny i streptomycyny, sacharoza, SDS, TRIS, Triton-X100, Tween-20.

Odczynniki pochodzące z Fluka Analytical (Poznań, Polska): arsenazo III, kwas nadchlorowy.

Odczynniki pochodzące z POCH (Gliwice, Polska): chlorek cynku, etanol, kwas solny, metanol, wodorotlenek sodowy.

Odczynniki pochodzące z Invitrogen (Warszawa, Polska): TSQ, iBlot[®] Gel Transfer Stacks PVDF.

Odczynniki pochodzące z firmy Bio-Rad (Warszawa, Polska): Coomassie Brilliant Blue G-250, bufor Laemmli, żel poliakrylamidowy 4-20%.

Przeciwciała pochodzące z firmy Synaptic System (Goettingen, Niemcy): ZnT1.

Przeciwciała pochodzące z firmy Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): goat anti-rabbit.

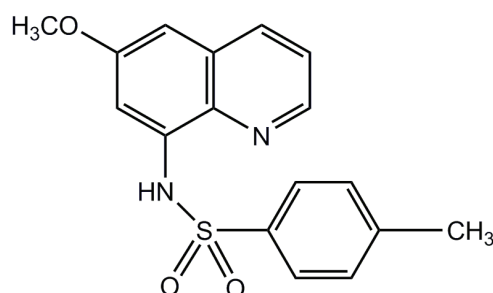
Naczynia plastikowe jednorazowego użytku do hodowli komórek były dostarczone przez Sarstedt (Stare Babice, Polska) i Medlab (Raszyn, Polska).

5 WYNIKI

5.1 Opracowanie i walidacja metody oznaczania wewnątrzkomórkowego cynku całkowitego

5.1.1 Wybór optymalnych warunków pomiaru

Metoda oznaczania cynku (Zn) opiera się na selektywnym wiązaniu tego kationu przez barwnik fluorescencyjny 6-metoksy-(8-*para*-toluenosulfonamido)-chinolina (TSQ) w obecności fizjologicznych stężeń jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . TSQ (Ryc. 5) został po raz pierwszy użyty przez Fredericksona (1987) w barwieniu histochemicznym Zn w tkankach pośmiertnych mózgu (Frederickson i wsp., 1987). W kompleksie TSQ- Zn^{2+} dwie cząsteczki liganda wiążą jeden jon Zn^{2+} (Prat i wsp., 1991).



Wzór sumaryczny

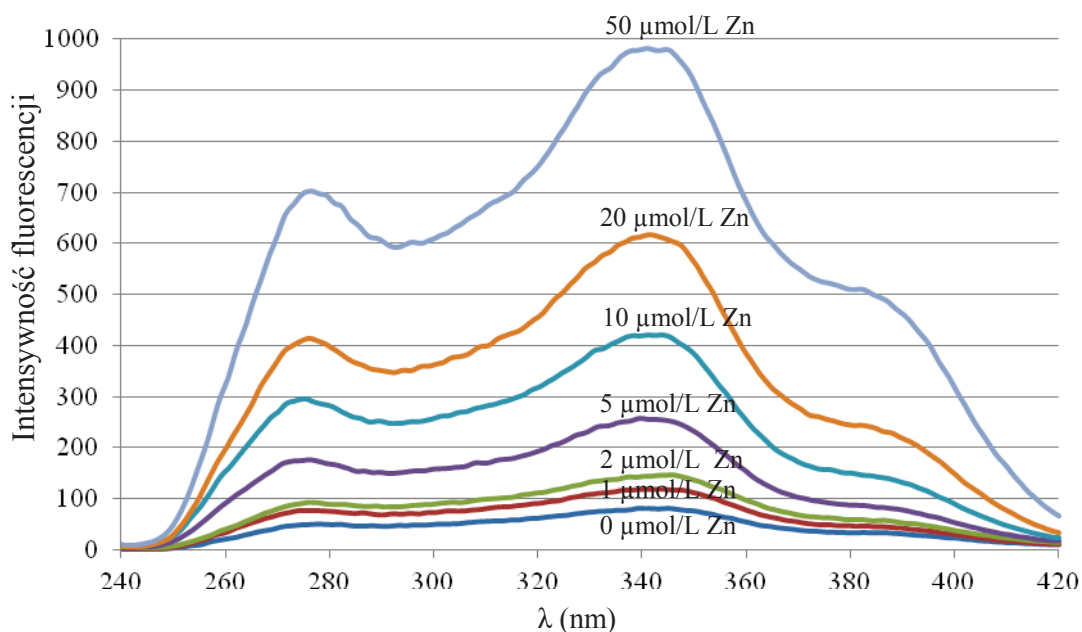
$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Masa cząsteczkowa

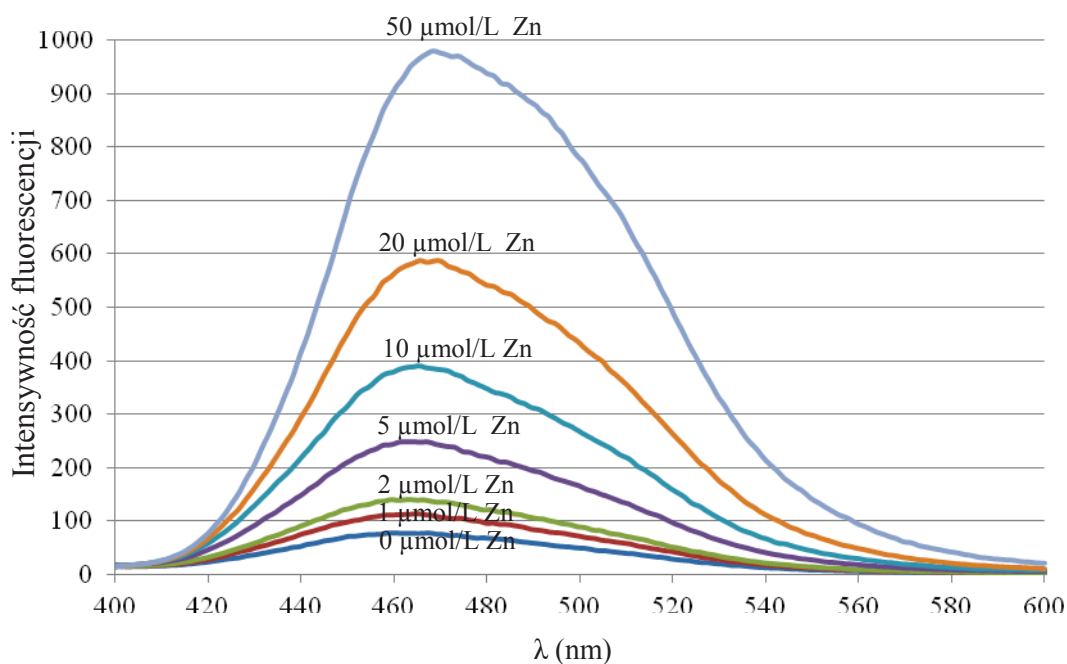
328.385 g/mol

Ryc. 5. Wzór strukturalny barwnika fluorescencyjnego TSQ utworzony za pomocą programu ChemDrew.

Widmo wzbudzenia i emisji barwnika TSQ (60 $\mu\text{mol/L}$) mierzone w buforze 100 mmol/L HEPES pH 7.4 w obecności wzrastającego stężenia Zn przedstawia rycina 6, 7.



Ryc. 6. Widmo wzbudzenia TSQ w obecności wzrastających stężeń Zn (0-50 $\mu\text{mol/L}$) przy długości fali 495 nm (maksimum emisji) mierzone w 100 mmol/L buforze HEPES pH 7.4.



Ryc. 7. Widmo emisyjne TSQ w obecności wzrastającego stężenia Zn (0-50 μM) przy długości fali wzbudzenia 335 nm mierzone w 100 mmol/L buforze HEPES pH 7.4.

W celu kalibracji metody pomiaru Zn całkowitego wykonano roztwory wzorcowe 1-50 $\mu\text{mol/L}$ próby, a następnie do kuwety pomiarowej dodano 1800 μL 100 mmol/L buforu HEPES pH 7.4, 200 μL każdego ze wzorców (Tabela 2) i zmierzono intensywność fluorescencji (RLU) z różnymi stężeniami TSQ (Tabela 3).

Przygotowanie standardów w celu wykonania krzywej kalibracyjnej przedstawiono w Tabeli 1 (patrz rozdz. 4.4).

Tabela 2. Schemat wykonania pomiaru krzywej kalibracyjnej do oznaczania Zn

	Stężenie $\mu\text{mole/L}$ próby	1	2	3	4	5	6
	Zawartość (nmole/próbę)						
Zn	$\frac{1.0}{(0.2)}$	200					
	$\frac{2.0}{(0.4)}$		200				
	$\frac{5.0}{(1.0)}$			200			
	$\frac{10}{(2.0)}$				200		
	$\frac{20}{(4.0)}$					200	
	$\frac{50}{(10.0)}$						200
	0.1 mmol/L HEPES [μL]	1800	—————→				

Tabela 3. Dobór optymalnego składu środowiska pomiarowego

[Zn] ($\mu\text{mol/L}$ próby) Zawartość Zn (nmole/próbę)	$\frac{0}{(0.0)}$	$\frac{1.0}{(0.2)}$	$\frac{2.0}{(0.4)}$	$\frac{5.0}{(1.0)}$	$\frac{10.0}{(2.0)}$	$\frac{20.0}{(4.0)}$	$\frac{50.0}{(10.0)}$
0.1 mol/L HEPES 1 mg/mL TSQ w EtOH [20 μL]	197	617	941	999.9			
0.1 mol/L HEPES 1 mg/mL TSQ w DMSO [20 μL]	17	35	52	83	125	189	351
0.1 M HEPES 2 mg/mL TSQ w DMSO [20 μL]	17	41	67	127	235	438	739
0.1 M HEPES 2 mg/mL TSQ w DMSO [30 μL]	22	43	67	133	268	446	823
H ₂ O 1 mg/mL TSQ w EtOH [20 μL]	193	970	999.9	999.9			
H ₂ O 1 mg/mL TSQ w DMSO [10 μL]	203	508	946	999.9			
H ₂ O 1 mg/mL TSQ w DMSO [20 μL]	247	616	832	999.9			

Dane z pojedynczego oznaczenia reprezentatywnego dla 3 doświadczeń.

5.1.2 Powtarzalność i odtwarzalność

Tabela 4. Powtarzalność oznaczania Zn we wzorcu metodą spektrofluorymetryczną – seria jednoczesna

[Zn] $\mu\text{mol/L}$ próby Zawartość Zn (nmole/próbkę)	ΔRLU	\bar{X}	OS	WZ (%)
$\frac{1}{(0.2)}$	36 36 36 36 36 38 35	36.1	0.9	2
$\frac{2}{(0.4)}$	65 69 64 64 65 64 63	64.9	1.9	3
$\frac{5}{(1.0)}$	162 157 168 167 162 162 159	162.4	3.9	2
$\frac{10}{(2.0)}$	280 274 278 271 274 288 278	277.6	5.5	2

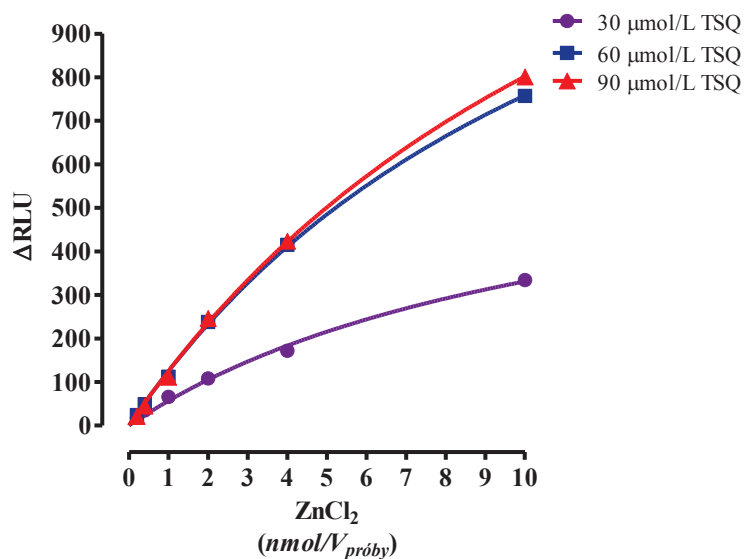
Skróty: \bar{X} , średnia arytmetyczna; OS, odchylenie standardowe; WZ, współczynnik zmienności

Tabela 5. Wartości Δ RLU dla krzywej wzorcowej do oznaczania Zn – seria niejednoczesna

[Zn] (μ mol/L próby) Zawartość Zn (nmole/próbę)	Δ RLU										\bar{X}	OS	WZ (%)
	Dzień	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
$\frac{1}{0.2}$	21	30	23	24	22	29	29	25	23	23	24	3.2	13
$\frac{2}{0.4}$	45	48	48	50	48	53	56	53	43	47	49	3.9	8
$\frac{5}{1.0}$	111	108	111	110	106	123	115	99	129	109	112	8.5	8
$\frac{10}{2.0}$	246	242	240	218	226	244	259	254	234	218	238	14	6
$\frac{20}{4.0}$	424	430	423	368	383	423	429	456	422	396	415	25.7	6
$\frac{50}{10.0}$	801	809	783	721	687	760	763	782	701	764	757	41.3	5

Skróty: \bar{X} , średnia arytmetyczna; OS, odchylenie standardowe; WZ, współczynnik zmienności

W celu oznaczenia całkowitego wewnątrzkomórkowego Zn, odpowiednio przygotowane komórki (patrz 4.1.1., 4.1.2) zawieszano w 0.3 ml 4% HClO₄, a następnie zobojętniano 7.5N K₂CO₃ do pH 6.0. Do kuwety reakcyjnej, zawierającej 1800 μ L 100 mmol/L buforu HEPES pH 7.4, dodawano 0-200 μ L próby badanej oraz 20 μ L TSQ 2 mg/mL. Intensywność fluorescencji odczytywano po 20 minutach przy długości fali wzbudzenia 335 nm oraz emisji 495 nm. Zawartość Zn odczytywano z wykresu kalibracyjnego, od 0.2 do 4.0 nmoli Zn/próbę (Tabela 1, Ryc. 8).



Ryc. 8. Krzywe kalibracyjne do oznaczania całkowitego Zn wewnątrzkomórkowego przy różnych stężeniach TSQ (patrz Tabela 3).

Wykres kalibracyjny dla Zn przedstawiony na Ryc. 8 (60 μmol/L TSQ), wraz z danymi wskazującymi na dobre parametry tej metody (Tabela 6, 7), był wykonywany w każdym doświadczeniu. Na jego podstawie obliczano zawartości metalu w badanych próbkach komórek.

Tabela 6. Powtarzalność oznaczeń zawartości Zn w komórkach SN56 metodą spektrofotometryczną – seria jednoczesna

Nr próby	Zawartość Zn (nmole/próbę)	\bar{X}	OS	WZ (%)
<u>Próba nr 1</u>	2.01	1.95	0.06	3
	1.89			
	2.03			
	1.88			
	1.91			
	1.95			
	2.03			
	1.90			
<u>Próba nr 2</u>	1.86	1.80	0.07	4
	1.75			
	1.88			
	1.74			
	1.69			
	1.76			
	1.80			
	1.89			

Skróty: \bar{X} , średnia arytmetyczna; OS, odchylenie standardowe; WZ, współczynnik zmienności.

Tabela 7. Odtwarzalność oznaczeń zawartości Zn w komórkach SN56 metodą spektrofluorymetryczną – seria niejednoczesna

Nr próby Dzień	Zawartość Zn (nmole/próbę)										\bar{X}	OS	WZ (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<u>Próba nr 3</u>	1.47	1.26	1.28	1.20	1.38	1.23	1.22	1.48	1.55	1.49	1.36	0.13	10
<u>Próba nr 4</u>	1.85	1.19	0.97	1.45	1.28	1.15	1.11	1.81	1.68	1.56	1.42	0.21	15

Skróty: \bar{X} , średnia arytmetyczna; OS, odchylenie standardowe; WZ, współczynnik zmienności.

Odzysk dla prób badanych wynosił 94±5%.

5.2 Charakterystyka parametrów enzymatycznych i metabolicznych nieróżnicowanych cholinergicznych komórek SN56 i astroglejowych C6

Tabela 8. Poziomy badanych w pracy parametrów pomiarowych w nieróżnicowanych neuronalnych komórkach cholinergicznych SN56 i astroglejowych C6.

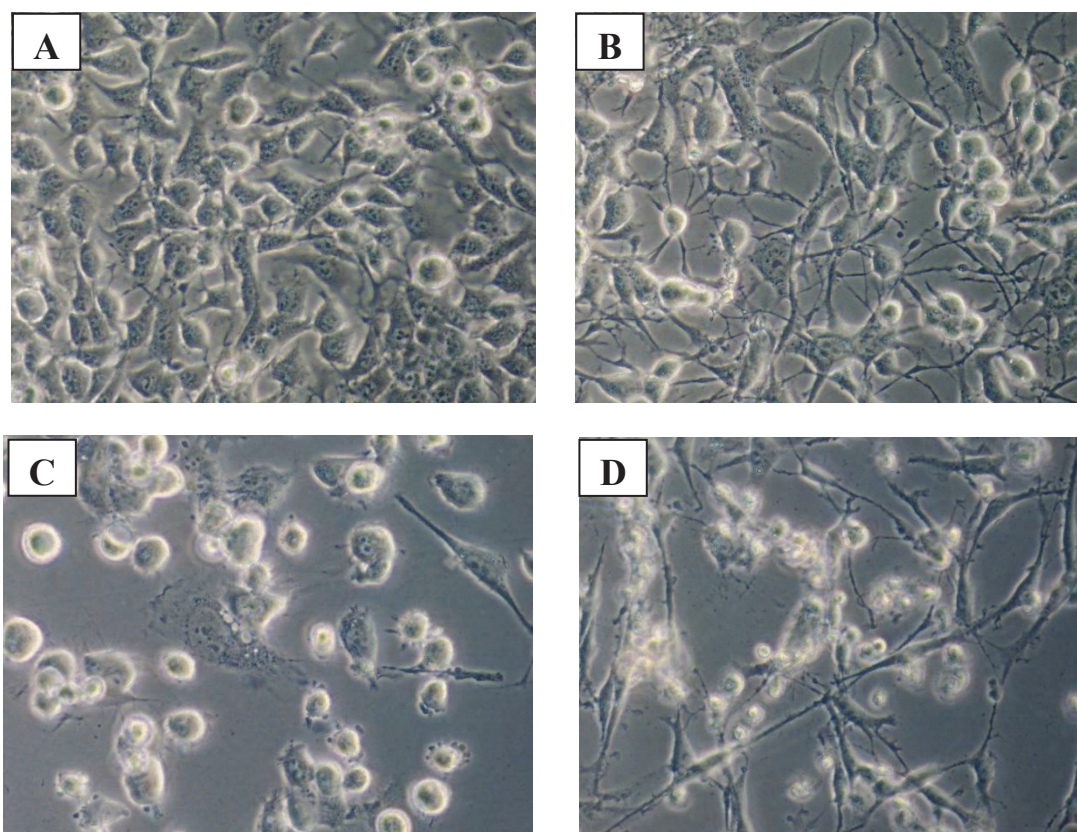
Parametr	SN56	C6
PDHC (nmol/min/mg białka)	6.81±0.14	2.76±0.15
Akonitaza (nmol/min/mg białka)	25.02±1.34	17.24±0.96
IDH-NADP (nmol/min/mg białka)	18.85±1.85	20.8±0.5
Całkowity acetylo-CoA (nmol/min/mg białka)	32.7±2.93*	22.8±2.93
Całkowity Ca (nmol/mg białka)	30.0±4.7*	23.5±2.8
Całkowity Zn (nmol/mg białka)	2.09±0.26	1.02±0.15
ZnT1/β-aktyna	0.75±0.05	1.18±0.15

*Dane z pracy Ronowska i wsp. 2007.

5.3 Wpływ cynku na morfologię komórek SN56 i C6

5.3.1 Komórki cholinergiczne neuroblastoma SN56

Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że Zn w stężeniu do 0.1 mmol/L nie powodował zmian w morfologii komórek SN56 (Ronowska i wsp., 2007). Dodanie 0.15 mmol/L Zn powodowało obniżenie stopnia proliferacji komórek, zanik wypustek neuronalnych i połączeń międzykomórkowych (Ryc. 9D). Jednocześnie obserwowano pojawianie się wodniczek oraz ziarnistości wewnątrz komórek oraz deformacji ich błon plazmatycznych (Ryc. 9C).

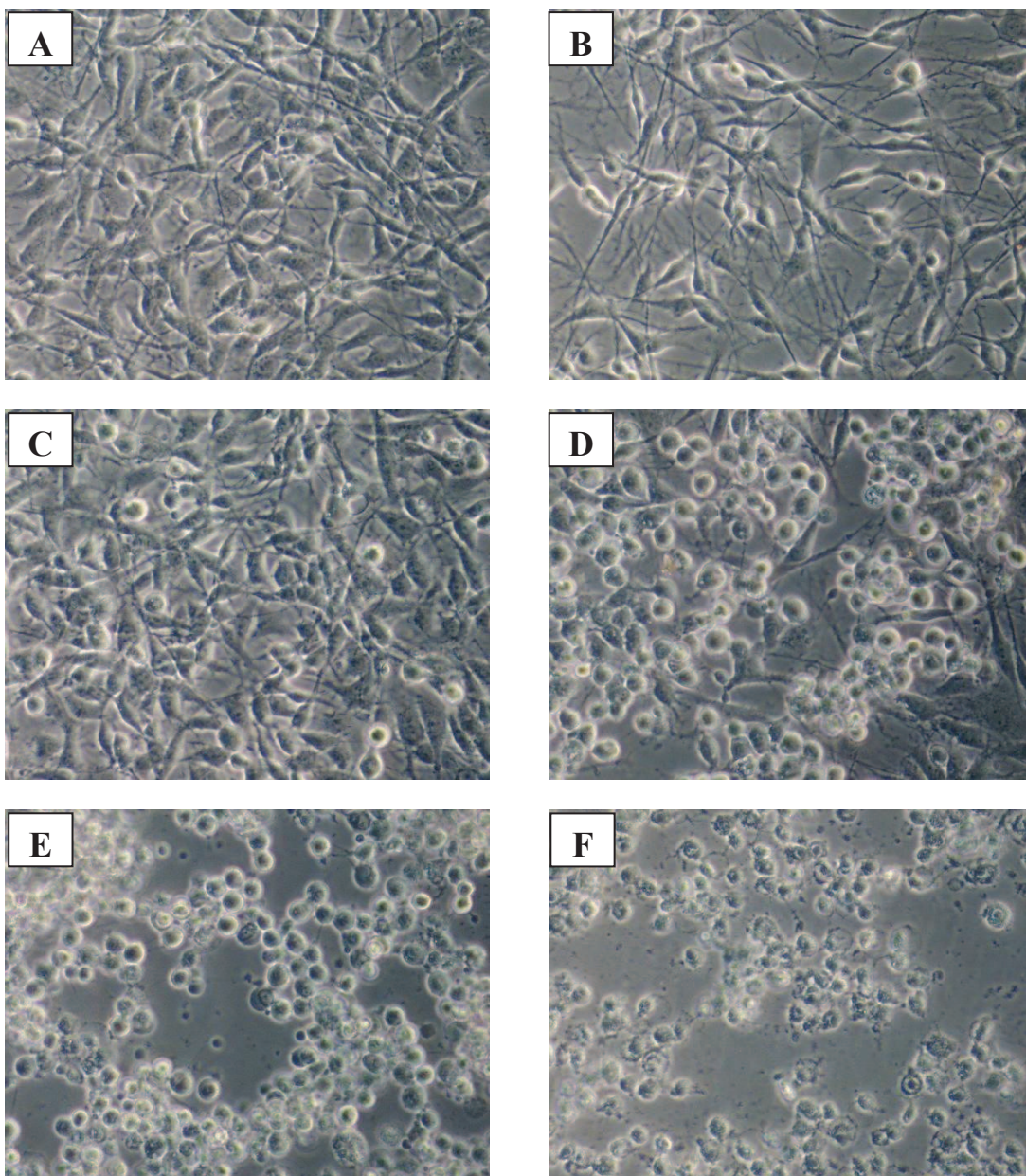


Ryc. 9. Wpływ Zn na morfologię neuronalnych komórek cholinergicznych SN56 A) kontrola, komórki nieróżnicowane (KN SN56), B) kontrola, komórki różnicowane dbcAMP/RA (KR SN56), C) KN SN56 z 0.15 mmol/L Zn, D) KR SN56 z 0.15 mmol/L Zn. Zdjęcia wykonane pod powiększeniem 400-krotnym, reprezentatywne dla 3 doświadczeń.

5.3.2 Komórki astroglajowe C6

Ekspozycja komórek C6 na dbcAMP/RA przez 48 godzin powodowała obniżenie szybkości proliferacji przy jednoczesnym wydłużeniu wypustek i zmianie kształtu na bardziej wrzecionowaty (Ryc. 10A, B). Zn w stężeniu do 0.20 mmol/L nie powodował zmian w morfologii komórek C6 w warunkach podstawowych

(Ryc. 10C). W komórkach C6 eksponowanych na dbcAMP/RA dodanie 0.20 mmol/L Zn powodowało obniżenie szybkości proliferacji komórek, zanik wypustek i połączeń międzykomórkowych (Ryc. 10D). Nieznacznie wyższe bo 0.22 mmol/L stężenie dodanego Zn powodowało podobne zmiany degeneracyjne w obu fenotypach komórek C6 (Ryc. 10E, F).

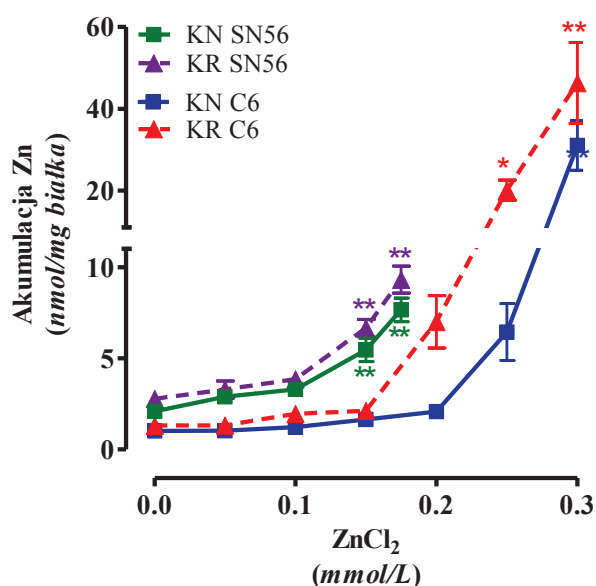


Ryc. 10. Wpływ Zn na morfologię komórek astrocytarnych C6 A) kontrola, komórki astrocytarne nieróżnicowane (KN C6), B) kontrola, komórki astrocytarne różnicowane dbcAMP i RA (KR C6), C) KN C6 z 0.20 mmol/L Zn, D) KR C6 z 0.20 mmol/L Zn, E) KN C6 z 0.22 mmol/L Zn, F) KR C6 z 0.22 mmol/L Zn. Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 400-krotnym, reprezentatywne dla 3 doświadczeń.

5.4 Akumulacja cynku w warunkach długoczasowych i jego cytotoksyczny wpływ na komórki SN56 i C6

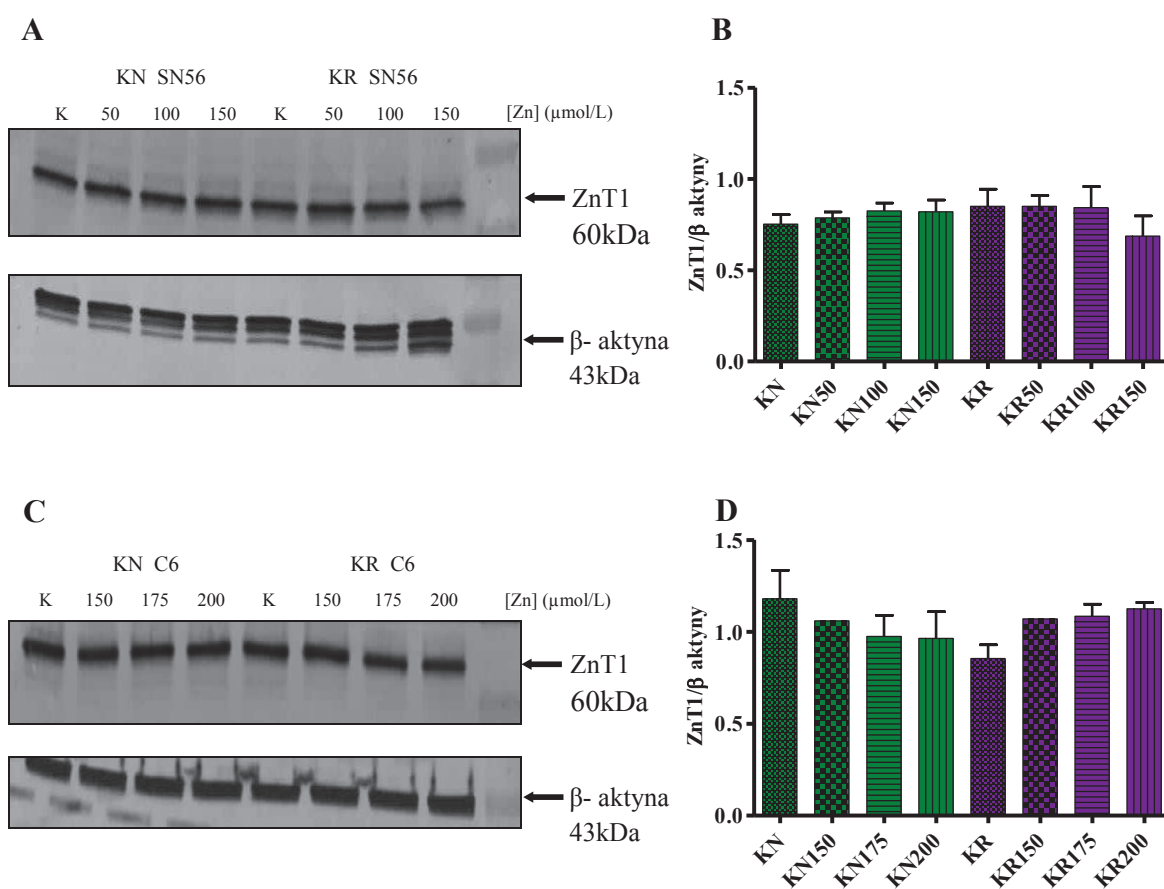
5.4.1 Zróżnicowana akumulacja Zn w różnych fenotypach komórek SN56 i C6

W nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56, po ekspozycji na zewnątrzkomórkowe stężenia Zn do 0.1 mmol/L nie obserwowano akumulacji tego kationu. Po 24 godzinnej ekspozycji nieróżnicowanych i różnicowanych neuronalnych komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn jego wewnątrzkomórkowa akumulacja wynosiła odpowiednio 5.46 oraz 6.66 nmoli/mg białka (Ryc. 11). W tych samych warunkach wewnątrzkomórkowy poziom Zn w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach astroglajowych C6 wynosił odpowiednio 1.64 oraz 2.12 nmoli/mg białka (Ryc. 11). Przy 0.25 mmol/L stężeniu Zn w środowisku jego akumulacja wynosiła 6.45 nmoli/mg białka w KN C6, natomiast w KR C6 wzrastała aż do 20.1 nmoli/mg białka (Ryc. 11).



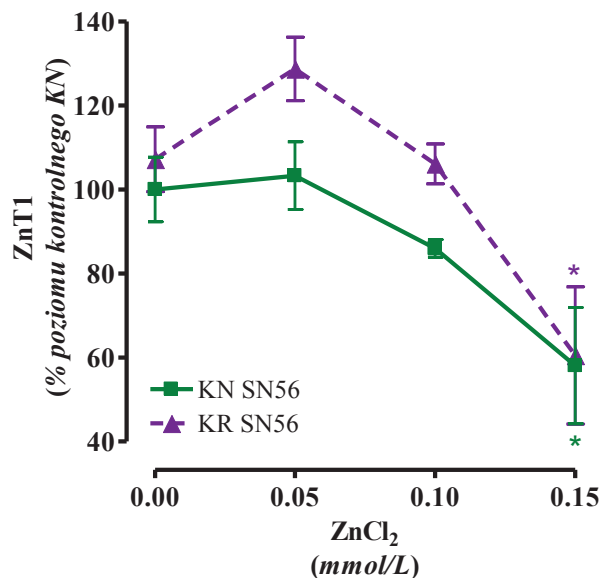
Ryc. 11. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na jego akumulację w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 oraz C6. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 8-14 doświadczeń. Znamiennie różne od kontroli, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Obecność białka ZnT1 w komórkach SN56 oraz C6 została potwierdzona ilościową metodą Western Blot (Ryc. 12). Metodą tą wykazano, że Zn w stężeniach do 0.15 mmol/L nie powodował zmian poziomu białka ZnT1 w komórkach SN56 (Ryc. 12A, B). Podobnie nie wykazano zmian poziomu tego białka w komórkach astrocytarnych C6 eksponowanych na zwiększające się do 0.20 mmol/L stężenia Zn (Ryc. 12C, D).



Ryc. 12. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom białka ZnT1 w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach cholinergicznym SN56 (A, B) oraz C6 (C, D) wykonywany techniką Western Blot. Na każdą ścieżkę nanoszono 50 μg białka. Zdjęcia są reprezentatywne dla 3 niezależnych doświadczeń. Wykresy zawierają względne zmiany zawartości ZnT1 w stosunku do β -aktyny i są wartościami średnimi \pm SEM z 3 doświadczeń.

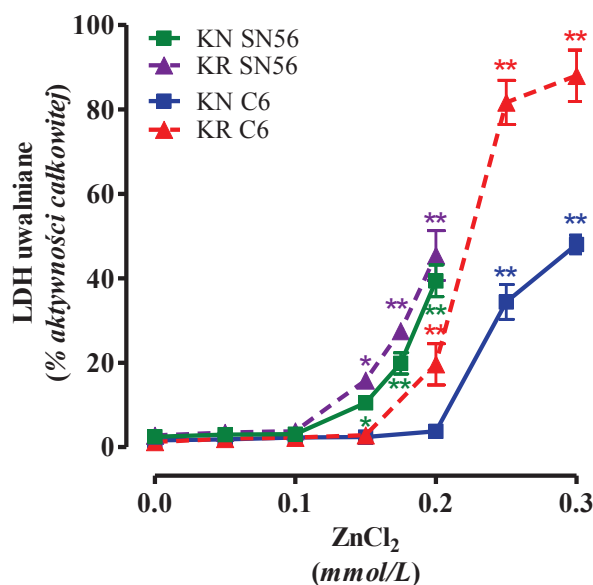
Natomiast przy użyciu testu ELISA wykazano około 40% spadek poziomu ZnT1 zarówno w KN, jak i KR neuronalnych SN56 przy ekspozycji na 0.15 mmol/L (Ryc. 13).



Ryc. 13. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom białka ZnT1 w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach cholinergicznym SN56 (oznaczenie metodą ELISA). Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, *p<0.05. Wartość względna 100% odpowiada zawartości 167.8±12.9 pg/mg białka ZnT1 dla KN SN56.

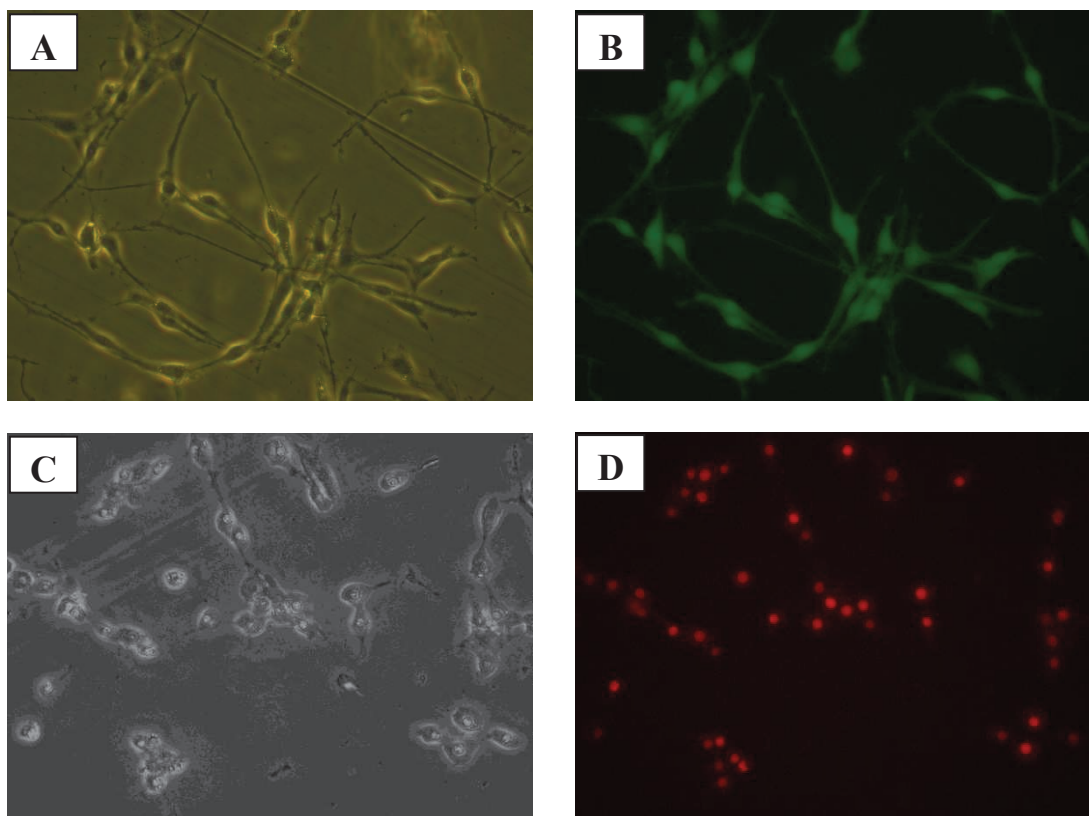
5.4.2 Cytotoksyczny wpływ akumulacji Zn na komórki SN56 i C6

Po 24 godzinnej ekspozycji neuronalnych komórek SN56 na 0.20 mmol/L Zn frakcja uszkodzonych komórek nieróżnicowanych wynosiła 40%, a różnicowanych 45% (Ryc. 14). W tych samych warunkach śmiertelność nieróżnicowanych, jak i różnicowanych astroglajowych C6 wynosiła 2-20%. Dopiero wzrost stężenia Zn w środowisku hodowlanym do 0.25 mmol/L powodował zwiększenie frakcji uszkodzonych KN C6 do 35%, podobne do obserwowanego w SN56 przy stężeniu Zn 0.20 mmol/L. W tych warunkach frakcja uszkodzonych KR C6 wzrastała do 88% (Ryc. 14).



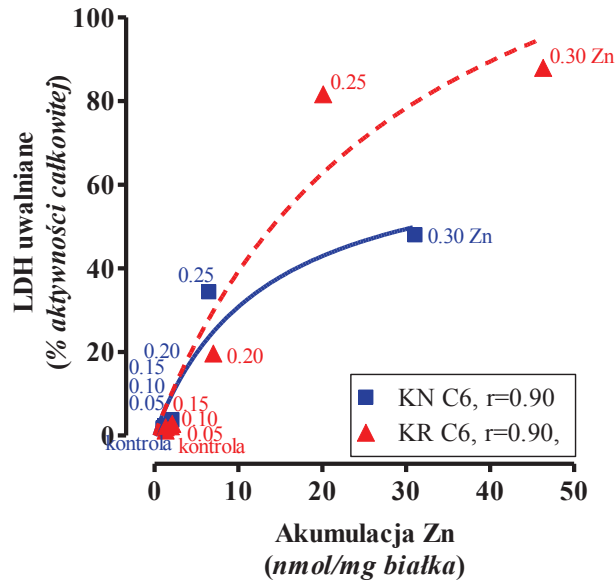
Ryc. 14. Długoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na frakcyjną zawartość pozakomórkowego LDH nieróżnicowanych i różnicowanych komórek SN56 i C6. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4–11 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, * $p<0.05$, ** $p<0.001$.

Stopień uszkodzenia komórek C6 zbadano również metodą immunofluorohistochemiczną barwienia różnicowego komórek diocetanem karboksylu fluoresceiny (6-CFDA) oraz jodkiem propidyny (PI). W warunkach kontrolnych żywe komórki astrocytarne C6 wykazywały intensywną, zieloną fluorescencję 6-CFDA (Ryc. 15B). Po 24 godzinnej ekspozycji tych komórek na 0.22 mmol/L Zn zaobserwowano zmianę w ich morfologii; komórki traciły wypustki, przybierały okrągły kształt z deformacjami błon plazmatycznych (Ryc. 15C). W tych warunkach komórki C6 wybarwiały się PI na czerwono, wskazując na obecność uszkodzeń integralności błony komórkowej (Ryc. 15D). Wskazuje to na obecność późnych stadiów apoptozy i procesów nekrotycznych.

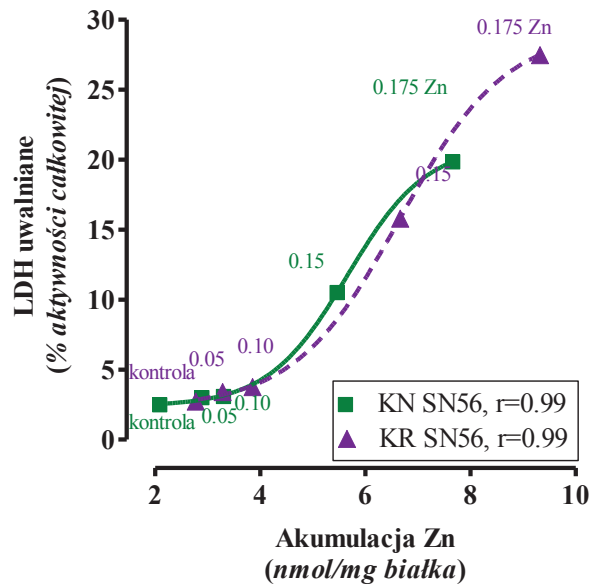


Ryc. 15. Przykładowe obrazy komórek astrocytarnych KN C6 w warunkach kontrolnych A) obraz w mikroskopie świetlnym, B) komórki C6 wybarwione dioctanem karboksyfluoresceiny (6-CFDA); przewlekły wpływ 0.22 mmol/L Zn na komórki KN C6 C) obraz w mikroskopie świetlnym, D) barwienie jodkiem propidyny (PI). Zdjęcia komórek wykonano pod powiększeniem 120-krotnym; reprezentatywne dla 3 doświadczeń.

Na podstawie powyższych wyników (Ryc. 11, 14) wykazano istnienie znamiennej korelacji nieprostoliniowej o charakterze nasyceniowym, wznoszącym pomiędzy akumulacją Zn w komórkach C6, a wielkością frakcji uwalnianej z nich dehydrogenazy mleczanowej (KN C6 $r=0.90$; KR C6 $r=0.99$; Ryc. 16). Natomiast w przypadku komórek neuronalnych, wykresy wysoce znamiennej korelacji między akumulacją Zn a stopniem uszkodzenia komórek SN56 wykazywały nakładające się na siebie przebiegi nieprostoliniowe o charakterze wznoszącej hiperboli (concave up) (KN SN56 $r=0.99$, KR SN56 $r=0.99$) (Ryc. 17).

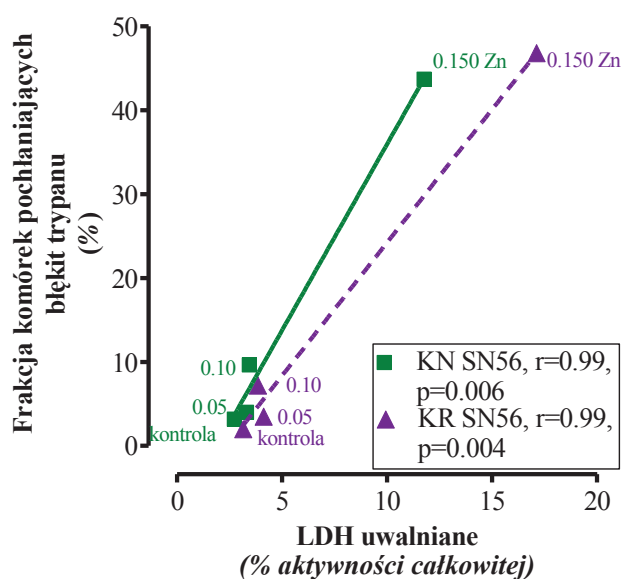


Ryc. 16. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a LDH uwolnionym z komórek nieróżnicowanych i różnicowanych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn (według danych z Ryc. 11, 14; liczby opowiadają stężeniu dodanego Zn w mmol/L).



Ryc. 17. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a uwalnianiem LDH z komórek nieróżnicowanych i różnicowanych SN56 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn (według danych z Ryc. 11, 14; liczby opowiadają stężeniu dodanego Zn w mmol/L).

Uwalnianie LDH, białka o dużej masie cząsteczkowej jest wskaźnikiem znacznego uszkodzenia, lub całkowitego rozpadu komórek spowodowanego działaniem czynników cytotoksycznych. Oznaczenie LDH w środowisku hodowlanym jest miarą toksyczności badanej substancji względem komórek (Kornberg, 1955). Natomiast utrata zdolności wydalania błękitu trypanu wskazuje na utratę zależnych od energii funkcji transportowych komórek i przerwanie integralności błony komórkowej. Niezmieniona strukturalnie i właściwie funkcjonująca błona żywych komórek wykazuje zdolność usuwania dodatnio naładowanych cząsteczek barwnika błękitu trypanu. Komórki uszkodzone wybarwiają się tym barwnikiem (Manford i Patterson, 1979). Zależne od stężenia Zn zmiany frakcyjnego uwalniania LDH wykazywały dodatnią prostoliniową znamioną korelację ze zmianami frakcji uszkodzonych pochłaniających błękit trypanu komórek KN i KR SN56 (KN SN56 $r=0.99$, $p=0.006$; KR SN56 $r=0.99$, $p=0.004$).



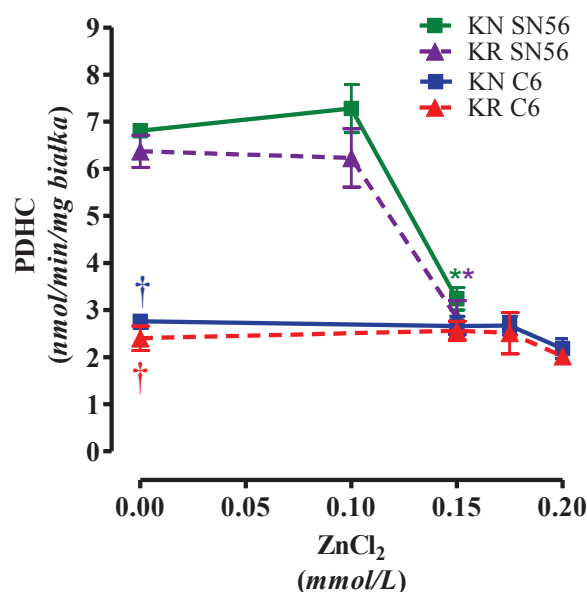
Ryc. 18. Korelacje pomiędzy frakcjami komórek pochłaniających błękit trypanu i LDH uwolnionego z komórek neuronalnych: nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) SN56 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn (liczby opowiadają stężeniu dodanego Zn w mmol/L).

5.5 Długoczasowy wpływ Zn na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach cholinergicznym SN56 i astroglejowym C6

Pośmiertne badania mózgow chorych z AD wykazały spadki aktywności szeregu enzymów metabolizmu energetycznego, w tym dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (Bubber i wsp., 2005). Z kolei nasze badania na neuronalnych hodowlach komórkowych wykazały, że przyczyną tych spadków mogą być tzw. neurotoksyny alzheimerowskie, które w różnym stopniu hamowały aktywności tych enzymów (Bielarczyk i wsp., 2003; Ronowska i wsp., 2007; Szutowicz i wsp., 2013). Uzasadniało to podjęcie takich badań w przypadku komórek astrocytarnych.

5.5.1 Długoczasowy wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) w komórkach astrocytarnych i neuronalnych

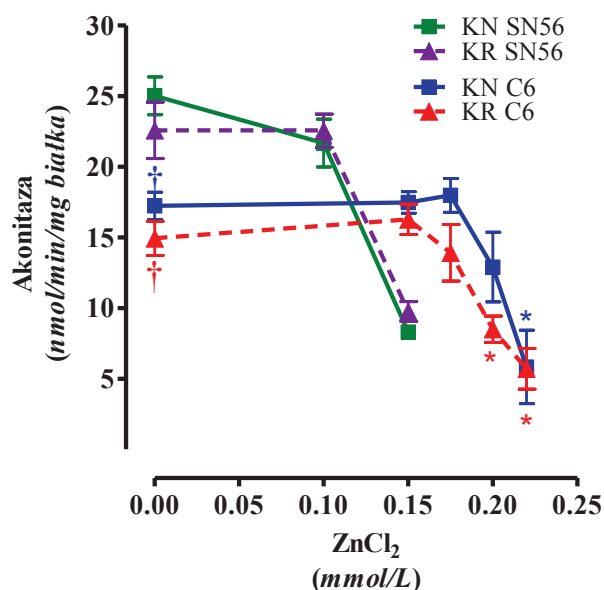
Aktywność PDHC w KN i KR SN56, hodowanych w środowisku DMEM-FBS wynosiła odpowiednio 6.81 ± 0.14 oraz 6.37 ± 0.34 nmoli/min/mg białka całkowitego. Natomiast aktywność PDHC w KN i KR C6, hodowanych w środowisku DMEM-FBS była około 3 razy niższa niż w komórkach SN56 i wynosiła odpowiednio 2.76 ± 0.15 ($p < 0.0001$) oraz 2.40 ± 0.26 ($p < 0.0001$) nmoli/min/mg białka całkowitego. Ekspozycja komórek SN56 na 0.10 mmol/L stężenie Zn przez 24 godziny nie powodowała inhibicji aktywności PDHC (Ryc. 19). Natomiast Zn w stężeniu 0.15 mmol/L spowodował zahamowanie aktywności tego enzymu w KN i KR SN56 odpowiednio o 58 i 56% (Ryc. 19). W komórkach C6, Zn w stężeniu 0.15, 0.175 oraz 0.20 mmol/L nie powodował inhibicji aktywności PDHC (Ryc. 19).



Ryc. 19. Aktywność PDHC w nieróżnicowanych (KN SN56) i różnicowanych (KR SN56) cholinergicznym neuroblastoma SN56 oraz nieróżnicowanych (KN C6) i różnicowanych (KR C6) komórkach astroglejowych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.001$; znamienne różne od aktywności w SN56, † $p < 0.0001$.

5.5.2 Długoczasowy wpływ Zn na aktywność akonitazy

Aktywność akonitazy w KN i KR SN56 hodowanych w środowisku DMEM-FBS wynosiła odpowiednio 25.34 ± 1.34 oraz 22.58 ± 2.0 nmoli/min/mg białka całkowitego. Natomiast aktywność akonitazy w KN i KR C6 hodowanych w środowisku DMEM-FBS była niższa niż w komórkach neuronalnych i wynosiła odpowiednio 17.24 ± 0.96 ($p = 0.0015$) oraz 14.93 ± 1.20 ($p = 0.0117$) nmoli/min/mg białka całkowitego. Ekspozycja komórek SN56 na 0.10 mmol/L stężenie Zn przez 24 godziny nie powodowała inhibicji aktywności akonitazy (Ryc. 20). Natomiast Zn w stężeniu 0.15 mmol/L spowodował zahamowanie aktywności tego enzymu w KN i KR SN56 odpowiednio o 67 i 57% (Ryc. 20). Zn w stężeniu 0.15 oraz 0.175 mmol/L nie powodowało inhibicji aktywności akonitazy w komórkach C6 (Ryc. 20). Natomiast Zn w stężeniach 0.20 oraz 0.22 mmol/L powodował zahamowanie aktywności tego enzymu w KN C6 odpowiednio o 26 i 67%, natomiast w KR C6 odpowiednio o 43 i 62% (Ryc. 20).

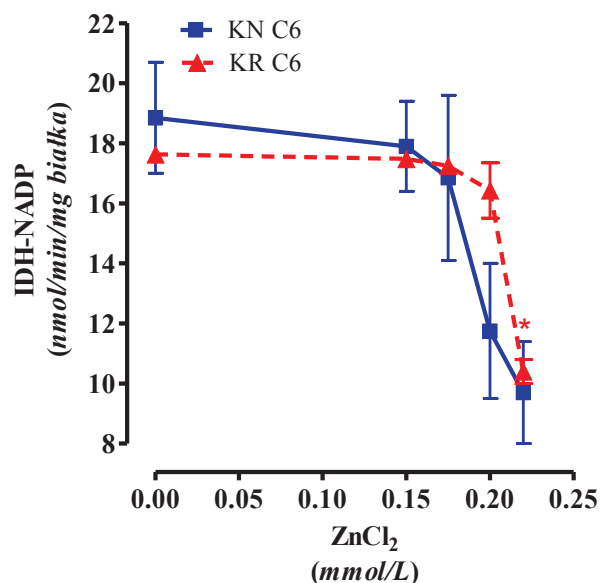


Ryc. 20. Aktywność akonitazy w nieróżnicowanych (KN SN56) i różnicowanych (KR SN56) cholinergicznym neuroblastoma SN56 oraz nieróżnicowanych (KN C6) i różnicowanych (KR C6) komórkach astroglejowych C6 eksponowanych przez 24 godziny na wzrastające stężenia Zn. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-5 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.01$; znamienne różne od komórek neuronalnych, † $p < 0.01$.

5.5.3 Długoczasowy wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej (IDH-NADP) w komórkach C6

Nasze poprzednie badania wykazały, że Zn nie hamował aktywności IDH-NADP w neuronalnych komórkach SN56 (Ronowska i wsp., 2007). Dlatego w przedstawianej pracy zbadano wyłącznie wpływ Zn na IDH-NADP w komórkach C6.

Aktywność IDH-NADP w komórkach nieróżnicowanych i różnicowanych C6 hodowanych w środowisku DMEM-FBS wynosiła odpowiednio 18.85 ± 1.85 oraz 17.63 ± 0.27 nmoli/min/mg białka całkowitego. Ekspozycja komórek C6 na 0.15, 0.175 oraz 0.20 mmol/L stężenie Zn przez 24 godziny nie powodowała inhibicji aktywności IDH (Ryc. 21). Natomiast Zn w stężeniu 0.22 mmol/L powodował zahamowanie aktywności tego enzymu w KN i KR C6, odpowiednio o 49 i 41% (Ryc. 21).

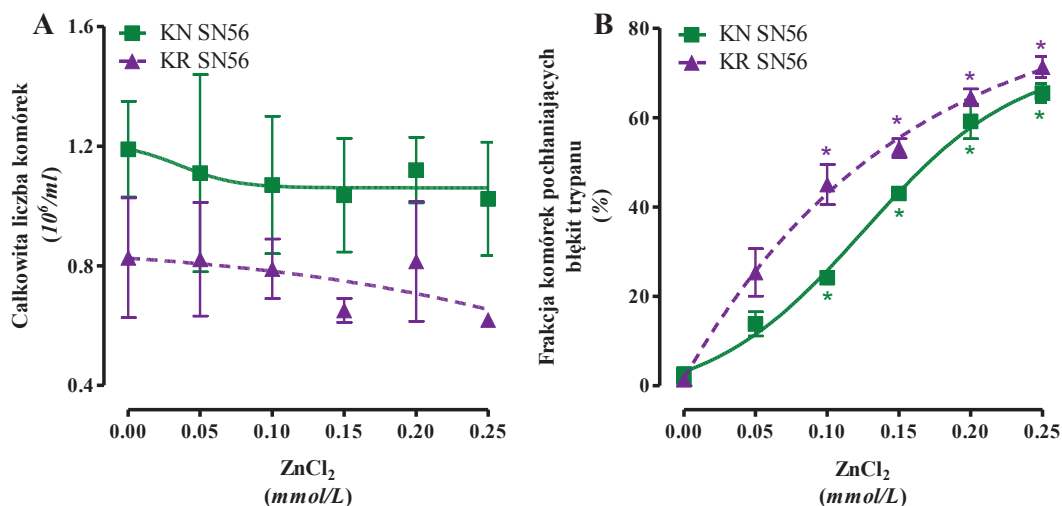


Ryc. 21. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach astroglowych C6 eksponowanych 24 godziny na wzrastające stężenia Zn. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, *p<0.001.

5.6 Krótkoczasowy cytotoksyczny wpływ Zn na cholinergiczne komórki SN56

W doświadczeniach neurotoksyczności krótkoczasowej, komórki po zebraniu z naczynia hodowlanego przenoszono do środowiska depolaryzacyjnego zawierającego 20 mmol/L bufor HEPES, pH 7.4, 1.5 mmol/L bufor fosforanowo-sodowy (pH 7.4), 90 mmol/L NaCl, 30 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L pirogronian, 2.5 mmol/l jabłczan. Do przemywania komórek użyto środowiska inkubacyjnego zawierającego 100 mmol/L EDTA. Środowisko nie zawierało surowicy płodowej.

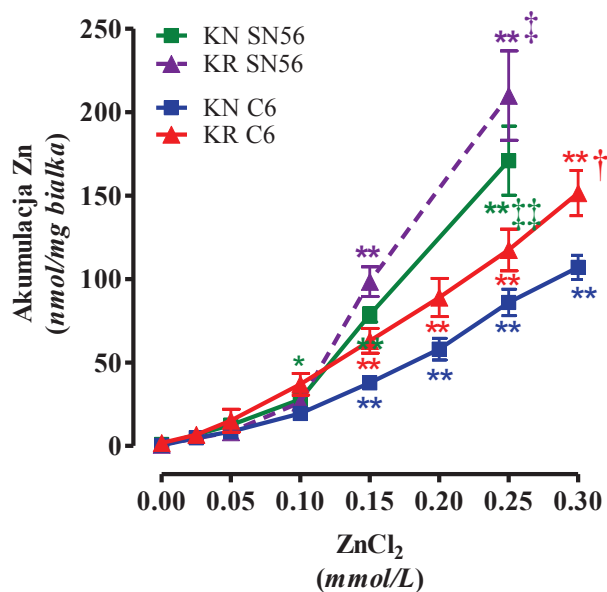
W warunkach depolaryzacyjnych, kontrolnych (bez Zn) frakcja komórek uszkodzonych, nie wydających błękitu trypanu wynosiła około 2% (Ryc. 22B). Natomiast 30 minutowa ekspozycja na Zn powodowała zależny od jego stężenia wzrost frakcji komórek uszkodzonych osiągający 70% przy 0.25 mmol/L stężeniu tego kationu (Ryc. 22B). W całym zakresie stężeń Zn nie powodował zmian całkowitej liczby zarówno KN, jak i KR (Ryc. 22A).



Ryc. 22. Krótkoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na wzrost komórek (A) i ich zdolność do wydalania błękitu trypanu (B). Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.001$.

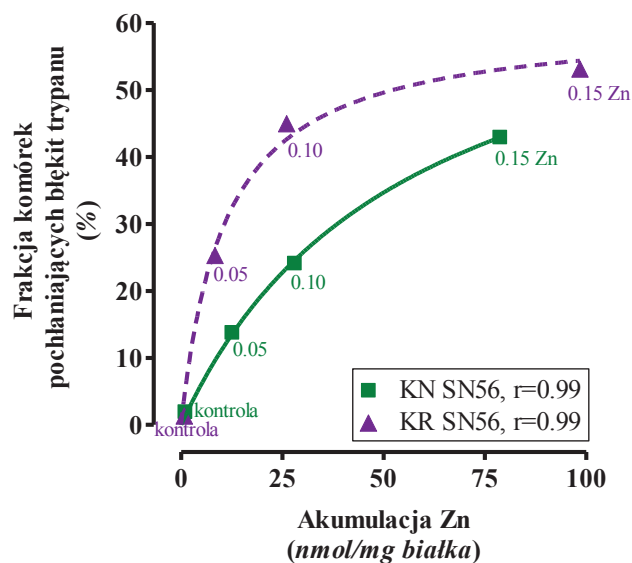
Krótkoczasowa, 30 minutowa ekspozycja komórek cholinergicznyc SN56 na wzrastające stężenie Zn wykazała jego akumulację o charakterze nienasycającym, która przy jego 0.15 mmol/L stężeniu osiągała wartości 78 i 98 nmoli/mg białka, odpowiednio w KN i KR (Ryc. 23).

Zn obecny w środowisku depolaryzującym akumulował się w komórkach C6, proporcjonalnie do jego stężenia. Akumulacja była proporcjonalna do stężenia Zn w środowisku i miała charakter nienasycający. Przy 0.25 mmol/L stężeniu Zn w środowisku osiągała ona wartości 82 nmoli/mg białka w KN C6 oraz 112 nmoli/mg białka w KR C6 (Ryc. 32). Akumulacja w KR C6 była znamienne wyższe niż w KN C6 ($p < 0.01$).



Ryc. 23. Krótkoczasowa, zależna od stężenia akumulacja Zn w zdepolaryzowanych komórkach cholinergicznym SN56 i astroglajowych komórkach C6. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-4 doświadczeń. Znamienne różne od: odpowiedniej kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; znamienne różne od akumulacji Zn w KN C6, † $p < 0.01$; znamienne różne od akumulacji Zn w KN i KR C6 0.25 mmol/L, ‡ $p < 0.05$, ‡‡ $p < 0.01$.

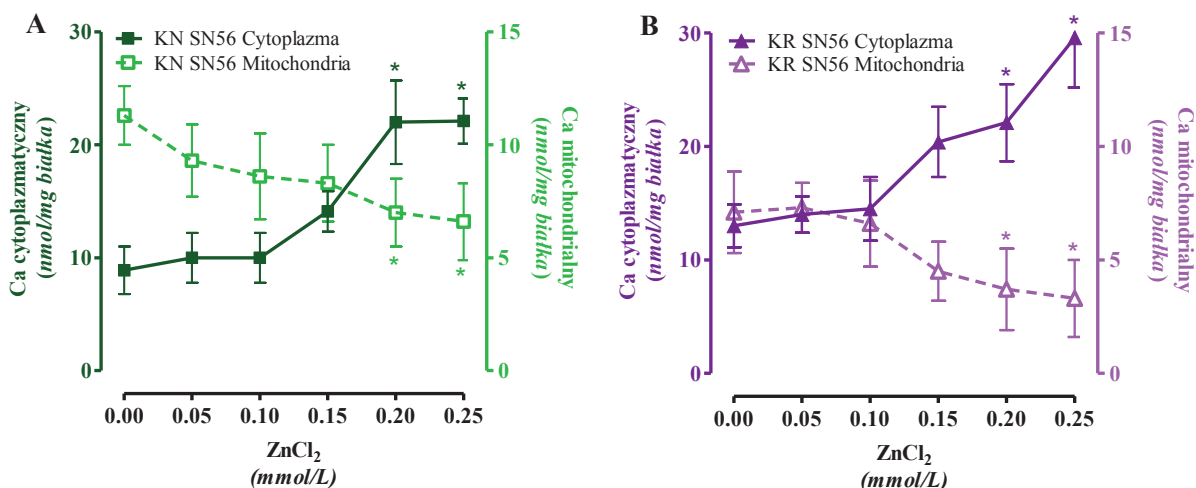
Krótkoczasowa akumulacja Zn w komórkach SN56 powodowała w tym czasie wzrost frakcji komórek uszkodzonych mierzonej zdolnością do usuwania błękitu trypanu. Wykazywała ona nieprostoliniową, nasycającą zależność pierwszorzędowej hiperboli od poziomu nagromadzonego Zn (Ryc. 24). Przy podobnych poziomach akumulacji tego kationu, KN SN56 wykazywały mniejszy stopień uszkodzenia niż komórki KR SN56 (Ryc. 24).



Ryc. 24. Korelacja pomiędzy akumulacją Zn a frakcją komórek uszkodzonych KN i KR SN56 eksponowanych przez 30 min w środowisku depolaryzacyjnym na wzrastające stężenia Zn (według danych z Ryc. 22B, 23; liczby przy wykresach opowiadają stężeniu dodanego Zn w mmol/L).

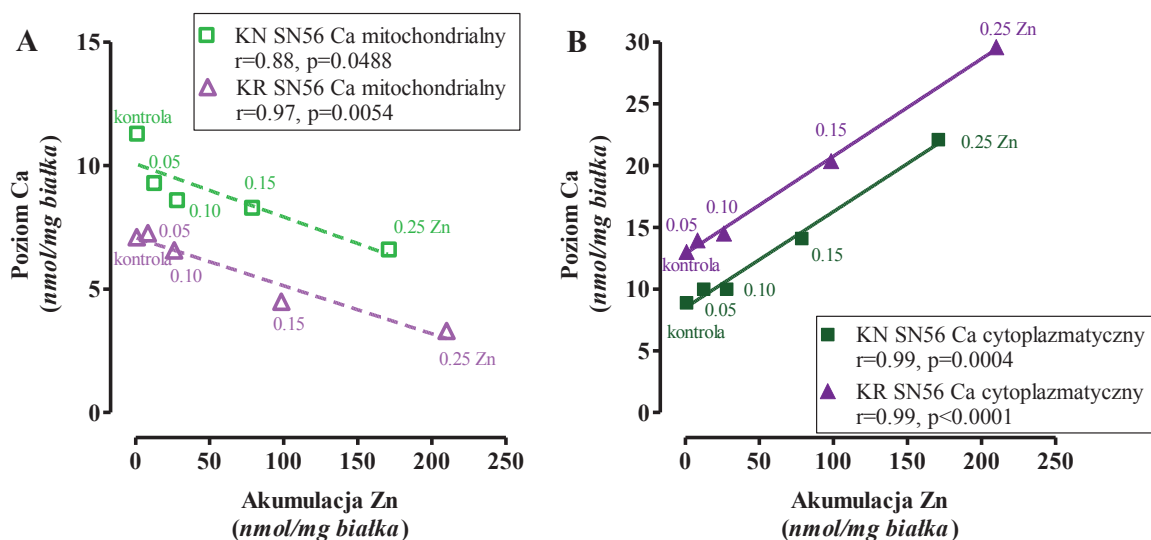
5.6.1 Krótkoczasowy wpływ Zn na poziom Ca w przedziałach subkomórkowych cholinergicznym komórkom SN56

W środowisku depolaryzacyjnym wzrastające stężenia Zn do 0.1 mmol/L nie powodowały istotnie statystycznych zmian w zawartości Ca w cytoplazmie i mitochondriach komórek SN56. Dalszy wzrost zewnątrzkomórkowego Zn powodował ponad dwukrotny wzrost zawartości Ca w cytoplazmie i obniżenie jego poziomu o 50% w mitochondriach zarówno w KN, jak i KR SN56 (Ryc. 25A, B).



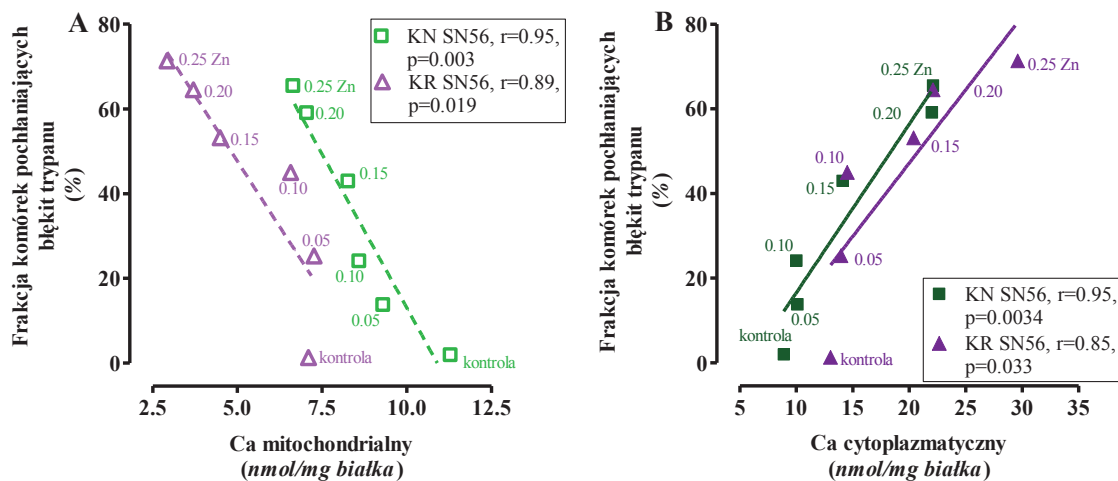
Ryc. 25. Krótkoczasowy, zależny od stężenia wpływ Zn na poziom Ca w przedziale cytoplazmatycznym i mitochondrialnym A. nieróżnicowanych; B. różnicowanych komórek cholinergicznym SN56. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.001$.

Wykazano istnienie znamiennej korelacji między akumulacją Zn i poziomem Ca w cytoplazmie (KN SN56 $r = 0.99$, $p = 0.0004$; KR SN56 $r = 0.99$, $p < 0.0001$) i odwrotnie proporcjonalną korelację między akumulacją Zn i poziomem Ca w mitochondriach (KN SN56 $r = 0.88$, $p = 0.0488$; KR SN56 $r = 0.97$, $p = 0.0054$) (Ryc. 26).



Ryc. 26. Korelacje pomiędzy akumulacją Zn i poziomem Ca w cytoplazmie i mitochondriach w komórkach nieróżnicowanych (A) i różnicowanych (B) SN56. Obliczono według danych z Ryc. 23, 25; liczby przy wykresach opowiadają stężeniom dodawanego do środowiska Zn w mmol/L.

Zależny od Zn wzrost frakcji uszkodzonych komórek KN i KR SN56 wykazywał odwrotną korelację w stosunku do zmian zawartości Ca w mitochondriach i prostą korelację ze zmianami Ca w przedziale cytoplazmatycznym (Ryc. 27A, B). Wzrost frakcji uszkodzonych KN SN56 następował przy znacznie wyższych stężeniach Ca mitochondrialnego niż w KR SN56 (Ryc. 27A).

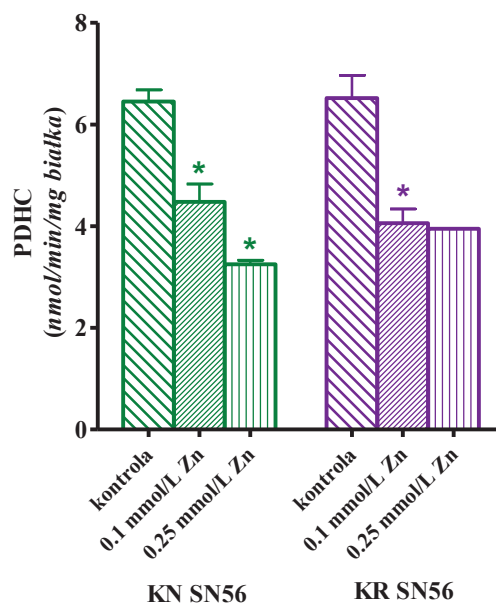


Ryc. 27. Odwrotne korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu a poziomem Ca w mitochondriach (A) oraz proste korelacje pomiędzy frakcją komórek pochłaniających błękit trypanu, a poziomem Ca w cytoplazmie (B) KN i KR SN56 po 30 minutowej inkubacji w obecności wzrastającego stężenia zewnątrzkomórkowego Zn (według danych z Ryc. 22, 25; liczby przy wykresach opowiadają stężeniom dodawanego Zn w mmol/L).

5.7 Wpływ krótkoczasowej ekspozycji komórek cholinergicznyc SN56 na Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego

5.7.1 Wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

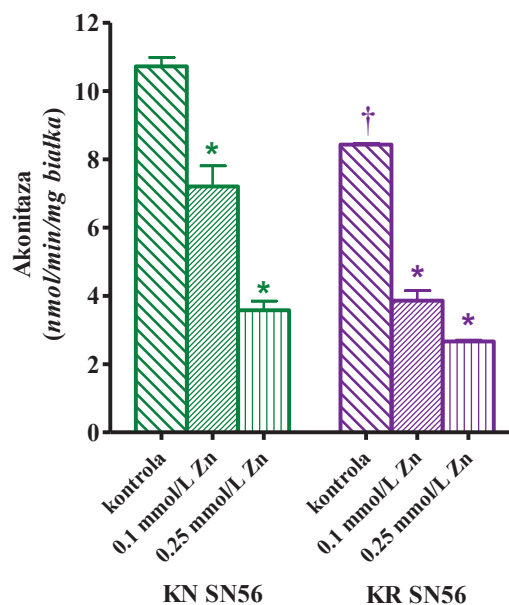
30-minutowa ekspozycja, zdepolaryzowanych 30 mmol/L K⁺, KN i KR SN56 na 0.1 lub 0.25 mmol/L stężenia Zn, powodowała 40-50% inhibicję aktywności PDHC (Ryc. 28).



Ryc. 28. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich PDHC. Dane są wartościami średnimi±SEM z 1-7 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli bez Zn, *p<0.001.

5.7.2 Wpływ Zn na aktywność akonitazy

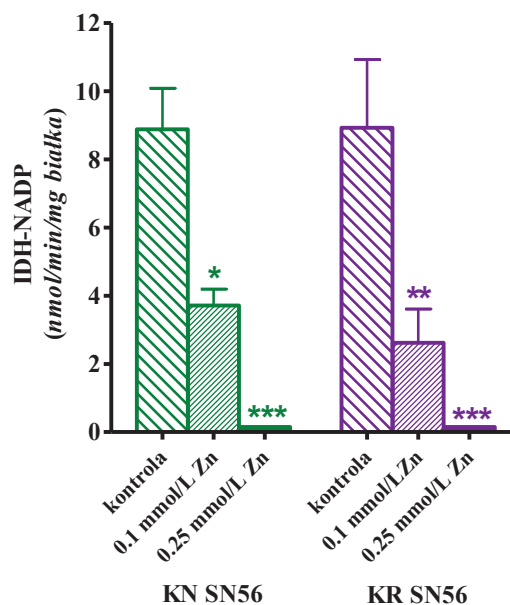
Krótkoczasowa ekspozycja KN i KR SN56 na 0.1 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym powodowała odpowiednio 38% i 54% inhibicję aktywności akonitazy. Zwiększenie stężenia Zn do 0.25 mmol/L zwiększało inhibicję, odpowiednio do 67% i 69% (Ryc. 29).



Ryc. 29. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich akonitazy. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli bez Zn, * $p < 0.001$, znamiennie różne od aktywności w KN C6, † $p < 0.01$.

5.7.3 Wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej

Krótkoczasowa ekspozycja depolaryzowanych KN i KR SN56 na 0.1 mmol/L stężenie Zn powodowała, odpowiednio 58% i 70% inhibicję aktywności IDH-NADP (Ryc. 31). Natomiast 0.25 mmol/L Zn powodował całkowite zahamowanie aktywności tego enzymu w obu fenotypach komórek SN56 (Ryc. 30).



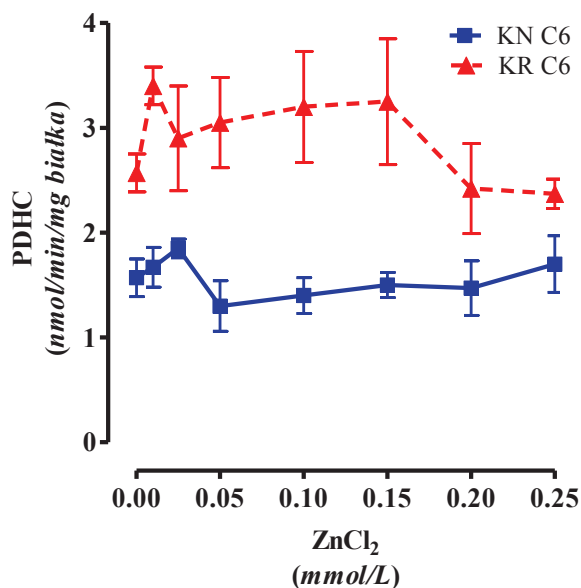
Ryc. 30. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR SN56 na średnio i wysoko-toksyczne stężenia Zn (Ryc. 22B), na aktywność ich IDH-NADP. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli bez Zn, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

5.8 Krótkoczasowa akumulacja Zn i jej wpływ na komórki astrocytarne C6

Zdepolaryzowane komórki C6 akumulowały Zn w przestrzeni pozakomórkowej mniej efektywnie niż komórki neuronalne SN56 (Ryc. 23). Również, w każdym z typów komórek akumulacja Zn była wyższa po ich zróżnicowaniu (Ryc. 23). Dlatego wydawało się interesujące zbadanie jak i czy te różnice odzwierciedlają się w zmianach parametrów metabolicznych komórek.

5.8.1 Wpływ na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

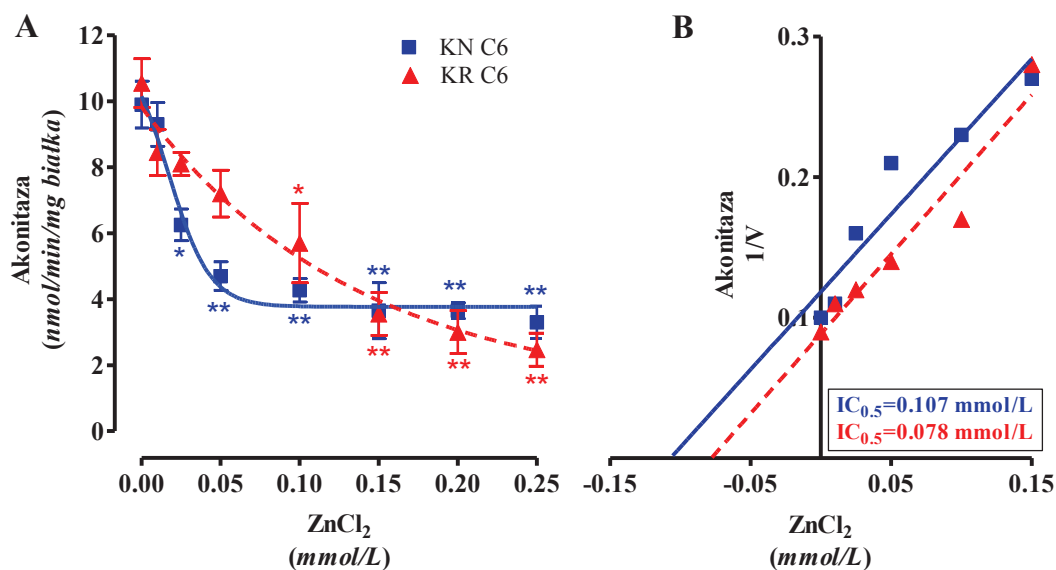
Aktywność PDHC w zdepolaryzowanych KN i KR C6 nie ulegała zmianie po ich 30 minutowej inkubacji z Zn w stężeniach od 0.05 do 0.25 mmol/L (Ryc. 31).



Ryc. 31. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność PDHC.

5.8.2 Wpływ na aktywność akonitazy

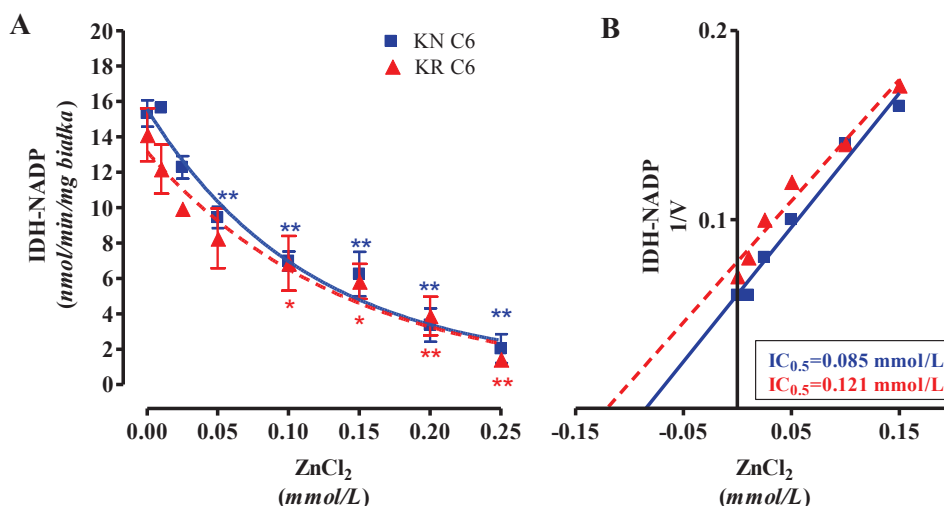
Z kolei 30 minutowa inkubacja KN i KR C6 z Zn powodowała inhibicję aktywności akonitazy. Wartości $[IC_{0.5}]$ dla Zn w stosunku do akonitazy z KN C6 wynosiła 0.107 mmol/L, a w KR C6 0.078 mmol/L (Ryc. 32B). Zwraca przy tym uwagę fakt, że w KN C6 wykres inhibicji był nietypowy. Mianowicie, maksymalna inhibicja wynosząca 52%, była już osiągnięta przy 0.1 mmol/L stężeniu Zn. Dalszy wzrost stężenia Zn nie powodował zwiększenia siły jego inhibicji (Ryc. 32A).



Ryc. 32. A. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność akonitazy B. Wykresy Dixona dla wpływu Zn na akonitazę. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, *p<0.01, **p<0.001.

5.8.3 Wpływ na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej

Inkubacja KN i KR C6 przez 30 minut w środowisku depolaryzującym ze wzrastającymi stężeniami Zn powodowała zależny od jego stężenia spadek aktywności IDH-NADP, który przy 0.1 mmol/L stężeniu tego metalu osiągał wartości ponad 50% (Ryc. 33A). Wartości [IC_{0.5}] dla inhibicji IDH-NADP przez Zn wynosiły dla KN C6 i KR C6, odpowiednio 0.085 mmol/L, i 0.121 mmol/L (Ryc. 33B).



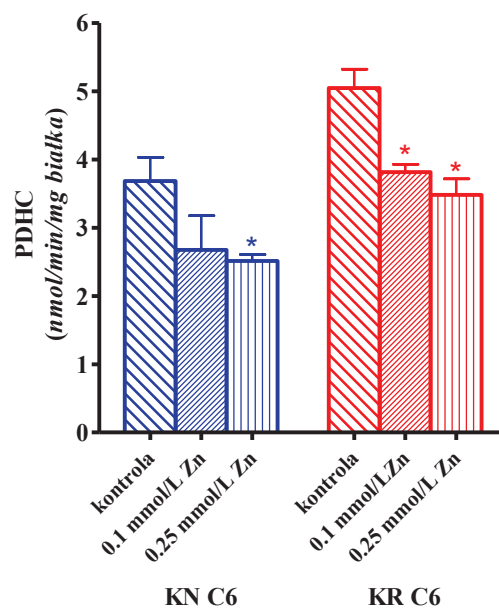
Ryc. 33. A. Wpływ krótkoczasowej ekspozycji zdepolaryzowanych KN i KR C6 na wzrastające stężenia Zn, na aktywność IDH-NADP B. Wykresy Dixona dla wpływu Zn na IDH-NADP. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 4-6 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

5.9 Bezpośredni wpływ Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach astroglowych C6

Zmiany aktywności PDHC, akonitazy i IDH-NADP zachodzące pod wpływem długoczasowego działania Zn mogą być wypadkową bezpośredniego wpływu Zn na te enzymy oraz zmian adaptacyjnych w komórkach wywołanych przez ten metal (Ryc. 19, 20, 21) (Ronowska i wsp., 2007). Dlatego oprócz opisanych powyżej badań wpływu Zn na aktywność tych enzymów *in situ* (Ryc. 19, 20, 21, 31, 32, 33) zbadano bezpośredni wpływ Zn na aktywność tych enzymów w zlizowanych komórkach C6. W tym celu komórki hodowano w środowisku DMEM-FBS przez 3 dni. Po zebraniu komórki były lizowane Tritonem X-100 w stężeniu końcowym 0.2% (w/v) (patrz rozdz. 4.1.3). Zn dodawano do środowisk pomiarowych dla poszczególnych enzymów i badano jego wpływ na ich aktywność w lizatach komórkowych.

5.9.1 Bezpośredni wpływ Zn na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w lizatach komórek astroglowych C6

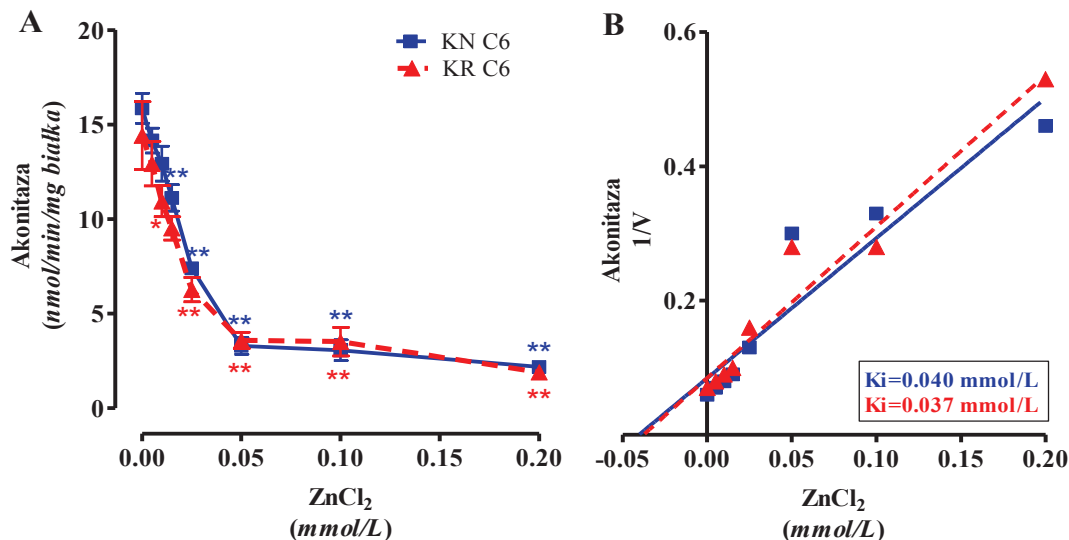
Po 10 min preinkubacji z lizatami KN i KR C6, Zn powodował zależne od stężenia zahamowanie aktywności PDHC, które przy jego 0.25 mmol/L poziomie w środowisku reakcyjnym, osiągało wartości około 39% (Ryc. 34).



Ryc. 34. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność PDHC w lizatach KN i KR komórek astroglowych C6. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$.

5.9.2 Bezpośredni wpływ Zn na aktywność akonitazy w lizatach komórek astrocytarnych C6

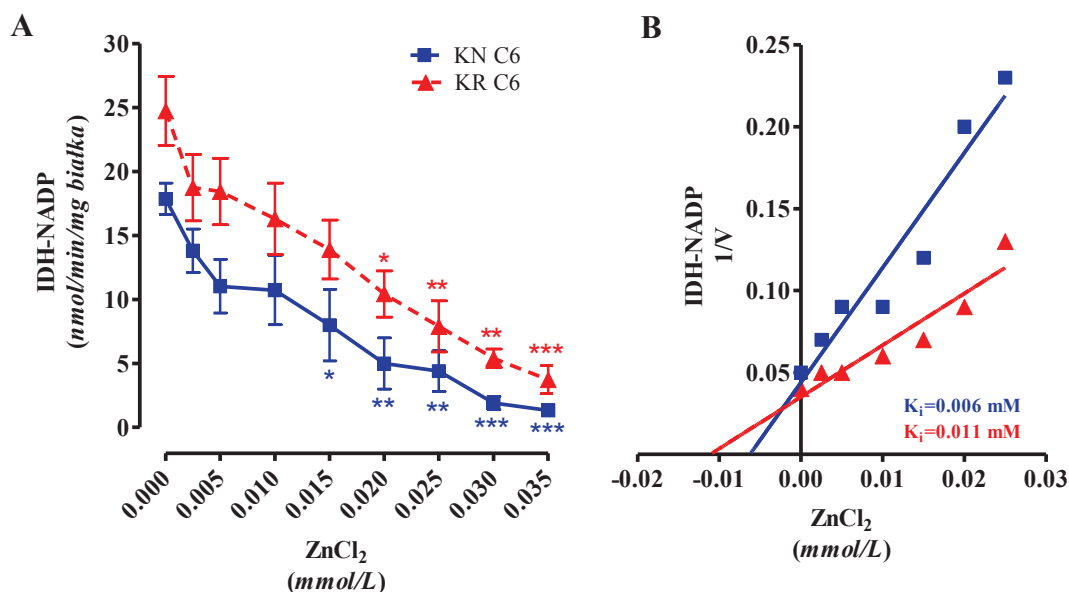
Po 10 min preinkubacji z Zn aktywność akonitazy w lizatach KN i KR C6 ulegała zależnej od jego stężenia inhibicji. Była ona podobna w obu fenotypach komórek (Ryc. 35A), a wartości $[K_i]$ dla obu lizatów C6 były podobne i wynosiły około 0.040 mmol/L (Ryc. 35B).



Ryc. 35. A. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność akonitazy w lizatach KN i KR komórek astroglajowych C6. B. Wykres Dixona dla wpływu Zn na aktywność akonitazy. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

5.9.3 Bezpośredni wpływ Zn na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w lizatach komórek astrocytarnych C6

Bezpośredni wpływ Zn na aktywność IDH-NADP badano w lizatach komórek C6 w środowisku do oznaczania aktywności tego enzymu, po 10 minutowej preinkubacji. W takich warunkach obserwowano zależną od stężenia inhibicję aktywności IDH-NADP (Ryc. 36A). Wartości [K_i] dla tego enzymu w komórkach nieróżnicowanych C6 wynosiła 0.006 mmol/L, natomiast w komórkach różnicowanych 0.011 mmol/L (Ryc. 36B).



Ryc. 36. A. Zależny od stężenia bezpośredni wpływ Zn na aktywność IDH-NADP w lizatach KN i KR komórek astroglowych C6. B. Wykres Dixona dla wpływu Zn na aktywność IDN-NADP. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

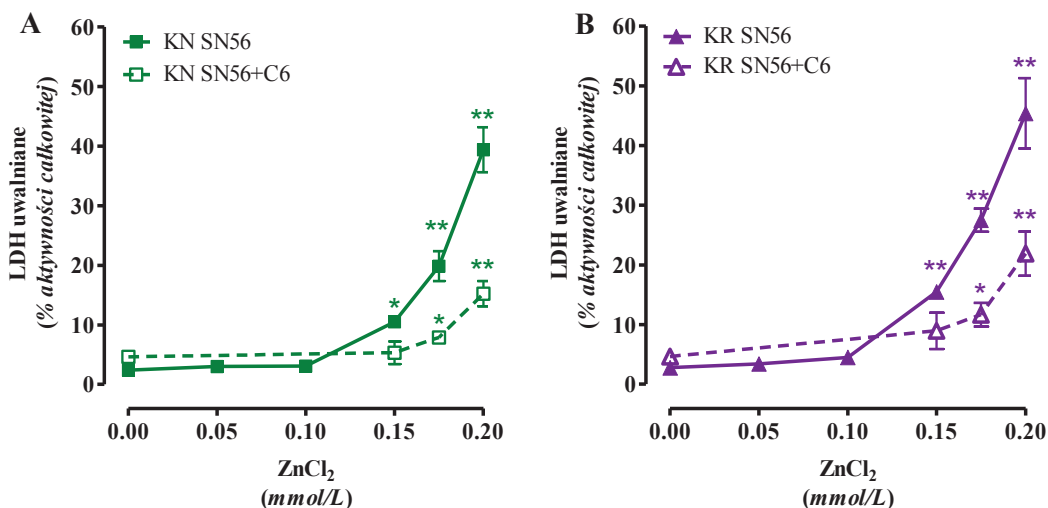
5.10 Wpływ komórek astrocytarnych C6 na cytotoksyczne działanie Zn na neuronalne komórki cholinergiczne SN56

Wiadomo, że astrocyty mogą spełniać rolę neuroprotekcyjną, między innymi, poprzez wychwyt neuroprzekaźników ekscytotoksycznych, jak również poprzez dostarczanie mleczanu oraz glutaminy do neuronów mózgu (Rae, 2014). Dlatego w przedstawianej pracy zbadano czy astrocyty mogłyby spełniać rolę cholino-neuroprotekcyjną w stosunku do ekscytotoksycznego działania wysokich stężeń Zn w przestrzeni pozakomórkowej (Ronowska i wsp., 2007).

Doświadczenia prowadzono wstawiając na płytki hodowlane inserty z półprzepuszczalnym dnem zawierające komórki astroglowe C6. Same puste inserty nie zmieniały ani potencjału wzrostowego ani wrażliwości komórek neuronalnych na czynniki cytotoksyczne (Gul-Hinc S. i wsp., dane nieopublikowane).

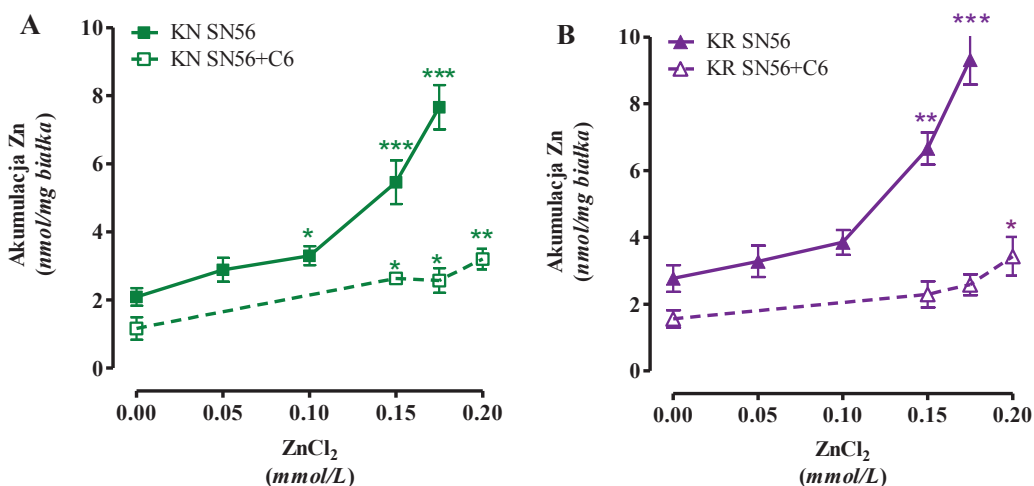
Przy stosunku liczbowym komórek astroglowych C6 do komórek neuronalnych SN56 wynoszącym 0.4:1 (patrz rozdz. 4.1.1) zależna od stężenia neurotoksyczność Zn ulegała znacznemu zmniejszeniu (Ryc. 37A, B).

I tak, po 24 godzinnej ekspozycji na cytotoksyczne stężenie Zn frakcja uszkodzonych komórek cholinergiczných zmniejszyła się z 40% do 15% w KN SN56+C6 oraz z 45% do 22% w KR SN56+C6. (Ryc. 37A, B).



Ryc. 37. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasowe, zależne od stężenia cytotoksyczne działanie Zn na nieróżnicowane (A) i różnicowane (B) komórki cholinergiczne SN56. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3–11 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

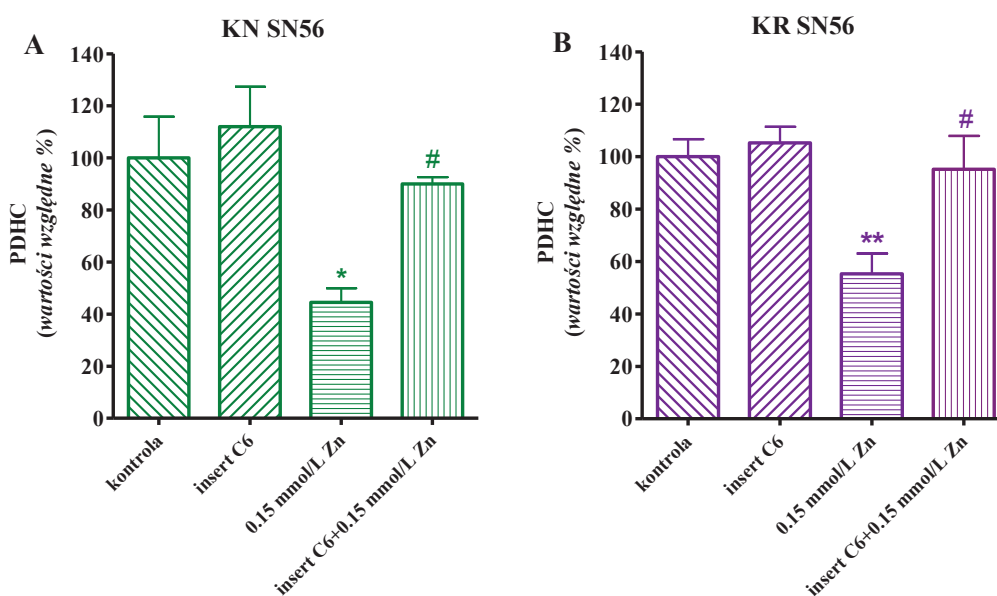
Również akumulacja Zn w komórkach SN56 przy jego zewnątrzkomórkowym stężeniu 0.15 mmol/L, zmniejszyła się z 5.15 do 2.63 nmoli/mg białka w KN SN56 oraz z 5.46 nmoli/mg białka do 2.29 nmoli/mg białka w KR SN56 (Ryc. 38A, B).



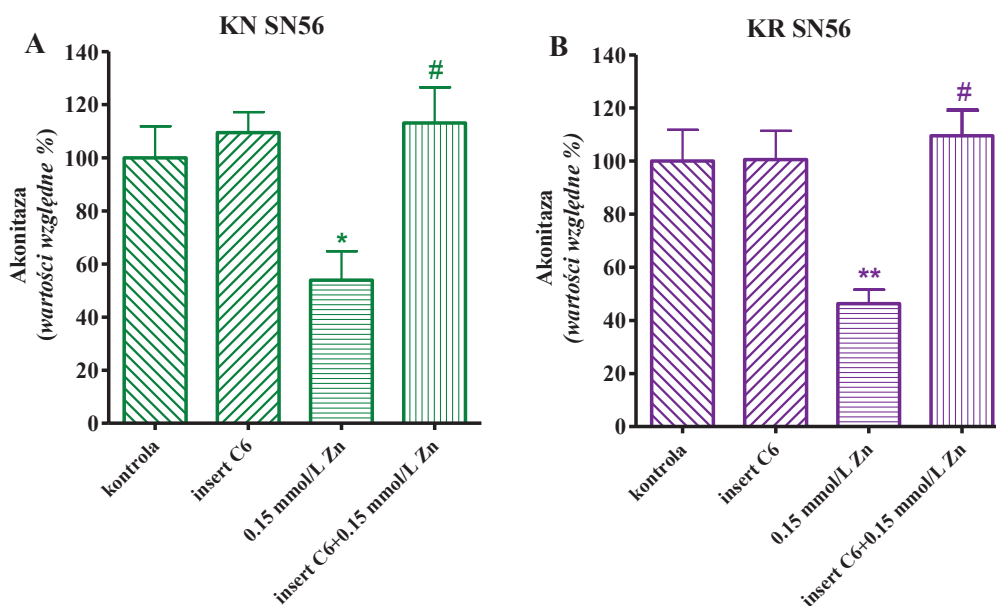
Ryc. 38. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia akumulację Zn w nieróżnicowanych (A) i różnicowanych (B) neuronalnych komórkach cholinergiczných SN56. Wyniki są wartościami średnimi±SEM z 3-15 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.11 Wpływ komórek astrocytarnych C6 na aktywność wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach SN56

Zbadano również jak komórki C6 wpływają na aktywności PDHC oraz akonitazy w SN56 eksponowanych przez 24 godziny na Zn. Wykazano, że 0.15 mmol/L Zn powodował około 50% inhibicję aktywności zarówno akonitazy, jak i PDHC w KN i KR SN56 (Ryc. 39, 40). Natomiast obecność insertów z komórkami C6, zapobiegała inhibicji aktywności PDHC i akonitazy przez 24 godzinną ekspozycję komórek KN i KR SN56 na 0.15 mmol/L stężenie Zn (Ryc. 39, 40).



Ryc. 39. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia Zn aktywność kompleksu PDHC w KN (A) i KR (B) cholinergicznym SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-7 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$; warunki z 0.15 mmol/L Zn, # $p < 0.001$. Wartość względna 100% odpowiada aktywności PDHC 7.21 nmoli/min/mg dla KN SN56 oraz 6.70 nmoli/min/mg białka dla KR SN56.



Ryc. 40. Wpływ komórek astrocytarnych C6 na długoczasową, zależną od stężenia Zn aktywność akonitazy w KN (A) i KR (B) cholinergicznym SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-6 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli, * $p < 0.05$, ** < 0.001 ; warunki z 0.15 mmol/L Zn, # $p < 0.01$. Wartość względna 100% odpowiada aktywności akonitazy 27.5 nmoli/min/mg białka dla KN SN56 oraz 27.3 nmoli/min/mg białka dla KR SN56.

Przedstawione dane wykazują, że przy wysokich, występujących w warunkach patofizjologicznych, stężeniach Zn może akumulować się zarówno w komórkach neuronalnych, jak i astroglejowych powodując bezpośrednią inhibicję kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego (Ryc. 19-21, 28-30, 31-36). Jednakże komórki cholinergiczne wykazywały większą wrażliwość na podobne cytotoksyczne stężenia zewnątrzkomórkowego Zn niż komórki astrocytarne C6. Przedstawione wyniki wykazują, że jedną z przyczyn może być wyższy poziom akumulacji tego kationu w komórkach neuronalnych (Ryc. 11, 14). Natomiast neuroprotekcyjne działanie komórek C6 w hodowlach łączonych mogło wynikać prawdopodobnie z wychwyty przez nie części Zn ze środowiska pozakomórkowego (Ryc. 38).

6 DYSKUSJA

6.1 Charakterystyka modelu doświadczalnego

6.1.1 Komórki cholinergiczne SN56

Przedstawiana praca została wykonana na linii komórek neuroblastoma SN56.B5.G4 utworzonej przez fuzję neuronów cholinergicznych z przegrody mózgu 21-dniowej myszy z mysią linią neuroblastoma N18TG2 (Blusztajn i wsp., 1992). Linie blastycznych komórek neuronalnych, mają podstawową wadę jaką jest ich niedojrzałość, zdolność do nieograniczonej liczby podziałów, których nie posiadają dojrzałe neurony. Z drugiej jednak strony, komórki SN56, wyprowadzone z cholinergicznych neuronów przegrody mózgu, stanowiły homogeną populację reprezentującą ten kompartment neuroprzekaźniczy w mózgu. Tym samym wszystkie zmiany metabolizmu energetycznego i związanego z nim fenotypu enzymatycznego, zachodzące pod wpływem neurotoksyn, w tym Zn, mogły być odnoszone wyłącznie do przedziału cholinergicznego (Ryc. 19, 20, 28-30) (Szutowicz i wsp., 2013). Również wzrost frakcji komórek uszkodzonych w tych warunkach, miał odniesienie wyłącznie do neuronalnych komórek cholinergicznych o niskiej i wysokiej ekspresji fenotypu cholinergicznego (Ryc. 14, 22). Doświadczenia te wykazały również, że uszkodzenie funkcjonalne komórek SN56 związane z utratą zdolności do usuwania błękitu trypanu wyprzedza ich uszkodzenie strukturalne mierzone uwalnianiem LDH do środowiska (Ryc. 18). Wskazują one również, że zarówno uszkodzenia funkcji, jak i struktury występowały wcześniej w komórkach KR SN56 niż w KN SN56 (Ryc. 18, 22B). Wyniki te pozostają w zgodzie, z naszymi doniesieniami, że KR SN56 były bardziej podatne niż KN SN56 na neurotoksyczny wpływ Al, amyloidu-beta, nadmiaru NO czy też niedobór witaminy B1 (Szutowicz i wsp., 2013).

Fenotyp cholinergiczny tych komórek został potwierdzony w poprzednich badaniach, poprzez wykazanie obecności antygenu i aktywności enzymatycznej ChAT, oraz akumulacji ACh i zdolności do kwantowego wydzielania tego neuroprzekaźnika, jak również receptorów p75-NGF, typowych dla cholinergicznych neuronów przegrody mózgu (Szutowicz i wsp., 2006). Co więcej, komórki te nabierały cech metabolicznych i morfologicznych dojrzałych neuronów przegrody mózgu pod wpływem powszechnie znanych czynników różnicujących takich jak cAMP, RA, czy też NGF (Bielarczyk i wsp., 2003a, 2003b; Blusztajn i wsp., 1992;

Szutowicz, 2001; Szutowicz i wsp., 2000). Taki fenotyp prezentował wysokie aktywności ChAT oraz poziomy ACh zbliżone do wartości stwierdzanych w zakończeniach nerwowych mózgu (Tabela 9) (Szutowicz i wsp., 1998; Tucek, 1993). Również obecna praca wykazała, że dbcAMP w połączeniu z RA powodowały pojawienie się w komórkach SN56 morfologicznych cech dojrzałości w postaci wypustek podobnych do neurytów tworzących połączenia z innymi komórkami (Ryc. 9B).

Także aktywności enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach hodowanych w warunkach kontrolnych były podobne do wykazywanych w poprzednich badaniach (Ryc. 19, 20; Tabela 9) (Jankowska i wsp., 1997; Ronowska i wsp., 2007). Były one również zbliżone do aktywności tych enzymów oznaczanych w homogenatach lub frakcji zakończeń nerwowych całego mózgu (Tabela 9) (Bubber i wsp., 2005; Szutowicz i wsp., 1998, 1982c, 1981a).

Tabela 9. Porównanie aktywności enzymów metabolizmu acetylo-CoA w komórkach cholinergicznym SN56 i preparatach całego mózgu.

Enzym/metabolit	SN56		Cały mózg	
	Aktywność/ poziom	Piśmiennictwo	Aktywność/ poziom	Piśmiennictwo
PDHC (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 6.8±0.1 KR 6.4±0.3	Obecna praca Ryc. 19	H 29.5±0.9 ^M . H 12.7±0.7 ^L .	(Bubber i wsp., 2005)
	KN 8.5±0.3 KR 7.0±1.1	(Jankowska i wsp., 1997)	H 23.0±2.1 ^{Sz} . B 26.5±3.2 ^{Sz} .	(Szutowicz i wsp., 1981)
			H 30.8±1.4 ^M . B 26.9±3.9 ^M .	(Jankowska dane nie- opublikowane)
Akonitaza (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 25.3±1.3 KR 22.6±2.0	Obecna praca Ryc. 20	H 14.2±0.8 ^M . H 2.0±0.3 ^L . H 63.8±2.9 ^M . B 54.4±3.0 ^M .	(Bubber i wsp., 2005) (Jankowska dane nie- opublikowane)
IDH-NADP (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 25.1±1.7 KR 22.7±1.7	(Ronowska i wsp., 2010)	H 25.2±1.2 ^M . H 20.0±1.3 ^L . H 18.1±1.2 ^M . B 19.3±3.7 ^M .	(Bubber i wsp., 2005) (Jankowska dane nie- opublikowane)

KDHC (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 4.0±0.1 KR 3.1±0.1	(Ronowska i wsp., 2010)	H 17.0±0.6 ^M . H 5.0±1.4 ^L . H 2.9±0.3 ^M . B 5.3±1.0 ^M .	(Bubber i wsp., 2005) (Jankowska dane nie- opublikowane)
Liaza ATP- cytrynianowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 38.8±3.7 KR 57.5±5.2	(Jankowska i wsp., 1997)	H 4.9±0.4 ^{Sz} . B 6.9±0.7 ^{Sz} . H 11.2±1.3 ^M . B 10.4±2.6 ^M .	(Szutowicz i wsp., 1982a) (Jankowska dane nie- opublikowane)
ChAT (<i>nmol/min/mg białka</i>)	KN 0.22±0.02 KR 0.79±0.05	(Jankowska i wsp., 1997)	H 0.72±0.08 ^{Sz} . B 1.87±0.13 ^{Sz} . H 0.78±0.05 ^M . B 0.76±0.14 ^M .	(Szutowicz i wsp., 1982c) (Jankowska dane nie- opublikowane)
ACh poziom (<i>pmol/mg białka</i>)	KN 220±37 KR 665±47	(Bielarczyk i wsp., 2003a)	B 622.5±85 ^M .	(Jankowska dane nie- opublikowane)
Poziom Acetylo-CoA (<i>pmole/mg białka</i>)	KN 30.5±1.7 KR 22.3±1.2	(Szutowicz i wsp., 2000)	B 30.3±3.0 ^M . B 41.5±3.3 ^M .	(Szutowicz i wsp., 1998) (Jankowska dane nie- opublikowane)

Skróty: KN, komórki nieróżnicowane; KR, komórki różnicowane; H, homogenaty mózgu; B, frakcja synaptosomów; Indeksy górne: Sz., szczur; M. mysz; L. człowiek

Dane te wskazują, że przedstawione tu wyniki badań dotyczące cytotoksycznego wpływu Zn na linie komórek SN56 można ekstrapolować do możliwego cholino-neurotoksycznego działania Zn w mózgu w warunkach neurodegeneracyjnych *in vivo* (Bubber i wsp., 2011, 2005; Szutowicz, 2001; Szutowicz i wsp., 2013).

6.1.2 Komórki astroglajowe C6

Drugą linią komórkową użytą w przedstawianej pracy były komórki astrocytarne C6 wyprowadzone z glejaka astrocytarnego szczura indukowanego nitrozomocznikiem (Benda i wsp., 1968). Komórki te służyły z kolei jako model do badania zmian metabolizmu energetycznego w przedziale astroglajowym mózgu w warunkach cytotoksycznego działania Zn.

Podobnie jak w przypadku komórek SN56, dodanie dbcAMP/RA do środowiska hodowlanego tych komórek powodowało obniżenie szybkości proliferacji oraz wydłużenie wypustek (Ryc. 9, 10). Podobne zmiany w komórkach C6 zachodzące pod wpływem dbcAMP były obserwowane przez innych badaczy (Bianchi i wsp., 2008; Hu i wsp., 2008; Sakai i wsp., 1997). Ostatnie doniesienia wykazały, że

różnicowanie C6 dbcAMP powodowało oprócz zmian morfologicznych, wzrost poziomu mRNA *PEN-2*, *GFAP*, *SI00β*, *Notch1*, typowych dla dojrzałych astrocytów (Angulo-Rojo i wsp., 2013). Tak więc, komórki C6, używane w niniejszej pracy, posiadały podobne cechy do pierwotnej hodowli astrocytów wyizolowanych z kory mózgu szczurów (Tabela 10) (Nolte i wsp., 2004).

Co więcej, w obecności cytotoksycznych stężeń Zn, komórki C6 wykazywały podobne do astrocytów pierwotnych frakcyjne uwalnianie LDH, stanowiące wskaźnik stopnia ich rozpadu (Ryc. 14) (Nolte i wsp., 2004; Ryu i wsp., 2002). Zarówno komórki C6, jak i astrocyty wyizolowane z kory przedczołowej mózgu szczura po ekspozycji na podobne stężenia Zn wykazywały zbliżony stopień uszkodzenia mierzony akumulacją jodku propidyny w ich jądrach komórkowych (Ryc. 15) (Ryu i wsp., 2002). Wskazuje to, że używane w pracy linie komórkowe C6 posiadają parametry metabolizmu energetycznego zbliżone do pierwotnych astrocytów w mózgu. Dlatego zmiany ich poziomów wywoływane przez Zn mogą być również odnoszone do zmian zachodzącym w przedziale astrocytarnym mózgu w warunkach pobudzenia ekscytotoksycznego.

Tabela 10. Porównanie właściwości komórek astrocytarnych C6 używanych w przedstawianej pracy i przez innych autorów

Model doświadczalny	Stężenie i sposób ekspozycji na Zn (mmol/L)	Parametr	Piśmiennictwo lub odnośnik w pracy doktorskiej
Komórki astroglejowe C6	-	Różnicowanie dbcAMP+RA – obniżenie współczynnika proliferacji, wydłużenie wypustek	Obecna praca Ryc. 10
Komórki astroglejowe C6	-	Różnicowanie (+) RA obniżenie proliferacji, wzrost ekspresji genu <i>Slc1a1</i> , wzrost poziomu białka EAAC1	(Bianchi i wsp., 2008)
Komórki astroglejowe C6	-	Różnicowanie dbcAMP spadek liczby komórek, wzrost liczby wypustek, wydłużenie wypustek	(Hu i wsp., 2008)
Hodowla:	Dodane do hodowli	Uwalnianie LDH	(Ryu i wsp., 2002)
Astrocyty pierwotne	0.2 (24h)	80%	
Komórki astroglejowe C6	0.2 (24h)	80%	

Komórki astroglajowe C6	0.25 (24h) 0.25 (24h)	Uwalnianie LDH Kontrola 35% dbcAMP + RA 88%	Obecna praca Ryc. 14
Hodowla pierwotna astrocytów	0.25 (24h)	Uwalnianie LDH 90%	(Nolte i wsp., 2004)
Komórki astroglajowe C6	0.22 (24h)	PI (+) Obkurczenie komórek, utrata wypustek, uszkodzenie błony komórkowej	Obecna praca Ryc. 15
Hodowla pierwotna astrocytów	0.2 (6h)	PI (+)	(Ryu i wsp. 2002)

Skróty: dbcAMP, dwumaślan cyklicznego AMP; RA, kwas retinowy; PI, jodek propidyny

6.2 Akumulacja cynku

6.2.1 Mechanizmy akumulacji Zn w komórkach

Doświadczenia *in vivo* wykazały, że w warunkach depolaryzacji, poziom jonów Zn^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu może osiągać stężenia sięgające 300 $\mu\text{mol/L}$ (Assaf i Chung, 1984; Howell i wsp., 1984). Mogło to prowadzić do nieprawidłowej, nadmiernej akumulacji Zn w neuronach postsynaptycznych i w konsekwencji do ich śmierci (Frederickson i Bush, 2001; Frederickson i wsp., 1989).

W przedstawionej pracy wykazano zależną od stężenia akumulację Zn w komórkach cholinergicznym SN56 zarówno przy krótkim, jak i długim czasie ekspozycji (Ryc. 11, 23). Należy podkreślić, że używane w tych doświadczeniach całkowite stężenia Zn w pożywce hodowlanej, rzędu 0.05-0.25 mmol/L , odpowiadały stężeniom tego metalu w całym mózgu oraz jego przestrzeni pozakomórkowej (Frederickson i wsp., 1992). Dlatego wykazywane w tej pracy cytotoksyczne właściwości cynku mogą mieć znaczenie patofizjologiczne (Ryc. 14, 15, 22) (Ronowska i wsp., 2010, 2007).

W naszych doświadczeniach obserwowano dużo wyższą akumulację Zn w komórkach SN56 inkubowanych przez 30 minut w bezbiałkowym środowisku depolaryzującym niż w komórkach po 24 godzinnej ekspozycji na Zn w środowisku zawierającym białka surowicy (Ryc. 11, 23). Tą pozorną niezgodność można wytłumaczyć tworzeniem przez Zn^{2+} nietoksycznych kompleksów z białkami anionowymi. Wiadomo, bowiem że tak jak w przypadku Fe, funkcjonalnymi i nietoksycznym formami Zn w osoczu są jego kompleksy albumina-Zn,

transferyna-Zn oraz α_2 -makroglobulina-Zn (Scott i Bradwell, 1983). W przestrzeniach pozakomórkowych mózgu stężenia tych białek są ponad 100 razy niższe niż w osoczu (Felgenhauer, 1998). Dlatego w przypadkach pobudzenia ekscytotoksycznego, może łatwo dochodzić do pojawienia się wolnych jonów Zn^{2+} w przestrzeniach około neuronalnych.

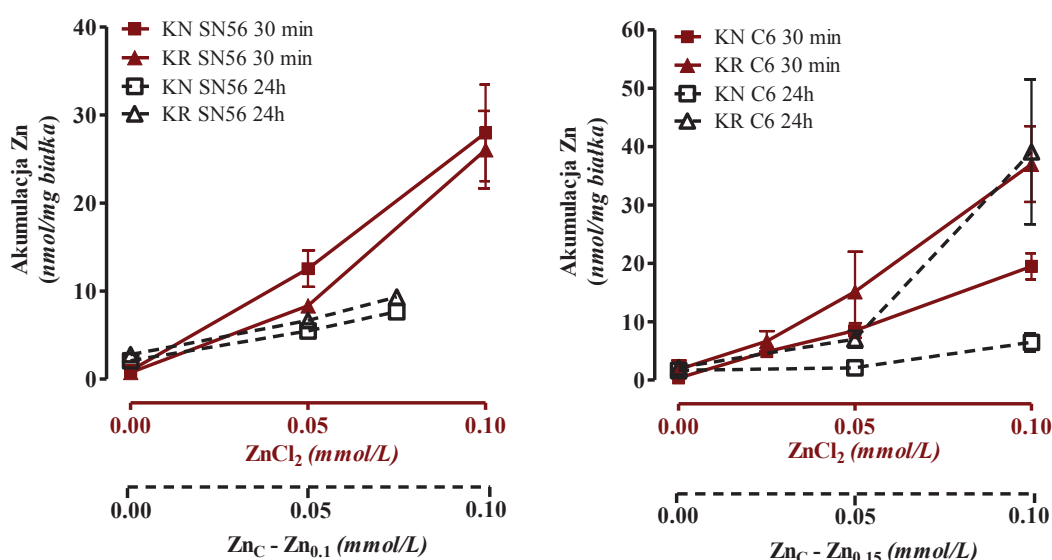
Jednakże w doświadczeniach długoczasowych, prezentowanych w tej pracy przy 10% zawartości surowicy wołowej w środowisku hodowlanym, stężenie białek było 10-krotnie wyższe od ich fizjologicznych w otoczeniu komórek neuronalnych/glejowych (patrz rozdz. 4.1.1). Powodowały one, a w szczególności zawarta w surowicy albumina, wiązanie części Zn, zmniejszając stężenie jego potencjalnie cytotoksycznej frakcji zjonizowanej. Wykazano, bowiem, że białka osocza, a przede wszystkim albumina oraz α_2 -makroglobulina i transferyna mogą łącznie wiązać do 90% Zn w przestrzeni pozakomórkowej (Scott, Bradwell, 1983).

Pozwala to przypuszczać, że w warunkach ekscytotoksycznych formą cynku transportowaną z przestrzeni pozakomórkowych mózgu do komórek około synaptycznych są jony Zn^{2+} . Dlatego w przedstawianej pracy podjęto próbę wyodrębnienia aktywnej puli Zn, która byłaby zbliżona do poziomu Zn^{2+} w środowisku pozakomórkowym mózgu. Podstawą były doświadczenia, które wykazały, że w środowisku DMEM-FBS, przy stężeniach dodanego Zn równych lub niższych od 0.10 lub 0.15 mmol/L nie obserwowano odpowiednio, ani neurotoksyczności, ani jego akumulacji zarówno w cholinergicznym komórkach SN56 jak i astroglajowych C6 (Ryc. 11, 14) (Haase i Beyersmann, 1999; Ronowska i wsp., 2007). Wskazywałoby to, że pojemność wiązania Zn przez białka surowicy, w stosowanym przez nas środowisku hodowlanym, wynosiła około 0.1-0.15 mmol/L (Ryc. 11). Za taką interpretacją przemawiają również nasze wcześniejsze prace, które wykazywały znaczną cytotoksyczność przewlekłą kilkunasto-mikromolowych stężeń Zn w środowiskach bezbiałkowych z suplementem N2, przy nieobecności jego cytotoksyczności w standardowych środowiskach DMEM-FBS 10% (Ryc. 14) (Ronowska i wsp., 2007).

Arbitralne uwzględnienie współczynnika wiązania Zn w środowisku DMEM-FBS na poziomie 0.15 mmol/L, spowodowało, że skorygowana akumulacja tego metalu w różnicowanych komórkach astroglajowych, w doświadczeniach długoczasowych okazała się podobna do jego akumulacji w doświadczeniach krótkoczasowych (Ryc. 41B). Z drugiej strony przy wysokich stężeniach Zn była ona dużo wyższa w KR C6

niż w KN C6 (Ryc. 41B). Z kolei KN C6 w środowisku depolaryzującym akumulowały 3 razy więcej Zn niż w środowisku białkowym o normalnym stężeniu K^+ (Ryc. 41B).

Podobną zgodność w akumulacji Zn wykazano przy niskich stężeniach Zn^{2+} (0.05 mmol/L) dla komórek neuronalnych KN i KR SN56 (Ryc. 41A). Jednakże przy wysokich stężeniach (0.1 mmol/L) Zn^{2+} jego akumulacja w bezbiałkowych środowiskach depolaryzujących okazywała się wielokrotnie wyższa niż w środowiskach wysokobiałkowych (Ryc. 41A). Z drugiej jednak strony długoczasowa ekspozycja komórek SN56 na wysokie stężenia Zn^{2+} , okazywała się niemożliwa ze względu na ich wysoką śmiertelność (Ryc. 14).



Ryc. 41. Zależność akumulacji Zn od obliczonych stężeń wolnego Zn w neuronalnych komórkach cholinergicznym SN56 (A) i astroglialnych C6 (B). Stężenie wolnego Zn obliczono z różnicy między całkowitym stężeniem dodawanego Zn, a jego hipotetycznym wiązaniem przez 10% FBS na poziomie 0.1-0.15 mmol/L. Dane zostały wyliczone z Ryc. 11, 23.

Oprócz różnic w pojemności układów wiążących pozakomórkowy Zn, istotnym czynnikiem zwiększającym akumulację Zn^{2+} w warunkach ekscytotoksycznych *in vivo*, może być depolaryzacja komórek neuronalnych i glejowych. Takie warunki mogą mieć miejsce w wielu stanach patologicznych takich jak niedotlenienie, hipoglikemia, nadmierna akumulacja związków psychotropowych i wielu leków, jak również ekspozycja na toksyny środowiskowe (Salińska i wsp., 2005).

Nasze doświadczenia wykazały, że modelowa depolaryzacja wywołana 30 mmol/L K^+ , może powodować znaczne przyspieszenie akumulacji Zn, szczególnie przy jego wysokich stężeniach w środowisku (Ryc. 23). Zjawisko to można wytłumaczyć faktem, że znaczna frakcja jonów Zn^{2+} może być transportowana za pośrednictwem kanałów wapniowych bramkowanych potencjałem błonowym, których czas otwarcia w takich warunkach jest znacznie przedłużony (Bouron i Oberwinkler, 2013; Harrison i Gibbons, 1994; Sensi i wsp., 1997). Wyniki te dostarczają tym samym nowego dowodu dla hipotezy, że transport Zn przez zdepolaryzowaną błonę komórkową może być ważnym elementem składowym ekscytotoksyczności glutaminianergicznej (Choi i Koh, 1998; Ketterman i Li, 2008; Sheline i wsp., 2002). Uzyskane dane stanowią również uzupełnienie hipotezy, że ekscytotoksyczność glutaminianergiczna składa się z dwóch składowych: glutaminianowej i Zn (Ronowska i wsp., 2010, 2007; Szutowicz i wsp., 2013, Frederickson i wsp., 2005, Takeda, 2010).

Za aktywnym udziałem Zn w uszkodzeniu zarówno komórek neuronalnych, jak i astroglejowych świadczy fakt, że ich uszkodzenie czynnościowe lub śmiertelność mierzone odpowiednio, utratą zdolności wydalania błękitu trypanu lub uwalnianiem LDH, zwiększały się równoległe z akumulacją Zn w komórkach (Ryc. 14, 16, 17, 22, 24). Większa odporność komórek C6 w stosunku do SN56, na cytotoksyczne działanie Zn mogła po części wynikać z niższej akumulacji Zn (Ryc. 11, 23).

Czynnikami powodującymi efektywniejszą akumulację Zn w neuronach mogła być natomiast dużo wyższa niż w astrocytach gęstość bramkowanych napięciem kanałów wapniowych ułatwiających transport Zn z przestrzeni pozakomórkowej (Ryc. 11) (Kushmerick i wsp., 2001; Sensi i wsp. 1997; Verkhratsky i Steinhauser, 2000). Istnieją natomiast rozbieżne opinie, co do obecności tych kanałów w astrocytach. Jedne badania wykazywały zmniejszenie cytotoksyczności Zn w stosunku do pierwotnych astrocytów po ich depolaryzacji, co dobrze korelowało z brakiem zmian w toksyczności wywołanej Zn po zastosowaniu antagonistów kanałów wapniowych typu L (Westenbroek i wsp., 1998; Sheline i wsp., 2004). Inne doświadczenia wykazywały jednak, że astrocyty pierwotne posiadają niskie, chociaż mierzalne poziomy tego kanału (D'Ascenzo i wsp. 2004; MacVicar i wsp. 1991; Verkhratsky i Steinhauser, 2000). Nasze badania również wykazały, że poziom tego białka w komórkach C6 jest około 2 razy niższy niż w komórkach SN56 (dane nieopublikowane).

Transportery cynkowe ZnT1 również biorą udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia tego kationu poprzez jego transport na zewnątrz komórki (Palmiter i Findley, 1995; Qin i wsp., 2009). W przedstawionej pracy wykazano obecność tego transportera zarówno w komórkach SN56, jak i C6 (Ryc. 12). Jednakże komórki neuronalne wykazywały niższą niż komórki C6 względną ekspresję transportera ZnT1 (Ryc. 12) (Wang i wsp. 2005). Co więcej, nasze badania wykazały, że przy toksycznym stężeniu zewnątrzkomórkowego Zn, poziom ZnT1 w komórkach neuronalnych ulegał obniżeniu, co mogło być przyczyną wysokiej akumulacji tego metalu wewnątrz komórek neuronalnych (Ryc. 13). Za takim mechanizmem przemawia również wznoszący kształt zależnej od stężenia akumulacji Zn (Ryc. 11).

6.2.2 Wpływ Zn na dystrybucję Ca

Nasze niezależne badania wykazały, że w warunkach depolaryzacji zablokowanie kanału wapniowego typu L przez 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedypinę zmniejszało poziom wewnątrzkomórkowego Ca w KN i KR SN56 odpowiednio o 41% i 21%, przy znacznie wyraźniejszym bo 60-67% obniżeniu akumulacji Zn (Zyśk i wsp., 2013).

W przedstawionej pracy wykazano, że krótkoczasowa ekspozycja na Zn powoduje zależny od jego stężenia, wzrost poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie przy jednoczesnym spadku jego stężenia w przedziale mitochondrialnym komórek SN56 (Ryc. 25). To ostatnie zjawisko mogło być spowodowane obrzękiem mitochondriów i wzrostem przepuszczalności ich megakanałów błonowych (mPTP) przez Zn akumulujący się w cytoplazmie (Ryc. 25) (Jiang i wsp., 2001). Prowadziłoby to do uwolnienia Ca^{2+} oraz proapoptotycznych białek z mitochondriów (cytochromu c, AIF) do cytoplazmy (Bossy-Wetzel i wsp., 2004; Jiang i wsp., 2001; Szutowicz i wsp., 2006). W warunkach ekscytotoksycznych następuje również aktywacja receptorów NMDA oraz VGCC i zwiększony napływ Ca^{2+} oraz Zn^{2+} do cytoplazmy (Bouron and Oberwinkler, 2014; Yin and Weiss, 1995). Akumulacja Zn w macierzy mitochondrialnej, może prowadzić do spadku potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$). Niski $\Delta\Psi_m$ zmniejszałby również napływ Ca^{2+} do mitochondriów. Wymienione zaburzenia homeostazy Ca^{2+} w komórkach neuronalnych, zwiększałyby produkcję ROS prowadzącą do śmierci neuronów (Ryc. 25) (Sensi i wsp., 2009). Jednocześnie zastąpienie traconego Ca przez akumulujący

się Zn może być przyczyną śmierci neuronów, wskutek zahamowania aktywności kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego (Ryc. 18, 26A, 28, 29, 30) (Dineley i wsp., 2003; Ronowska i wsp., 2010, 2007; Sheline i wsp., 2000). Hipotezę tą potwierdza istnienie odwrotnych korelacji pomiędzy zawartością Ca w mitochondriach, a akumulacją Zn i wielkością frakcji uszkodzonych komórek SN56 (Ryc. 26A, 27A). Z kolei równoległa akumulacja Zn i Ca w przedziale cytoplazmatycznym powodowałaby, niezależne od mitochondrialnych, zaburzenia procesów aktywacji białek komórkowych. Wiadomo, że w takich warunkach dochodziło do aktywacji kinazy białkowej C oraz kalpain prowadzącej do proteolizy kinaz białkowych CaM-PK typu II czy kalcyneuryny. Powodowało to m.in. upośledzenie syntezy i uwalniania neuroprzekaźników oraz apoptotyczne uszkodzenia komórek (Ryc. 26B, 27B) (Gurkoff i wsp., 2013; Kawahara i wsp., 2013; Weiss i wsp., 2000).

Zatem zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu Zn^{2+} i Ca^{2+} poprzez zahamowanie VGCC mogłoby być skuteczną strategią zapobiegającą uszkodzeniom komórek powstającym w tych warunkach.

6.3 Wpływ Zn na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego w cholinergicznym komórkach neuronalnych SN56 i astroglialnych C6

Wyniki naszych poprzednich badań wskazują, że przyczyną śmierci cholinergicznym komórek neuronalnym SN56 eksponowanych na Zn, mogła być inhibicja aktywności kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego takich jak PDHC, akonitaza, KDHC, prowadząca do spadku poziomów acetylo-Co i ATP (Ronowska i wsp., 2010, 2007). Inhibicję tych enzymów wykazywano zarówno po ekspozycji całych komórek na ten kation, jak i w lizatach komórkowych. W pierwszym przypadku dochodziło do trwałej inhibicji/inaktywacji tego enzymu, którą wykazywano *ex post*, po oddzieleniu komórek od środowiska zawierającego Zn. W drugim przypadku inhibicja była wynikiem bezpośredniego wpływu Zn na enzym w lizacie. Z kolei, inni badacze wykazywali, że sub-mikromolowe lub kilku-mikromolowe stężenia Zn hamowały również aktywności oczyszczonych enzymów cytoplazmatycznych, takich jak dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydowa, czy fosfofruktokinaza (Maret i wsp., 2001; Ikeda i wsp., 1980). Obserwowano również inhibicję innych enzymów mitochondrialnych w tym: dehydrogenazy α -ketoglutaranowej i kompleksu I łańcucha oddechowego wyizolowanych z mięśnia

sercowego i wątroby (Brown i wsp., 2000; Gazaryan i wsp., 2002). Wskazuje to, że wiele kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego może podlegać bezpośredniemu inhibicyjnemu działaniu tego kationu.

Mechanizm działania Zn był sugerowany w naszych poprzednich badaniach. I tak, w przypadku akonitazy, Zn mógł podstawiać żelazo niehemowe w jego centrum aktywnym (Ronowska i wsp., 2007; Sreedhar i Nair, 2005). Z kolei w przypadku PDHC mogło to być usuwanie lipoamidu z miejsc jego wiązania na podjednostce E2 (acetylotransferaza dihydroliponianowa, EC 2.3.1.12) (Ronowska i wsp. 2010) Świadczyłyby o tym odwracalność inhibicyjnego wpływu Zn przez nadmiar lipoamidu w przypadku PDHC i jego nieodwracalność w przypadku akonitazy (Ronowska i wsp. 2007).

Z dotychczasowych badań wynika, że poszczególne enzymy są w różnym stopniu podatne na inhibicyjne/inaktywacyjne działanie Zn. I tak, spośród enzymów neuronalnych w lizatach komórek SN56 wykazano około 10-krotnie silniejszą inhibicję IDH-NADP ($K_i \sim 0.004$ mmol/L Zn) oraz akonitazy ($K_i \sim 0.008$ mmol/L Zn) niż PDHC ($K_i \sim 0.07$ mmol/L Zn) (Ronowska i wsp., 2007). Wyniki przedstawiane w tej pracy pozostają w zgodzie z tymi doniesieniami wykazując dużo słabszy od bezpośredniego, długoczasowy inhibicyjny wpływ Zn na aktywności PDHC i akonitazy *in situ* w komórkach SN56 KN i KR (Ryc. 19, Ryc. 20) (Ronowska i wsp., 2007). Różnice te były najprawdopodobniej spowodowane wiązaniem Zn przez białka surowicy obecne w środowisku DMEM. Powstające kompleksy białko-Zn uniemożliwiały jego transport do komórek (Mocchegiani i wsp., 2005; Takeda, 2000). Również wewnątrz komórek Zn mógł być inaktywowany poprzez wiązanie z niewrażliwymi na ten kation ligandami białkowymi i niebiałkowymi. Tak więc, zdolność białek zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych do kompleksowania Zn w około-fizjologicznych stężeniach, zapewniałoby utrzymanie prawidłowych aktywności enzymów metabolizmu energetycznego, a tym samym i żywotności komórek w warunkach fizjologicznej aktywności neuronów glutaminianergicznych (Ryc. 11, 19, 20). Dopiero przekroczenie pojemności wiązania tego kationu dawałoby nadmierną akumulację Zn, inhibicję aktywności tych enzymów i uszkodzenie postsynaptycznych komórek neuronalnych (Ryc. 11, 19, 20, 41A) (Frederickson i Bush, 2001; Koh i wsp., 1996; Sensi i wsp., 2009).

Należy przy tym zaznaczyć, że stężenia białek w pozakomórkowych przestrzeniach płynowych mózgu są około 10 razy niższe od używanych przez nas w hodowlach

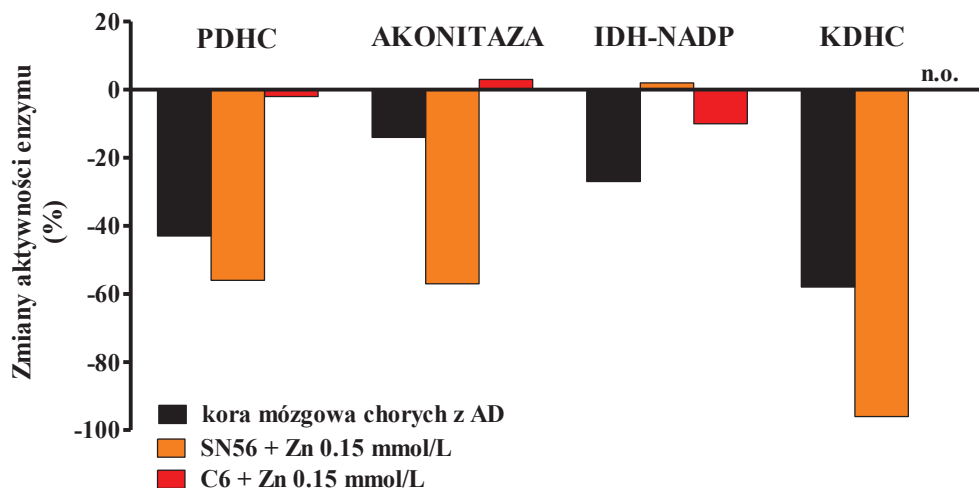
(patrz rozdz. 4.1.1) (Felgenhauer, 1998). Można, więc przypuszczać, że cytotoksyczność Zn w przestrzeniach synaptycznych mózgu będzie tylko nieznacznie niższa od cytotoksyczności obserwowanej przez nas w doświadczeniach krótkoczasowych, a znacznie wyższa niż w doświadczeniach długoczasowych (Ryc. 14, 22).

Z powyższą tezę pozostają w zgodzie wyniki naszych doświadczeń, które wykazały silną inhibicję ICDH-NADP *in situ* w komórkach zdepolaryzowanych w środowisku bezbiałkowym, wobec jej nieobecności w środowiskach zawierających białka surowicy (Ryc. 30, 33) (Ronowska i wsp., 2007). Może to wynikać z wielokrotnie wyższej akumulacji Zn w komórkach zdepolaryzowanych w środowiskach bezbiałkowych (Ryc. 11, 23, 41). Tłumaczy to również silniejszą inhibicję PDHC w środowisku bezbiałkowym niż w środowisku o standardowej zawartości białek surowicy (Ryc. 19, 20, 28, 29). Wskazuje to, że w warunkach *in vivo*, przy niskich stężeniach białek w przestrzeniach około synaptycznych mózgu, nadmiar Zn poprzez inhibicję tych enzymów może być czynnikiem upośledzającym przepływ metaboliczny reszt acetylowych w cyklu kwasów trójkarboksylowych, a tym samym produkcję energii (Ryc. 28, 29, 30, 32, 33) (Dineley i wsp., 2003; Ronowska i wsp., 2010, 2007; Sensi i wsp., 2009) (Ronowska i wsp., 2007). Pozwala to przypuszczać, że inhibicyjny wpływ Zn na aktywność PDHC, akonitazy i IDH-NADP może spełniać istotną rolę w mechanizmach neurodegeneracji w mózgach chorych na chorobę Alzheimera. Wskazuje na to wysoka zgodność stopnia inhibicji tych enzymów przez patofizjologicznie prawdopodobne stężenie Zn, w komórkach SN56 ze stopniem obniżenia ich aktywności stwierdzanych w korze mózgowej chorych zmarłych z chorobą Alzheimera (Bubber i wsp., 2011; Koh i wsp., 1996; Ronowska i wsp., 2007) (Ryc. 19, 20, 42).

Nieco wyższy stopień inhibicji PDHC, akonitazy i IDH-NADP przez Zn w komórkach neuronalnych niż w mózgu, może wynikać z faktu, że homogenat mózgu był mieszaniną rozbitych komórek nerwowych i glejowych. Tak więc homogenat mózgu ludzkiego zawierał zarówno enzymy neuronalne wrażliwe na Zn, jak i astroglejowe dużo mniej wrażliwe na ten kation (Ryc. 19, 20, 21, 31, 32, 33, 42). W takim przypadku uśredniony efekt inhibicyjny był niższy niż w homogenacie z czystych neuronów.

Przyczyną silniejszej inhibicji wymienionych enzymów w neuronach *in situ* może być wyższa niż w komórkach astroglejowych akumulacja Zn zarówno

w doświadczeniach długo, jak i krótkoczasowych (Ryc 11, 23). Może to przynajmniej po części wynikać z wyższej gęstości transportera ZnT1 w komórkach C6, który usuwa ten kation z komórek do przestrzeni pozakomórkowej (Ryc. 12).



Ryc. 42. Wywołana przez Zn inhibicja kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego jest podobna do zmian obserwowanych w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera. Dane z ryc. 19, 20, Ronowska i wsp. 2007 (KDHC) oraz Bubber i wsp. (Ch. Alzheimera). Enzymy w komórkach C6 nie były hamowane przez 0.15 mmol/L Zn (Ryc. 19, 20, 21). Skróty: n.o.- nie oznaczano.

Innym czynnikiem wpływającym na większą wrażliwość komórek neuronalnych niż astroglejowych na Zn mogą być odmienne właściwości kinetyczne samych enzymów. Hipotezę tą sprawdzono badając bezpośredni wpływ Zn na aktywność tych enzymów w lizatach komórkowych (patrz rozdz. 4.1.3). Okazało się, że stałe inhibitorowe dla Zn w stosunku do PDHC, akonitazy i IDH-NADP były w przypadku lizatów komórek C6 odpowiednio 10, 5 i 2 razy wyższe niż w lizatach komórek SN56 (Tabela 11) (Ronowska i wsp. 2010). Tak więc większa odporność komórek C6 na cytotoksyczne działanie Zn wynikałaby zarówno z niższego stopnia akumulacji tego kation, jak i większej odporności jego enzymów na inhibicję przez Zn (Ryc. 34, 35, 36, 42). Szczególnie duża oporność astroglejowego PDHC na inhibicyjne działanie Zn zabezpieczałaby komórki C6 przed spadkiem podaży acetylo-CoA do cyklu kwasów trójkarboksylowych, co również zwiększałoby ich przeżywalność w warunkach cytotoksycznych. Odkryte w tej pracy właściwości astrogleju byłyby niezbędne do jego ochronnego działania na neurony w mózgu w warunkach neurodegeneracyjnych (Jordan i wsp., 2008). Mniejsza wrażliwość astrogleju na czynniki toksyczne może zwiększać szanse na przeżycie neuronów

poprzez dostarczanie do przestrzeni przyneuronalnych prekursorów energetycznych, np. mleczanu.

Należy jednak zaznaczyć, że molekularny mechanizm zróżnicowanej podatności wymienionych enzymów w komórkach neuronalnych i astroglejowych pozostaje niewyjaśniony (Tabela 11).

Tabela 11. Porównanie wartości K_i wybranych enzymów metabolizmu energetycznego w lizatach cholinergicznym komórek SN56 i astroglejowych C6

Enzym	Lizaty komórek SN56		Lizaty komórek C6	
	KN	KR	KN	KR
	Wartość K_i dla Zn (mmol/L)			
PDHC	0.069*	0.089*	0.57 [†]	0.69 [†]
Akonitaza	0.0078*	0.0088*	0.040 [†]	0.037 [†]
IDH-NADP	0.0038*	0.0057*	0.006 [†]	0.011 [†]

Dane pochodzą z: *Ronowska i wsp., 2010; [†]obecna praca (Ryc. 34, 35, 36).

Z kolei w tych samych warunkach zaobserwowano również inhibicję IDH-NADP przez Zn ($IC_{0.5 KN}=0.085$ mmol/L, $IC_{0.5 KR}=0.121$ mmol/L) (Ryc. 33B). Enzym ten w neuronach jest w 80% zlokalizowany w cytoplazmie. Natomiast przedział cytoplazmatyczny astrogleju zawiera 50% puli tego enzymu. Taka lokalizacja jest kompatybilna z faktem, że NADPH wytworzony przez IDH-NADP utrzymuje prawidłowy, poziom zredukowanego glutationu, którego synteza odbywa się w cytoplazmie. Tym samym odpowiednia szybkość syntezy NADPH przez IDH-NADP zapewniałaby pośrednio ochronę komórki przed uszkodzeniem oksydacyjnym w warunkach stresu oksydacyjnego (Lee i wsp., 2002; Minich i wsp., 2003). Komórki neuronalne ze względu na zwiększoną szybkość ich metabolizmu energetycznego, wymagałyby większej syntezy glutationu zredukowanego. Takiemu wymogowi odpowiadałaby wyższa frakcyjna zawartość IDH-NADP w cytoplazmie (Minich i wsp., 2003).

Zn poprzez zahamowanie aktywności IDH-NADP w komórkach astrocytarnych C6 może przyczyniać się do zwiększenia stresu oksydacyjnego i/lub zmniejszenia ochrony antyoksydacyjnej, a tym samym może prowadzić do śmierci tych komórek (Ryc. 21, 33, 36) (Bishop i wsp., 2007; Chen i Liao, 2003; Ryu i wsp., 2002). Nieco mniejsze powinowactwo Zn do IDH-NADP w komórkach C6 niż do IDH-NADP

w komórkach SN56, również może być czynnikiem w nieznacznym stopniu polepszającym względną przeżywalność komórek astroglejowych (Tabela 11).

6.4 Wpływ astrogleju C6 na neurotoksyczność Zn w cholinergicznym komórkach SN56

W przedstawianej pracy wykazano, że w warunkach długoczasowej ekspozycji na cytotoksyczne stężenia Zn, frakcyjna zawartość uszkodzonych neuronów cholinergicznym SN56 w hodowli łączonej obniżała się o 50% w porównaniu do stopnia ich uszkodzenia w hodowli bez komórek astroglejowych (Ryc. 37A, B). Wiadomo, że jednym z mechanizmów ochronnego oddziaływania astrogleju na neurony postsynaptyczne w obrębie mikrokompartymentu potrójnego jest wychwytywanie glutaminianu wydzielanego do szczeliny synaptycznej przez pobudzone presynaptyczne zakończenia glutaminianergiczne (Choi and Koh, 1998; Frederickson i wsp., 2005; Sensi i wsp., 2011). Drugim czynnikiem cytotoksycznym okazał się Zn, który wydzielany jest jednocześnie w formie kompleksu z L-glutaminianem (Choi i Koh, 1998; Ronowska i wsp., 2010, 2007; Sensi i wsp., 2009). W naszych doświadczeniach czynnikiem powodującym całkowite odwrócenie cytotoksyczności cynkowej w stosunku do neuronów SN56, mogło być wychwytywanie Zn ze środowiska przez hodowany wspólnie astroglej (Ryc. 37, 38). Doprowadzało to do obniżenia zawartości Zn w SN56 do wartości kontrolnych, niezależnie od stopnia ich zróżnicowania (Ryc. 38A, B). W takim przypadku oczywistym było zachowanie przez komórki SN56 kontrolnych wartości aktywności PDHC i akonitazy (Ryc. 39, 40). Tym samym można przypuszczać, że komórki SN56 w tych warunkach zachowywały również prawidłowe poziomy acetyl-CoA i ATP, które były kluczowymi czynnikami zapewniającymi żywotność komórek (Szutowicz i wsp. 2013).

Wyniki tych doświadczeń są zgodne z wnioskami licznych badań wskazujących na neuroprotekcijną rolę astrogleju poprzez: utrzymanie właściwego składu przestrzeni międzykomórkowej w tkance nerwowej, wychwytywanie glutaminianu ze szczeliny synaptycznej, wydzielanie mleczanu, α -ketoglutaranu, alaniny oraz glutaminy, wydzielanie czynników troficznych do wzrostu neuronów oraz usuwanie wolnych rodników i dostarczanie substratów do syntezy glutationu w neuronach, co zwiększa przeżycie neuronów w warunkach stresu oksydacyjnego (Chen and Swanson, 2003; Rae, 2014; Schousboe and Waagepetersen, 2005).

Nasze badanie wykazało po raz pierwszy, że dodatkowym mechanizmem zmniejszającym ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów może być wychwyt przez astroglęj Zn ze szczeliny synaptycznej. Można przypuszczać, że przy fizjologicznej proporcji astrocytów do neuronów w korze mózgowej 2 : 1 te pierwsze mogą stanowić efektywną osłonę przed ekscytotoksycznością cynkową (Nedergaard i wsp., 2003).

7 WNIOSKI

1. Zarówno komórki neuronalne, jak astroglejowe wychwytyją Zn z przestrzeni pozakomórkowej poprzez mechanizmy zależne od depolaryzacji błony komórkowej.
2. Niższa akumulacja Zn w komórkach astrocytarnych C6 niż w komórkach neuronalnych SN56 może wynikać z niższej gęstości bramkowanych napięciem kanałów Ca oraz wyższą gęstością transportera ZnT1.
3. Spadek stężenia Ca w mitochondriach przy równoczesnym wzroście jego stężenia w cytoplazmie może być jednym z mechanizmów zależnego od Zn wzrostu śmiertelności neuronów cholinergicznyc
4. Wysoka wrażliwość neuronalnej akonitazy i PDHC i około 10-krotnie słabsza podatność enzymów astrocytarnych na bezpośrednią i pośrednią inhibicję przez Zn, determinuje wysoką podatność neuronów cholinergicznyc i względną oporność astrocytów na degenerację. Inhibicja tych enzymów zmniejsza syntezę acetylo-CoA oraz szybkość ich przepływu w cyklu kwasów trójkarboksylowyc, co prowadzi do spadku syntezy ATP i uszkodzeń komórek.
5. Zahamowanie aktywności IDH-NADP przez Zn może zwiększać stopień uszkodzenia komórek poprzez spadek syntezy NADPH niezbędnego do syntezy glutationu. Również w tym przypadku większa podatność IDH-NADP neuronalnego na Zn odpowiada większej wrażliwości neuronów na ten kation.
6. Jednym z mechanizmów ochronnego działania astrogleju na neurony może być wychwyt nadmiaru Zn pojawiającego się w przestrzeni pozakomórkowej mózgu w różnych warunkach patologicznyc.

8 PIŚMIENNICTWO

- Adlard, P.A., Parncutt, J.M., Finkelstein, D.I., Bush, A.I., 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1631–1636.
- Albrecht, J., Dolińska, M., 2001. Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 65, 1–5.
- Albrecht, J., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44, 788–794.
- Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H.A., Magistretti, P.J., 2010. Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3326–3338.
- Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* 74, 342–352.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* 5, 196–201.
- Angulo-Rojo, C., Manning-Cela, R., Aguirre, A., Ortega, A., López-Bayghen, E., 2013. Involvement of the Notch pathway in terminal astrocytic differentiation: role of PKA. *ASN Neuro* 5.
- Aoyama, M., Kakita, H., Kato, S., Tomita, M., Asai, K., 2012. Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on brain astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 90, 2272–2280.
- Aschner, M., 1996. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 1129–1136.
- Assaf, S.Y., Chung, S.H., 1984. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* 308, 734–736.
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145.
- Baber, Z., Haghghat, N., 2010. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* 25, 413–418.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653.
- Baloyannis, S.J., 2006. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 119–126.
- Benarroch, E.E., 2005. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* 80, 1326–1338.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370–371.
- Bianchi, M.G., Gazzola, G.C., Tognazzi, L., Bussolati, O., 2008. C6 glioma cells differentiated by retinoic acid overexpress the glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Neuroscience* 151, 1042–1052.
- Bielarczyk, H., Jankowska, A., Madziar, B., Matecki, A., Michno, A., Szutowicz, A., 2003a. Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid beta-

- peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem. Int.* 42, 323–331.
- Bielarczyk, H., Jankowska-Kulawy, A., Gul, S., Pawelczyk, T., Szutowicz, A., 2005. Phenotype dependent differential effects of interleukin-1beta and amyloid-beta on viability and cholinergic phenotype of T17 neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 47, 466–473.
- Bielarczyk, H., Szutowicz, A., 1989. Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Biochem. J.* 262, 377–380.
- Bielarczyk, H., Tomaszewicz, M., Madziar, B., Cwikowska, J., Pawelczyk, T., Szutowicz, A., 2003b. Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J. Neurosci. Res.* 73, 717–721.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P., Davis, K.L., 1995. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 64, 749–760.
- Bishop, G.M., Dringen, R., Robinson, S.R., 2007. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1222–1230.
- Björkdahl, C., Sjögren, M.J., Winblad, B., Pei, J.-J., 2005. Zinc induces neurofilament phosphorylation independent of p70 S6 kinase in N2a cells. *Neuroreport* 16, 591–595.
- Blusztajn, J.K., Venturini, A., Jackson, D.A., Lee, H.J., Wainer, B.H., 1992. Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 793–799.
- Blusztajn, J.K., Wurtman, R.J., 1983. Choline and cholinergic neurons. *Science* 221, 614–620.
- Bosomworth, H.J., Thornton, J.K., Coneyworth, L.J., Ford, D., Valentine, R.A., 2012. Efflux function, tissue-specific expression and intracellular trafficking of the Zn transporter ZnT10 indicate roles in adult Zn homeostasis. *Met. Integr. Biometal Sci.* 4, 771–779.
- Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Lipton, S.A., 2004. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron* 41, 351–365.
- Bouron, A., Oberwinkler, J., 2014. Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 466, 381–387.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T., 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614–1619.
- Brown, A.M., Kristal, B.S., Effron, M.S., Shestopalov, A.I., Ullucci, P.A., Sheu, K.F., Blass, J.P., Cooper, A.J., 2000. Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-

- stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* 275, 13441–13447.
- Brown, A.M., Ransom, B.R., 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263–1271.
- Brown, J.E., Cohen, L.B., De Weer, P., Pinto, L.H., Ross, W.N., Salzberg, B.M., 1975. Rapid changes in intracellular free calcium concentration. Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. *Biophys. J.* 15, 1155–1160.
- Brusilow, S.W., 2002. Hyperammonemic encephalopathy. *Medicine (Baltimore)* 81, 240–249.
- Brusilow, S.W., Horwich, A.L., 1995. Urea cycle disorders, in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1187–1232.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.* 57, 695–703.
- Bubber, P., Hartounian, V., Gibson, G.E., Blass, J.P., 2011. Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 21, 254–260.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Tanzi, R.E., 1994. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265, 1464–1467.
- Butler, M., Spearman, M., 2007. Cell Counting and Viability Measurements, in: Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 205–222.
- Carroll, P.T., 1997. Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release. *Brain Res.* 753, 47–55.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A., 2010. Alzheimer disease. *Dis.-Mon. DM* 56, 484–546.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 137–149.
- Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., Bush, A.I., 1999. Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A beta amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* 274, 23223–23228.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., 1998. Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 347–375.
- Choi, D.W., Yokoyama, M., Koh, J., 1988. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 24, 67–79.
- Cole, S.L., Vassar, R., 2008. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 283, 29621–29625.
- Coleman, J.E., 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 897–946.
- Colvin, R.A., Fontaine, C.P., Laskowski, M., Thomas, D., 2003. Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 479, 171–185.
- Cooper, A.J., Plum, F., 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67, 440–519.

- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J., 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470–473.
- Coulter, D.A., Eid, T., 2012. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215–1226.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P., Lichten, L.A., 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281, 24085–24089.
- Cuajungco, M.P., Lees, G.J., 1997. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 4, 137–169.
- Dardenne, M., Pléau, J.M., Nabarra, B., Lefrancier, P., Derrien, M., Choay, J., Bach, J.F., 1982. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5370–5373.
- Daschil, N., Obermair, G.J., Flucher, B.E., Stefanova, N., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Humpel, C., Marksteiner, J., 2013. CaV1.2 calcium channel expression in reactive astrocytes is associated with the formation of amyloid- β plaques in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Alzheimers Dis. JAD* 37, 439–451.
- De Strooper, B., 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- De Vries, G.H., Boullerne, A.I., 2010. Glial cell lines: an overview. *Neurochem. Res.* 35, 1978–2000.
- Deshpande, A., Kawai, H., Metherate, R., Glabe, C.G., Busciglio, J., 2009. A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4004–4015.
- Dineley, K.E., Scanlon, J.M., Kress, G.J., Stout, A.K., Reynolds, I.J., 2000. Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn(2+)](i). *Neurobiol. Dis.* 7, 310–320.
- Dineley, K.E., Votyakova, T.V., Reynolds, I.J., 2003. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 85, 563–570.
- Dolińska, M., Dybel, A., Albrecht, J., 2000. Glutamine transport in C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* 37, 139–146.
- Durand, J., Meloni, G., Talmard, C., Vašák, M., Faller, P., 2010. Zinc release of Zn₇-metallothionein-3 induces fibrillar type amyloid- β aggregates. *Met. Integr. Biometal Sci.* 2, 741–744.
- Eiden, L.E., 1998. The cholinergic gene locus. *J. Neurochem.* 70, 2227–2240.
- Eng, L.F., Yu, A.C., Lee, Y.L., 1992. Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res.* 94, 353–365.
- Escartin, C., Valette, J., Lebon, V., Bonvento, G., 2006. Neuron-astrocyte interactions in the regulation of brain energy metabolism: a focus on NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* 99, 393–401.
- Felgenhauer, K., 1998. Laboratory diagnosis of neurological diseases, in: *Clinical Laboratory Diagnostics*. TH Books, Frankfurt, pp. 1308–1326.
- Fonnum, F., 1975. Review of recent progress in the synthesis, storage and release of acetylcholine, in: Waser, P.G. (Ed.), *Cholinergic Mechanisms*. Raven Press, New York, pp. 145–159.
- Frederickson, C.J., 1989. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145–238.

- Frederickson, C.J., Bush, A.I., 2001. Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 14, 353–366.
- Frederickson, C.J., Hernandez, M.D., McGinty, J.F., 1989. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.* 480, 317–321.
- Frederickson, C.J., Kasarskis, E.J., Ringo, D., Frederickson, R.E., 1987. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Methods* 20, 91–103.
- Frederickson, C.J., Klitenick, M.A., Manton, W.I., Kirkpatrick, J.B., 1983. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273, 335–339.
- Frederickson, C.J., Koh, J.-Y., Bush, A.I., 2005. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 449–462.
- Frederickson, C.J., Rampy, B.A., Reamy-Rampy, S., Howell, G.A., 1992. Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 5, 521–530.
- Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, C.J., Thompson, R.B., 2000. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J. Nutr.* 130, 1471S–83S.
- Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M., Hirano, T., 2011. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1123–1134.
- Gasser, U.E., Hatten, M.E., 1990. Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4543–4547.
- Gazaryan, I.G., Krasnikov, B.F., Ashby, G.A., Thorneley, R.N.F., Kristal, B.S., Brown, A.M., 2002. Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277, 10064–10072.
- Gibson, G.E., Peterson, C., 1981. Aging decreases oxidative metabolism and the release and synthesis of acetylcholine. *J. Neurochem.* 37, 978–984.
- Gil-Bea, F.J., García-Alloza, M., Domínguez, J., Marcos, B., Ramírez, M.J., 2005. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. *Neurosci. Lett.* 375, 37–41.
- Giovannini, M.G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Vannucchi, M.G., Rosi, S., Pepeu, G., Casamenti, F., 2002. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol. Dis.* 11, 257–274.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488.
- Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B., Berman, R., 2013. Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharm. Basel Switz.* 6, 788–812.
- Haase, H., Beyersmann, D., 2002. Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 923–928.
- Haghighat, N., McCandless, D.W., Geraminegad, P., 2000. Responses in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyl cyclic-AMP. *Neurochem. Res.* 25, 277–284.

- Hajo Haase, Wolfgang Maret, 2010. The Regulatory and Signaling Functions of Zinc Ions in Human Cellular Physiology, in: *Cellular and Molecular Biology of Metals*. CRC Press Taylor & Francis Group, London, pp. 181–211.
- Hambidge, M., 2000. Human Zinc Deficiency. *J. Nutr.* 130, 1344S–1349S.
- Hammond, D.N., Lee, H.J., Tongsgard, J.H., Wainer, B.H., 1990. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 512, 190–200.
- Harrison, N.L., Gibbons, S.J., 1994. Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33, 935–952.
- Haug, F.M., 1967. Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochem. Histochem.* 8, 355–368.
- Hayashi, F., Takahashi, K., Nishikawa, T., 1997. Uptake of D- and L-serine in C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* 239, 85–88.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., Robinson, S.R., 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57, 417–428.
- Hertz, L., Kala, G., 2007. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab. Brain Dis.* 22, 199–218.
- Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P., Vasák, M., 2001. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 55, 133–145.
- Hoshi, M., Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T., Imahori, K., 1997. Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 272, 2038–2041.
- Howell, G.A., Welch, M.G., Frederickson, C.J., 1984. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308, 736–738.
- Hu, W., Onuma, T., Birukawa, N., Abe, M., Ito, E., Chen, Z., Urano, A., 2008. Change of morphology and cytoskeletal protein gene expression during dibutyryl cAMP-induced differentiation in C6 glioma cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 519–528.
- Huang, L., Tepasamorndech, S., 2013. The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol. Aspects Med.* 34, 548–560.
- Hulette, C.M., Welsh-Bohmer, K.A., Murray, M.G., Saunders, A.M., Mash, D.C., McIntyre, L.M., 1998. Neuropathological and neuropsychological changes in “normal” aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 1168–1174.
- Hwang, J.J., Lee, S.-J., Kim, T.-Y., Cho, J.-H., Koh, J.-Y., 2008. Zinc and 4-hydroxy-2-nonenal mediate lysosomal membrane permeabilization induced by H₂O₂ in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3114–3122.
- Ibs, K.-H., Rink, L., 2003. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133, 1452S–6S.
- Ikeda, T., Kimura, K., Morioka, S., Tamaki, N., 1980. Inhibitory effects of Zn²⁺ on muscle glycolysis and their reversal by histidine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 26, 357–366.
- Imura, T., Shimohama, S., Kageyama, T., Kimura, J., 1999. Selective induction of glial glutamate transporter GLT-1 by hypertonic stress in C6 glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 240–245.

- Jankowska, A., Blusztajn, J.K., Szutowicz, A., 1997. Activities of enzymes of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in SN56 hybrid cholinergic cell line differentiated by dibutyl cyclic AMP and all-trans retinoic acid. *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.* 35, 247–249.
- Jeong, J., Eide, D.J., 2013. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 612–619.
- Jiang, D., Sullivan, P.G., Sensi, S.L., Steward, O., Weiss, J.H., 2001. Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 47524–47529.
- Johnstone, M., Gearing, A.J., Miller, K.M., 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J. Neuroimmunol.* 93, 182–193.
- Kawahara, M., Mizuno, D., Koyama, H., Konoha, K., Ohkawara, S., Sadakane, Y., 2013. Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia. *Met. Integr. Biometal Sci.*
- Keilin, D., Mann, T., 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.* 34, 1163–1176.
- Kettenmann, H., Ransom, B.R., 2005. *Neuroglia*. Oxford University Press.
- Kim, E.Y., Koh, J.Y., Kim, Y.H., Sohn, S., Joe, E., Gwag, B.J., 1999. Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur. J. Neurosci.* 11, 327–334.
- Kim, Y.H., Kim, E.Y., Gwag, B.J., Sohn, S., Koh, J.Y., 1999. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89, 175–182.
- Kim, Y.-H., Koh, J.-Y., 2002. The role of NADPH oxidase and neuronal nitric oxide synthase in zinc-induced poly(ADP-ribose) polymerase activation and cell death in cortical culture. *Exp. Neurol.* 177, 407–418.
- King, J.C., Shames, D.M., Woodhouse, L.R., 2000. Zinc Homeostasis in Humans. *J. Nutr.* 130, 1360S–1366S.
- King Janet C., Keen Carl L., 2006. Zinc, in: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 271–285.
- Kocki, T., Dolińska, M., Dybel, A., Urbańska, E.M., Turski, W.A., Albrecht, J., 2002. Regulation of kynurenic acid synthesis in C6 glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 68, 622–626.
- Koh, J.Y., Suh, S.W., Gwag, B.J., He, Y.Y., Hsu, C.Y., Choi, D.W., 1996. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272, 1013–1016.
- Kornberg, A., 1955. [67] Lactic dehydrogenase of muscle: Pyruvate + DPNH \rightleftharpoons Lactate + DPN, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 441–443.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4044–4048.
- Koyama, A., Okereke, O.I., Yang, T., Blacker, D., Selkoe, D.J., Grodstein, F., 2012. Plasma amyloid- β as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Neurol.* 69, 824–831.
- Krebs, N.F., 2000. Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. *J. Nutr.* 130, 1374S–1377S.
- Kurz, G.M., Wiesinger, H., Hamprecht, B., 1993. Purification of cytosolic malic enzyme from bovine brain, generation of monoclonal antibodies, and

- immunocytochemical localization of the enzyme in glial cells of neural primary cultures. *J. Neurochem.* 60, 1467–1474.
- Lee, D.H., Chung, M.Y., Lee, J.U., Kang, D.G., Paek, Y.W., 2000. Changes of glucose transporters in the cerebral adaptation to hypoglycemia. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 47, 15–23.
- Lee, H.H., Prasad, A.S., Brewer, G.J., Owyang, C., 1989. Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256, G87–91.
- Lee, J.Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Koh, J.Y., 2000. Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, RC79.
- Lee, J.-Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Suh, S.W., Koh, J.-Y., 2002. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7705–7710.
- Lee, S.-J., Cho, K.S., Koh, J.-Y., 2009. Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57, 1351–1361.
- Lee, S.M., Koh, H.-J., Park, D.-C., Song, B.J., Huh, T.-L., Park, J.-W., 2002. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1185–1196.
- Leis, J.A., Bekar, L.K., Walz, W., 2005. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50, 407–416.
- Li, M., Chen, L., Lee, D.H.S., Yu, L.-C., Zhang, Y., 2007. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 83, 131–139.
- Li, Y., Hough, C.J., Frederickson, C.J., Sarvey, J.M., 2001. Induction of mossy fiber --> Ca³ long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 8015–8025.
- Liao, S.-L., Ou, Y.-C., Lin, S.-Y., Kao, T.-K., Pan, H.-C., Chang, C.-Y., Lai, C.-Y., Lu, H.-C., Wang, W.-Y., Chen, C.-J., 2011. Signaling cascades mediate astrocyte death induced by zinc. *Toxicol. Lett.* 204, 108–117.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158, 47–52.
- Lovell, M.A., Smith, J.L., Xiong, S., Markesbery, W.R., 2005. 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.* 7, 265–271.
- Ludwin, S.K., Kosek, J.C., Eng, L.F., 1976. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.* 165, 197–207.
- Manford, K., Patterson, J., 1979. [11] Measurement of growth and viability of cells in culture, in: Jakoby, W.B., Pastan, I.H. (Eds.), *Methods in Enzymology, Cell Culture*. Academic Press, New York, pp. 141–152.
- Maske, H., 1955. Über den topochemischen Nachweis von Zink im Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften* 42, 424–424.
- Masters, B.A., Quaipe, C.J., Erickson, J.C., Kelly, E.J., Froelick, G.J., Zambrowicz, B.P., Brinster, R.L., Palmiter, R.D., 1994. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5844–5857.

- Maxwell, K., Berliner, J.A., Cancilla, P.A., 1989. Stimulation of glucose analogue uptake by cerebral microvessel endothelial cells by a product released by astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48, 69–80.
- Mayer, M.L., Vyklicky, L., Westbrook, G.L., 1989. Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J. Physiol.* 415, 329–350.
- McKenna, M.C., Tildon, J.T., Stevenson, J.H., Huang, X., Kingwell, K.G., 1995. Regulation of mitochondrial and cytosolic malic enzymes from cultured rat brain astrocytes. *Neurochem. Res.* 20, 1491–1501.
- McMahon, R.J., Cousins, R.J., 1998. Mammalian zinc transporters. *J. Nutr.* 128, 667–670.
- Mesulam, M.M., 1995. Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 757, 169–179.
- Minich, T., Yokota, S., Dringen, R., 2003. Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *J. Neurochem.* 86, 605–614.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F., Malavolta, M., 2005. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog. Neurobiol.* 75, 367–390.
- Montgomery, D.L., 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* 31, 145–167.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.-Y., 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* 971, 197–209.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K., 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163–166.
- Narkiewicz, O., 2007. Tkanki układu nerwowego, in: Łasiński, W. (Ed.), *Anatomia Człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, pp. 4–17.
- Nestor, P.J., Scheltens, P., Hodges, J.R., 2004. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 10 Suppl, S34–41.
- Nolte, C., Gore, A., Sekler, I., Kresse, W., Hershinkel, M., Hoffmann, A., Kettenmann, H., Moran, A., 2004. ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. *Glia* 48, 145–155.
- Norenberg, M.D., 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 13–33.
- Olesen, O.F., Dagø, L., Mikkelsen, J.D., 1998. Amyloid beta neurotoxicity in the cholinergic but not in the serotonergic phenotype of RN46A cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 266–274.
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14, 639–649.
- Paoletti, P., Vergnano, A.M., Barbour, B., Casado, M., 2009. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158, 126–136.
- Park, J.A., Koh, J.Y., 1999. Induction of an immediate early gene *egr-1* by zinc through extracellular signal-regulated kinase activation in cortical culture: its role in zinc-induced neuronal death. *J. Neurochem.* 73, 450–456.

- Park, J.A., Lee, J.Y., Sato, T.A., Koh, J.Y., 2000. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 9096–9103.
- Pedersen, W.A., Berse, B., Schüler, U., Wainer, B.H., Blusztajn, J.K., 1995. 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.* 65, 50–58.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., Magistretti, P.J., 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev. Neurosci.* 20, 291–299.
- Perea, G., Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38, 375–382.
- Peters, S., Koh, J., Choi, D.W., 1987. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 236, 589–593.
- Plaut, G.W.E., 1963. Isocitrate dehydrogenases, in: Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (Eds.), *The Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 105–126.
- Prasad, A.S., 1991. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 403–412.
- Prasad, A.S., 1995. Zinc: an overview. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 11, 93–99.
- Prat, M.D., Guiteras, J., Compañó, R., Beltrán, J.L., 1991. Spectrofluorimetric method for the simultaneous determination of zinc and cadmium. *J. Fluoresc.* 1, 267–272.
- Price, J.L., Morris, J.C., 1999. Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 45, 358–368.
- Prochiantz, A., Mallat, M., 1988. Astrocyte diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 540, 52–63.
- Qin, Y., Thomas, D., Fontaine, C.P., Colvin, R.A., 2009. Silencing of ZnT1 reduces Zn²⁺ efflux in cultured cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 450, 206–210.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2013. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PloS One* 8, e64372.
- Rae, C.D., 2014. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain (1)h magnetic resonance spectra. *Neurochem. Res.* 39, 1–36.
- Rassendren, F.A., Lory, P., Pin, J.P., Nargeot, J., 1990. Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 4, 733–740.
- Raulin, J., 1869. Etudes chimiques sur la vegetation. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 93–299.
- Regland, B., Lehmann, W., Abedini, I., Blennow, K., Jonsson, M., Karlsson, I., Sjögren, M., Wallin, A., Xilinas, M., Gottfries, C.G., 2001. Treatment of Alzheimer’s disease with clioquinol. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12, 408–414.
- Richardson, P.J., 1981. Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. *J. Neurochem.* 37, 258–260.
- Rícny, J., Tucek, S., Nováková, J., 1992. Acetylcarnitine, carnitine and glucose diminish the effect of muscarinic antagonist quinuclidinyl benzilate on striatal acetylcholine content. *Brain Res.* 576, 215–219.

- Rodríguez, J.J., Olabarria, M., Chvatal, A., Verkhatsky, A., 2009. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 16, 378–385.
- Ronowska, A., Dyś, A., Jankowska-Kulawy, A., Klimaszewska-Lata, J., Bielarczyk, H., Romianowski, P., Pawełczyk, T., Szutowicz, A., 2010. Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 56, 143–151.
- Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Bielarczyk, H., Pawełczyk, T., Szutowicz, A., 2007. Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 103, 972–983.
- Ruiz, A., Walker, M.C., Fabian-Fine, R., Kullmann, D.M., 2004. Endogenous zinc inhibits GABA(A) receptors in a hippocampal pathway. *J. Neurophysiol.* 91, 1091–1096.
- Ryu, R., Shin, Y., Choi, J.-W., Min, W., Ryu, H., Choi, C.-R., Ko, H., 2002. Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 143, 257–263.
- Sakai, H., Nakashima, S., Yoshimura, S., Nishimura, Y., Sakai, N., Nozawa, Y., 1997. Identification of differentially expressed mRNAs during rat C6 glial cell differentiation by mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP). *Neurosci. Lett.* 229, 93–96.
- Salińska, E., Danysz, W., Łazarewicz, J.W., 2005. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.* 43, 322–339.
- Samuel, W., Masliah, E., Hill, L.R., Butters, N., Terry, R., 1994. Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology* 44, 2081–2088.
- Sarter, M., Parikh, V., 2005. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 48–56.
- Scheff, S.W., Price, D.A., 2006. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 101–115.
- Schliebs, R., Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 113, 1625–1644.
- Schmidlin, A., Wiesinger, H., 1994. Transport of L-arginine in cultured glial cells. *Glia* 11, 262–268.
- Scott, B.J., Bradwell, A.R., 1983. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin. Chem.* 29, 629–633.
- Sekler, I., Moran, A., Hershfinkel, M., Dori, A., Margulis, A., Birenzweig, N., Nitzan, Y., Silverman, W.F., 2002. Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with chelatable zinc in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 447, 201–209.
- Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Yu, S.P., Ying, H.S., Koh, J.Y., Kerchner, G.A., Choi, D.W., 1997. Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 9554–9564.
- Sensi, S.L., Paoletti, P., Bush, A.I., Sekler, I., 2009. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 780–791.
- Sensi, S.L., Rapposelli, I.G., Frazzini, V., Mascetra, N., 2008. Altered oxidant-mediated intraneuronal zinc mobilization in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 43, 488–492.

- Shank, R.P., Bennett, G.S., Freytag, S.O., Campbell, G.L., 1985. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res.* 329, 364–367.
- Sheline, C.T., Behrens, M.M., Choi, D.W., 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3139–3146.
- Sheu, K.F., Kim, Y.T., Blass, J.P., Weksler, M.E., 1985. An immunochemical study of the pyruvate dehydrogenase deficit in Alzheimer's disease brain. *Ann. Neurol.* 17, 444–449.
- Sisodia, S.S., Price, D.L., 1995. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 366–370.
- Smart, T.G., 1992. A novel modulatory binding site for zinc on the GABAA receptor complex in cultured rat neurones. *J. Physiol.* 447, 587–625.
- Smart, T.G., Hosie, A.M., Miller, P.S., 2004. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 10, 432–442.
- Smart, T.G., Xie, X., Krishek, B.J., 1994. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog. Neurobiol.* 42, 393–441.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Sorimachi, M., Kataoka, K., 1975. High affinity choline uptake: an early index of cholinergic innervation in rat brain. *Brain Res.* 94, 325–336.
- Sreedhar, B., Nair, K.M., 2005. Modulation of aconitase, metallothionein, and oxidative stress in zinc-deficient rat intestine during zinc and iron repletion. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 999–1008.
- Srere, P.A., 1965. The Molecular Physiology of Citrate. *Nature* 205, 766–770.
- Suh, S.W., Chen, J.W., Motamedi, M., Bell, B., Listiak, K., Pons, N.F., Danscher, G., Frederickson, C.J., 2000a. Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res.* 852, 268–273.
- Suh, S.W., Jensen, K.B., Jensen, M.S., Silva, D.S., Kesslak, P.J., Danscher, G., Frederickson, C.J., 2000b. Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Res.* 852, 274–278.
- Szutowicz A., 1978. Regional and developmental correlations between choline acetyltransferase and ATP-citrate oxaloacetate lyase in rat brain, in: Matthies H., Krug M., Popov N. (Ed.), *Biological Aspects of Learning, Memory Formation and Ontogeny of the CNS.* Akademie Verlag, Berlin, pp. 489–499.
- Szutowicz, A., 2001. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 1009–1018.
- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Gul, S., Ronowska, A., Pawełczyk, T., Jankowska-Kulawy, A., 2006. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab. Brain Dis.* 21, 149–161.
- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Jankowska-Kulawy, A., Pawełczyk, T., Ronowska, A., 2013. Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 38, 1523–1542.
- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Lysiak, W., 1981a. The role of citrate derived from glucose in the acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Int. J. Biochem.* 13, 887–892.

- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Skulimowska, H., 1994. Effect of dichloroacetate on acetyl-CoA content and acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 19, 1107–1112.
- Szutowicz, A., Jankowska, A., Blusztajn, J.K., Tomaszewicz, M., 1999. Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J. Neurosci. Res.* 57, 131–136.
- Szutowicz, A., Kabata, J., Bielarczyk, H., 1982a. The contribution of citrate to the synthesis of acetyl units in synaptosomes of developing rat brain. *J. Neurochem.* 38, 1196–1204.
- Szutowicz, A., Lysiak, W., 1980. Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 35, 775–785.
- Szutowicz, A., Lysiak, W., Angielski, S., 1977. The effect of (-)hydroxycitrate on pyruvate metabolism in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 29, 375–378.
- Szutowicz, A., Morrison, M.R., Srere, P.A., 1983. The enzymes of acetyl-CoA metabolism in differentiating cholinergic (s-20) and noncholinergic (NIE-115) neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 40, 1664–1670.
- Szutowicz, A., Stepień, M., Bielarczyk, H., Kabata, J., Lysiak, W., 1982b. ATP citrate lyase in cholinergic nerve endings. *Neurochem. Res.* 7, 799–810.
- Szutowicz, A., Stepień, M., Piec, G., 1981b. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal. Biochem.* 115, 81–87.
- Szutowicz, A., Stepień, M., Piec, G., 1981c. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal. Biochem.* 115, 81–87.
- Szutowicz, A., Tomaszewicz, M., Bielarczyk, H., 1996. Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 56, 323–339.
- Szutowicz, A., Tomaszewicz, M., Bielarczyk, H., Jankowska, A., 1998. Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbances of cholinergic transmission in brain. *Dev. Neurosci.* 20, 485–492.
- Szutowicz, A., Tomaszewicz, M., Jankowska, A., Madziar, B., Bielarczyk, H., 2000. Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Metab. Brain Dis.* 15, 29–44.
- Takeda, A., 2000. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34, 137–148.
- Tomaszewicz, M., Rossner, S., Schliebs, R., Cwikowska, J., Szutowicz, A., 2003. Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *J. Neurochem.* 87, 318–324.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* 101, 294–301.
- Tucek, S., 1985. Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 44, 11–24.

- Tucek, S., 1993. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60, 59–69.
- Vallee, B.L., Auld, D.S., 1993. New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 6493–6500.
- Vallee, B.L., Falchuk, K.H., 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79–118.
- Van den Berg, C.J., Krzalić, L., Mela, P., Waelsch, H., 1969. Compartmentation of glutamate metabolism in brain. Evidence for the existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. *Biochem. J.* 113, 281–290.
- Vanhoutte, N., Hermans, E., 2008. Glutamate-induced glioma cell proliferation is prevented by functional expression of the glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett.* 582, 1847–1852.
- Villafranca, J.J., 1974. The mechanism of aconitase action. Evidence for an enzyme isomerization by studies of inhibition by tricarboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 249, 6149–6155.
- Vogt, K., Mellor, J., Tong, G., Nicoll, R., 2000. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26, 187–196.
- Voller, A., 1978. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric. Clin. Lab.* 8, 289–298.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Waagepetersen, H.S., Sonnewald, U., Schousboe, A., 2007. Glutamine, Glutamate, and GABA: Metabolic Aspects, in: Lajtha, A. (Ed.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer, New York, USA, pp. 1–21.
- Walsh, C.T., Sandstead, H.H., Prasad, A.S., Newberne, P.M., Fraker, P.J., 1994. Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 2, 5–46.
- Weiss, J.H., Sensi, S.L., Koh, J.Y., 2000. Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 395–401.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delon, M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237–1239.
- Wyss, M.T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P.J., Weber, B., 2011. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 7477–7485.
- Yi, J.-S., Lee, S.-K., Sato, T.-A., Koh, J.-Y., 2003. Co-induction of p75(NTR) and the associated death executor NADE in degenerating hippocampal neurons after kainate-induced seizures in the rat. *Neurosci. Lett.* 347, 126–130.
- Yin, H.Z., Weiss, J.H., 1995. Zn(2+) permeates Ca(2+) permeable AMPA/kainate channels and triggers selective neural injury. *Neuroreport* 6, 2553–2556.
- Zhang, L.-H., Wang, X., Zheng, Z.-H., Ren, H., Stoltenberg, M., Danscher, G., Huang, L., Rong, M., Wang, Z.-Y., 2010. Altered expression and distribution of zinc transporters in APP/PS1 transgenic mouse brain. *Neurobiol. Aging* 31, 74–87.
- Zyśk, M., Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Dyś, A., Szutowicz, A., Bielarczyk, H., 2013. Regulatory effect of L-type voltage-gated calcium channel on acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons during acute Zn exposure. *Folia Neuropathol.* 51, 399.