



Marlena Inga Zyśk

**Regulacyjny wpływ białek transportujących wapń
na cholinergiczne komórki mózgu oraz ich podatność na sygnały cytotoksyczne**

Rozprawa doktorska

Praca wykonana w
Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej
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 hab. n. med. Tadeusz Pawełczyk

Praca została wykonana z funduszy projektów GUMed (MN 001-0059/08, St-57)
oraz grantu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki (2015/17/N/NZ3/01428).

Gdańsk 2016

Część wyników, dotycząca chronicznego wpływu cynku na poziom N-acetyloasparagianu i acetylo-CoA została opublikowana w artykułach:

1. Klimaszewska-Łata J, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Ronowska A, **Zyśk M**, Gruzewska K, Pawełczyk T and Szutowicz A (2015) Differential effects of lipopolysaccharide on energy metabolism in murine microglial N9 and cholinergic SN56 neuronal cells. *J Neurochem*, v. **133**, p. 284-97.
2. **Zyśk M**, Bielarczyk H, Gul-Hinc S, Gapys B, Ronowska A, Szutowicz A (2016) N-acetyl-L-aspartate, a marker of acetyl-CoA-linked energy deficits in SN56 cholinergic cells of septal origin. *J Alzheimers Dis* (wysłano do druku: styczeń 2016)

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi

dr hab. n. med. Hannie Bielarczyk

za wszelką pomoc metodyczną, jak i merytoryczną
na wszystkich etapach tworzenia rozprawy doktorskiej
oraz okazaną wyrozumiałość podczas
redagowania niniejszej rozprawy doktorskiej

Dziękuję zespołowi Zakładu Medycyny Laboratoryjnej oraz Zakładu Medycyny
Molekularnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za pomoc w trakcie wykonywania
niniejszej rozprawy doktorskiej

Dziękuję rodzicom i rodzeństwu za wsparcie i wiarę.....

SPIS TREŚCI

	Wykaz rycin, równań i tabel umieszczonych w tekście.....	10
1.	STRESZCZENIE	19
2.	WSTĘP	21
2.1.	Choroba Alzheimerera.....	21
2.2.	Rola Ca w ośrodkowym układzie nerwowym.....	22
2.3.	Neuroprzeobrażalność cholinergiczną	23
2.3.1.	Nikotynowe receptory acetylocholiny.....	28
2.3.2.	Wewnątrzkomórkowa regulacja poziomu Ca w pobudzonych neuronach cholinergicznym.....	29
2.3.3.	Bramkowane napięciem kanały wapniowe	31
2.4.	Rola Ca w neurodegeneracji.....	34
2.5.	Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym	34
2.5.1.	Drogi transportu acetylo-CoA z mitochondrium do cytoplazmy neuronu cholinergicznego.....	37
2.5.2.	Metabolizm <i>N</i> -acetyloasparaginianu	37
2.6.	Rola Zn w ośrodkowym układzie nerwowym.....	39
2.6.1.	Zn jako neuromodulator jonotropowych receptorów glutaminergicznym	40
2.6.2.	Wpływ Zn na degenerację neuronów cholinergicznym.....	40
2.7.	Komórki linii SN56 jako komórkowy model neurodegeneracji cholinergicznym.....	41
3.	CEP PRACY	44
4.	MATERIAŁY I METODY	45
4.1.	Odczynniki	45
4.2.	Materiały zużywalne	46
4.3.	Aparatura	47
4.4.	Komórki cholinergiczne	48
4.4.1.	Hodowla komórkowa	48
4.4.2.	Schemat eksperymentalny przewlekłego wpływu Zn na komórki SN56.....	49
4.4.3.	Schemat eksperymentu ostrego wpływu Zn na komórki cholinergiczne SN56 poddane działaniu antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia w warunkach polaryzacji i depolaryzacji błony komórkowej	50
4.4.4.	Rozdział frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej komórek SN56.....	52

4.5.	Czynniki neurotoksyczne	52
4.5.1.	Cynk	52
4.6.	Czynniki neuroprotekcyjne	53
4.6.1.	Amid kwasu liponowego	53
4.7.	Selektywni antagoniści białek regulujących wewnątrzkomórkowy poziom Ca	53
4.7.1.	2-aminoetoksydifenylboran	53
4.7.2.	ω -konotoksyna GIVA	53
4.7.3.	ω -konotoksyna MVIIC	53
4.7.4.	Mekamylamina	54
4.7.5.	Nifedypina	54
4.8.	Oznaczanie aktywności enzymów	54
4.8.1.	Dehydrogenaza mleczanowa	54
4.8.2.	Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej	55
4.8.3.	Akonitaza	56
4.8.4.	Dehydrogenaza izocytrynianowa	56
4.8.5.	Syntaza cytrynianowa	56
4.8.6.	<i>N</i> -acetylotransferaza asparaginianowa	57
4.8.7.	Acetylotransferaza cholinowa	58
4.9.	Oznaczanie poziomu metabolitów komórkowych	59
4.9.1.	Acetylo-CoA	59
4.9.2.	<i>N</i> -acetyloasparaginian	60
4.9.3.	Acetylocholina	61
4.9.4.	Adenozyno-5'-trifosforan	62
4.9.5.	Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym	63
4.10.	Oznaczanie poziomu i dystrybucja jonów wapnia i cynku	63
4.10.1.	Oznaczanie poziomu wapnia	63
4.10.2.	Oznaczanie poziomu cynku	64
4.10.3.	Obrazowanie subkomórkowej dystrybucji cynku	64
4.11.	Obrazowanie zmian morfologicznych komórek	65
4.12.	Oznaczanie liczby i przeżywalności komórek	65
4.13.	Immunodetekcja enzymu NAT8L w komórkach SN56	65
4.13.1.	Oznaczanie metodą ELISA zawartości <i>N</i> -acetylotransferazy asparaginianowej	65

4.13.2.	Półilościowe wyznaczenie zawartości białek regulujących homeostazę wapnia metodą Western Blot.....	66
4.14.	Oznaczanie zawartości białka całkowitego.....	67
4.15.	Metody statystyczne.....	67
5.	WYNIKI.....	68
5.1.	Charakterystyka komórek SN56 jako komórkowego modelu neuronów cholinergicznyc...	68
5.2.	Zależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego przewlekła neurotoksyczność Zn w komórkach SN56.....	73
5.2.1.	Akumulacja cynku i wapnia w komórkach SN56 przewlekłe ekspozowanych na Zn (0-0.15 mmol/L).....	75
5.2.2.	Chroniczny wpływ lipoamidu i Zn na produkcję acetylo-CoA.....	77
5.2.3.	Ocena jakości rozdziału frakcji mitochondrialnej komórek SN56.....	80
5.2.4.	Chroniczny wpływ Zn na poziom acetylo-CoA w przedziałach komórkowych.....	81
5.2.5.	Optymalizacja oznaczenia poziomu <i>N</i> -acetyloasparaginianu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconych układem faz.....	82
5.2.6.	Chroniczny wpływ Zn na subkomórkową lokalizację produkcji <i>N</i> -acetyloasparaginianu w komórkach SN56.....	85
5.2.6.1.	Chroniczny wpływ stężenia Zn na poziom i aktywność <i>N</i> -acetylotransferazy asparaginianowej.....	86
5.2.6.2.	Chroniczny wpływ stężenia Zn na poziom <i>N</i> -acetyloasparaginianu oraz ATP w komórkach SN56.....	87
5.2.7.	Przewlekły wpływ Zn na poziom białek regulujących homeostazę wapnia w komórkach SN56.....	88
5.2.7.1.	Przewlekły wpływ Zn na poziom nikotynowego receptora acetylocholin w komórkach SN56.....	89
5.2.7.2.	Przewlekły wpływ Zn na poziom receptorów glutaminianu w komórkach SN56.....	90
5.2.7.3.	Przewlekły wpływ Zn na poziom bramkowanych napięciem kanałów wapniowych w komórkach SN56.....	91
5.2.7.4.	Przewlekły wpływ Zn na poziom białek błony śródplazmatycznej w komórkach SN56.....	93
5.3.	Neurotoksyczność ostra Zn w komórkach SN56 o różnej ekspresji fenotypu cholinergicznego.....	94
5.3.1.	Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na neurotoksyczność ostrą Zn w nieróżnicowanych komórkach SN56.....	99

5.3.1.1.	Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na żywotność nieróżnicowanych komórek SN56.....	99
5.3.1.2.	Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na akumulację cynku i wapnia w nieróżnicowanych komórkach SN56.....	100
5.3.1.3.	Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na produkcję acetylo-CoA w nieróżnicowanych komórkach SN56.....	102
5.3.2.	Rola CaTR w neurotoksyczności Zn w neuronalnych komórkach SN56	104
5.3.2.1.	Wpływ CaTR na żywotność komórek SN56 poddanych ostremu działaniu Zn	104
5.3.2.2.	Wpływ antagonistów CaTR na wewnątrzkomórkowy poziom wapnia.....	105
5.3.2.3.	Wpływ antagonistów białek regulujących komórkową homeostazę wapnia na poziom tego kationu w komórkach SN56 poddanych ostremu wpływowi Zn	106
5.3.2.4.	Wpływ antagonistów CaTR na kompartmentację wapnia w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu Zn.....	107
5.3.2.5.	Wpływ CaTR na akumulację cynku w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu cynku	109
5.3.2.6.	Wpływ antagonistów CaTR na produkcję związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym	111
5.3.2.7.	Wpływ antagonistów CaTR na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn	112
5.3.2.8.	Wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56	113
5.3.2.9.	Wpływ antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA w przedziałach komórkowych komórek SN56.....	114
5.3.2.10.	Wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn	116
5.3.2.11.	Wpływ antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA we frakcjach komórkowych komórek SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn	117
5.3.2.12.	Wpływ antagonistów CaTR na aktywność wybranych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu Zn.....	119
5.3.2.13.	Wpływ antagonistów CaTR na poziom ATP w komórkach SN56 poddawanych ostremu wpływowi Zn.....	122
5.3.2.14.	Wpływ antagonistów CaTR na poziom i wydzielanie acetylocholino w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu Zn	122
5.3.2.15.	Wpływ antagonistów CaTR na poziom N-acetyloasparagianu w komórkach SN56 poddanych ostremu wpływowi Zn	126
6.	DYSKUSJA.....	128

6.1.	SN56 jako komórkowy model neuronów cholinergicznyc	128
6.2.	Optymalizacja metod badawczych	129
6.3.	Zmiennoczasowy wpływ Zn na komórki SN56	130
6.4.	Wpływ białek regulujących homeostazę Ca na toksyczność Zn	133
6.5.	Homeostaza Ca w komórkach SN56 w warunkach toksyczności ostrej Zn	138
6.6.	Zależna od białek regulujących poziom wapnia aktywność enzymów mitochondrialnych cholinergicznyc komórek SN56 eksponowanych na warunki toksyczne	141
6.7.	Zależne od aktywności białek transportujących wapń zmiany poziomów acetylo-CoA, ATP i acetylocholinyc w komórkach SN56 eksponowanych na Zn	144
6.8.	Produkcja N-acetyloasparaginianu w neuronach cholinergicznyc eksponowanych na sygnały cytotoksyczne	147
7.	WNIOSKI	151
8.	BIBLIOGRAFIA	153

WYKAZ RYCIN, RÓWNAŃ I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Ryciny:

Ryc. 1. Udział Ca w procesie przekazywania sygnału pomiędzy neuronami cholinergicznymi z acetylocholiną jako neuroprzekaźnikiem.....	28
Ryc. 2. Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym.....	36
Ryc. 3. Schemat eksperymentu 24 godzinowego wpływu cynku na komórki linii SN56 wstępnie inkubowanych w obecności bądź nieobecności lipoamidu.....	50
Ryc. 4. Schemat eksperymentu badającego wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na neurotoksyczne działanie cynku.....	51
Ryc. 5. Schemat przemian biochemicznych obserwowanych w cyklizacyjnej metodzie oznaczania poziomu acetylo-CoA.....	60
Ryc. 6. Morfologia komórek SN56 hodowanych w obecności czynników różnicujących...	69
Ryc. 7. Wpływ czynników różnicujących na poziom i wydzielanie acetylocholin w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	70
Ryc. 8. Wpływ czynników różnicujących na poziom acetylo-CoA i <i>N</i> -acetyloasparagianu w komórkach neuronalnych SN56.....	71
Ryc. 9. Morfologia komórek SN56.....	74
Ryc. 10. Zależny od stężenia przewlekły wpływ Zn na liczbę oraz stopień uszkodzenia nieróżnicowanych i różnicowanych komórek SN56.....	75
Ryc. 11. Akumulacja cynku oraz wapnia w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56 przewlekłe eksponowanych na Zn (0-0.15 mmol/L).....	76
Ryc. 12. Przewlekły wpływ Zn (0-0.15 mmol/L) na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz całkowity poziom acetylo-CoA nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	78
Ryc. 13. Wpływ amidu kwasu liponowego i Zn na frakcyjną aktywność dehydrogenazy mleczanowej w pożywce, poziom acetylo-CoA oraz <i>N</i> -acetyloasparagianu w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	79
Ryc. 14. Wpływ Zn na poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym oraz cytoplazmatycznym w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	82
Ryc. 15. Chromatogram HPLC nadsącza uzyskanego z komórek SN56.....	84
Ryc. 16. Zależna od stężenia Zn aktywność enzymu oraz poziom białka <i>N</i> -acetylotransferazy asparagianowej w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	87

Ryc. 17. Zależne od stężenia Zn poziomy ATP oraz <i>N</i> -acetyloasparaginyanu w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	88
Ryc. 18. Chroniczny wpływ Zn na poziom nikotynowego receptora acetylocholiny w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	90
Ryc. 19. Chroniczny wpływ Zn na poziom receptorów glutaminianu w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	91
Ryc. 20. Chroniczny wpływ Zn na poziom zależnych od napięcia kanałów wapniowych w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	92
Ryc. 21. Chroniczny wpływ Zn na poziom śródplazmatycznych białek uczestniczących w transporcie wapnia w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	93
Ryc. 22. Akumulacja Zn w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych przez 30 minut w środowisku polaryzacyjnym.....	95
Ryc. 23. Zależny od stężenia ostry wpływ Zn na parametry żywotności nieróżnicowanych i różnicowanych komórek SN56.....	96
Ryc. 24. Ostry wpływ Zn (0-0.175 mmol/L) na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogrońianowej oraz całkowity poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56.....	97
Ryc. 25. Protekcyjny wpływ antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na nieróżnicowane komórki SN56 poddane ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym.....	100
Ryc. 26. Wpływ selektywnych antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na akumulację cynku w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzacyjnym.....	101
Ryc. 27. Wpływ selektywnych antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na wewnątrzkomórkowy poziom wapnia w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym....	101
Ryc. 28. Regulatorowy wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na aktywność dehydrogenazy pirogrońianowej w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym.....	102
Ryc. 29. Wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na całkowity poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym.....	103

Ryc. 30. Protekcyjny wpływ antagonistów CaTR na przeżywalność nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórek SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	104
Ryc. 31. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na całkowity poziom wapnia oznaczony w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	106
Ryc. 32. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na całkowity poziom wapnia oznaczony w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych	107
Ryc. 33. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na akumulację cynku w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych	110
Ryc. 34. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na akumulację związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	112
Ryc. 35. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	113
Ryc. 36. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	114
Ryc. 37. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na mitochondrialny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	115
Ryc. 38. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na cytoplazmatyczny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	116

Ryc. 39. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych	117
Ryc. 40. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na mitochondrialny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych	118
Ryc. 41. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na cytoplazmatyczny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	119
Ryc. 42. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność akonitazy w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych	120
Ryc. 43. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	121
Ryc. 44. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom ATP w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych.....	122
Ryc. 45. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom acetylocholin w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	123
Ryc. 46. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na wydzielanie acetylocholin w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	125
Ryc. 47. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom <i>N</i> -acetyloasparagianu w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 poddanych ostrej	

ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych tudzież polaryzacyjnych.....	127
Ryc. 48. Wpływ wewnątrzkomórkowego poziomu Zn na inhibicję akonitazy w komórkach SN56	135
Ryc. 49. Akumulacja związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych w obecności antagonistów bramkowanych wysokim napięciem kanałów wapniowych.....	136
Ryc. 50. Zmiennozasowy wpływ 10 μ mol/L nifedypiny na przeżywalność nieróżnicowanych komórek SN56 eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn.....	137
Ryc. 51. Korelacja pomiędzy aktywnością dehydrogenazy izocytrynianowej a akumulacją cynku tudzież związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym.....	143
Ryc. 52. Wpływ mekamyminy i 2-aminoetoksydifenylboranu na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut w warunkach depolaryzacyjnych	146
Ryc. 53. Korelacja pomiędzy całkowity poziomem <i>N</i> -acetyloasparagianu a mitochondrialnym tudzież cytoplazmatycznym poziomem acetylo-CoA w komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego.....	149

Równania:

Równanie 1. Schemat reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową w obecności NADH.....	55
Równanie 2. Schemat reakcji zachodzących w czasie badania aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej.....	55
Równanie 3. Schemat reakcji z zastosowaniem znakowanego izotopowo asparagianu jako substratu reakcji katalizowanej przez <i>N</i> -acetylotransferazę asparaginianową. ..	57
Równanie 4. Schemat reakcji zachodzących w czasie pomiaru zawartości acetylocholino w próbce.	62
Równanie 5. Sumaryczny schemat reakcji katalizowanej przez enzym lucyferazę w obecności jonów magnezu i tlenu.	63

Tabele:

Tabela 1. Wartości parametrów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych komórkach SN56.....	72
Tabela 2. Aktywność enzymów w przedziałach komórkowych komórek SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego.....	80
Tabela 3. Subkomórkowa lokalizacja N-acetyloasparagianu oraz N-acetylotransferazy asparagianowej w komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego.....	85
Tabela 4. Wpływ toksyczności ostrej Zn na wybrane parametry oznaczone w nieróżnicowanych oraz różnicowanych neuronalnych komórkach SN56 w warunkach depolaryzacyjnych.....	98
Tabela 5. Poziom wapnia w przedziale mitochondrialnym komórek SN56 inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym.....	108
Tabela 6. Poziom jonów wapnia w przedziale cytoplazmatycznym komórek SN56 inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym.....	109
Tabela 7. Porównanie wybranych parametrów związanych z metabolizmem acetylo-CoA oznaczonych w różnych modelach badawczych.....	129
Tabela 8. Poziom acetylo-CoA we frakcjach mitochondrialnych zależny od stanu czynnościowego komórek SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego...	145

OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

acetylo-CoA	acetylowany koenzym A
ACh	acetylocholina
ACO	akonitaza
AD	choroba Alzheimerera
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
AMPA	receptor kwasu glutaminowego aktywowany kwasem α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowym
2-APB	2-aminoetoksydifenylboran
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
C18-RP-HPLC	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z zastosowaniem kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi pełniącymi funkcję fazy odwróconej
Ca ²⁺	dwudodatni jon wapnia
Ca	wapń wolny bądź skoordynowany
CaTR	białka regulujące wewnątrzkomórkową równowagę wapniową
CoA	koenzym A
Ctx-GVIA	ω -konotoksyna GIVA
Ctx-MVIIC	ω -konotoksyna MVIIC
db-cAMP	dibutyrylo-cykliczny adenzyno-3',5'- monofosforan

DMSO	dimetylosulfotlenek
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa
IP ₃ -R	receptor 1,4,5-trifosforanu inozytolu
LA	amid kwasu liponowego (lipoamid)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
L-VGCC	zależne od potencjału kanały wapniowe typu L
MEC	mekamylamina
NAA	<i>N</i> -acetyloasparaginian
nAChR	nikotynowy receptor acetylocholinowy
NAT8L / A-NAT / Asp-NAT	<i>N</i> -acetylotransferaza asparaginianowa
NF	nifedypina
NMDA	receptor kwasu glutaminowego aktywowany kwasem <i>N</i> -metylo-D-asparaginowym
N-VGCC	zależne od potencjału kanały wapniowe typu N
obr./min	obrotów na minutę
PDHC	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej
P/Q-VGCC	zależne od potencjału kanały wapniowe typu P i Q
RA	kwas <i>trans</i> -retinowy
SN56 KR	różnicowane komórki linii SN56, komórki linii SN56 ze zwiększoną ekspresją fenotypu cholinergicznego
SN56 KN	nieróżnicowane komórki linii SN56
STIM1	pierwsza cząsteczka zrębowej interakcji, sensor Ca ²⁺ wewnątrz siateczki śródplazmatycznej

VGCC	zależny/-e od potencjału kanał/-y wapniowy/-we
TBARS	reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TRP	kanały jonowe zależne od receptorów przejściowego potencjału
TSQ	<i>N</i> -(6-metoksy-8-chinolilo)- <i>p</i> -toluenosulfonamid
Zn ²⁺	dwudodatni jon cynku
Zn	cynk, donor jonów cynku (tu: chlorek cynku)

1. STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera jest jedną z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych na świecie. Zauważalną oznaką choroby jest postępujące uszkodzenie neuronów cholinergiczných. W niniejszej pracy, połączono założenia hipotez dysfunkcji mitochondrialnych z zaburzeniami równowagi wapniowej jako przyczyn neurodegeneracji cholinergiczných. W przedstawionej pracy weryfikowano hipotezę o wpływie białek regulujących wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia na metabolizm energetyczny w neuronach cholinergiczných eksponowanych na warunki toksyczne.

Badania prowadzono przy użyciu komórek SN56 nieróżnicowanych i różnicowanych kwasem *trans*-retinowym oraz dibutyrylo-cyklicznym AMP w celu zwiększenia ekspresji fenotypu cholinergiczných. Czynnikiem wywołującym warunki toksyczne były jony cynku (Zn).

W badaniach chronicznego wpływu Zn, akumulacja jonu w kontroli wynosiła około 2 pmol/mg białka, z czego poniżej 1% zlokalizowane było we frakcji mitochondrialnej komórek. Chroniczna ekspozycja na 0.15 mmol/L Zn zwiększała akumulację Zn do 9.0 nmol/mg białka, z czego 27% stanowił Zn mitochondrialny. 0.15 mmol/L Zn wywołał 38% inhibicję *N*-acetylotransferazy asparaginianowej oraz 60% kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Skutkowało to ponad 50% obniżeniem dostępności acetylo-CoA oraz *N*-acetyloasparaginianu (NAA). Produkcja NAA odbywała się w mitochondrium komórek SN56. W komórkach różnicowanych obserwowano spadek poziomu NAA o średnio 20% oraz acetylocholinę o ponad 100% w stosunku do komórek nieróżnicowanych. Poziom NAA był ściśle zależny od dostępności acetylo-CoA, którego poziom zabezpieczono przed toksycznym wpływem Zn dodając do środowiska hodowlanego 0.12 mmol/L lipoamidu. 30-sto minutowa ekspozycja komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn w bezbiałkowym depolaryzacyjnym środowisku inkubacyjnym wywoływała analogiczne zmiany, jak w przypadku badań chronicznego wpływu Zn.

Celem zbadania roli białek regulujących wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia (CaTR) na metabolizm acetylo-CoA, komórki SN56 poddano 30-sto minutowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn poprzedzonej wstępnej inkubacji antagonistów CaTR, tj. 2 μ mol/L mekamylamina (nikotynowy receptor acetylocholinę), 10 μ mol/L nifedypina (kanały wapniowe typu L), 0.2 μ mol/L ω -konotoksyna-MVHC (kanały wapniowe typu P/Q), 0.5 μ mol/L ω -konotoksyna-GVIA (kanały wapniowe typu N),

50 $\mu\text{mol/L}$ 2-aminoetoksydifenylboran (2-APB, receptor trójfosforanu inozytolu). Antagoniści pozostawali bez wpływu na przeżywalność komórek SN56. Największy 48% bądź 35% (odpowiednio w obecności bądź nie Zn w środowisku depolaryzacyjnym) spadek poziomu Ca w różnicowanych komórkach SN56 wywołała nifedypina.

Inkubacja różnicowanych komórek SN56 w obecności toksycznych stężeń Zn spowodowała wzrost frakcji komórek niezdolnych do eliminacji błękitu trypanu do 57%. Wstępna inkubacja komórek SN56 w warunkach depolaryzacyjnych z antagonistami CaTR zwiększała przeżywalność średnio o 20%. 30-minutowa ekspozycja komórek na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych wywołała zwiększenie akumulacji Zn w komórkach SN56 z poziomu 0.3 nmol/mg białka do 42.0 nmol/mg białka. Jednakże, akumulacja Zn w komórkach inkubowanych w obecności CaTR została obniżona nawet o 50%. Krótkoczasowa ekspozycja różnicowanych komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn spowodowała trzykrotny wzrost akumulacji związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym. Ponadto Zn obniżył aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC), akonitazy oraz dehydrogenazy izocytrynianowej o ponad 50%. Wstępna inkubacja z antagonistami CaTR zabezpieczyła aktywność PDHC w zakresie poziomów kontrolnych. Aktywność akonitazy w tych warunkach zależna była od ilości zakumulowanego Zn. W przypadku dehydrogenazy izocytrynianowej jedynie antagoniści CaTR wykazujący właściwości antyoksydacyjne (nifedypina, mekamylamina) zabezpieczały aktywność tego enzymu przed toksycznym wpływem cynku. Ekspozycja komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn spowodowało obniżenie poziomu acetylo-CoA i acetylocholino o 50%, a NAA o 40%. Pre-inkubacja z antagonistami CaTR zabezpieczała ścieżki syntezy opisanych metabolitów na znamienne wyższym poziomie niżeli w punktach badających toksyczny wpływ 0.15 mmol/L Zn.

Uzyskane wyniki wykazują, że białka regulujące homeostazę wapnia stanowią jedną z dróg transportu Zn do wnętrza neuronów cholinergicznych. Wysokie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie Zn może być jednym z pierwszych etapów inicjujących zaburzenia metabolizmu energetycznego skutkujących uszkodzeniem tudzież śmiercią komórek neuronalnych. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że obniżenie poziomów wapnia i cynku poprzez zahamowanie kanałów wapniowych zależnych od napięcia mogłoby być znaczącą strategią zapobiegającą uszkodzeniom komórek neuronalnych w stanach patologicznych, które prowadzą do zaburzeń homeostazy wapnia.

WSTĘP

Postęp cywilizacyjny, wraz z towarzyszącym mu rozwojem w zakresie diagnostyki i efektywności metod leczniczych, wpłynęły na jakość oraz długość życia człowieka (Laxminarayan et al., 2006). W przeszłości mało znaczący problem postępującej wraz z wiekiem degeneracji neuronów mózgu człowieka stał się dziś jednym z głównych wyzwań współczesnej nauki. W raporcie Światowej Organizacji Zdrowia czytamy, że w roku 2010 z powodu demencji starczych cierpiało około 35.6 mln ludzi, z czego ponad połowę stanowili pacjenci dotknięci chorobą Alzheimera. Ponadto, zgodnie z szacunkami do roku 2050 liczba chorych wzrośnie trzykrotnie (World Health Organization and Alzheimer's Disease International., 2012).

W związku z tym, celowym wydaje się intensyfikowanie badań skupiających się na ludzkim mózgu oraz jego transformacji na przestrzeni życia człowieka. Ze względu na towarzyszące demencji upośledzenie funkcji poznawczych, bezpośrednio związanych z zaburzeniami neuroprzekaźniczej funkcji neuronów cholinergicznym, szczególnego znaczenie nabierają badania skupiające się wokół układu cholinergicznego.

Neurony cholinergiczne, które stanowią około 1% całkowitej puli neuronów mózgu, tworzą do 10% połączeń nerwowych (Nickerson Poulin et al., 2006; Richardson, 1981). Zlokalizowane są w pniu mózgu, przodomózgowiu oraz śródmózgowiu (Cuello and Sofroniew, 1984; Mesulam et al., 1986). Podstawową ich rolą jest synteza acetylocholiny (ACh), a funkcją przekazywanie bodźca na drodze chemicznej, z wykorzystaniem acetylocholiny jako neuroprzekaźnika wydzielanego do szczeliny synaptycznej. W ten sposób neurony cholinergiczne odpowiadają za naszą zdolność do nauki, zapamiętywania tudzież myślenia (Oda, 1999).

1.1. Choroba Alzheimera

Obraz kliniczny choroby Alzheimera (AD) jest niejednorodny. Pierwszymi symptomami postępującej neurodegeneracji w AD są: osłabienie pamięci krótkotrwałej, problemy z identyfikacją osób z najbliższego otoczenia, apatia, problemy z mową, myśleniem abstrakcyjnym, liczeniem a nawet orientacją w przestrzeni. W kolejnych etapach choroby pacjent kolejno traci zdolności psychomotoryczne i motoryczne. Początkowo apatyczny, przechodzi gwałtowne zmiany nastroju. W ostatnim etapie pacjent wymaga pomocy w każdym aspekcie życia i staje się całkowicie zależny od rodziny (Petersen et al., 1999).

Od czasu pierwszej diagnozy dokonanej przez doktora Aloiza Azheimera minął wiek. Przeprowadzono szereg badań, które ujawniły powtarzające się w układzie nerwowym cechy chorobowe. Przede wszystkim odnotowano zwiększone tempo neurodegeneracji. Analiza materiału badawczego ujawniła obecność amyloidu- β formującego płytki starcze, zwiększony poziom białka ApoE oraz destrukcję mikrofilamentu neuronu z równoczesną hiperfosforylacją białka tau (Dickson, 1997; Glenner and Wong, 1984; Goedert, 1993; Iqbal et al., 1998; Kim et al., 2009; Pericak-Vance et al., 1991). Opisanym zmianom towarzyszyło obniżenie parametrów cholinergicznym skutkujące spadkiem efektywności neuroprzebieżności z udziałem acetylocholino. W neuronach, uszkodzeniu ulegały także mitochondria, a wraz z nimi destabilizacji ulegał stan energetyczny komórek (Blass and Zemcov, 1984; Caldwell et al., 2015; Szutowicz et al., 2013). Część badań wskazuje jako przyczynę długofalowe skutki urazów głowy (zaburzenia homeostazy jonów wapnia, glinu oraz cynku) (Bielarczyk et al., 2003a; Bielarczyk et al., 1998; Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007; Szutowicz et al., 2013). Do czynników ryzyka należą również epizody dysfunkcji układu krwionośnego takie jak niedotlenienie oraz nadciśnienie. Ponadto jedną z przyczyn rozwoju AD są zaburzenia genetyczne. I tak, mogą to być autosomalne, dominujące mutacje genu APP (białko prekursorowe amyloidu) na chromosomie 21, genu PSEN1 na chromosomie 14, a także PSEN2 na chromosomie 1. Prowadzą one do zwiększonego wytwarzania β -amyloidu (1-42) zarówno przez neurony, jak i inne komórki mózgu. W zależności od źródeł, 1-5% przypadków AD ma charakter dziedziczny (FAD, *Familial Alzheimer Disease*). U pacjentów w tej grupie pierwsze objawy zwyrodnienia układu nerwowego pojawiają się już po 30. roku życia, podczas gdy w postaci sporadycznej (SAD, *Sporadic Alzheimer Disease*) nasilenie zapadalności na AD obserwuje się po 65. a nawet 80 roku życia (Brookmeyer et al., 2007; Caldwell et al., 2015; Cuajungco and Lees, 1997a; Moats et al., 1994; Rabinovici and Jagust, 2009).

1.2. Rola Ca w ośrodkowym układzie nerwowym

Funkcjonowanie neuronów cholinergicznym jest zależne od jonów wapnia, którego wewnątrzneuronalne stężenie w stanie spoczynku wynosi około 1 mmol/L, z czego 10% zlokalizowane jest w mitochondriach (Pivovarova et al., 1999). Jony wapnia wewnątrz neuronów cholinergicznym występują zarówno w postaci wolnej (niezwiązanej), jak i zaangażowanej w oddziaływania z innymi cząsteczkami (np. białkami). Ostatecznie, poziom jonów wapnia niezwiązanych zarówno w cytozolu, jak i mitochondrium wynosi

jedynie ok. 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (Pivovarova and Andrews, 2010). Gradient stężeń Ca^{2+} pomiędzy neuronem a otoczeniem utrzymują zależne od ATP białkowe transportery jonowe. Przykładami takich białek są wymienniki sodowo-wapniowe (NCX), pompy wapniowe zlokalizowane w błonie komórkowej (PMCA) tudzież siateczce śródplazmatycznej (SERCA) (Berridge et al., 2000; Grienberger and Konnerth, 2012; Pandya et al., 2013; Pivovarova and Andrews, 2010).

Depolaryzacja błony neuronalnej zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom wolnych jonów wapniowych ok. dziesięciokrotnie. Źródłem jonów wapnia napływających do wnętrza neuronu w trakcie depolaryzacji jest otoczenie, w którym szacunkowo znajduje się 1.2 mmol/L jonów wapnia (Berridge et al., 2000). Napływ jonów wapnia jest procesem niezależnym od energii. Odbywa się on z wykorzystaniem receptorów jonotropowych oraz kanałów wapniowych bramkowanych napięciem (VGCCs, *Voltage-Gated Calcium Channels*) (Berridge et al., 2000; Grienberger and Konnerth, 2012; Pandya et al., 2013; Pivovarova and Andrews, 2010).

W neuronach cholinergicznym wapń uczestniczy w szeregu procesów komórkowych, przykładami są: egzocytoza, transkrypcja genów, aktywacja procesu programowanej śmierci komórki tudzież produkcja energii. Regulacja produkcji energii odbywa się poprzez uczestnictwo jonów wapnia w fosforylacji i defosforylacji enzymów metabolizmu energetycznego. W efekcie prowadzi to do regulacji aktywności katalitycznych enzymów i poziomu produkowanej energii. Jony wapnia w układzie nerwowym odgrywają szczególną rolę regulatora plastyczności i ostatecznie morfologii komórek. Regulowanie tych istotnych właściwości neuronów jest możliwe poprzez inicjację neuroprzekaznictwa. Efektywność przekazywania bodźca pomiędzy neuronami wymusza zmiany morfologiczne neuronów, co globalnie skutkuje szybką odpowiedzią na bodziec w całym układzie nerwowym (Grienberger and Konnerth, 2012).

1.3. Neuroprzekaznictwo cholinergiczne

Kontakt neuronu cholinergicznego z innymi neuronami oraz komórkami efektorowymi odbywa się za pośrednictwem synapsy. Dzięki niej neurony cholinergiczne mogą zarówno odbierać, jak i wysyłać bodźce do otoczenia. Neurony cholinergiczne wysyłają bodziec na drodze neuroprzekaznictwa z wykorzystaniem acetylocholiny (Blusztajn and Wurtman, 1983).

Acetylocholina jest metabolitem produkowanym w cytoplazmatycznej przestrzeni neuronów cholinergicznyc. Substratami do jej produkcji są acetylo-CoA oraz cholina (Ryc. 1C, Ryc 2). Acetylo-CoA dostarczany jest z mitochondrialnego przedziału komórkowego (patrz → podrozdział 1.5.1). Cholina zaś transportowana jest z otoczenia neuronów cholinergicznyc do ich wnętrza w obecności Na^+ -zależnego transportera o wysokim powinowactwie do choliny (CHT1, High-Affinity Choline Transporter) (Ryc. 1C). Substraty reagują w obecności enzymu acetylotransferazy cholinowej (zamiennie: acetylaza cholinowa, ChAT, EC 2.3.1.6.) (Ryc. 2) (Blusztajn and Wurtman, 1983; Tucek and Cheng, 1970). Następnie, zsyntezowana acetylocholina przechowywana jest w pęcherzykach transportujących acetylocholinę (VACht), gdzie pozostaje do momentu zapoczątkowania neuroprzekaznictwa acetylocholinowego (Ryc. 1A, 2) (Brandon et al., 2004).

Przekazywanie bodźca od neuronu do neuronu wymaga obecności Ca^{2+} w czasie zapoczątkowywania oraz zakończenia neuroprzekaznictwa. Zakładając, że opisujemy synapsę neuronu cholinergicznego z neuronem cholinergicznym, przekazanie bodźca odbywałoby się kilkuetapowo.

Receptory są jednym z niezbędnych elementów współtworzących ścieżkę przekazywania bodźca. Wydzielana do szczeliny synaptycznej acetylocholina ma możliwość oddziaływać z receptorami metabotropowymi bądź jonotropowymi. Do receptorów jonotropowych oddziałujących z acetylocholiną zaliczają się receptory nikotynowe oraz kainowe (patrz → podrozdział 1.3.1). Białka te w wyniku koordynacji z ligandem (acetylocholiną) zezwalają na napływ Ca^{2+} do wnętrza neuronów cholinergicznyc (Ryc. 1B) (Jones et al., 1999). W wyniku aktywacji receptorów jonotropowych dochodzi do zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca. Skutkuje to zmianą potencjału błonowego neuronu ze spoczynkowego do wzbudzonego i aktywacją bramkowanych wysokim napięciem kanałów jonowych (VGCC) (Ryc. 1C) (Satin and Kinard, 1998). Najlepiej poznaną rodziną wapniowych kanałów jonowych są VGCC typu L. Kanały wapniowe typu L zlokalizowane są w błonie neuronalnej neuronów cholinergicznyc. Otwarcie kanału typu L wywołuje lokalny wzrost stężenia Ca i aktywację, leżących bliskim sąsiedztwie VGCC typu L, receptorów rianodynowych. Białka RyR stanowią integralną część siateczki sarkoplazmatycznej. Na drodze mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego, pomiędzy kanałem typu L a receptorem RyR, uwalniane są kolejne pokłady Ca z siateczki sarkoplazmatycznej do cytoplazmy całego neuronu (Ryc. 1D) (Nakai et al., 1998).

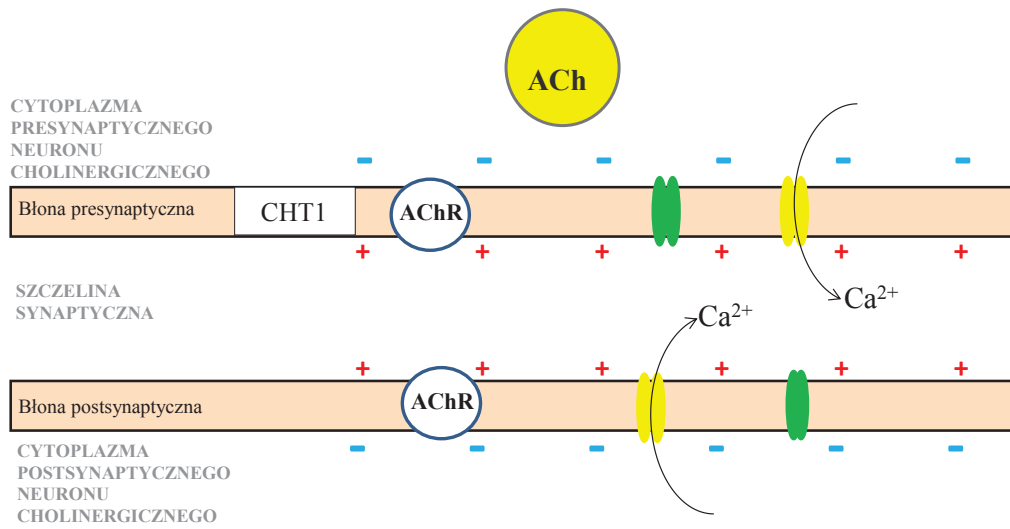
Należące do metabotropowych receptorów acetylocholin, receptory muskarynowe mają również swój udział w depolaryzacji błony neuronalnej poprzez zmianę wewnątrzneuronalnej równowagi wapniowej. Receptory muskarynowe należą do białek związanych z białkiem G, oznacza to, że w wyniku ich oddziaływania z acetylocholimą, aktywacji ulega wewnątrzkomórkowa ścieżka sygnalizacyjna skutkująca produkcją wtórnych wewnątrzkomórkowych przekaźników. Jednym z nich jest 1,4,5-trójfosforan (IP_3), który oddziałuje ze specyficznym dla siebie receptorem (IP_3 -R). IP_3 -R zlokalizowany jest wewnątrz siateczki śródplazmatycznej, a jego oddziaływanie z ligandem (IP_3) skutkuje uwalnianiem pokładów jonów wapnia z ER (Ryc. 1D) (Berridge, 1993).

W czasie, gdy w neuronie postsynaptycznym następują głębokie zmiany wywołane aktywacją receptorów zależnych od acetylocholin, w neuronie presynaptycznym (przekazującym bodziec na drodze wydzielania acetylocholin do szczeliny synaptycznej) neuroprzebieżność jest zakańczana. Białka aktywne w czasie depolaryzacji ulegają wyłączeniu, a pracę podejmują transportery białkowe zależne od ATP, doprowadzając neuron do stanu spoczynkowego (Ryc. 1D) (Grienberger and Konnerth, 2012).

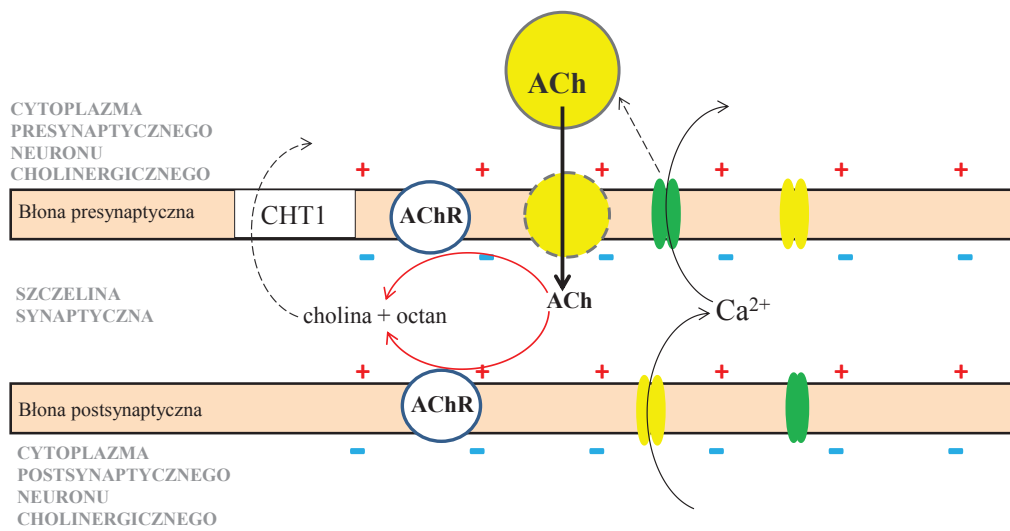
Efektom koordynacji liganda (acetylocholin), neuron postsynaptyczny ulega depolaryzacji na całej swojej powierzchni. Fala depolaryzacji przesuwana się z jednego zakończenia nerwowego, poprzez cały neuron, do przeciwległego i neuron postsynaptyczny zaczyna pełnić rolę neuronu presynaptycznego gotowego do przekazania bodźca poprzez wydzielenie do synapsy neuroprzebieżnika (Ryc. 1B).

Do zapoczątkowania wydzielania acetylocholin niezbędna jest aktywność grupy wapniowych kanałów jonowych związanych z białkiem G. Otwarcie tych kanałów wapniowych związane jest z dwoma istotnymi aspektami neuroprzebieżności. Po pierwsze, na błonie presynaptycznej, VGCC związane z białkiem G umożliwiają napływ Ca z otoczenia do wnętrza neuronu. Po wtóre, aktywują ścieżkę związaną z białkiem G, skutkującą przesunięciem Ca z siateczki śródplazmatycznej do przedziału cytoplazmatycznego, co pośrednio stymuluje wydzielania neuroprzebieżnika (Ryc. 1B) (Catterall, 2011; Grienberger and Konnerth, 2012; Hisatsune et al., 2005; Ockenga et al., 2013).

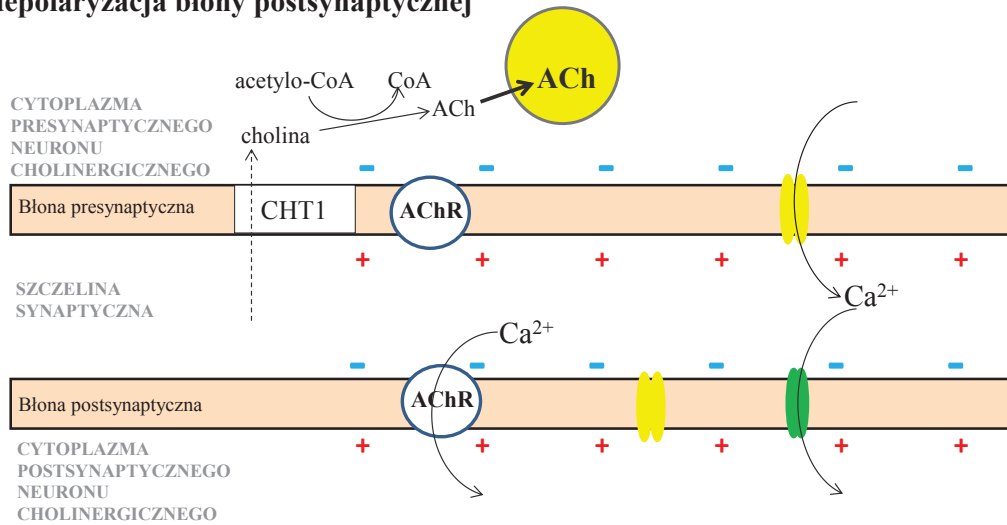
A) Stan spoczynkowy (polaryzacja)



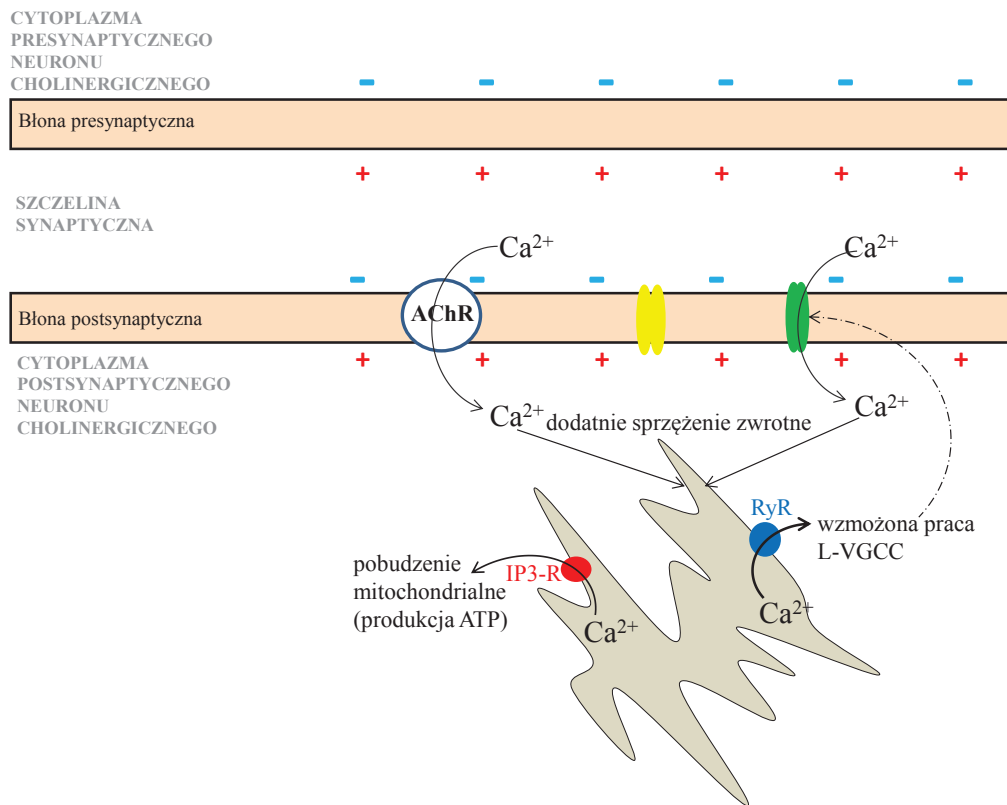
B) Depolaryzacja błony presynaptycznej, wydzielanie acetylocholin (ACh)



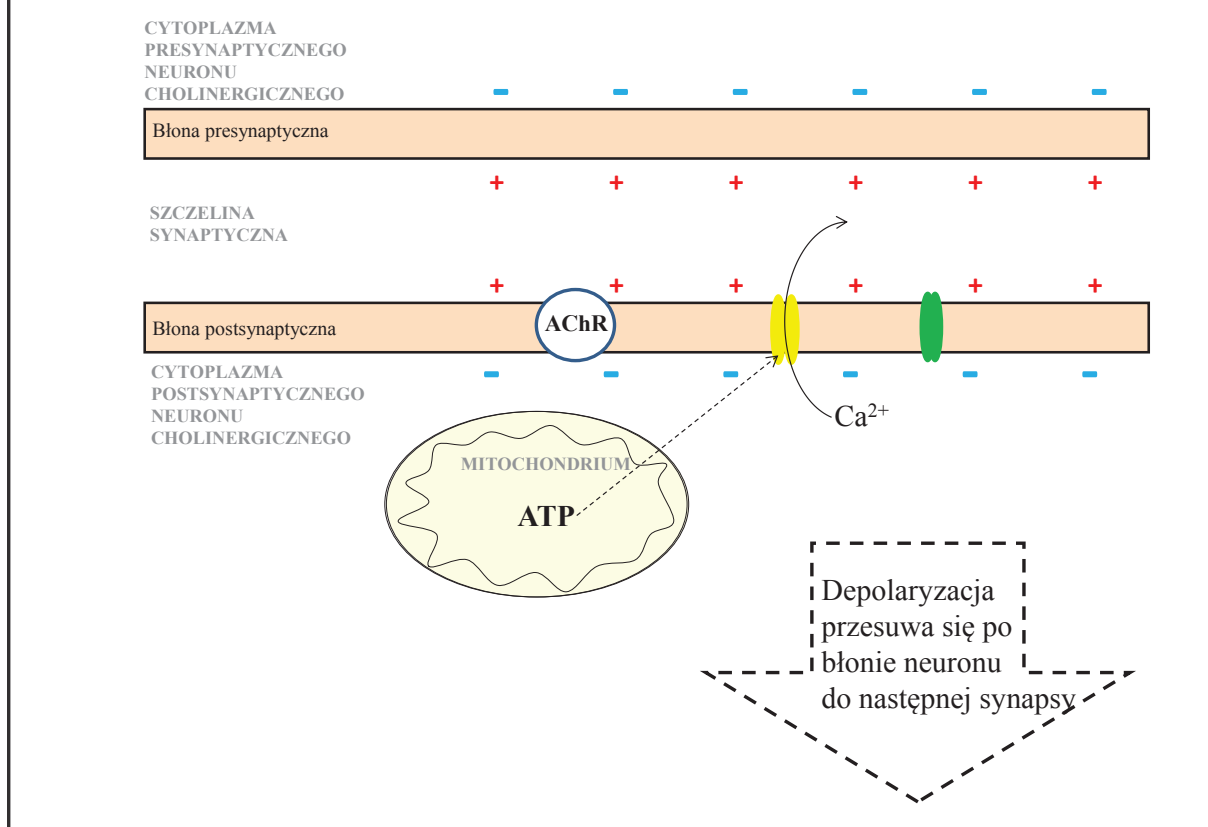
C) Repolaryzacja błony presynaptycznej (z równoległą syntezą ACh) oraz depolaryzacja błony postsynaptycznej



D) Wewnątrzneuronalna kompartmentacja Ca²⁺



E) Repolaryzacja błony postsynaptycznej



Ryc. 1. Udział Ca w procesie przekazywania sygnału pomiędzy neuronami cholinergicznymi z acetylocholiną jako neuroprzekaźnikiem. Transportery wapniowe zależne od ATP (kolor żółty) oraz niezależne (kolor niebieski). Opracowano na podstawie (Blusztajn and Wurtman, 1983; Grienberger and Konnerth, 2012; Weber, 2012).

Skróty: ACh: acetylocholina; AChR: transbłonowe receptory acetylochliny (tu: receptory jonotropowe); CHT1: Na⁺-zależny transporter o wysokim powinowactwie do cholicy; IP₃-R: receptor 1,4,5-trifosforanu inozytoli; L-VGCC: zależny od wysokiego napięcia kanał wapniowy typu L; RyR: receptor rianodynowy.

1.3.1. Nikotynowe receptory acetylochliny

Nikotynowe receptory acetylochliny (nAChR) są grupą reprezentującą białkowe transbłonowe receptory jonotropowe. Ligandem dla receptorów jest acetylocholina i w związku z tym obecne są na powierzchni komórek odbierających sygnał neuroprzekaźniczy wysyłany przez neurony cholinergiczne (Miyazawa et al., 2003). Związanie się liganda (acetylochliny) z nAChR wywołuje swobodny napływ jonów sodu i wapnia do wnętrza komórki oraz wypływ jonów potasu do otoczenia, zapoczątkowujący depolaryzację błony komórkowej. Efektem zmiany potencjałów błonowych jest otwarcie bramkowanego napięciem kanałów jonowych (Decker and Dani, 1990; Miyazawa et al., 2003).

Receptory nikotynowe są jednymi z najlepiej poznanych pod względem budowy receptorów błonowych zidentyfikowanych w organizmie człowieka. Z uwagi na mnogość podtypów receptora, jego funkcja w organizmie, a szczególnie w mózgu, wciąż nie jest całkowicie poznana. Obecnie wiadomo, że receptory odgrywają kluczową rolę zarówno na etapie rozwoju człowieka, jak i w dorosłym życiu. Molekularnie, nAChR są presynaptycznymi modulatorami wydzielania noradrenaliny, acetylocholin, glutaminianu czy kwasu γ -aminomasłowego (Improgo et al., 2010; Jones et al., 1999). Ta cecha receptorów pozwala na regulację neuroplastyczności i oznacza współodpowiedzialność nAChR w procesach uczenia się, koncentracji oraz umiejętności kojarzenia (Jones et al., 1999). W postępującej neurodegeneracji związanej z chorobą Alzheimera odnotowano istotne, szczególnie w hipokampie, obniżenie ilości i aktywności receptorów acetylocholin korelujące z uwstecznieniem funkcji poznawczych (Jones et al., 1999).

1.3.2. Wewnątrzkomórkowa regulacja poziomu Ca w pobudzonych neuronach cholinergicznym

Muskarynowe receptory acetylocholin (mAChR) należą do klasy receptorów metabotropowych. Wyróżniamy 5 klas tych białek, z czego klasy M_1 , M_3 oraz M_5 uczestniczą w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu Ca. Receptory muskarynowe, w odróżnieniu od jonotropowych nikotynowych receptorów acetylocholin, nie zwiększają wewnątrzkomórkowej puli Ca, ale zapoczątkowują wewnątrzkomórkową kaskadę reakcji, w wyniku której zmienia ulega poziom Ca w przedziałach komórkowych (Ockenga et al., 2013). W wyniku zmiany kompartmentacji Ca dochodzi do aktywacji na błonie presynaptycznej kanałów bramkowanych napięciem. Ostatecznie, następuje wydzielanie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej i przekazanie impulsu od sąsiadującego neuronu (Jensen et al., 2004; Ockenga et al., 2013).

Przyłączenie acetylocholin do receptorów muskarynowych zmienia ich konformację i właściwości biochemiczne. Zmiany przestrzenne białka umożliwiają oddziaływanie z białkiem G. W kolejnym kroku następuje przekazanie informacji od receptora poprzez białko G do fosfolipazy C (PLC, EC 3.1.4.11). Ostatecznie generowane są wtórne przekaźniki informacji: diacyloglicerol (DAG) oraz IP_3 (inozytol 1,4,5-trifosforanu) (Fernández de Sevilla et al., 2008; Hisatsune et al., 2005; Mukherjee and Brooks, 2014). Powstały IP_3 łączy się z dedykowanym dla siebie receptorem (IP_3 -R), zlokalizowanym w siateczce śródplazmatycznej.

IP₃-R jest mało poznanym białkiem. Wiadomo jedynie, że stosunkowo niskie poziomy Ca w przedziale cytoplazmatycznym neuronu zwiększają jego aktywność receptora, podczas gdy stosunkowo wysokie działają hamująco (Fernández de Sevilla et al., 2008; Hisatsune et al., 2005; Stathopoulos et al., 2013; Stathopoulos et al., 2008).

Zwiększony poziom Ca w cytoplazmie, indukowany poprzez zlokalizowane w wewnątrzneuronalnych strukturach błonowych (receptory IP₃-R oraz RyR), jest częściowo buforowany obecnością mitochondrii. Wiadomo, że mitochondria zlokalizowane są w bliskim sąsiedztwie siateczki śródplazmatycznej bogatej w receptory IP₃. Ponadto, mitochondria posiadają szereg transporterów jonowych, które wychwytyją jony wapnia w trakcie zależnego od aktywności IP₃-R wyrzutu Ca z siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy. Odpowiednia lokalizacja białek transportujących Ca²⁺ zezwala na kontrolowanie stężenia Ca, którego zbyt wysoki poziom może inicjować apoptozę komórki. Zauważono również, że napływ Ca do wnętrza mitochondrium poprzez uniporty wapniowe zwiększa aktywność cyklu kwasów trójkarboksylowych. Odnotowany niemal trzykrotny wzrost produkcji cząsteczek ATP prawdopodobnie jest spożytkowany w trakcie neuroprzebiegu. Wyprodukowana energia jest spożytkowana do procesów związanych z umieszczaniem neuroprzebiegu w pęcherzykach synaptycznych, a następnie z jego wyrzutem do szczeliny synaptycznej na drodze egzocytozy. Ostatecznie, cząsteczki ATP są zużywane przez zależne od energii transportery wapniowe, aktywnie usuwające Ca²⁺ z wnętrza neuronów cholinergicznym podczas etapów przywrócenia i utrzymania potencjału spoczynkowego (Dingsdale et al., 2012; Jonas et al., 2014).

Depolaryzacja neuronów prowadzi do zaburzeń równowagi wapniowej zarówno w cytoplazmie, jak i siateczce śródplazmatycznej. Powstałe na skutek działania receptorów RyR oraz IP₃-R niedobory Ca wewnątrz siateczki śródplazmatycznej są regulowane poprzez dwie ścieżki. Pierwszą jest otwarcie kanałów jonowych zależnych od receptorów przejściowego potencjału (TRP). Drugą zaś transport Ca na drodze współdziałania dwóch białek: śródplazmatycznego sensoru poziomu Ca (tj. STIM 1 - pierwsza cząsteczka interakcji zrębowej) oraz regulowanego wewnątrzkomórkowymi magazynami Ca kanału wapniowego 1 (ORAI 1) (Stathopoulos and Ikura, 2013; Stathopoulos et al., 2008).

Cząsteczki interakcji zrębowej (STIM, *stromal interaction molecule*) zlokalizowane są na powierzchni zrębu w regionach leżących blisko błony komórkowej. Nieaktywne białko STIM w przestrzeni komórkowej ma formę „zwiniętej” cząsteczki, niezdolnej

do oddziaływania z kanałem ORAI 1. Struktura przestrzenna STIM1, obserwowana w warunkach wysycenia jonami wapnia, jest utrzymywana poprzez wspomniane jony wapnia wbudowane w jej strukturę. W wyniku działania receptorów plazmatycznych dochodzi do gwałtownego obniżenia wewnątrzplazmatycznego poziomu wapnia. W warunkach niedostatecznego zmagazynowania wapnia w siateczce śródplazmatycznej, jony wapnia dysocjują od cząsteczki STIM1. Efektem jest zmiana struktury przestrzennej STIM1 ze „zwiniętej” do cylindrycznej i wydłużonej. Sensor w tej formie łączy się z kanałem ORAI aktywując go i zezwalając na swobodny napływ Ca^{2+} do cytoplazmy. Skąd jony wapnia są natychmiast transportowane do wnętrza siateczki śródplazmatycznej z udziałem pompy wapniowej SERCA (Majewski and Kuznicki, 2015; Mukherjee and Brooks, 2014; Stathopoulos et al., 2008).

1.3.3. Bramkowane napięciem kanały wapniowe

Efektem współdziałania receptorów jonotropowych i metabotropowych są duże zmiany potencjału błonowego, uaktywniające białkowe kanały wapniowe z grupy HVA (*high voltage-activated*). Do tej grupy należą kanały typu L, N, P/Q oraz R. W budowie kanałów wapniowych można wyróżnić 3 fragmenty:

- transbłonowy, który stanowi cylindryczny trzon białka zbudowany z 4 łańcuchów tworzących podjednostkę $\alpha 1$;
- zewnątrzkomórkowy złożony z podjednostek $\alpha 2$ oraz δ ;
- wewnątrzkomórkowa podjednostka β (Catterall, 2011).

Części zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe tworzą szkielet pomocniczy dla części transbłonowej, która w istocie odpowiada za napływ Ca^{2+} do wnętrza neuronu. W efekcie bramkowane napięciem transportery wapnia klasyfikuje się względem budowy łańcuchów podjednostki $\alpha 1$. Obecnie wyróżnia się 3 podrodziny: Ca_v1 (kanały typu L), Ca_v2 (kanały typu N, P, Q, R), oraz Ca_v3 (aktywowany niskim napięciem kanał typu T) (Jensen et al., 2004; Snutch and Reiner, 1992).

Kanały typu L (L-VGCC) należą do najpowszechniej występujących i najlepiej poznanych zależnych od potencjału kanałów jonowych. Początkowo obecność tego białka zaobserwowano w neuronach obwodowych oraz komórkach mięśnia sercowego. Obecnie uważa się, że przedstawiciele L-VGCC są obecni we wszystkich komórkach pobudliwych,

a nawet niektórych niebudliwych. W tej grupie transporterów jonowych wyróżniamy cztery podklasy: Ca_v 1.1, Ca_v 1.2, Ca_v 1.3 oraz Ca_v 1.4.

Klasy Ca_v 1.1 i 1.4 spełniają ściśle określone funkcje determinujące ich występowanie. Ca_v 1.1 uczestniczy w regulacji skurczu mięśni szkieletowych zaś klasa Ca_v 1.4 jest uczestnikiem procesu widzenia. Klasy 1.2 oraz 1.3 są najbardziej rozpowszechnione w ciele człowieka, w tym w neuronach, gdzie uczestniczą aktywnie w procesach depolaryzacji (Catterall, 2011; Snutch and Reiner, 1992).

Charakterystycznymi cechami VGCC typu L są: wymóg silnego bodźca napięciowego do aktywacji oraz stosunkowo długi czas inaktywacji, zależny od zmian napięcia i poziomu Ca we wnętrzu neuronu. Badania prowadzone przez ostatnie lata wskazują na istotną rolę L-VGCC w procesach uczenia się i zapamiętywania. Obecność tych kanałów warunkuje również zdolność do odczuwania lęku, zmiany nastroju oraz uzależnianie od używek. Zmienną aktywność kanałów odnotowano w wielu chorobach. W chorobie Alzheimera zaobserwowano obniżenie zawartości transporterów z grupy L. U pacjentów cierpiących na chorobę dwubiegunową identyfikuje się mutację genetyczną skutkującą zmianą sekwencji aminokwasowej w podjednostce α -C1. W innych zmianach chorobowych mózgu, tj. chorobie Parkinsona oraz padaczce, w trakcie analiz elektrofizjologicznych, kanał typu L okazywał się być nadaktywnym (Hasreiter et al., 2014; Nimmrich and Eckert, 2013; Simms and Zamponi, 2014; Williams et al., 1997).

Zależne od potencjału kanały typu L są wrażliwe na trzy główne grupy związków organicznych, klasyfikowanych jako ich antagoniści. Należą do nich: werapamil, diltiazem oraz 1,4-dihydropirydyny (DHP), takie jak nitrendypina, nifedypina czy nimodypina. Antagoniści z grupy DHP preferencyjnie wiążą się z kanałami w aktywnej konformacji. Innymi słowy, w trakcie depolaryzacji, w której L-VGCC są otwarte, hamowanie ich aktywności z użyciem DHP jest znacznie bardziej efektywne (Nimmrich and Eckert, 2013; Snutch and Reiner, 1992; Williams et al., 1997).

Kanały typu N (N-VGCC) występują w układzie nerwowym i są sklasyfikowane jako białka Ca_v 2.2. Kanały typu N (*neither*) zostały nazwane na podstawie odmiennej od znanych ówczesnie kanałów typu L oraz T charakterystyki. Otwarcie kanałów jonowych typu N jest wywoływane, podobnie jak w przypadku L-VGCC, wysokim skokiem napięcia błonowego. Natomiast, w odróżnieniu od kanałów typu L i analogicznie do kanałów typu

T, N-VGCC ulegają zależnej od czasu szybkiej i gwałtownej dezaktywacji (Catterall, 2011; Snutch and Reiner, 1992).

Wewnątrzkomórkowa część N-VGCC związana jest z białkiem G. W ten sposób otwarcie kanału typu N skutkuje wydzielaniem neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej. Oznacza to, że kluczowa rola N-VGCC związana jest z neuronem presynaptycznym. Z badań wynika, że N-VGCC jest szczególnie istotny w neuroprzekaźnictwie cholinergicznym. Jego inhibicja ω -konotoksyną wywołuje zahamowanie wydzielania ACh oraz obraz kliniczny typowy dla dysfunkcji układu cholinergicznego (Adams and Berecki, 2013; Catterall, 2011; Snutch and Reiner, 1992). Kanał ten jest również odpowiedzialny za odczuwanie bólu. W ostatnich latach prowadzono badania, w których badano efekty równoległego zastosowania antagonistów N-VGCC oraz nAChR. Wykazano, że zastosowanie terapii opartej na współbieżnym działaniu wspomnianych leków znacznie obniżyło próg odczuwanego bólu wśród pacjentów przewlekle cierpiących tę dolegliwość (Adams and Berecki, 2013; Catterall, 2011; Snutch and Reiner, 1992).

Kanały typu P/Q (VGCC-P/Q) (zwane także Ca_v 2.1), podobnie jak kanały typu N, są związane z białkiem G, modulując w ten sposób wydzielanie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej.

Nazwa kanału P/Q oznacza w rzeczywistości dwa odrębne białka różniące się głównie mechanizmem inaktywacji kanałów oraz miejscem występowania. W kwestii nomenklaturowej, białka te należą do tej samej podklasy podjednostki $\alpha 1$ oraz mają wspólnych antagonistów z grupy ω -konotoksyn i ω -agatoksyn. (Catterall, 2011; Nimrich and Gross, 2012; Snutch and Reiner, 1992). Wiedza na temat białek z rodziny kanałów typu P i Q jest wciąż znikoma. Wiadomo, że klinicznie zaobserwowano obniżoną aktywność tych białek w wielu chorobach genetycznych, w tym rodzinnej migrenie. Niestety, okazuje się, że zwiększona aktywność kanałów również skutkuje patologiami, takimi jak epilepsja czy ataksja (Catterall, 2011; Nimrich and Gross, 2012; Snutch and Reiner, 1992).

Dane literaturowe opisują szereg różnic i analogii pomiędzy kanałami typu P oraz Q. Jednak, dla potrzeb niniejszej pracy, opierającej się głównie na identyfikacji względem podjednostki $\alpha 1$ oraz stosowaniu inhibitora z grupy ω -konotoksyn, przyjmuje się kanały typu P oraz Q jako jednego przedstawiciela podklasy Ca_v 2.1, opisanego skrótem P/Q-VGCC.

1.4. Rola Ca w neurodegeneracji

Kontrola wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia jest kluczem do efektywnego działania układu nerwowego. Mechanizm regulacji wapniowej wciąż nie jest całkowicie poznany. Kolejne dane literaturowe prezentują nowe rodziny białek nadzorujących i uczestniczących w dwukierunkowym transporcie Ca. Zaburzenia w obrębie transportu mogą objawiać się na przykład patologicznie wysokim poziomem jonów wapnia w cytoplazmie neuronu, skutkującym jego śmiercią (Jonas et al., 2014; Seaton et al., 2011). Obecnie wnioskuje się, że już samo neuroprzekąźnictwo niesie za sobą potencjalnie niebezpieczne w skutkach gwałtowne zmiany wewnątrzneuronalnych poziomów jonów wapnia. W neuronach, rolę buforu wapniowego pełnią mitochondria. Jednakże, ich zdolność buforowa jest ograniczona. W związku z tym, istnieje wysokie prawdopodobieństwo przekroczenia bezpiecznego poziomu jonów wapnia, skutkujące uwolnieniem do cytoplazmy cytochromu C i inicjacją apoptozy neuronu (Jonas et al., 2014; Seaton et al., 2011).

W postępujących chorobach neurodegeneracyjnych zależnych od wieku (m.in. chorobie Alzheimera tudzież chorobie Parkinsona) zaobserwowano zaburzenia poziomu Ca, w szczególności w cytoplazmatycznym przedziale komórkowym neuronu. Zwiększony poziom wapnia związany jest pośrednio z pobudzeniem ekscytotoksycznym neuronów glutaminergicznych, towarzyszącym rozwojowi AD. Zwiększony wewnątrzsynaptyczny poziom glutaminianu powoduje wzrost aktywności jonotropowych receptorów glutaminianowych, a w efekcie wydłużony czas działania białek z rodziny VGCC. Zaburzenie homeostazy wapniowej w ośrodkowym układzie nerwowym jest jedną z hipotez, które tłumaczą przyczyny rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Według niej wraz z wiekiem wewnątrz neuronów zwiększa się ilość epizodów zaburzenia homeostazy Ca. Mogą one spowodować nieznaczne obniżenie funkcji poznawczych. Związane z zaistniałymi zaburzeniami zmiany wewnątrz neuronów skutkują zwiększaniem produkcji β -amyloidu. Ten ostatni zaś pogłębia zaburzenia homeostazy Ca, na drodze deregulacji aktywności białek zaangażowanych w regulację wewnątrzkomórkowego poziomu Ca (Jonas et al., 2014; Mattson, 2007; Mattson et al., 1991; Seaton et al., 2011).

1.5. Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznych

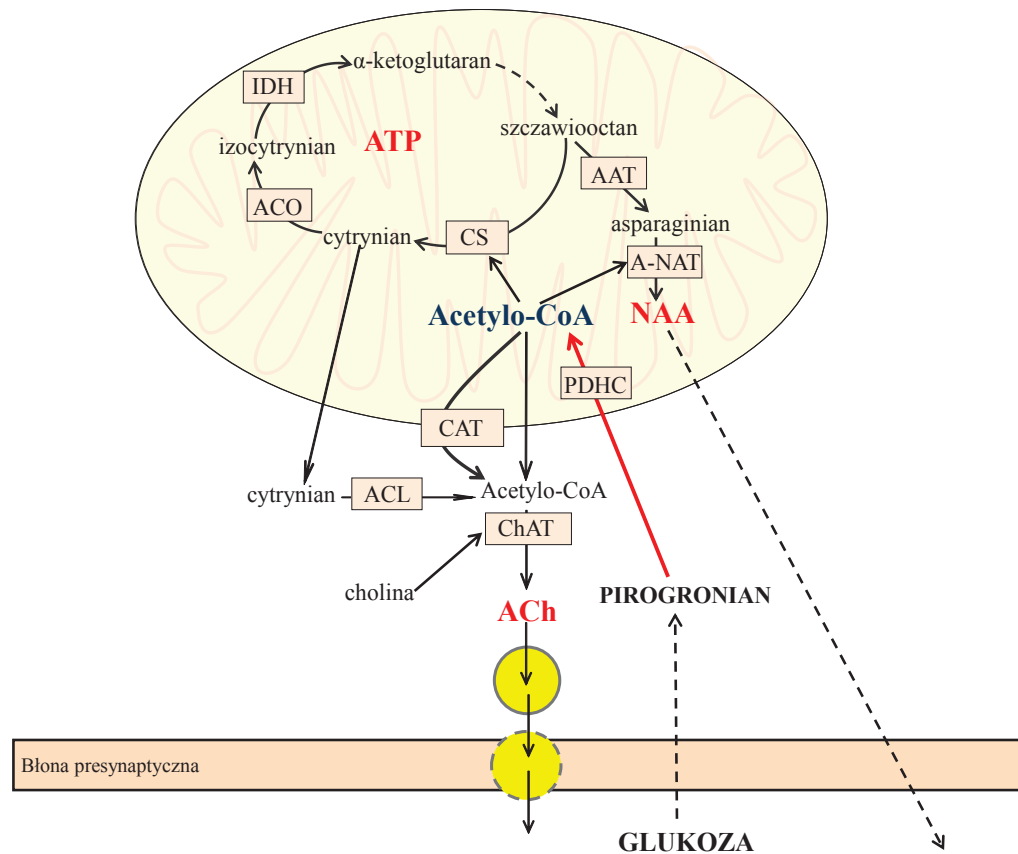
Glukoza, w warunkach fizjologicznych jest głównym substratem energetycznym w ośrodkowym układzie nerwowym. W cytoplazmie komórek mózgu glukoza ulega

przemianie glikolitycznej do pirogronianu. Powstały pirogronian transportowany jest do wnętrza mitochondrium neuronalnego. Tam, w obecności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; EC 1.2.4.1), reaguje z koenzymem A, dając acetylo-CoA (Ryc. 2). Acetylo-CoA zużywany jest w neuronach cholinergicznym do kilku procesów. Przede wszystkim, około 90% tego metabolitu jest wykorzystywane do produkcji energii. Następną, kilkuprocentową pulę acetylo-CoA neurony cholinergiczne zużywają do produkcji *N*-acetyloasparagianu. Poniżej 1% produkowanego acetylo-CoA zużywane jest do syntezy kwasów tłuszczowych. Dodatkowo, neurony cholinergiczne jako jedyna grupa neuronów zużywa do 3% acetylo-CoA celem syntezy acetylocholino (ACh) (patrz → podrozdział 1.3) (Bielarczyk et al., 2006; Denton and Halestrap, 1979; Lefresne et al., 1973; Szutowicz et al., 2000).

Szybkość produkcji ACh uzależniona jest od wzajemnych relacji pomiędzy dostępnością acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym neuronu cholinergicznego, a jego potencjałem błonowym. W stanie spoczynku obserwuje się niewielką szybkość niekwantowego wydzielania ACh. Jednak zapotrzebowanie na ACh w stanach pobudzenia może wymagać zużycia nawet kilku procent całkowitej puli acetylo-CoA, co potencjalnie może prowadzić do chwilowych niedoborów acetylo-CoA. Niewystarczający poziom acetylo-CoA, ograniczający szybkość syntezy ACh tudzież produkcję energii, według naszej hipotezy jest przyczyną zwiększonej wrażliwości neuronów cholinergicznym na sygnały neurotoksyczne (Bielarczyk et al., 2006; Bielarczyk et al., 2003a; Szutowicz et al., 1998a; Szutowicz et al., 1999).

W związku z kluczową rolą acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym, ogromnego znaczenia nabiera PDHC, jako enzym syntezujący acetylo-CoA. Obniżenie jego aktywności w neuronach cholinergicznym zwielokrotnia prawdopodobieństwo zachwiania poprawnego funkcjonowania całego układu nerwowego. Najmniejsze sygnały cytotoxyczne, które prowadzą do supresji PDHC skutkują zaburzeniami metabolizmu energetycznego prowadzącymi do uszkodzenia lub/i śmierci neuronów cholinergicznym (Bielarczyk et al., 2003b; Bielarczyk et al., 1998; Bizon-Zygmańska et al., 2011; Jankowska-Kulawy et al., 2010; Ronowska et al., 2007; Szutowicz et al., 2013). Badania *post mortem* mózgow pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera wykazały, że aktywność PDHC u tych pacjentów była znacząco niższa w porównaniu do aktywności zaobserwowanej u pacjentów nie cierpiących z powodu neurodegeneracji (Blass et al., 2000; Bubber et al.,

2005). Podobną tendencję odnotowano podczas badań z wykorzystaniem modelu mysiego 3xTg-AD, rozwijającego cechy charakterystyczne dla ludzkiego obrazu AD. Myszy w tym modelu posiadają zwiększoną ekspresję peptydów A β oraz białka Tau (Yao et al., 2009).



Ryc. 2. Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznyc. Trzy najważniejsze metabolity wtórne acetylo-CoA zaznaczono kolorem czerwony, tj. ATP, acetylocholina oraz *N*-acetyloasparaginian. Opracowano na podstawie (Szutowicz et al., 2013).

Skróty: AAT: aminotransferaza asparaginianową; ACh: acetylocholina; ACL: liaza cytrynianowa zależna od ATP; ACO: akonitaza; A-NAT: *N*-acetylotransferaza asparaginianową; CAT: acetylotransferaza karnitynowa; ChAT: acetylotransferaza cholinowa; CS: syntaza cytrynianowa; IDH: dehydrogenaza izocytrynianowa; NAA: *N*-acetyloasparaginian; PDHC: kompleks dehydrogenazy pirogronianowej.

Zespół Zakładu Medycyny Laboratoryjnej (ZML) w odpowiedzi na doniesienia literaturowe, jak również w oparciu o własne obserwacje, rozpoczął pracę nad badaniami kofaktorów PDHC (Bizon-Zygmańska et al., 2011; Ronowska et al., 2007). Z badań wynika, że pewną szansę dla pacjentów cierpiących z powodu AD stanowić może suplementacja donorem lipoamidu, jako kofaktora PDHC. Zauważono, że dodanie lipoamidu do komórek

neuronalnych z wysoką ekspresją fenotypu cholinergicznego zwiększało poziom i dostępność metabolitu produkowanego w obecności PDHC, tj. acetylo-CoA. Co więcej, wstępna inkubacja komórkowego modelu neuronów cholinergiczych z lipoamidem zabezpieczała komórki przed neurotoksycznym działaniem jonów cynku (Ronowska et al., 2007).

1.5.1. Drogi transportu acetylo-CoA z mitochondrium do cytoplazmy neuronu cholinergicznego

Synteza acetylocholino odbywa się w cytoplazmie neuronu cholinergicznego, podczas gdy acetylo-CoA (substrat reakcji) powstaje w mitochondriach. W tej sytuacji powstaje pytanie: jak metabolit trafia do miejsca utylizacji? Odpowiedź nie jest oczywista. W stanie spoczynku, błona mitochondrialna neuronu cholinergicznego pozostaje nieprzepuszczalna dla acetylo-CoA. Depolaryzacja błony neuronu cholinergicznego zezwala na bezpośredni, zależny od Ca^{2+} , transport acetylo-CoA wzdłuż błony mitochondrialnej (Bielarczyk and Szutowicz, 1989; Szutowicz et al., 1998b). Niestety, droga ta nie zapewnia odpowiedniej puli acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym neuronów cholinergiczych. W związku z tym istnieją alternatywne ścieżki transportu tego substratu do cytozolu. Najważniejszą z nich jest transport w postaci cytrynianu. Około 30% acetylo-CoA transportowane jest z mitochondriów do cytoplazmy w postaci cytrynianu, który swobodnie pokonuje błonę mitochondrialną. W cytoplazmie, acetylo-CoA zostaje odtworzony z cytrynianu na drodze reakcji z zależną od ATP liazą cytrynianową (Srere, 1992; Szutowicz et al., 1996; Tucek, 1985, 1993). Znana jest również ścieżka transportu, w której grupa acetylowa przenoszona jest z acetylo-CoA na karnitynę. Produkcja acetylokarnityny odbywa się po wewnętrznej stronie błony mitochondrialnej (enzym: acetylotransferaza karnitynowa I). W kolejnym etapie następuje transport powstałej pochodnej karnityny i ostatecznie jego utylizacja katalizowana po zewnętrznej stronie błony mitochondrialnej przez acetylotransferazę karnitynową II (Szutowicz et al., 1994; Tucek, 1993).

1.5.2. Metabolizm *N*-acetyloasparagianu

N-acetyloasparagian (NAA) należy do grupy aminokwasów o najwyższej zawartości w mózgu człowieka, a jego stężenie mieści się w zakresie 8-12 mmol/L. Produkowany jest wyłącznie w neuronach z acetylo-CoA oraz asparagianu w obecności enzymu *N*-acetylotransferazy asparagianowej (zamiennie: NAA syntetaza, NAT8L, białko *shati*, EC 2.3.1.17) (Ryc. 2) (Moffett et al., 2013; Rigotti et al., 2007b; Tanaka et al., 2006).

Rola NAA w mózgu nie jest w pełni poznana. Istnieją cztery podstawowe hipotezy tłumaczące jego obecność w mózgu. Uważa się że NAA, jako związek osmotycznie czynny może przeciwdziałać wewnątrzneuronalnemu deficytowi anionowemu bądź uczestniczyć w eliminacji cząsteczek wody, powstałych w trakcie metabolizmu komórkowego. Ponadto, służy także do neuronalnej produkcji *N*-acetyloaspartyloglicyny. *N*-acetyloasparaginian wydany z wnętrza neuronu trafia do astrocytów i oligodendrocytów, gdzie prawdopodobnie wykorzystywany jest do produkcji energii. W oligodendrocytach spełnia jeszcze jedną rolę, służy jako nośnik grup acetylowych, niezbędnych do produkcji otoczki mielinowej ośrodkowego układu nerwowego. (Arun et al., 2006; Baslow, 2000; Namboodiri et al., 2006).

Enzym *N*-acetylotransferaza asparaginianowa (Asp-NAT) jest związanym z błoną komórkową białkiem kodowanym najprawdopodobniej przez gen NAT8L. Jego masa cząsteczkowa wynosi około 670 kDa, a budowa przestrzenna przypuszczalnie jest zbliżona do innych enzymów kodowanych przez gen NAT8L (Protein Data Bank, protein ID: 2Q7B). Dokładną projekcję białka utrudnia brak informacji na temat centrum katalitycznego oraz kontrowersje wokół kwestii jego subkomórkowej lokalizacji (Ariyannur et al., 2010; Madhavarao et al., 2003). W literaturze sugerowane są trzy możliwe lokalizacje: mitochondria, mikrosomy bądź równoległa obecność w obu indywidualnych komórkowych. Według ostatniej wymienionej hipotezy Asp-NAT prezentuje zmienną aktywność zależną od lokalizacji, a miejsce produkcji NAA uzależnione jest bezpośrednio od dostępności pozostałych niezbędnych czynników reakcji (Arun, et al., 2010; Lu, et al., 2004). Podążając tą analogią zastosowano znakowanie radioaktywne substratów niezbędnych do produkcji NAA. Dane wskazują na mitochondrialną produkcję NAA zarówno w modelach *in vitro* (komórki linii SH-SY5Y neuroblastoma), jak i *in vivo* (Arun, et al., 2009; Pessentheiner, et al., 2013).

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie metabolizmem NAA, jako wtórnego metabolitu acetylo-CoA. Związane jest to przede wszystkim z możliwością nieinwazyjnego (¹H-MRS) oznaczenia poziomu NAA w mózгах pacjentów. Periodyczna ocena zmian poziomu NAA mogłaby stać się podstawą oceny zmian stanu energetycznego mózgu i pośrednio acetylo-CoA (Di Pietro, et al., 2014, Gazdzinski, et al., 2010). Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że poziom NAA ulega obniżeniu w wielu chorobach mózgu, m.in. w chorobie Alzheimera, Huntingtona, stwardnieniu rozsianym, schizofrenii tudzież udarze

mózgu (Clark, 1998, Ferguson, et al., 2002, Friedman, et al., 1998, Moffett, et al., 2007). W mózgzach pacjentów cierpiących z powodu choroby Alzheimera (potwierdzonego zwiększoną akumulacją amyloidu- $\beta(1-42)$ w płynie mózgowo-rdzeniowym) odnotowano 15-20% redukcję stężenia NAA tudzież wskaźnika NAA/Cr (Kantarci and Jack, 2003, Moats, et al., 1994, Moats and Shonk, 1995, Moffett, et al., 2007; Jessen, et al., 2011; Watanabe, et al., 2012). Korelację pomiędzy etapem rozwoju AD, a poziomem NAA potwierdzają także badania z wykorzystaniem myszy 5xFAD (zwierzęcy model rodzinnej postaci AD). Wraz z pojawieniem się złożeń β -amyloidu produkcja energii w mózgu była mniej efektywna. Całości towarzyszyła supresja mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej i ostatecznie obniżenie poziomu NAA (Zaroff, et al., 2015).

1.6. Rola Zn w ośrodkowym układzie nerwowym

W organizmie człowieka znajduje się około 2 g cynku, zlokalizowanego w mięśniach, wątrobie oraz mózgu. Zn, podobnie jak jony wapnia, występuje w postaci wolnej (w stężeniach nanomolarnych) bądź związanej (jako składnik enzymów, transporterów, białek stabilizujących DNA czy innych molekuł, w tym hormonów (Bertoni-Freddari et al., 2006; Frederickson et al., 2006; Takeda, 2010)). Mózg człowieka odznacza się najwyższą zawartością cynku wynoszącą około 200 $\mu\text{mol/L}$. Wysokie stężenie Zn w mózgu świadczy o ważnej roli, w regulacji funkcji ośrodkowego układu nerwowego. Badania wskazują, że jony cynku w mózgu mogą regulować plastyczność neuronalną. Ponadto, cynk jest współodpowiedzialny za odczuwanie strachu, efektywność procesów uczenia się oraz zapamiętywanie (Nakashima and Dyck, 2009). Zn^{2+} odgrywają istotną rolę w trakcie depolaryzacji presynaptycznych neuronów glutaminergicznych bądź GABAergicznych. Uwalniane do przestrzeni synaptycznej jony współuczestniczą w podtrzymywaniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, *long-term potentiation*) (Kodirov et al., 2006).

Napływ jonów cynku do wnętrza neuronów jest mało poznanym procesem. W błonach komórek eukariotycznych zidentyfikowano dwie grupy specyficznych białkowych transporterów jonów cynku: rodzina białek Zip (*Zrt-Irt-like Protein*) oraz ZnT (*Zinc Transporter*) (Bouron and Oberwinkler, 2014). Sugeruje się możliwość napływu jonów cynku do wnętrza neuronów alternatywnymi ścieżkami transportu wykorzystującymi bramkowane napięciem wapniowe kanały jonowe. Przeprowadzone badania wskazują na prawdopodobieństwo transportu jonów cynku alternatywnie przez kanały typu L, N

oraz T (Bouron and Oberwinkler, 2014; Sensi et al., 1997). Przepuszczalność kanałów bramkowanych napięciem dla Zn jest prawdopodobnie spowodowana zbliżonymi właściwościami chemicznymi jonów wapnia i cynku, w tym promieniu uwodnionego kationu, konfiguracją elektronową orbitali jonowych (Atchison, 2003).

1.6.1. Zn jako neuromodulator jonotropowych receptorów glutaminergicznych (iGluR)

Pęcherzyki transportowe neuronów glutaminergicznych są indywiduami komórkowymi o najwyższym stężeniu jonów cynku (ok. 1 mmol/L). Wewnątrz pęcherzyka związane są z glutaminianem, stabilizując go do czasu zapoczątkowania neuroprzebieżnictwa glutaminergicznego (Mocchegiani et al., 2005). W trakcie neuroprzebieżnictwa glutaminian cynku jest wydzielany bezpośrednio do szczeliny synaptycznej. Tam sól ulega dysocjacji, a powstałe jony cynku wraz z glutaminianem oddziałują z receptorami glutaminianu zlokalizowanymi na powierzchni komórek zaangażowanych w synapsę (Frederickson et al., 2005). Receptory kwasu glutaminowego można podzielić na 2 grupy: jonotropowe (iGluR) oraz metabotropowe. Do receptorów jonotropowych zaliczamy receptory NMDA oraz nie-NMDA (AMPA i kainowy). W odróżnieniu od metabotropowych monomerów, receptory jonotropowe mają budowę tetramerów (Madden, 2002). Receptory GluR posiadają oddzielne miejsca wiążące dla glutaminianu i cynku. Równoległe oddziaływanie tych czynników z receptorem AMPA wywołuje zwiększenie przepuszczalności białka dla napływających jonów wapnia i sodu oraz wpływających jonów potasu (Takeda, 2000). Proces ten zapoczątkowuje depolaryzację błony neuronów postsynaptycznych. Zmiana napięcia powierzchniowego błony wywołuje dysocjację jonu magnezu od receptora NMDA. Uwolniony receptor wiąże się z glutaminianem i neuromodulatorami (D-seryna bądź D-glicyna). W efekcie wzrasta jego przepuszczalność dla jonów wapnia i potasu (Newcomer et al., 2000). Ostatecznie zapoczątkowana jest wewnątrzkomórkowa ścieżka sygnalizacyjna regulująca wrażliwość całego neuronu na bodźce zewnętrzne (Takeda, 2000).

1.6.2. Wpływ Zn na degenerację neuronów cholinergicznych

Pomimo niewątpliwej istotnej roli w mózgu, Zn jest znanym czynnikiem neurotoksycznym. Związane jest to z zaburzeniem jego homeostazy w następstwie pobudzenia ekscytotoksycznego występującego u pacjentów cierpiących z powodu udaru mózgu, epizodów niedokrwienych tudzież epilepsji (Frederickson et al., 2005; Galasso and Dyck, 2007; Takeda, 2000). W warunkach pobudzenia ekscytotoksycznego jego stężenie

w szczelinie synaptycznej może wzrosnąć do 300 $\mu\text{mol/L}$ (Assaf and Chung, 1984). Zn jako metal przejściowy znacznie chętniej, niżeli jony manganu czy żelaza, ulega reakcjom redukcja-utlenienie. Wynikająca z reaktywności cynku, indukcja stresu oksydacyjnego prowadzi do produkcji reaktywnych form tlenu, destabilizujących poprawne funkcjonowanie neuronu. W rozwoju choroby Alzheimera cynk jest jednym z wielu czynników sprzyjających agregacji amyloidu- β . Ponadto, jony cynku blokują aktywność szeregu enzymów mitochondrialnych: dehydrogenaz (pirogronianowej, izocytrynianowa i α -ketoglutaranowa), akonitazy, oksydazy cytochromu c, kompleksu I, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfolipidowego, (Brown et al., 2000; Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007; Sheline et al., 2000); (Frederickson et al., 2005; Suh et al., 2004; Takeda, 2000, 2010; Zatta et al., 2003). Konsekwencją obniżenia aktywności enzymów metabolizmu energetycznego komórek neuronalnych jest spadek poziomu acetylo-CoA i ATP oraz zahamowanie neuroprzebieżności cholinergicznego (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007). Przytoczone dane literaturowe wskazują, że wzrost poziomu cynku lub jego nieprawidłowa redystrybucja w komórkach ośrodkowego układu nerwowego mogą być jedną z przyczyn uszkodzenia lub śmierci neuronów w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Ronowska et al., 2007; Sensi et al., 1997; Szutowicz et al., 2013).

1.7. Komórki linii SN56 jako komórkowy model neurodegeneracji cholinergiczej

Ostatnie lata badań nad chorobami neurodegeneracyjnymi skupiają się wokół prawdopodobnych mechanizmów śmierci neuronów. Angażowane są liczne schematy eksperymentalne, zarówno *in vivo*, jak i *post mortem*. Materiałem do badań pozostają: mózg ludzki, zwierzęta transgeniczne tudzież linie komórkowe (Nilbratt et al., 2010; Rabinovici and Jagust, 2009; Szutowicz et al., 2004).

Niestety, badania nad metabolizmem acetylo-CoA jako kluczowego metabolitu poprawnego funkcjonowania neuronów cholinergiczych, posiadają wiele ograniczeń. Neurony cholinergiczne stanowią 1% ogółu neuronów mózgu i tworzą około 10% zakończeń nerwowych izolowanych z tkanki mózgowej (Richardson 1981). 20-70% frakcji ogółu neuronów stanowiły neurony cholinergiczne wywodzące się z embrionalnych komórkach macierzystych (Bissonnette et al., 2011; Nilbratt et al., 2010). Jednakże ilości uzyskiwanego materiału biologicznego są niewystarczające do wykonania pełnego panelu badań biochemicznych. W związku z tym, badania nad metabolizmem acetylo-CoA w neuronach cholinergiczych prowadzone są obecnie na, różnicowanych w kierunku fenotypu

cholinergicznego, klonalnych komórkach neuronalnych linii SN56 posiadających wysoką aktywność enzymu acetylotransferazy cholinowej oraz odpowiedni poziom niespecyficznego receptora p75 o niskim powinowactwie do neutrofin (Bielarczyk et al., 2006; Szutowicz et al., 2006; Szutowicz et al., 1983).

Linia komórkowa SN56.B5.G4, jako model *in vitro* neurodegeneracji cholinergicznej, powstała w wyniku fuzji neuronów cholinergicznych C57BL/6 pochodzących z przegrody mózgu 21-dniowej myszy z niecholinergicznymi neuroblastoma N18TG2 (Hammond et al., 1990). Z danych literaturowych wynika, że w komórkach linii SN56 wykryto zarówno obecność muskarynowych i nikotynowych receptorów acetylocholinyl oraz kanałów białek regulujących wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia i sodu. Ponadto, w wyniku hodowli komórek linii SN56 w obecności czynników różnicujących (dibutyrylo-cAMP wraz z kwasem *trans*-retinowym) uzyskane komórki posiadały fenotyp zgodny z rdzennymi neuronami cholinergicznymi przegrody mózgu myszy. Morfologicznie, różnicowane komórki SN56 wykazywały obecność wypustek dendrycznych oraz połączeń synaptycznych, a tempo ich wzrostu uległo znacznemu zahamowaniu (Bielarczyk et al., 2003b; Madziar et al., 2003; Szutowicz et al., 2006; Szutowicz et al., 2000). Te cechy sprawiają, że komórki linii SN56 stanowią dogodny model do badań wpływu czynników chemicznych na parametry biochemiczne oraz pozwalają na badania molekularne uzyskanego materiału biologicznego (Nilbratt et al., 2007; Ronowska et al., 2010).

Dotychczas przeprowadzone przez zespół Zakładu Medycyny Laboratoryjnej (ZML) badania wskazują na zwiększoną wrażliwość różnicowanych w kierunku fenotypu cholinergicznego neuronalnych komórek linii SN56 na sygnały cytotoksyczne. Wnioskuje się, że szczególna ich wrażliwość jest wywołana zwiększoną aktywnością cytoplazmatycznej ścieżki utylizacji acetylo-CoA w kierunku syntezy acetylocholinyl (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007; Szutowicz et al., 2013). Prezentowane w niniejszej rozprawie wyniki badań bazowały na uzyskanych uprzednio przez zespół danych, które wykazały dodatnią korelację pomiędzy wzmożonym napływem Zn do wnętrza neuronalnych komórek SN56 a wzrostem ich śmiertelności. Dodatkowo zauważono, że wzrost wewnątrzkomórkowego Zn wywołał spadek poziomu acetylo-CoA. Cynk w stężeniu cytotoksycznym powodował uszkodzenie i zwiększoną śmiertelność neuronalnych komórek linii SN56 (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007).

Według jednej z hipotez, tłumaczących cytotoksyczny wpływ Zn na neurony cholinergiczne, jony cynku mogą być transportowane do wnętrza neuronów cholinergicznych za pośrednictwem białek uczestniczących w transporcie jonów wapnia (Bouron and Oberwinkler, 2014; Cuajungco and Lees, 1997a; Takeda et al., 2000; Zatta et al., 2003). Jednakże, prezentowane dane tłumaczące ten fenomen są niekompletne i mają charakter przypuszczający. Ponadto nie ma żadnych danych literaturowych badających wpływ tych białek na poziom i dostępność acetylo-CoA w warunkach cytotoksycznych.

W związku z tym, celowym wydaje się podjęcie badań wyjaśniających drogi transportu Zn w warunkach neurodegeneracji z wykorzystaniem wybranych białek transportujących Ca jako potencjalnych nośników Zn.

2. CEP PRACY

Nadrzędnym celem pracy było zbadanie udziału białek transportujących wapń w regulacji/zaburzeniach metabolizmu acetylo-CoA neuronów o różnym stopniu różnicowania cholinergicznego i w różnych stanach czynnościowych poddanych działaniu cynku.

W tym celu:

1. W komórkach SN56 poddanych wstępnej inkubacji z antagonistami białek regulujących wewnątrzkomórkową równowagę Ca lub/i różno-czasowej ekspozycji na Zn (w stężeniu 0-0.15 mmol/L) zbadano:
 - poziom wybranych metabolitów komórkowych;
 - aktywność dehydrogenazy pirogronianowej;
 - aktywność wybranych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych;
 - wewnątrzkomórkowy poziom Zn i Ca.
2. Zbadano wpływ przewlekłej ekspozycji Zn (w stężeniu 0-0.15 mmol/L) na poziom białek transportujących Ca;
3. Zbadano aktywność oraz zawartość enzymu *N*-acetylotransferazy asparaginianowej w komórkach SN56 poddanych 24-ro godzinnej (przewlekłej) ekspozycji na Zn (w stężeniu 0-0.15 mmol/L)

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Odczynniki

Wszystkie odczynniki użyte do badań, z wyjątkiem tych wymienionych poniżej, pochodziły z firmy Sigma Aldrich Co. (Poznań, Polska).

Odczynniki zakupione w firmie ABCAM Co (Cambridge, Wielka Brytania):

ω -konotyksyna GIVA, ω -konotoksyna MVIIC, poliklonalne anty-mysie przeciwciała 1^0 przeciwko: receptorom IP_3 , kanałom wapniowym typu N, kanałom wapniowym typu P/Q oraz białku STIM1.

Odczynniki zakupione w firmie Avantor Performance Materials Polska S.A. (Gliwice, Polska):

alkohol etylowy, chlorek potasu, chlorek sodu, chloroform, dioksan, kwas mrówkowy, kwas ortofosforowy, kwas solny, metanol, wersanian sodu (EDTA), wodorotlenek sodu, wodorowęglan sodu, wodorowęglan potasu.

Odczynniki zakupione w firmie Bio-Rad (Warszawa, Polska):

gradientowe żele poliakrylamidowe 4-20% Mini-PROTEAN TGX, bufor obciążający Laemmli.

Odczynniki zakupione w firmie Cusabio Biotech Co (Gdańsk, Polska):

zestaw do oznaczenia poziomu białka *N*-acetylotransferazy asparaginianowej (NAT8L) metodą ELISA.

Odczynniki zakupione w firmie Life Technologies Polska Sp. z o.o. (Warszawa, Polska):

N-(6-metoksy-8-chinolilo)-*p*-toluenosulfonamid (TSQ), zestaw do elektrotransferu (iBlot Transfer Stacks, PVDF membrane, regular size).

Odczynniki zakupione w firmie Merck Millipore (Warszawa, Polska):

acetonitryl, metanol, poliklonalne anty-mysie przeciwciała 1⁰ przeciwko kanałom wapniowym typu L.

Odczynniki zakupione w firmie Perkin Elmer Polska S.A. (Warszawa, Polska):

[U-C¹⁴]-L-asparaginian, scyntylator Ultima Gold[®].

Odczynniki zakupione w firmie Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, USA):

poliklonalne anty-królicze przeciwciała 2⁰ IgG skoniugowane z fosfatazą alkaliczną, poliklonalne anty-mysie przeciwciała 1⁰ przeciwko nikotynowym receptorom acetylocholinowym oraz receptorom NMDA i AMPA.

Odczynniki zakupione w firmie Sharlau Chemie S.A. (Stargard Szczeciński, Polska):

acetonitryl, metanol.

Odczynniki zakupione w firmie Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA):

Białkowe markery mas (Spectra Multicolor Broad Range).

3.2. Materiały zużywalne

Plastikowe oraz szklane naczynia hodowlane, jak również pozostałe niezbędne materiały jednorazowego użytku przeznaczone do hodowli komórek były dostarczane przez firmy: Sarstedt (Stare Babice, Polska), Merck Millipore (Warszawa, Polska) oraz Medlab (Raszyn, Polska).

Kolumna analityczna do chromatografii ciekowej RP-C18 Synergi Fusion pochodziła z firmy Phenomenex (Torrance, USA), prekolumna C-18 wraz z obudową do wysokosprawnej chromatografii ciekowej z firmy Tosoh Biosence (Gliwice, Polska), mikrokolumny chromatograficzne C-18 (500 mg, 3 mL) z firmy Sigma Aldrich Co. Materiały zużywalne, takie jak: jednorazowe filtry strzykawkowe, strzykawki typu Luer Lock, inserty szklane, buteleczki reakcyjne wraz z nakrętkami pochodziły z firmy CRONUS (Gdańsk, Polska).

3.3. Aparatura

- chromatograf cieczowy: Perkin Elmer HPLC Systems Series 200 z oprogramowaniem TotalChrom Navigator[®] Version 6.2.0 (Perkin Elmer Instruments, USA);
- licznik scyntylicyjny: Wallac 1409 (Perkin Elmer, USA);
- luminometr: Junior (Berthold Technology, Niemcy); LS 55 z oprogramowaniem FLWinLab[®] Version 4.00.02 (Perkin Elmer Instruments, USA);
- mikroskop odwrócony: Axiovert (Zeiss, Niemcy) z oprogramowaniem Utility Software[®] Version C-2.1 (Olympus Optical Co, Japan); Olympus CK30 (Olympus, Japan);
- pH-metr: AD100 (Adwa, Polska);
- spektrofotometry: Ultraspec 3100 Pro (Amersham Biosciences, UK) z nakładką termostatyczną MultiTempIII (ThermoElectron, Niemcy); UV-1202 Spectrophotometer (Shimadzu, Japan); Victor 3. 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA);
- sumator hematologiczny: SH-9612 (MedLab Products, Polska);
- system do dokumentacji żeli: UVITEC Allince 4.7 z oprogramowaniem UViband[®] (UVITEC, Wielka Brytania)
- termostaty: E-20ECO (POLL, Polska), Epoll typ 520 (POLL, Polska);
- termowyrząsarki: MixMate (Eppendorf, Niemcy); Termomixer Comfort (Eppendorf, Niemcy); Termomixer Compact (Eppendorf, Niemcy); Wyrząsarka typ 357 (Elpin+,Polska);
- wirówki: MiniSpin (Eppendorf, Niemcy); MPW-65R (MWP Medical Instruments, Polska); MPW-223e (MWP Medical Instruments, Polska); Wirówka typ 5415R (Eppendorf, Niemcy);
- zestaw do elektroforezy pionowej: Mini-Protean III (Bio-Rad, Polska);
- zestaw do elektrotransferu: iBlot Dry Blotting System (Life Technologies Co., USA).

3.4. Komórki cholinergiczne

3.4.1. Hodowla komórkowa

Badania przeprowadzono na linii komórkowej SN56.B5.G4 stanowiącej komórkowy model neurodegeneracji, który powstał w wyniku fuzji cholinergicznych neuronów C56BL/6 wyizolowanych z przegrody mózgu 21-dniowej myszy z niecholinergicznymi komórkami neuroblastoma N18TG2 (Hammond et al., 1990). Komórki zostały podarowane przez prof. J.K. Blusztajna (Boston, USA).

Komórki SN56 przechowywano w temperaturze -80°C w środowisku zawierającym 63% pożywki Eagle zmodyfikowanej według Dulbecco (DMEM), 30% bydlęcej surowicy płodowej (FBS), 7% dimetylosulfotlenku (DMSO). Komórki zamrażano w objętości 1.0 mL przy stężeniu 2.0-2.5 mln komórek na mL środowiska.

Po rozmrożeniu hodowla komórek SN56 prowadzona była w środowisku DMEM zawierającym 4.5 g glukozy na 1 L środowiska. Ponadto do środowiska hodowlanego dodawano FBS (10%), L-glutaminę (2 mmol/L) oraz mieszaninę antybiotyków: streptomycyna (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicylina (50 J.M./mL) i amfoterycyna B (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Badania prowadzono pomiędzy 45 a 55 pasażem linii komórkowej SN56.

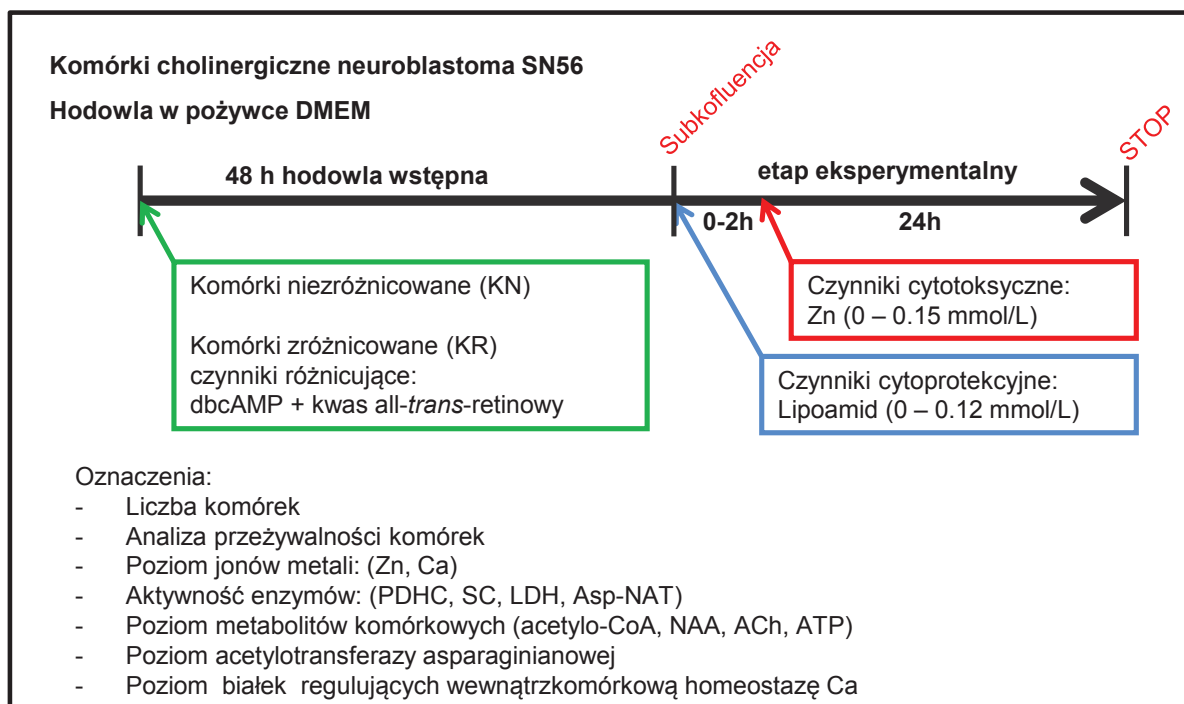
Cykl eksperymentalny składał się z dwóch etapów. Pierwszy etap (hodowla wstępna), prowadzony do momentu pokrycia przez komórki około 80% powierzchni naczynia hodowlanego (subkofluencji), trwał 48 godzin oraz drugi etap eksperymentalny trwający w zależności od schematu eksperymentalnego od 90-40 minut (ostrzy wpływ czynnika toksycznego) do 24-26 godzin (przewlekły wpływ czynnika toksycznego).

W pierwszym etapie hodowli komórki wysiewano na powierzchnię naczynia hodowlanego z gęstością 40 000 komórek/ cm^2 bez dodatku kolagenu (komórki adherentne). Na tym etapie do części komórek dodawano czynniki różnicujące, tj. czynniki zwiększające ekspresję fenotypu cholinergicznego. Czynnikiem tymi były dwumaślan cyklicznego AMP (db-cAMP) oraz kwas *trans*-retinowy w końcowych stężeniach odpowiednio 0.5 mmol/L oraz 0.001 mmol/L. Wysiane komórki hodowano 48 godz. w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO_2 / 95% powietrza.

3.4.2. Schemat eksperymentalny przewlekłego wpływu Zn na komórki SN56

Po 48 godzinach hodowli wstępnej (podrozdział 3.4.1) pożywkę hodowlaną wymieniano na świeżą nie zawierającą czynników różnicujących. W schemacie wpływu lipoamidu oraz Zn, nowe środowisko hodowlane było suplementowane lipoamidem (0-0.12 mmol/L). Po 2 godzinach wstępnej hodowli z czynnikiem cytoprotekcyjnym dodawano chlorek cynku (II) w stężeniu końcowym 0-0.15 mmol/L. Z doniesień literaturowymi wynika, że zastosowane środowisko hodowlane (DMEM) w swoim składzie zawiera jony cynku w stężeniu 0.005 mmol/L (MacDonald et al., 1998). Całkowity czas hodowli wyniósł 72 bądź 74 godziny. Wydłużony czas eksperymentu dotyczy tylko badań analizujących potencjalny protekcyjny wpływ lipoamidu. Pełny schemat eksperymentalny przedstawiono na Ryc.3.

Po zakończeniu eksperymentu z nad komórek zebrano pożywkę inkubacyjną przeznaczoną do oznaczenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej (podrozdział 4.8.1). Komórki pozostające na powierzchni naczynia hodowlanego ostrożnie przepłukiwano 5 mL schłodzonego buforu Puck's o składzie 137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L sodowo-potasowy bufor fosforanowy (pH=7.4), 5 mmol/L glukoza, 0.1 mmol/L EDTA. Procedurę dwukrotnie powtórzono z użyciem buforu Puck's bez dodatku EDTA. Następnie komórki zdrapywano plastikową skrobaczką z powierzchni naczynia hodowlanego w obecności 5 mL buforu Puck's bez EDTA. W kolejnym etapie całość zwirowano (7 min, 1 000 obr./min). Otrzymany osad komórek, przeznaczony do badań enzymatycznych, zawieszano w 0.32 mmol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES i 0.1 mmol/L EDTA. Końcowe stężenia białka w zawiesinie wynosiło ok. 10 mg /mL.



Ryc. 3. Schemat eksperymentu 24-ro godzinnego wpływu cynku na komórki linii SN56 wstępnie inkubowanych w obecności bądź nieobecności lipoamidu.

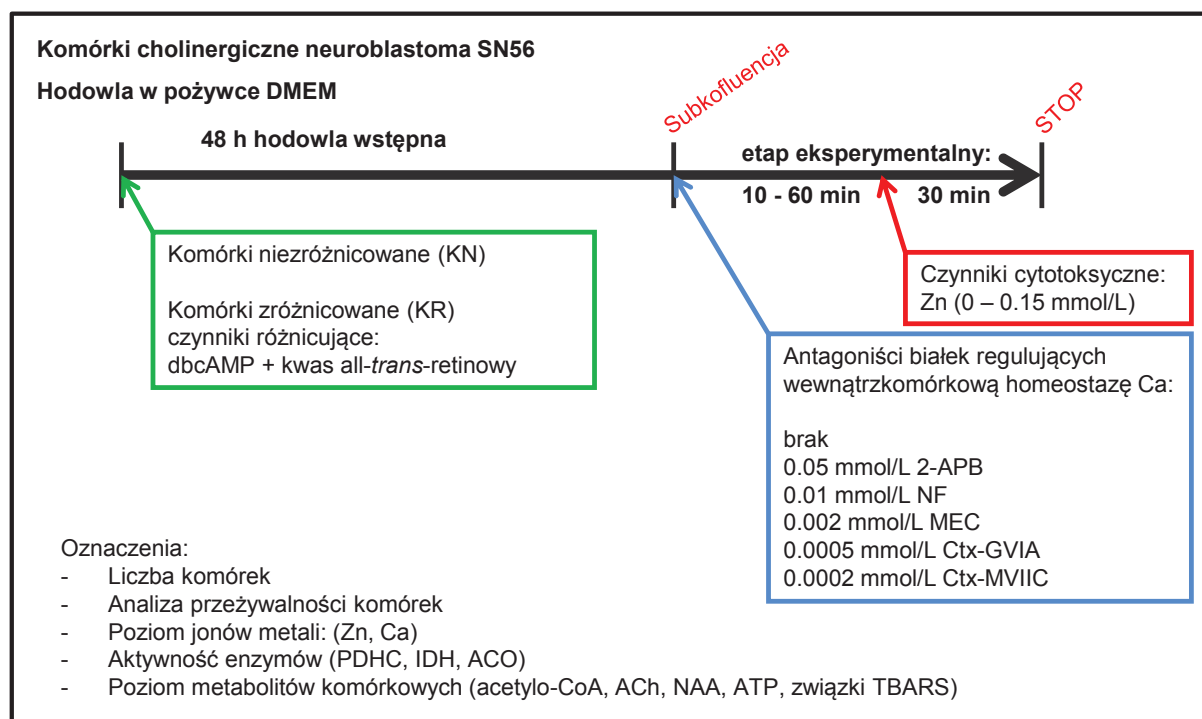
4.4.3. Schemat eksperymentu ostrego wpływu Zn na komórki cholinergiczne SN56 poddane działaniu antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia w warunkach polaryzacji i depolaryzacji błony komórkowej

Po zakończeniu etapu hodowli wstępnej z nad komórek usuwano środowisko hodowlane, a komórki ostrożnie przemywano dwukrotnie 5 mL schłodzonego buforu Puck's bez EDTA, zbierano i wirowano (7 min, 1200 obr./min). Następnie komórki zawieszano w 0.32 M roztworze sacharozy zbuforowanej 5 mmol/L HEPES (pH=7.4), końcowe stężenie białka w zawieszynie wynosiło 25 mg/mL. Równolegle przygotowano środowiska inkubacyjne do etapu eksperymentalnego przedstawionego na Ryc. 4.

Środowisko inkubacyjne do badań w warunkach depolaryzacyjnych zawierało ($V_k=0.8$ mL): 20 mmol/L 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, 0.01 mmol/L chlorek choliny.

Środowisko inkubacyjne do badań w warunkach polaryzacyjnych zawierało ($V_k=0.8$ mL): 20 mmol/L HEPES (pH=7.4), 1.5 mmol/L sodowy bufor fosforanowy (pH=7.4), 90 mmol/L NaCl, 30 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L pirogronian, 2.5 mmol/L jabłczan, 0.01 mmol/L chlorek choliny, 0.015 mmol/L ezeryna.

Do naczynek inkubacyjnych dodawano 0.8 mL wybranego środowiska inkubacyjnego dodawano 0.05 mL roztworu antagonisty białka regulującego homeostazę wapnia (końcowe stężenia antagonistów: MEC: 0.002 mmol/L, NF: 0.01 mmol/L, Ctx-GVIA: 0.0005 mmol/L, Ctx-MVIIC: 0.0002 mmol/L, 2-APB: 0.05 mmol/L). Eksperyment zapoczątkowywano dodatkiem 0.1 mL (ok. 3 mg białka) przygotowanej zawiesiny komórkowej. Mieszaninę inkubacyjną umieszczano w temperaturze 37⁰C i mieszano z prędkością mieszania 100 cykli na minutę. Etap ten (pre-inkubacja, inkubacja wstępna), wyznaczony eksperymentalnie, był czasem na przeprowadzenie selektywnego zablokowania analizowanego transportera wapniowego. W związku z tym czas pre-inkubacji uzależniony był od zastosowanego czynnika. MEC, Ctx-GVIA, Ctx-MVIIC wymagały 10 minutowej pre-inkubacji. W przypadku 2-APB czas ten wydłużono do 60 minut. Następnie do środowiska dodawano 0.05 mL chlorku cynku (II) o końcowym stężeniu 0.15 mmol/L i kontynuowano inkubację przez kolejne 30 minut. Eksperyment kończono odwirowaniem mieszaniny inkubacyjnej (2 min, 10 tys. obr./min), a otrzymany osad komórek zawieszano w 0.32 mmol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES i 0.1mmol/L EDTA i przeznaczano go do badań aktywności enzymatycznych.



Ryc. 4. Schemat eksperymentu badającego wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na neurotoksyczne działanie cynku (Zn). W schemacie eksperymentalnym badano 30-minutowy wpływ Zn na komórki linii SN56 w warunkach depolaryzacji i polaryzacji błony komórkowej.

4.4.4. Rozdział frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej komórek SN56 (*Szutowicz and Bielarczyk, 1987*)

W celu uzyskania frakcji mitochondrialnej i cytozolowej komórek cholinergicznym SN56 zarówno w badaniach przewlekłego, jak i ostrego wpływu Zn, w obecności antagonistów białek regulujących homeostazę Ca, na metabolizm komórek po uprzedniej krótkotrwałej lizie, poddawano je rozdziałowi na mieszaninie olei AR 20: AR200 (2:1, v/v). W pierwszym etapie, 0.4 mL mieszaniny inkubacyjnej, mieszano z 0.4 mL schłodzonego buforu lizującego (0.14 mg/mL digitoniny, 125 mmol/L KCl, 20 mmol/L HEPES (pH=7.4), 3 mmol/L EDTA. Próbkę mieszano 15 sek. Następnie 0.7 mL mieszaniny komórkowej i lizującej nawarstwiano na górną powierzchnię mieszaniny rozdzielającej. Warstwy mieszaniny rozdzielającej: dolna o objętości 0.1 mL (0.32 mmol/L sacharozy zbuforowanej 5 mmol/L HEPES z 0.1 mmol/L EDTA) oraz górna o objętości 0.5 mL (oleje silikonowe AR20:AR200 (2:1, v/v)).

Po 30 sek. od momentu zmieszania z roztworem lizującym całość zwirowano (45 sek, 14 tys. obr./min), następnie odbierano górną (cytozolową) warstwę roztworu, w której oznaczono zawartość białka. Pozostałą frakcję górną, warstwę olei silikonowych oraz dolną usunięto. Osad zawierający mitochondria przeznaczano do oznaczenia poziomu jonów oraz parametrów metabolicznych (próby zawieszano w 4% HClO₄) bądź enzymatycznych (próby zawieszano w 0.32 mmol/L sacharozie zbuforowanej 5 mmol/L buforem HEPES z 0.1 mmol/L EDTA).

4.5. Czynniki neurotoksyczne

4.5.1. Cynk

Źródłem Zn²⁺ był chlorek cynku (donor jonów cynku). Wstępnie przygotowywano jego 10 mmol/L (badanie przewlekłego działania cynku) bądź 3 mmol/L roztwór (badanie 30-sto minutowego wpływu jonów cynku na komórki SN56). Ostatecznie dodawano do środowiska eksperymentalnego w końcowym stężeniu 0-0.15 mmol/L.

4.6. Czynniki neuroprotekcyjne

4.6.1. Amid kwasu liponowego (LA)

Amid kwasu liponowego (LA) został zastosowany jako utleniona forma kwasu liponowego i jednocześnie kofaktor kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Czynniki użyto w schemacie przewlekłego wpływu cynku. Wstępnie LA został rozpuszczony w DMSO, a następnie dodawany do pożywki w końcowym stężeniu 120 $\mu\text{mol/L}$ (stężenie DMSO wyniosło 0.01%, nie wykazano wpływu rozpuszczalnika na badane parametry metaboliczne oraz przeżywalność komórek SN56).

4.7. Selektywni antagoniści białek regulujących wewnątrzkomórkowy poziom Ca

4.7.1. 2-aminoetoksydifenylboran (2-APB)

2-aminoetoksydifenylboran (2-APB), w stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$, został zastosowany jako selektywny antagonist receptoru 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP_3R) oraz ścieżki napływu Ca poprzez kanały regulowane wewnątrzkomórkowymi magazynami wapniowymi (SOCE, ang. *Store-Operated Calcium Entry*). Czynniki wstępnie zostały rozpuszczone w DMSO w stężeniu 80 mmol/L , a następnie dodawany do środowiska inkubacyjnego w końcowym stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ (stężenie DMSO wyniosło 0.06%, nie wykazano wpływu rozpuszczalnika na stan komórek).

4.7.2. ω -konotoksyna GIVA (Ctx-GVIA)

ω -konotoksyna GVIA została zastosowana jako selektywny antagonist bramkowanego napięciem kanału wapniowego typu N. Czynniki wstępnie zostały rozpuszczone w wodzie dejonizowanej w stężeniu 0.5 mmol/L , a następnie dodawany do środowiska inkubacyjnego w końcowym stężeniu 0.5 $\mu\text{mol/L}$.

4.7.3. ω -konotoksyna MVIIC (Ctx-MVIIC)

ω -konotoksyna MVIIC została zastosowana jako selektywny antagonist bramkowanego napięciem kanału wapniowego typu P/Q. Czynniki wstępnie zostały rozpuszczone w wodzie dejonizowanej w stężeniu 0.5 mmol/L , a następnie dodawany do środowiska inkubacyjnego w końcowym stężeniu 0.2 $\mu\text{mol/L}$.

4.7.4. Mekamylamina (MEC)

Mekamylamina została zastosowana jako nioselektywny antagonistą nikotynowych receptorów acetylocholino (nAChR). Czynniki wstępnie zostały rozpuszczone w wodzie w stężeniu 10 mmol/L, a następnie dodawane do środowiska inkubacyjnego w końcowym stężeniu 2 μ mol/L.

4.7.5. Nifedypina (NF)

Nifedypina została zastosowana jako antagonistą bramkowanego napięciem kanału wapniowego typu L. Czynniki wstępnie zawieszane były w DMSO w stężeniu 20 mmol/L, a następnie dodawane do środowiska inkubacyjnego w końcowym stężeniu 10 μ mol/L (stężenie DMSO wyniosło 0.05%, nie wykazano wpływu rozpuszczalnika na stan komórek).

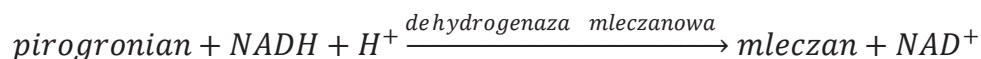
4.8. Oznaczanie aktywności enzymów

Bezpośrednio po zakończeniu etapu eksperymentalnego komórki bądź pożywki hodowlane umieszczono w temperaturze 4⁰C i przygotowano do natychmiastowego oznaczenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej, syntazy cytrynianowej, dehydrogenazy izocytrynianowej oraz akonitazy. W przypadku badań aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, *N*-acetylotransferazy asparaginianowej oraz cholinowej acetylotransferazy zawieszę komórkową w ilości 0.05 mL oraz stężeniu 10 mg białka/mL zamrażano w temperaturze -20⁰C. Analiza zamrożonych próbek była przeprowadzona w czasie do 3 dni od momentu zamrożenia. Po rozmrożeniu komórki rozcieńczane były 0.2% roztworem Triton X-100 w objętości uzależnionej od wymaganej minimalnej ilości białka, niezbędnej do oznaczenia aktywności wybranego enzymu w próbce.

4.8.1. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH; EC 1.1.1.27) (Koh and Choi, 1987)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=1.0$ mL): 100 mmol/L bufor Tris-HCl (pH=7.4), 0.2 mmol/L NADH, 0.2 mL badanej próby, zawierającej 0.02 mg białka bądź pożywkę hodowlaną zebraną z punktów doświadczalnych, poddanej wstępnej (15 minutowej) inkubacji z 0.2% Tritonem X-100 w temperaturze 4⁰C.

Próby wstępnie inkubowano 5 minut w temperaturze 37⁰C, a następnie reakcję zapoczątkowano dodaniem 10 μ L 100 mmol/L pirogronianu sodu.



Równanie 1. Schemat reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową w obecności NADH.

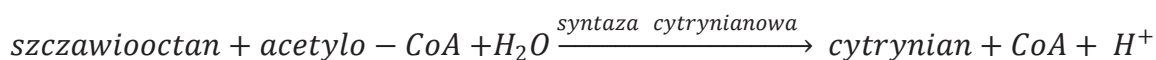
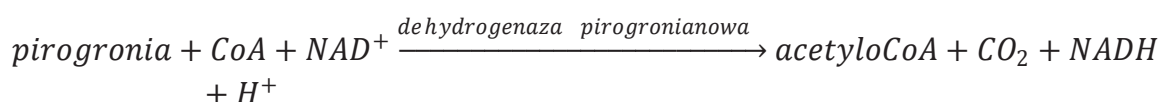
Pomiar spadku absorbancji w czasie prowadzono przez 10 minut przy długości fali $\lambda=340\text{nm}$. Wynik wyrażono w postaci nmoli utlenionego NADH/min/mg białka, na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH równej 6.22/mol/cm. Aktywność enzymu badano w komórkach SN56, jak również środowisku hodowlanym. W przypadku pomiaru aktywności LDH w medium próbą reprezentującą stuprocentową śmiertelność komórek była próba kontrolna inkubowana w ostatnich 2 godzinach eksperymentu z Tritonem X-100 w końcowym stężeniu 0.2%.

4.8.2. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; EC 1.2.4.1.) (Szutowicz et al., 1981)

Etap I: synteza cytrynianu

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.25\text{mL}$): 50 mmol/L bufor TRI-HCl (pH=8.3), 2 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L ditiotreitól, 2 mmol/L NAD, 10 mmol/L pirogronian sodu, 2 mmol/L pirofosforan tiaminy, 0.2 mmol/L CoA, 2.5 mmol/L szczawiooctan, 0.15 J.M. syntazy cytrynianowej. Ślepe próby inkubowano bez obecności CoA w środowisku reakcyjnym.

Reakcję zapoczątkowano dodaniem 0.1 mg białka do środowiska inkubacyjnego. Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C zgodnie z Równaniem 2.



Równanie 2. Schemat reakcji zachodzących w czasie badania aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej.

Reakcję zakończono poprzez inkubację prób w temperaturze 100°C przez 10 minut. Następnie próby schłodzono do temperatury pokojowej, wirowano (2 min, 10 tys. obr./min).

Etap 2: oznaczanie poziomu cytrynianu

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.7\text{mL}$): 100 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 0.1 mmol/L NADH, 0.2 J.M. dehydrogenazy jabłczanowej, 0.1 mL próby z etapu 1.

Reakcję zapoczątkowano 0.1 J.M. bakteryjnej liazy cytrynianowej. Pomiar spadku absorbancji prowadzono przy długości fali $\lambda=340\text{nm}$. Wynik wyrażono w postaci nmoli utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH równej 6.22/mol/cm.

4.8.3. Akonitaza (AKO; EC 4.2.1.3) (De Villafranca and Haines, 1974)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=1.0\text{mL}$): 50 mmol/L bufor Tris-HCl (pH=7.4), 2 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L NADP, 1 J.M. dehydrogenazy izocytrynianowej, 0.1 mL badanej próby zawierającej 0.1 mg białka.

Próby wstępnie inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C , a reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie 10 μL 20 mmol/L cis-akonitanu do środowiska reakcyjnego. Pomiar spadku absorbancji w czasie prowadzono przez 10 minut przy długości fali $\lambda=340\text{nm}$. Wynik wyrażono w postaci nmoli zredukowanego NADP/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADP równej 6.22/mol/cm.

4.8.4. Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH; EC 1.1.1.42) (Plaut and Aogaichi, 1968)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.6\text{mL}$): 50 mmol/L bufor Tris-HCl (pH=8.3), 0.6 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L NADP oraz 0.1 mL badanej próby zawierającej 0.1 mg białka.

Próby wstępnie inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C , a reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie 10 μL 10 mmol/L D,L-izocytrynianu do środowiska reakcyjnego. Pomiar, jak również sposób obliczania aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej był analogiczny do pomiaru aktywności akonitazy (podrozdział 4.8.3).

4.8.5. Syntaza cytrynianowa (SC, EC 2.3.3.1) (Wright et al., 1967)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.7\text{mL}$): 100 mmol/L bufor Tris-HCl (pH=8.0), 0.015 mmol/L acetylo-CoA, 0.2 mmol/L DTNB oraz 0.1 mL badanej próby zawierającej 0.02 mg białka.

Próby wstępnie inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C , a następnie reakcję zapoczątkowano dodaniem 10 μL 0.2 mmol/L szczawiooctanu. Pomiar spadku absorbancji w czasie prowadzono przez 10 minut przy długości fali $\lambda=405\text{nm}$. Wynik wyrażono w postaci

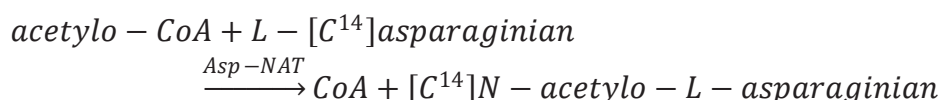
nmoli powstałego NTB/min/mg białka, na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NTB równego 13.6/mol/cm.

Skróty: DTNB: kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy, NTB: 2-nitro-5-merkaptobenzoesan.

4.8.6. *N*-acetylotransferaza asparaginianowa (*Asp-NAT*, *NAT8L*; *EC 2.3.1.17*) (*Wiame et al., 2010*)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.1\text{ mL}$): 10 mmol/L monofosforan sodu, 20 mmol/L HEPES (pH=7.1), 1 mmol/L MgCl_2 , 50 $\mu\text{mol/L}$ kwas L-asparaginianowy, kwas L-[U- C^{14}] asparaginianowy (0.2 nmol/próbkę, 0.004 μCi), 200 $\mu\text{mol/L}$ acetylo-CoA.

Analizę rozpoczynano od 15 minutowej inkubacji 0.05 mL zawiesiny komórkowej (2 mg białka/mL) z 0.05 mL roztworu lizującego (skład: 0.2% Triton X-100, 50 mmol/L buforem sodowo-fosforanowym oraz 1 mmol/L EDTA) w temperaturze 4⁰C. W próbie zerowej zawiesinę komórkową zastąpiono 50 mmol/L buforem sodowo-fosforanowym. Badanie aktywności *N*-acetylotransferazy asparaginianowej zapoczątkowano dodaniem do zawiesiny komórkowej 0.1 mL środowiska inkubacyjnego. Całość umieszczono w termobloku (30 min, T = 30⁰C, 600 obr./min). Reakcję zakończono 5 minutową inkubacją prób w temperaturze 80⁰C, a następnie dodaniem 1 mL 5 mmol/L HEPES (pH=7.1). Próby schłodzono i zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min).



Równanie 3. Schemat reakcji z zastosowaniem znakowanego izotopowo asparaginianu jako substratu reakcji katalizowanej przez *N*-acetylotransferazę asparaginianową.

Zgodnie z Równaniem 3. w nadsączu znajdowały się dwa związki znakowane izotopowo, tj. substrat (asparaginian) oraz produkt (*N*-acetyloasparaginian, NAA), które rozdzielono techniką chromatografii cieczowej z zastosowaniem mikrokolumny wypełnionej złożem RP-C-18 (500 mg). Kolumnę zwilżono 5 mL metanolu, przemywano 5 mL wody destylowanej oraz równowagowano 5 mL 5 mmol/L HEPES (pH=7.1). Rozdział rozpoczęto dodaniem na szczyt mikrokolumny 1 mL nadsączu poreakcyjnego, po czym układ przemyto 2 mL 5 mmol/L HEPES (pH=7.1). Asparaginian został usunięty ze złoża mikrokolumny za pomocą 5 mL 150 mmol/L NaCl. Elucję badanego produktu (NAA) wywołano poprzez zwiększenie siły jonowej fazy mobilnej (300 mmol/L NaCl, 5 mL).

Do 20 mL naczynek scyntylicyjnych dodano 10 mL płynnego scyntylicatora UltimaGold[®] oraz 3 mL frakcji „elucja” uzyskanej z rozdzielania chromatograficznego. Następnie, w celu wyekstrahowania NAA z fazy wodnej do scyntylicatora organicznego, zakręcone naczynka scyntylicyjne intensywnie zmieszano i pozostawiono w zaciemnionym miejscu do czasu rozdzielania się faz (3 godziny). Radioaktywność prób mierzono każdorazowo przez 10 minut. Całkowitą reaktywność środowiska mierzono po jego rozpuszczeniu w scyntylicatorze dioksanowym. Całkowita ilość dodanego do środowiska inkubacyjnego kwasu asparaginowego wyniosła 10.2 nmol na próbę, w tym 0.2 nmol stanowił aminokwas znakowany izotopowo. Aktywność enzymu wyliczano na podstawie aktywności specyficznej, która wynosiła $1,45 \times 10^4$ dpm/nmol. Wynik wyrażono w postaci pmoli zsyntezowanego NAA/min/mg białka.

4.8.7. Acetylotransferaza cholinowa (ChAT; EC 2.3.1.6) (Fonnum, 1975)

Środowisko inkubacyjne ($V_k=0.01\text{mL}$): 50 mmol/L bufor fosforanowo-sodowy (pH=7.4), 1 mmol/L EDTA, 600 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L ezeryna, [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-acetylo-CoA (0.43 nmol/próbę, 0.025 μCi), 0.05 mmol/L chlorek cholinowy.

Analizę rozpoczynano od 15 minutowej inkubacji 0.005 mL zawiesiny komórkowej (5 mg białka/mL) z 0.005 mL roztworu lizującego (0.2% Triton X-100, 50 mmol/L bufor sodowo-fosforanowy oraz 1 mmol/L EDTA) w temperaturze 4⁰C. W próbie zerowej zawiesinę komórkową zastąpiono 50 mmol/L buforem sodowo-fosforanowym. Badanie aktywności acetylotransferazy cholinowej zapoczątkowano dodaniem do zawiesiny komórkowej 0.01 mL środowiska inkubacyjnego. Całość umieszczono w termobloku (30 min, T = 30⁰C, 600 obr./min).

Reakcję zakończono przeniesieniem inkubowanych prób do 20 mL naczynek scyntylicyjnych zawierających 6 mL lodowato-zimnego roztworu (10mmol/L bufor fosforanowo-sodowy o pH=7.4, 0.5% 4-fenotyloboran sodowy, 2 mL/próbę acetonitryl) i wytrząsano przez 10 sek. Ostatecznie dodano 10 mL scyntylicatora toluenowego. Następnie, w celu wyekstrahowania ACh z fazy wodnej do scyntylicatora organicznego, zakręcone naczynka scyntylicyjne intensywnie zmieszano i pozostawiono w zaciemnionym miejscu do czasu rozdzielania się faz (3 godziny).

Radioaktywność prób mierzono każdorazowo przez 10 minut. Całkowitą reaktywność środowiska mierzono po jego rozpuszczeniu w scyntylicatorze dioksanowym. Całkowita ilość

dodanego do środowiska inkubacyjnego acetylo-CoA wyniosła 2.43 nmol na próbę, w tym 0.43 nmol stanowił acetylo-CoA znakowany izotopowo. Aktywność enzymu wyliczano na podstawie aktywności specyficznej, która wynosiła 1.65×10^4 dpm/nmol. Wynik wyrażono w postaci pmoli zsyntezowanego ACh/min/mg białka.

4.9. Oznaczanie poziomu metabolitów komórkowych

4.9.1. Acetylo-CoA (*Szutowicz and Bielarczyk, 1987*)

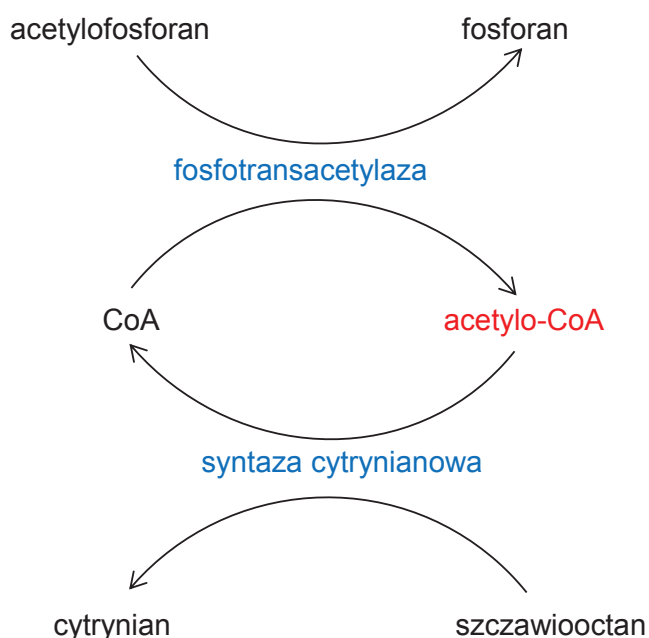
Zgodnie z procedurą ekstrakcji frakcji mitochondrialnej z całkowitej puli komórkowej, (podrozdział 4.4.4) analizie poddane zostały każdorazowo dwie próby: całkowita pula komórkowa (acetylo-CoA całkowity) oraz frakcja mitochondrialna (acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej). Poziom acetylo-CoA we frakcji cytozolowej uzyskiwano przez odejmowanie od poziomu całkowitej puli komórkowej acetylo-CoA poziomu oznaczonego we frakcji mitochondrialnej. Do oznaczenia całkowitej puli acetylo-CoA, po zakończeniu inkubacji opisanej w podrozdziale 4.4.4, ze środowiska inkubacyjnego zawierającego zawiesinę komórkową odbierano 0.2 mL mieszaniny inkubacyjnej. Następnie pobraną próbę wirowano (2 min, 10 tys. obr./min), usunięto nadsącz, a osad zawieszano w 4% HClO₄ (stężenie: 1 mg białka/mL kwasu). Uzyskaną po rozdzieleniu frakcji komórkowych (podrozdział 4.4.4) frakcję mitochondrialną przygotowywano analogicznie. Zdenaturowane próby zamrażano w temperaturze -20°C. Analiza zamrożonych próbek była przeprowadzona w czasie do 7 dni od momentu zamrożenia.

Zawartość acetylo-CoA oznaczano metodą cyklizacyjną (Ryc. 5), w której oznaczanym produktem końcowym jest cytrynian (*Szutowicz and Bielarczyk, 1987*). Rozmrożoną próbkę zwirowano 2 min (10 tys. obr./min), a następnie zobojętniono za pomocą 7.5 wal/L K₂CO₃. Badanie rozpoczęto od usunięcia z próby interferującego CoA-SH. Do 0.04 mL zobojętnionego nadsącza dodano 0.01 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH=7.4) oraz 0.010 mL świeżo przygotowanego roztworu 1 mmol/L bezwodnika maleinowego w eterze dietylowym, który w sposób nieodwracalny wiąże CoA. Próby wytrząsano przez 15 minut z prędkością 600 obr./min w temperaturze otoczenia, następnie próby pozostawiono na 2 godziny, bez wytrząsania

Środowisko cyklizacyjne (V_k=0.05mL): 50 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 5 mmol/L NH₄Cl, 0.01% (w/v) albumina wołowa, 1.2 mmol/L szczawiooctan, 1 mmol/L acetylofosforan, 1 J.M. syntazy cytrynianowej, 1 J.M fosfotransacetylazy.

Po upływie 2 godzin wieczka probówek otwierano w celu swobodnego odparowania eteru dietylowego, następnie próby zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min). Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie do prób 0.05 mL środowiska cyklizacyjnego i umieszczenie mieszaniny reakcyjnej w $T=30^{\circ}\text{C}$ (100 minut, wytrząsanie: 10 obr./min), prowadząc etap cyklizacyjny metody zgodnie z Ryc.5.

Analizę zakończono 10 minutową inkubacją prób w temperaturze 100°C . Następnie próby schłodzono do temperatury pokojowej i ponownie zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min). Cytrynian oznaczono analogicznie, jak w etapie drugim oznaczania aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (procedura 4.8.2). Zawartość acetylo-CoA wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej 0.0-10.0 pmoli acetylo-CoA na 0.1 mL próby. Wynik wyrażono w postaci ilości pmoli acetylo-CoA na 1 mg białka.



Ryc. 5. Schemat przemian biochemicznych obserwowanych w cyklizacyjnej metodzie oznaczania poziomu acetylo-CoA.

4.9.2. *N*-acetyloasparaginian (Koller et al., 1984)

Poziom *N*-acetyloasparaginianu (NAA) oznaczono zmodyfikowaną metodą Kollera (Koller et al., 1984). Próby przeznaczone do oznaczenia zawartości NAA denaturowano przez noc w 4% HClO_4 (0.6 mg białka/mL kwasu) w temperaturze 4°C . Następnie próby zwirowywano (2 min, 10 tys. obr./min), a uzyskany nadsącz przenoszono do kolejnej probówki, doprowadzono do pH 3 za pomocą 7.5 wal/L K_2CO_3 i ponownie zwirowano

(2 min, 10 tys. obr./min). Uzyskany nadsącz filtrowano przez membranę teflonową o średnicy porów 0.22 μm .

90 μL próby rozdzielano na analitycznej kolumnie chromatograficznej RP-C18 (25cm x 4.6mm; wielkość ziarna: 4 μm ; wielkość porów: 80 \AA). Rozdział chromatograficzny prowadzono przez 20 minut z prędkością przepływu 0.9 mL/min, w temperaturze otoczenia. Fazę mobilną (pH=2.5) stanowił układ zawierający 0.1% H_3PO_4 / 1% metanol / woda. Po serii analiz kolumnę przemywano fazą mobilną acetonitryl/metanol/woda (40:40:20, v/v/v) przez 60 minut, a następnie równowagowano przez kolejne 30 minut fazą mobilną do analizy zawartości NAA. Poziom NAA oznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej w zakresie 0.9-18.0 nmol NAA oraz wyrażano w postaci nmol NAA/mg białka.

4.9.3. Acetylocholina (*Israël and Lesbats, 1982*)

W czasie eksperymentu każdorazowo pobierano dwie próby po 0.2 mL. Pierwszą bezpośrednio po dodaniu zawiesiny komórkowej do środowiska inkubacyjnego. Drugą natychmiast po zakończeniu eksperymentu. Odebrane próby wirowano (5 min, 5 tys. obr./min, $T=4^{\circ}\text{C}$). W obu próbach oddzielano nadsącz od osadu. Do dalszej analizy pozostawiano nadsącz oraz osad otrzymany po eksperymencie. Przygotowane próby zamrażano w temperaturze -20°C , oznaczenie zawartości ACh przeprowadzano w czasie do 30 dni od momentu zamrożenia. W celu obliczenia ilości wydzielonej w czasie eksperymentu acetylocholino (ACh) od oznaczonego po eksperymencie poziomu ACh w nadsączu odejmowano ACh oznaczoną w próbce pobranej bezpośrednio przed eksperymentem, a wynik wyrażano w postaci wydzielonych pmoli ACh/min/mg białka. Poziom ACh w komórkach neuronalnych oznaczano w osadzie i wyrażano w postaci pmoli ACh/mg białka.

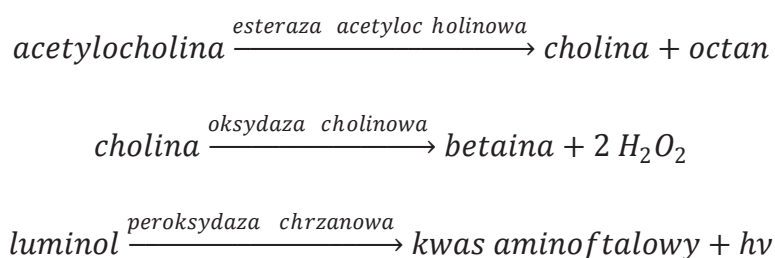
Oznaczenie acetylocholino w nadsączu wykonywano bezpośrednio po rozmrożeniu próby. W przypadku oznaczanie w osadzie etap analizy luminometrycznej był każdorazowo poprzedzony etapem ekstrakcji acetylocholino z osadu komórkowego.

Ekstrakcja acetylocholino prowadzona była w całości w temperaturze 4°C z zastosowaniem schłodzonych rozpuszczalników. Po rozmrożeniu osad wirowano (1 min, 5 tys. obr./min) i usuwano nadsącz. Acetylocholinę dwukrotnie ekstrahowano metanolem w łącznej objętości 0.4 mL oraz wirowano (5 min, 5 tys. obr./min). Do odebranego nadsączu dodawano w kolejności: 0.05 mL świeżo sporządzonego 1 M kwasu

mrówkowego, 0.9 mL chloroformu oraz 0.4 mL wody dejonizowanej. Po dodaniu każdego z rozpuszczalników próbkę dokładnie mieszano. Ostatecznie, w celu rozdzielenia warstwy wodno-metanolowej od chloroformowej, całość wirowano (5 min, 10 tys. obr./min). Z warstwy wodno-metanolowej odbierano 0.3 mL, które odparowywano do sucha w wirówce próżniowej w temperaturze 37⁰C z prędkością 1.5 tys. obr./min.

Środowisko inkubacyjne (0.5 mL): 67 mmol/L bufor glicyna-NaOH (pH=8.3), 0.01 mmol/L luminol, 10 U peroksydazy chrzanowej, 0.5 J.M. oksydazy cholinowej, 0.02 mL analitu.

Środowisko wraz z analitem inkubowano 5 minut, następnie mierzono emisję środowiska (czas pomiaru: 20 sekund). Po pomiarze dodawano 0.01 mL esterazy acetylocholinowej, która zapoczątkowała reakcje przedstawione w Równaniu 4. Natychmiast po dodaniu enzymu mierzono luminescencję całego układu. Po kolejnych 5 minutach ponownie mierzono emisję środowiska i dodawano 0.01 mL wzorca acetylocholinę. Pomiar powtarzano, a zawartość acetylocholinę w próbce mierzono względem emisji wzorca. W badaniu wykorzystano schemat następujących po sobie reakcji:



Równanie 4. Schemat reakcji zachodzących w czasie pomiaru zawartości acetylocholinę w próbce.

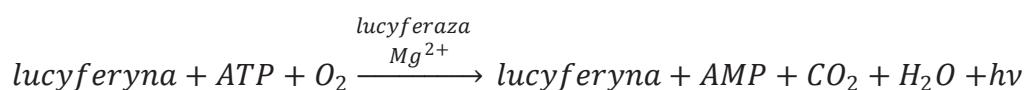
4.9.4. Adenozyno-5'-trifosforan (*Gorman et al., 2003*)

ATP oznaczano w komórkach SN56 poddanych 24-ro godzinnej (podrozdział 3.4.2) tudzież 30-sto minutowej (podrozdział 4.4.3) ekspozycji na Zn. W przypadku chronicznej ekspozycji na Zn, po zakończeniu eksperymentu płytkę z komórkami delikatnie przepłukiwano buforem Puck's bez EDTA. W przypadku badań wpływu krótkoczasowej ekspozycji Zn na komórki SN56, po zakończeniu eksperymentu próbkę wirowano (2 min, 10 tys. obr./min), a następnie usuwano nadsącz. W kolejnym kroku, do komórek dodawano zimny 4% HClO₄ i pozostawiono w 4⁰C na 10 minut do pełnej denaturacji białka. Ostatecznie próby wirowano (2 min, 10 tys. obr./min). Uzyskany nadsącz zamrażano w temperaturze -20⁰C. Oznaczenie zawartości ATP przeprowadzono w czasie do 7 dni

od momentu zamrożenia. Rozmrożone próby zubożniano za pomocą 7.5 wal/L K_2CO_3 , następnie zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min, $T=4^0C$).

Środowisko inkubacyjne ($V_c=0.2$ mL): 25 mmol/L Tris-HCl (pH=7.8), 5 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L ditiotreitól, 0.5 mmol/L lucyferyna, 6 J.M. lucyferazy.

Analizę rozpoczynano od pomiaru emisji środowiska (czas pomiaru: 10 sekund), następnie dodawano 0.02 mL uzyskanego nadsączu i natychmiast ponawiano pomiar, obserwując zmiany zgodne z Równaniem 5. Poziom ATP w próbach wyznaczano na podstawie wykonanej krzywej kalibracyjnej w zakresie od 2.5 do 20.0 pmol ATP/próbe. Ostatecznie wynik wyrażano jako liczbę pmoli ATP/ mg białka.



Równanie 5. Sumaryczny schemat reakcji katalizowanej przez enzym lucyferazę w obecności jonów magnezu i tlenu.

4.9.5. Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (*Panse et al., 1985*)

Po zakończeniu eksperymentu ostrego wpływu Zn na komórki SN56, ze środowiska inkubacyjnego odebrano 0.3 mL (3 mg/mL) próby, a otrzymany po zwirowaniu (2 min, 10 tys. obr./min) osad komórek zawieszano w 0.6 mL 10% kwasu trójchlorooctowego i inkubowano 10 minut ($T=4^0C$, 600 obrotów/min). Całość zwirowano (2min, 10 tys. obr./min), do supernatantu dodano 0.2 mL 2% kwasu tiobarbiturowego i ponownie inkubowano 20 min w temperaturze 100^0C . Próbe schłodzono i zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min). Absorbancję nadsączu mierzono przy długości fali $\lambda=535nm$. Próbe zerową stanowiła zawieszona w środowisku inkubacyjnym 0.32 mmol/L sacharoza. Ostatecznie wynik wyrażano w postaci liczby nmoli związków TBARS/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla TBARS równej 15.6/mol/cm.

4.10. Oznaczanie poziomu i dystrybucja jonów wapnia i cynku

4.10.1. Oznaczanie poziomu wapnia (*Scarpa, 1979*)

Próby do oznaczenia poziomu wapnia w przedziałach komórkowych przygotowywano analogicznie jak próby do oznaczenia acetylo-CoA (podrozdział 4.9.1).

Środowisko inkubacyjne ($V_c=1.1$ mL): 0.82 $\mu\text{mol/L}$ arsenazo III, 45 mmol/L KCl, 64 mmol/L bufor MOPS (pH=7.4), 0.1 mL badanej próby (pH=7.4).

Analizę spektrofotometryczną wykonywano przy długości fali 650 nm, 2-5 minut od momentu przygotowania środowiska inkubacyjnego. Poziom jonów wapnia w próbach wyznaczono na podstawie wykonanej krzywej kalibracyjnej w zakresie od 3 do 25 nmol Ca/próbę. Ostatecznie wynik wyrażono jako liczba nmoli Ca/mg białka.

4.10.2. Oznaczanie poziomu cynku (*Chen and Liao, 2003a*)

Próby do oznaczenia poziomu cynku w całych komórkach tudzież przedziałach komórkowych przygotowano analogicznie jak próby do oznaczenia acetylo-CoA (podrozdział 4.10.1).

Środowisko inkubacyjne ($V_c=2.0$ mL): 0.3 mmol/L HEPES (pH=7.4), 0-0.4 mL badanej próby (pH=6.0).

Badanie zapoczątkowywano dodaniem 0.02 mL TSQ (2 mg/mL w DMSO). Analizę fluorymetryczną prowadzono przez 20 minut, przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}}=335$ nm i emisji $\lambda_{\text{em}}=495$ nm, w temperaturze otoczenia. Poziom Zn w próbach wyznaczano na podstawie wykonanej krzywej kalibracyjnej w zakresie od 0.2 do 4.0 nmol Zn/próbę. Ostatecznie wynik wyrażano jako nmole Zn/mg białka.

4.10.3. Obrazowanie subkomórkowej dystrybucji cynku (*Lo et al., 2004*)

Komórki linii SN56 wysiano na powierzchnię szklanego naczynia hodowlanego z gęstością 10 tys. komórek/cm², a następnie poddano 30-sto minutowej ekspozycji na chlorek cynku w stężeniu 0-0.2 mmol/L w środowisku polaryzacyjnym (patrz → podrozdział 4.4.3). Po zakończeniu hodowli komórki przemywano kolejno 2 mL buforu Puck's z EDTA oraz dwu krotnie 2 mL buforu Puck's bez EDTA. W kolejnym kroku do naczynia hodowlanego dodawano bufor Puck's bez EDTA zawierający 20 $\mu\text{mol/L}$ roztwór TSQ. Komórki inkubowano 15 minut, po czym usuwano bufor i 3 krotnie przemywano buforem Puck's bez EDTA. Komórki wybarwione TSQ obserwowano pod mikroskopem odwróconym przy 400 krotnym powiększeniu oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}}=365$ nm i emisji $\lambda_{\text{em}}=440$ nm. Zarejestrowane zdjęcia analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ[®] Version 1.48 (National Institutes of Health, USA).

4.11. Obrazowanie zmian morfologicznych komórek

Komórki linii SN56 hodowano zgodnie ze schematem eksperymentalnym opisanym w podrozdziale 3.4.2. Ocenę zmian morfologicznych oraz obrazowanie komórek wykonywano przy użyciu mikroskopu odwróconego przy 400 krotnym powiększeniu. Zarejestrowane zdjęcia analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ[®] Version 1.48 (National Institutes of Health, USA).

4.12. Oznaczanie liczby i przeżywalności komórek

Zawiesinę komórkową (2 mg białka/mL) rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:1 (v/v) 0.4% roztworem barwnika błękitu trypanu w 0.9% NaCl. Tak przygotowaną zawiesinę umieszczano w komorze hematologicznej Fuchs-Rosenthal. W ocenie mikroskopowej zliczano średnią liczbę komórek w kwadracie komory oraz frakcję komórek uszkodzonych. Jako komórki uszkodzone kwalifikowano komórki niezdolne do wydalenia błękitu trypanu. Analizę prowadzono przy 200 krotnym powiększeniu.

4.13. Immunodetekcja enzymu NAT8L w komórkach SN56

4.13.1. Oznaczanie metodą ELISA zawartości *N*-acetylotransferazy asparaginianowej

Oznaczenie zawartości enzymu NAT8L w komórkach SN56 wykonano za pomocą testu ELISA (Mouse *N*-acetylaspartate synthetase ELISA kit, Cusabio, Chiny). Hodowlę komórkową przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.4.2. Zebrane przy użyciu buforu Pucks'a komórki poddano 30-sto minutowej lizie w buforze lizującym o składzie 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 1 mmol/L EDTA, 1% Igepal CA-630 w temperaturze 4⁰C. Następnie próbkę zwirowano (2 min, 10 tys. obr./min). Uzyskany nadsącz o stężeniu ok. 10 mg białka/mL zamrożono w temperaturze -20⁰C, oznaczenie zawartości enzymu przeprowadzono w czasie 7 dni od momentu zamrożenia. Oznaczenie zawartości NAT8L wykonano zgodnie z procedurą postępowania opracowaną przez producenta testu. Równolegle sporządzono krzywą kalibracyjną w zakresie 6.25-50.00 pg NAT8L/mL, za pomocą której odczytano zawartość białka w badanych próbach. Absorbancję prób mierzono przy długości fali $\lambda = 450\text{nm}$.

4.13.2. Półilościowe wyznaczenie zawartości białek regulujących homeostazę wapnia metodą Western Blot

Próby do analizy metodą Western Blot przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.4.2, a uzyskany osad komórkowy zawieszano i inkubowano ($t = 30 \text{ min}$, $T = 4^{\circ} \text{C}$) w buforze lizującym o składzie 50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=7.4$), 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton-X100, 5% glicerol, 10 mmol/L KH_2PO_4 , 0.1% dodecylosiarczan sodu, koktajl inhibitorów proteaz (1:100, v/v) w składzie: AEBSF, aprotynina, bestynina, E-64, leupeptyna, pepstatyna A. Po inkubacji próby zwirowano (2 min, 12 tys. obr./min, $T=4^{\circ}\text{C}$) a uzyskany nadsącz przechowywano w temperaturze -20°C . Immunodetekcję metodą Western Blot (WB) przeprowadzono w czasie do 30 dni od momentu zamrożenia.

Analizę metodą WB rozpoczęto od rozcieńczenia nadsączu buforem Laemmliego w stosunku 1:1 (v/v), następnie próby gotowano ($t=5\text{min}$, $T=100^{\circ}\text{C}$) i ostatecznie zwirowano (2 min, 12 tys. obr./min, $T=4^{\circ}\text{C}$). Uzyskaną próbę (100 μg białka w 20 μL roztworu) bądź białkowy marker mas (10 μL) poddawano rozdzielni elektroforetycznej na gradientowym żelu poliakrylamidowym (4-20%) w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) ($t = 2 \text{ godz.}$, $U = 100\text{V}$, T_{pok}). Elektroforezę prowadzono w buforze katodowo-anodowym o składzie 25 mmol/L Tris ($\text{pH}=8.3$), 192 mmol/L glicyna, 0.1% dodecylosiarczan sodu. Po zakończeniu elektroforezy przeprowadzono suchy 8-minutowy transfer z żelu poliakrylamidowego na błonę poliwinylidenową (PVDF). Następnie uzyskaną błonę PVDF płukano przez 60 min w roztworze podstawowym stanowiącym 3% roztwór odłuszczonego mleka w buforze TBS-T (skład: 25 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} = 7.4$), 134 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 0.1% Tween20). W kolejnym kroku błonę PVDF poddawano całonocnej inkubacji ($T=4^{\circ}\text{C}$) z poliklonalnymi anty-mysimi przeciwciałami 1^o rozpuszczonymi w roztworze podstawowym zgodnie z zaleceniami producentów, tzn.: anty- β -aktyna (1: 5000, v/v), anty-AMPA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-NMDA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-nAChR (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-N-VGCC (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-P/Q-VGCC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-STIM1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-L-VGCC (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anty-IP₃ (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Drugi dzień analizy rozpoczynano 4 krotnym płukaniem błony w roztworze podstawowym. Przepłukaną błonę poddawano 2.5 godzinnej inkubacji z poliklonalnymi przeciwciałami 2^o skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną w roztworze podstawowym (1: 5000, v/v). Po zakończeniu inkubacji powtarzano 40-sto minutowy etap płukania.

Ostatecznie błonę umieszczano w roztworze zawierającym BCIP (0.17mg/mL), NBT (0.33 mg/mL) oraz bufor o składzie 100 mmol/L Tris-HCl (pH=9.5), 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂. Reakcję przerywano poprzez przemycie błony zimną wodą dejonizowaną. Analizę densytometryczną normalizowano względem β -aktyny.

Skróty: BCIP: fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indylu, NBT: błękit nitrotetrazoliowy.

4.14. Oznaczanie zawartości białka całkowitego

Zawartość białka w próbce oznaczano zgodnie z metodą Bradford (Bradford, 1976). Krzywą kalibracyjną wyznaczono w zakresie od 10 do 50 μ g immunoglobuliny ludzkiej.

4.15. Metody statystyczne

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów przedstawiono w postaci wartości średnich (\bar{X}) wraz z ich standardowymi błędami średniej (SEM). Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $\alpha=0.05$. Istotność różnic między średnimi w doświadczeniach wielopunktowych weryfikowano hipotezami testu ANOVA z testem *post hoc* Bonfferoni. Dla porównania dwóch grup wyników stosowano niesparowany testu *t*-Studenta. Analizę statystyczną wykonywano przy użyciu programu statystycznego Graph Pad Prism[®] Version 4.01 (Graph Pad Software, USA).

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka komórek SN56 jako komórkowego modelu neuronów cholinergicznym

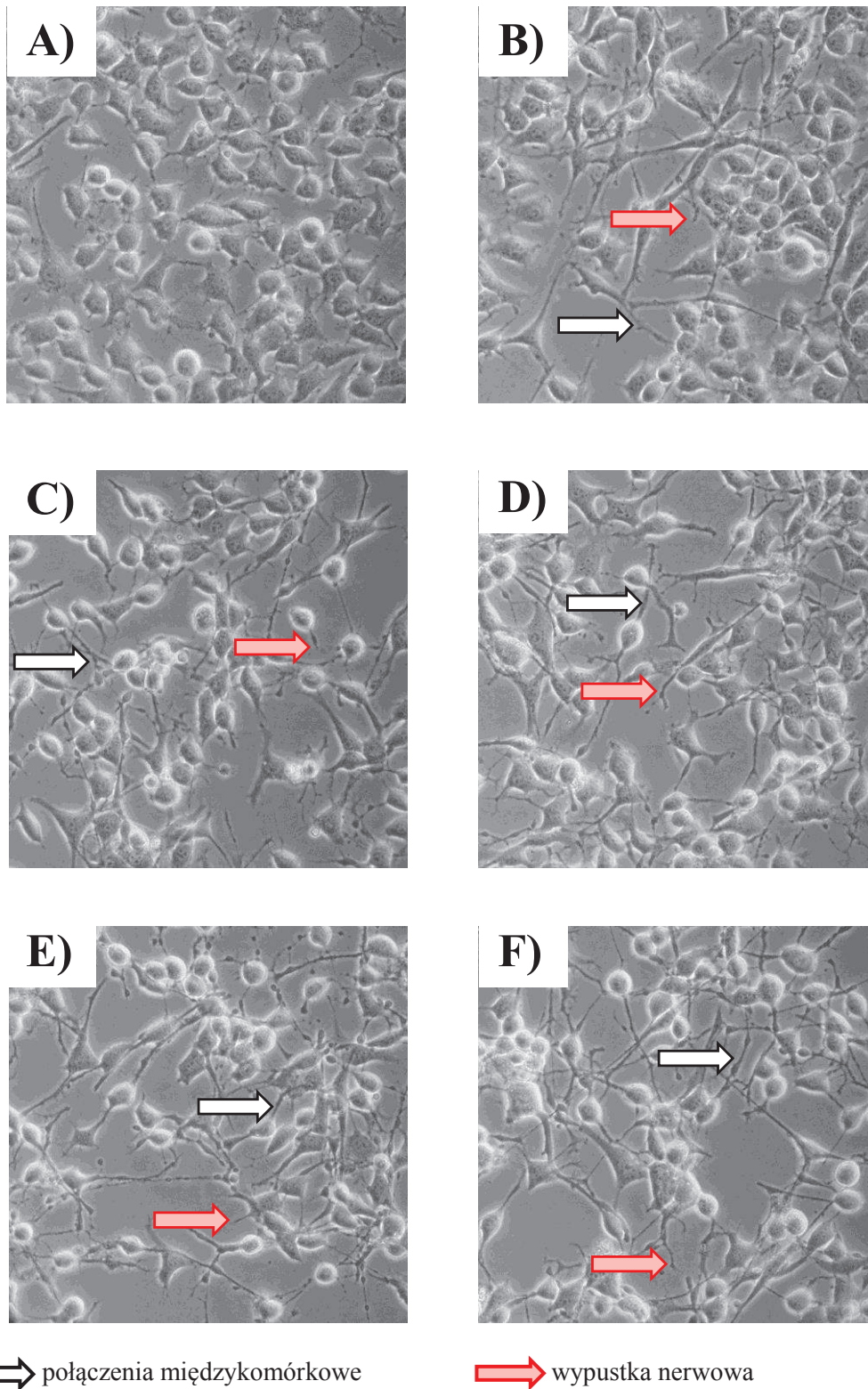
Do badań oceniających neurotoksyczny wpływ Zn na neurony cholinergiczne wykorzystano mysia linię komórkową SN56 z wysoką bądź niską ekspresją fenotypu cholinergicznego. Badania prowadzono w dwóch schematach eksperymentalnych:

- przewlekły (zamiennie: chroniczny, 24-ro godzinny, długoczasowy) wpływ jonów cynku (Zn) na komórki SN56 hodowane w środowisku o niskim stężeniu K^+ (5.4 mmol/L);
- ostry (zamiennie: 30-sto minutowy, krótkoczasowy) wpływ 0.15 mmol/L Zn na komórki SN56 inkubowane wstępnie w obecności bądź nieobecności selektywnych antagonistów białek transportujących wapń w warunkach niskiego (5.4 mmol/L) bądź wysokiego (30 mmol/L) stężenia K^+ .

Optymalny układ różnicujący komórki SN56 w kierunku neuronalnych komórek o wyższej ekspresji fenotypu cholinergicznego wybrano porównując wpływ czynników różnicujących na model komórkowy neuronów cholinergicznym. SN56 poddano wstępnej 48 godzinnej hodowli zawierającej:

- A) bez czynników różnicujących (kontrola);
- B) 0.001 mmol/L kwas *trans*-retinowy (RA);
- C) 0.5 mmol/L dibutyrylowa pochodna cyklicznego AMP (db-cAMP);
- D) 1 mmol/L dibutyrylowa pochodna cyklicznego AMP (db-cAMP);
- E) 0.001mmol/L RA + 0.5 mmol/L db-cAMP;
- F) 0.001mmol/L RA)+ 1 mmol/L db-cAMP.

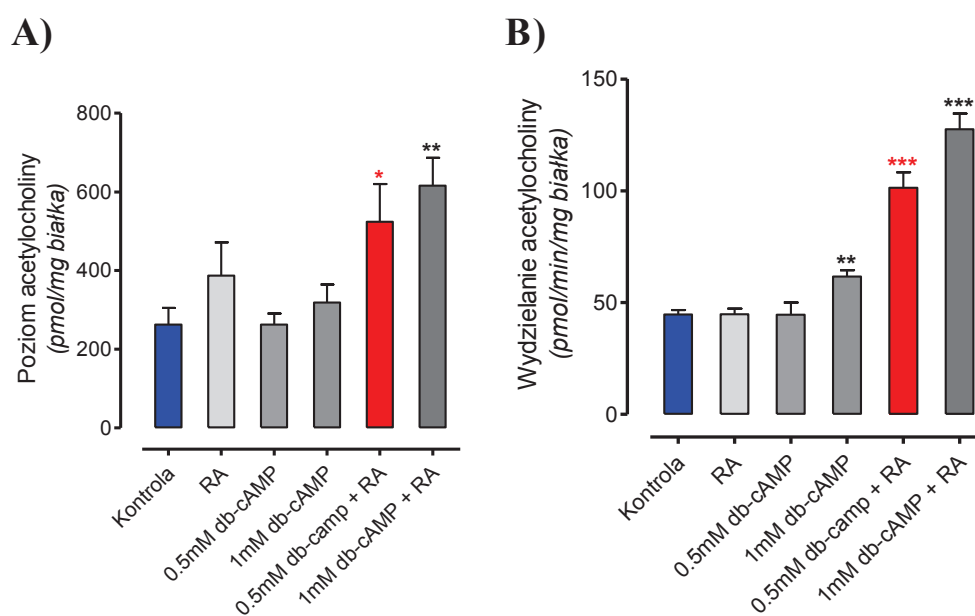
Zwiększenie ekspresji fenotypu cholinergicznego w komórkach linii SN56 oceniano na podstawie zmian morfologicznym (Ryc. 6) oraz metabolicznym (Ryc. 7-9 oraz Tabela 1).



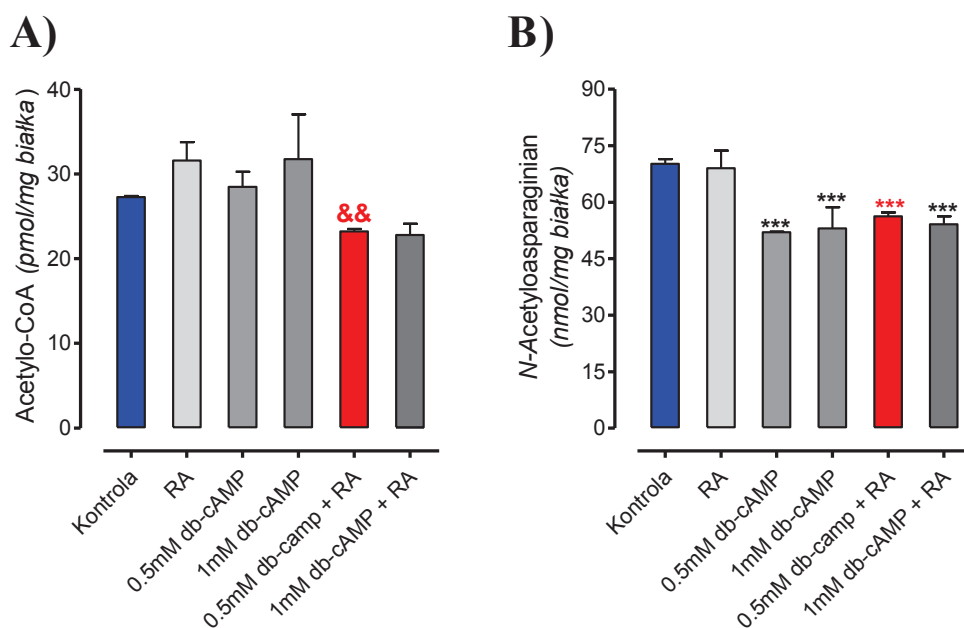
Ryc. 6. Morfologia komórek SN56 hodowanych w obecności czynników różnicujących: A) kontrola; B) 0.001mmol/L RA; C) 0.5 mmol/L db-cAMP; D) 1 mmol/L db-cAMP; E) 0.001mmol/L RA + 0.5 mmol/L db-cAMP; F) 0.001mmol/L RA + 1 mmol/L db-cAMP. Zdjęcia są reprezentatywne dla 3 doświadczeń.

Zastosowanie 1 $\mu\text{mol/L}$ kwasu *trans*-retinowego (RA), jako czynnika różnicującego, nie wpłynęło zasadniczo na analizowane parametry. Morfologicznie obserwowano tworzące się połączenia międzykomórkowe (Ryc. 6 B, 7 A-B). Jednakże, wewnątrzkomórkowy poziom acetylocholino oraz jej wydzielanie nie zmieniły się istotnie (Ryc. 8 A-B). Zmianie nie uległ także poziom acetylo-CoA oraz jego wtórnego metabolitu (NAA). Analogiczna tendencja utrzymywała się w przypadku hodowania komórek w obecności butyrylowej pochodnej cyklicznego AMP (db-cAMP) (Ryc. 7 A-B, 8 A-B).

Hodowla komórek SN56 w obecności mieszaniny RA oraz db-cAMP skutkowała istotną zmianą ekspresji fenotypu cholinergicznego. Znamiennego znaczenia nabrała ścieżka syntezy acetylocholino, której poziom wzrósł ponad 2-krotnie (Ryc. 7 A). Wydzielanie ACh w nieróżnicowanych komórkach SN56 wyniosło 44.7 pmol/min/mg białka, zaś w komórkach SN56 różnicowanych przekroczyło wartość 100.0 pmol/min/mg białka (Ryc. 7 A-B). Morfologicznie obserwowano liczne połączenia międzykomórkowe przypominające sieć neuronalną. Ponadto, w stosunku do komórek nieróżnicowanych (SN56 KN), w komórkach różnicowanych (SN56 KR) zahamowaniu uległa ich proliferacja. (Ryc. 6). Zwiększona synteza acetylocholino w SN56KR skutkowała obniżeniem dostępności acetylo-CoA, a w efekcie obniżeniem poziomu *N*-acetyloasparagianu (Ryc. 8 A-B).



Ryc. 7. Wpływ czynników różnicujących na poziom (A) i wydzielanie (B) acetylocholino w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Ryc. 8. Wpływ czynników różnicujących na poziom acetylo-CoA (A) i *N*-acetyloasparagininianu (B) w komórkach neuronalnych SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-9 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$; SN56 KN (&&) $p < 0.01$.

Ze względu na brak istotnych różnic pomiędzy punktami eksperymentalnym zawierającymi 1 $\mu\text{mol/L}$ RA wraz z 0.5 mmol/L bądź 1 mmol/L db-cAMP, w dalszej części pracy różnicowanie komórek SN56 wywoływano 48 godziną hodowlą wstępną, zawierającą 1 $\mu\text{mol/L}$ kwas *trans*-retinowy i 0.5 mmol/L dibutyrylo-cAMP.

Różnicowane komórki SN56 wykazują szereg istotnych różnic w wewnątrzkomórkowym metabolizmie acetylo-CoA (Tabela 1). Pomimo braku zmian w aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, całkowity poziom dostępnego acetylo-CoA uległ istotnemu statystycznie obniżeniu, z poziomu 27.3 (SN56 KN) do 23.2 (SN56 KR) pmol/mg białka. 33% redukcję tego metabolitu obserwowano w cytoplazmatycznym przedziale komórkowym przy braku zmian w poziomie acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym komórek SN56 (Tabela 1). Wzrost ekspresji fenotypu cholinergicznego nie wpływał znacząco na aktywność syntazy cytrynianowej, a poziom ATP wynosił niezmiennie 17.6 nmol/mg białka (Tabela 1). Pomimo braku zmian w aktywności *N*-acetylotransferazy asparagininianowej (około 68.5 pmol/min/mg białka), poziom NAA wynoszący w SN56 KN 70.2 nmol/mg białka, w wyniku różnicowania spadł średnio o 20%. Wspomnianemu spadkowi cytoplazmatycznego poziomu acetylo-CoA towarzyszyło ponad 2-krotne zwiększenie aktywności acetylotransferazy cholinowej, z niemal tożsamym wzrostem poziomu oraz wydzielania acetylocholin (Tabela 1).

Tabela 1. Wartości parametrów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w nieróżnicowanych (KN) oraz różnicowanych (KR) komórkach SN56.

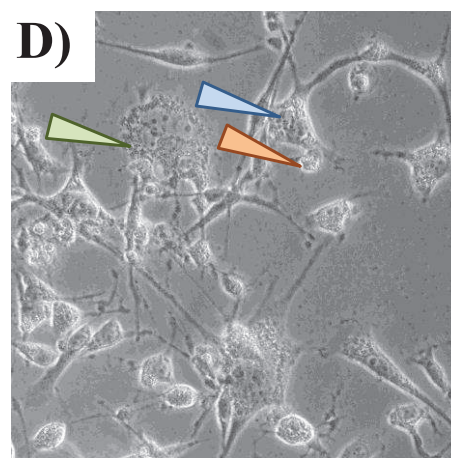
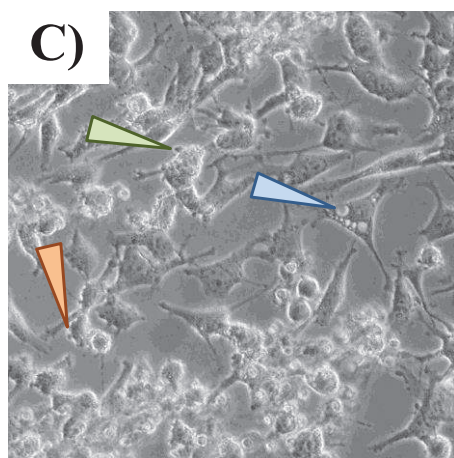
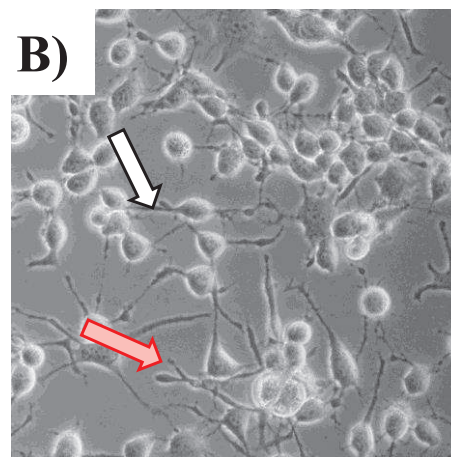
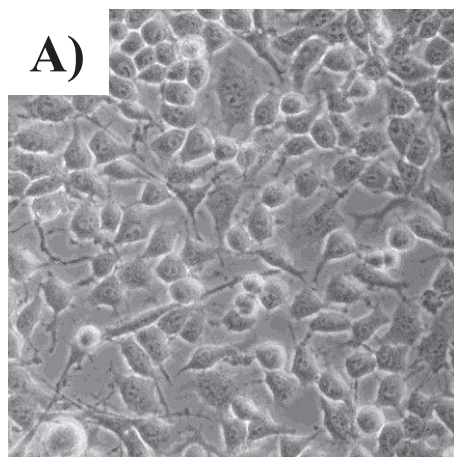
PARAMETR	SN56 KN	SN56 KR
Dehydrogenaza mleczanowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)	1895 ±332	1522 ±257
Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (<i>nmol/min/mg białka</i>)	6.0 ±0.6	5.2 ±0.5
Acetylo-CoA całkowity (<i>pmol/mg białka</i>)	27.3 ±0.1	23.2 ±0.3 ^{&&}
Acetylo-CoA mitochondrialny (<i>pmol/mg białka</i>)	12.2 ±0.8	13.4 ±0.4
Acetylo-CoA cytoplazmatyczny (<i>pmol/mg białka</i>)	18.4 ±0.5	12.3 ±1.6 ^{&&}
Syntaza cytrynianowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)	101.7 ±12.1	117.0 ±11.2
ATP (<i>nmol/mg białka</i>)	17.6 ±0.2	17.6 ±1.5
Acetylotransferaza cholinowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)	0.10 ±0.01	0.23 ±0.02 ^{&&&}
Acetylocholina (<i>pmol/mg białka</i>)	263.1±41.7	523.9 ±96.2 ^{&}
Acetylocholina-wydzielanie (<i>pmol/min/mg białka</i>)	44.7 ±1.9	101.3 ±6.9 ^{&&&}
<i>N</i> -acetylotransferaza asparaginianowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)	0.066 ±0.005	0.069 ±0.006
<i>N</i> -acetyloasparaginian (<i>nmol/mg białka</i>)	70.2 ±1.8	56.2 ±1.1 ^{&&&}

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od SN56 KN: [&]p<0.05, ^{&&}p<0.01, ^{&&&}p<0.001.

5.2. Zależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego przewlekła neurotoksyczność Zn w komórkach SN56

Chroniczny wpływ Zn na neuronalne komórki SN56 oceniano mierząc parametry związane z ich żywotnością oraz metabolizmem acetylo-CoA. Zarówno czas inkubacji, jak i stężenie chlorku cynku (zamiennie: donor jonów cynku, Zn) wyznaczono eksperymentalnie. Morfologicznie, w wyniku ekspozycji różnicowanych komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn obserwowano zahamowanie proliferacji komórkowej. Ponadto komórki były obkurczone, a ich błony komórkowe ulegały deformacji. Wewnątrz komórek obserwowano liczne wodniczki oraz ziarnistości. Utworzone w wyniku różnicowania połączenia międzykomórkowe zastały przerwane (Ryc. 9 A-D).

Poza zmianami morfologicznymi odnotowano zwiększoną aktywność LDH w pożywce, z jednoczesnym zwiększeniem frakcji komórek pochłaniających błękit trypanu (Ryc.10 B-C). Całości towarzyszy zależny od stężenia Zn wzrost poziomu wapnia całkowitego (Ryc. 11 B), spadek liczby komórek (Ryc. 10 A) oraz deprecjacja poziomu ATP (Ryc. 17 A) (patrz → podrozdziały 5.2.1 i 5.2.4). Prezentowane zmiany parametrów żywotności komórek SN56 każdorazowo były większe w przypadku różnicowanych komórek SN56. Uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej przedstawiono w zależności od stężenia Zn dodanego do środowiska hodowlanego (Ryc. 10 C) bądź zakumulowanego wewnątrz komórek SN56 (Ryc. 10 D). Dwie metody prezentacji pozwalają uwzględnić efekt buforujący albuminy, jako istotnego składnika 10% surowicy bydlęcej (FBS). Z ubiegłych badań zespołu Zakładu Medycyny Laboratoryjnej (ZML) wynika, iż w niskobiałkowym środowisku hodowlanym zawierającym 1% suplement N2, neurotoksyczny efekt Zn obserwowano już przy 0.02 mmol/L stężeniu chlorku cynku. Znaczący toksyczny efekt Zn w eksperymentach z zastosowaniem FBS obserwowano w stężeniach powyżej 0.1 mmol/L Zn (Ronowska et al., 2007). Ponadto z doniesień literaturowych wynika, że środowisko hodowlane zawierające FBS wykazuje wysokie powinowactwo do jonów cynku, zmniejszając jego poziom ze stężeń milimolowych nawet do nanomolowych (Haase et al., 2015). W związku z tym, w niniejszym badaniu zmierzono zakumulowany wewnątrzkomórkowo całkowity poziom Zn. Toksyczny efekt donora cynku był niezależny od ekspresji fenotypu cholinergicznego oraz wzrastał wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowej akumulacji Zn (Ryc. 10 D).



⇨ połączenia międzykomórkowe

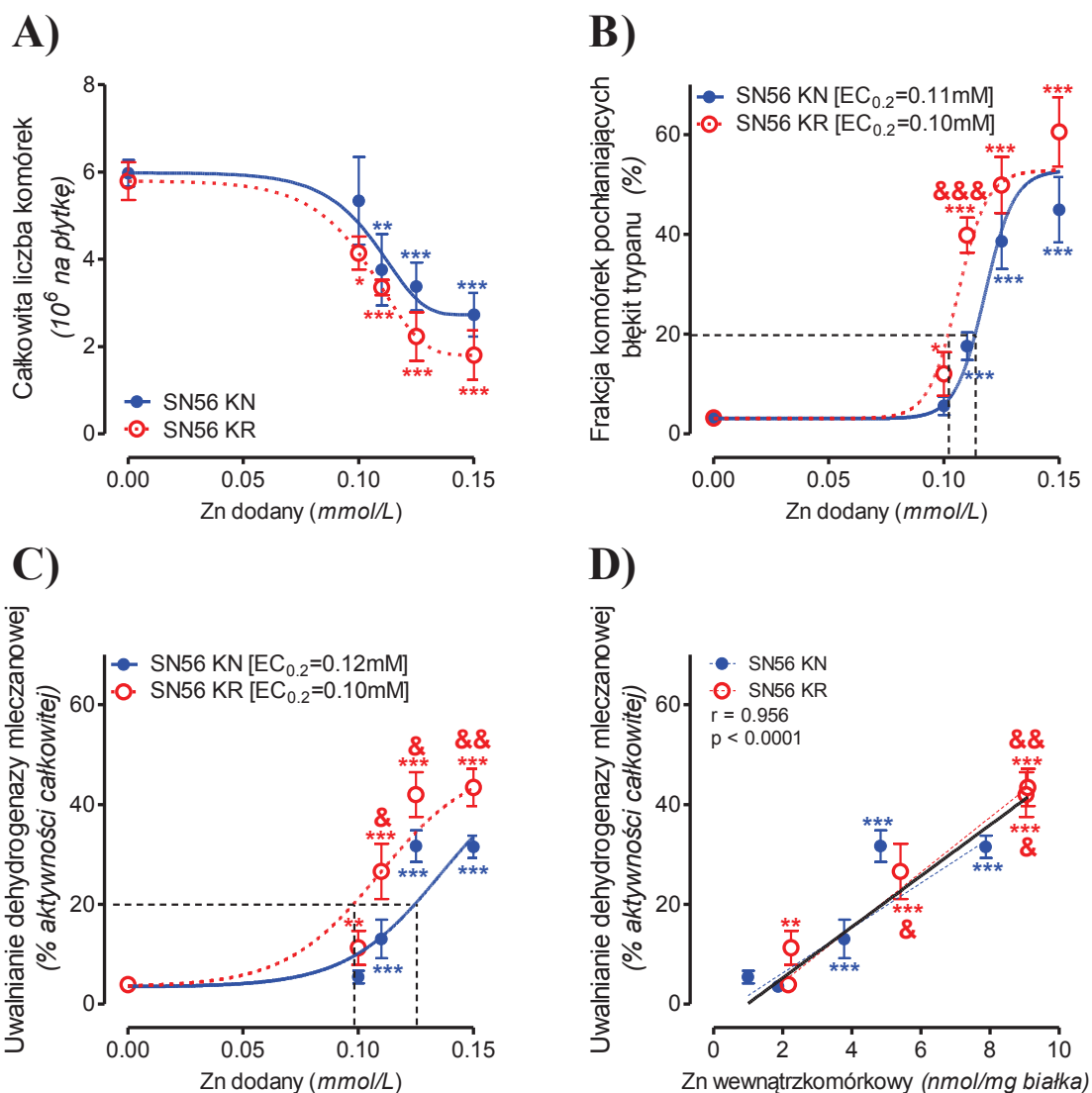
⇨ wypustka nerwowa

⇨ wodniczki

⇨ deformacja błony komórkowej

⇨ ziarnistości

Ryc. 9. Morfologia komórek SN56: A) komórki nieróżnicowane; B) komórki różnicowane; C) komórki nieróżnicowane poddane chronicznemu działaniu 0.15 mmol/L Zn; D) komórki różnicowane poddane chronicznemu działaniu 0.15 mmol/L Zn. Zdjęcia są reprezentatywne dla 5 doświadczeń.

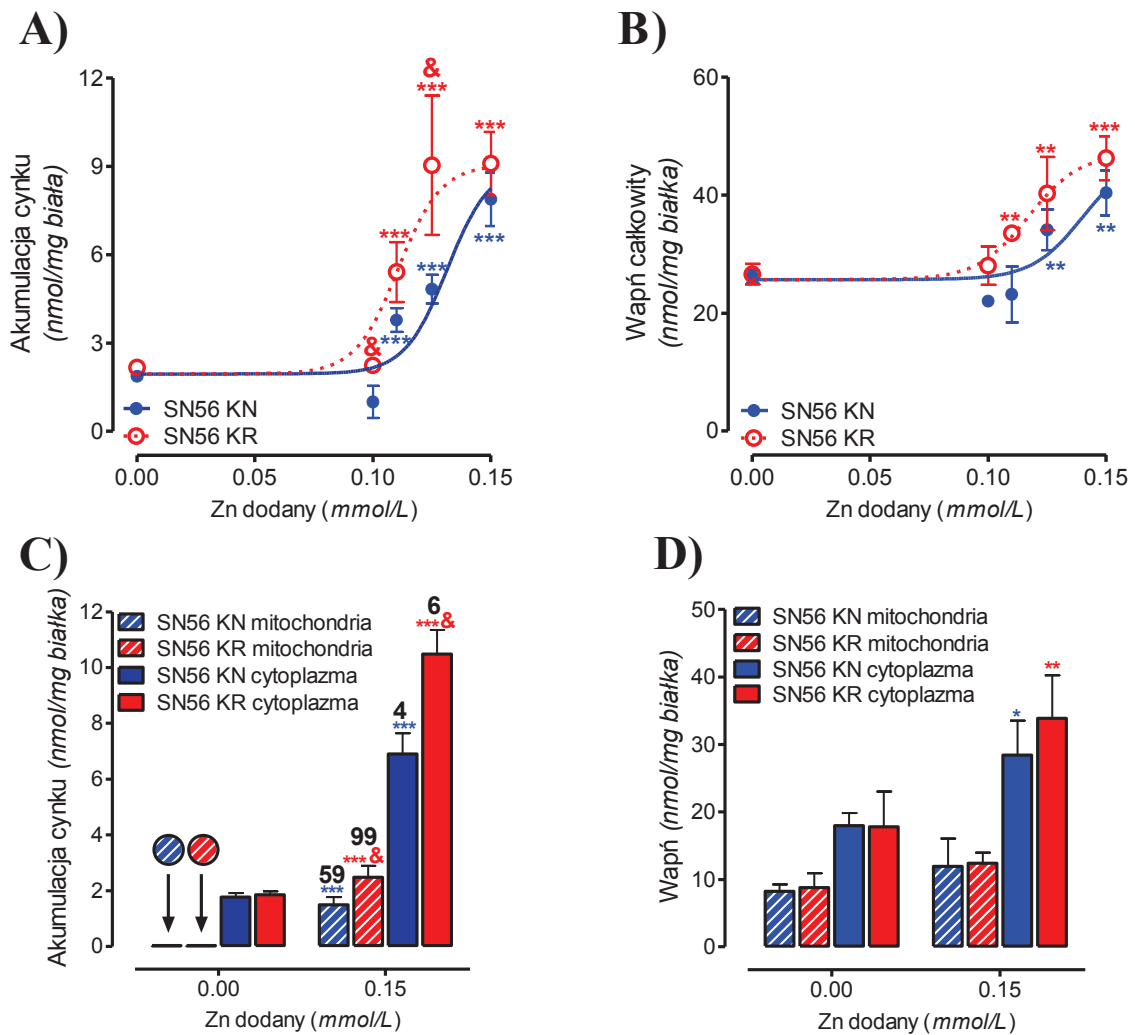


Ryc. 10. Zależny od stężenia przewlekły wpływ Zn na liczbę oraz stopień uszkodzenia nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórek SN56. A) Całkowita liczba komórek; B) Frakcja komórek uszkodzonych C-D) Frakcyjna aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 4-10 doświadczeń. Znamiennie różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$).

5.2.1. Akumulacja cynku i wapnia w komórkach SN56 przewlekłe ekspozycyjnych na Zn (0-0.15 mmol/L)

W schemacie przewlekłego wpływu Zn analizowano akumulację cynku oraz wapnia jako pośrednie parametry toksyczności. Wraz ze wzrostem dodawanego do środowiska hodowlanego donora cynku rosła akumulacja zarówno Zn, jak i Ca (Ryc. 11 A-B). I tak, poziom Zn w komórkach SN56 KR i SN56 KN oscylował w granicach 2 nmol/mg białka, z czego około 1% (czyli 0.025 nmol Zn /mg białka) znajdowało

się we frakcji mitochondrialnej (Ryc. 11 A,C). 24-ro godzinna hodowla komórek w obecności 0.15 mmol/L Zn czterokrotnie zwiększała zawartość Zn w całych komórkach (Ryc. 11 A,C). Natomiast we frakcji cytoplazmatycznej poziom Zn wzrastał 4 krotnie (SN56 KN) tudzież 6 krotnie (SN56 KR). Z drugiej strony, poziom Zn we frakcji mitochondrialnej wzrósł aż 59 krotnie (tj. 1.49 nmol Zn/mg białka dla SN56 KN) bądź 99 krotnie (tj. 2.48 nmol Zn/mg białka dla SN56 KR) (Ryc. 11 A,C).

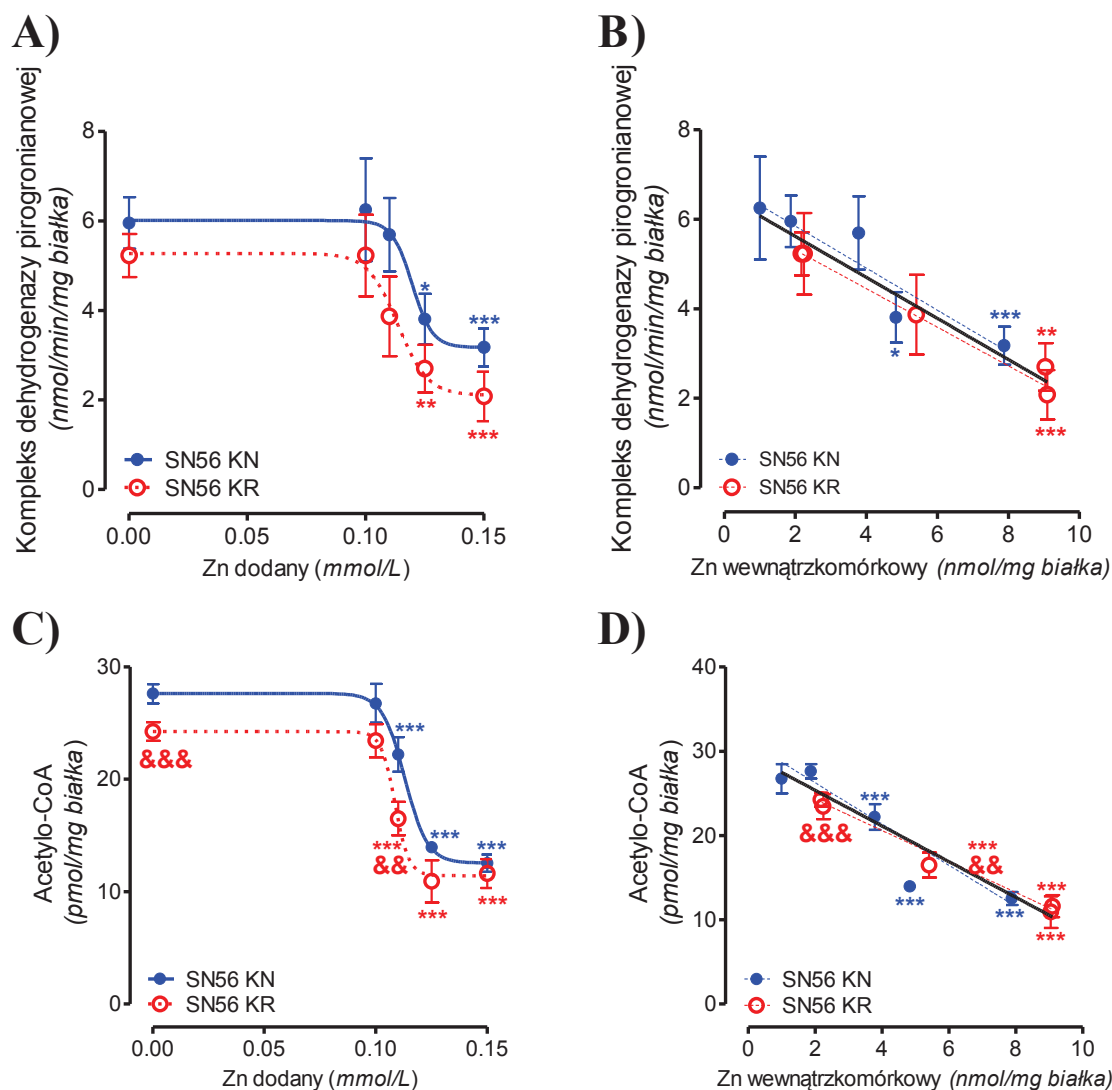


Ryc. 11. Akumulacja cynku (A,C) oraz wapnia (B,D) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56 przewlekłe eksponowanych na Zn (0-0.15 mmol/L). Poziom jonów oznaczano w całych komórkach (A-B) oraz ich przedziałach komórkowych (C-D). Wyniki są wartościami \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$).

Całkowita zawartość wapnia w SN56 KN wyniosła 26.0 nmol/mg białka, zaś w SN56 KR 26.4 nmol/mg białka, z czego około 30% stanowił wapń oznaczony we frakcji mitochondrialnej. Ekspozycja komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn zwiększyła całkowity poziom wapnia o 54% (SN56 KN) oraz 74% (SN56 KR) (Ryc. 11 B). Zawartość wapnia we frakcji mitochondrialnej ponownie stanowiła około 30% całkowitej puli Ca. Z drugiej strony, poziom Ca we frakcji mitochondrialnej z kontrolnego poziomu 8.3 nmol/mg białka (SN56 KN) tudzież 8.8 nmol/mg białka (SN56 KR) wzrósł do 11.9 nmol/mg białka (SN56 KN) oraz 12.4 (SN56 KR). Ekspozycja komórek SN56 na 0.15 mmol/l Zn zwiększała poziom wapnia we frakcji cytoplazmatycznej o 60% (SN56 KN) bądź 90% (SN56 KR), niezależnie od stopnia zróżnicowania komórek SN56 (Ryc. 11 D). Analizując przebieg krzywej akumulacji Zn dla SN56 KN i SN56 KR zauważono, że pomimo zbliżonych wartości skrajnych wykresu, wartości akumulacji w pośrednich punktach stężeniowych znacząco różnią się w zależności od ekspresji fenotypu cholinergicznego. Analogiczną sytuację zaobserwowano podczas analizy zmian wewnątrzkomórkowego poziomu Ca (Ryc. 11).

5.2.2. Chroniczny wpływ lipoamidu i Zn na produkcję acetylo-CoA

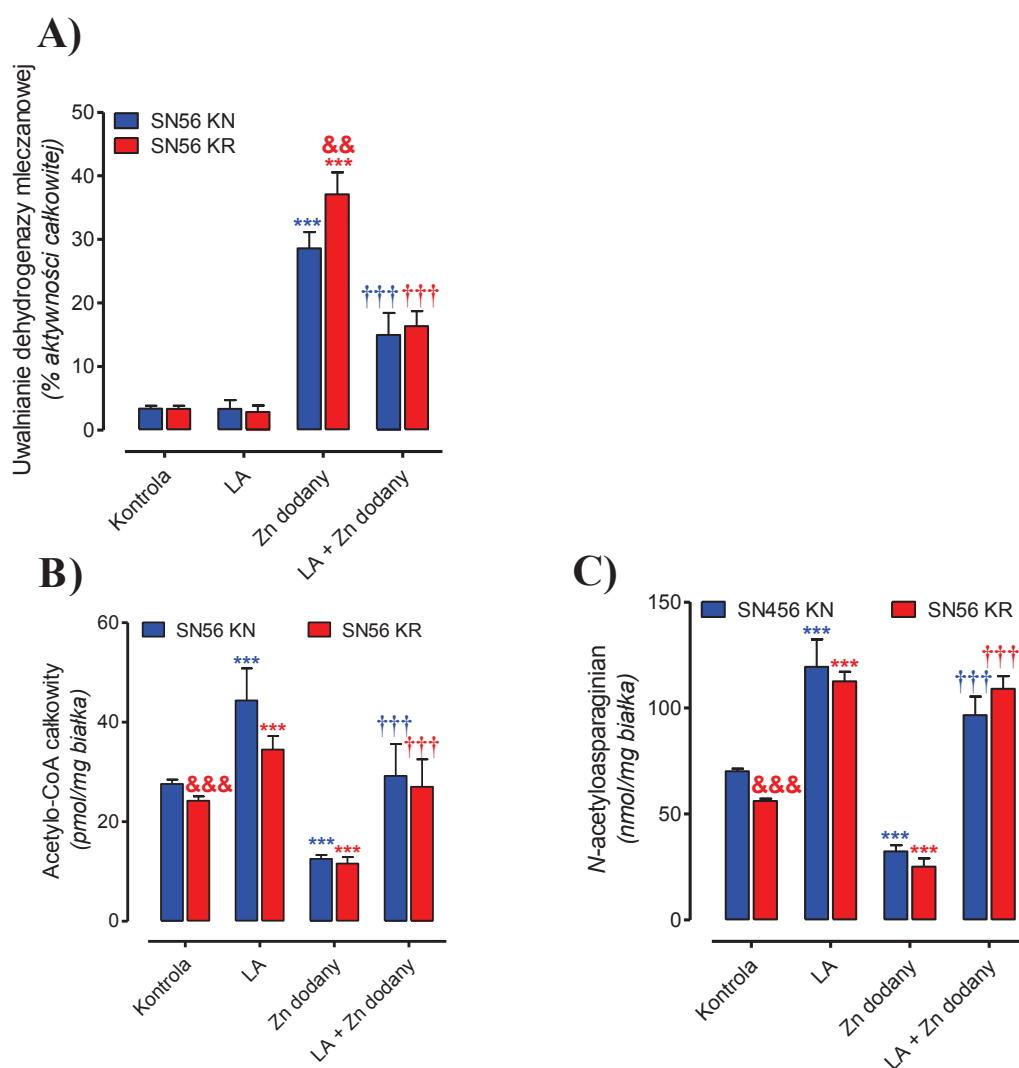
W wyniku inkubacji komórek SN56 z donorem Zn w stężeniach powyżej 0.11mmol/L, aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) oraz poziom całkowitego acetylo-CoA ulegają zależnemu od stężenia Zn obniżeniu (Ryc. 12). Aktywność PDHC w warunkach kontrolnych wynosiła 6.0 (SN56 KN) oraz 5.2 nmol/min/mg białka (SN56 KR). Chroniczna ekspozycja na chlorek cynku spowodowała inhibicję PDHC w SN56 KN i SN56 KR odpowiednio o 47 i 60% (Ryc. 11 A-B). W przypadku acetylo-CoA w komórkach nieróżnicowanych poziom acetylo-CoA wynosił 27.3 pmol/mg białka, podczas gdy w komórkach różnicowanych poziom metabolitu wyniósł 23.3 pmol/mg białka (Tabela 1, Ryc. 11 C-D). Chroniczna ekspozycja SN56 KN i SN56KR na 0.15 mmol/L Zn wywołała ponad 50% redukcję poziomu acetylo-CoA (Ryc. 11 C-D). Wyznaczenie zależności poziomu acetylo-CoA oraz aktywności PDHC do poziomu zakumulowanego Zn potwierdziło, że toksyczny efekt Zn na te parametry jest zależny od poziomu Zn zakumulowanego wewnątrz komórki.



Ryc. 12. Przewlekły wpływ Zn (0-0.15 mmol/L) na (A-B) aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz (C-D) całkowity poziom acetylo-CoA nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z maksymalnie 3 -10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (&& $p < 0.01$).

Amid kwasu liponowego (LA) jest niezbędnym kofaktorem PDHC (patrz \rightarrow podrozdział 2.5). Ekspozycja nieróżnicowanych komórek SN56 na cytotoksyczne stężenie Zn w obecności LA zmniejszyło frakcyjną aktywność LDH w pożywce z 31.3% do 17.2%. Równolegle, w SN56 KR zmiany wynosiły odpowiednio 43.4% oraz 16.4% (Ryc. 13 A). Hodowla neuronalnych komórek SN56 w środowisku suplementowanym lipoamidem znamienne zwiększyła poziom acetylo-CoA (SN56 KN: 61%; SN56 KR: 42%). Analogiczną zmianą w tych warunkach odznaczał się poziom NAA, wzrósł o 70% (SN56 KN) oraz 100% (SN56 KR). Pre-inkubacja komórek

z LA zabezpieczała komórki przed toksycznym wpływem Zn na poziom acetylo-CoA zarówno w SN56 KN jak i SN56 KR (Ryc. 13 B). W przypadku NAA, obecność lipoamidu zwiększyła dostępność tego metabolitu ponad 2 (KN) oraz 3-krotnie (KR), w stosunku do poziomu obserwowanego w komórkach poddanych przewlekłemu działaniu cynku (Ryc. 13 C). Potwierdza to słuszność założenia, że lipoamid mógłby stanowić suplement diety zabezpieczający metabolizm energetyczny mózgu, przeznaczony dla pacjentów cierpiących z powodu rozwoju AD.



Ryc. 13. Wpływ amidu kwasu liponowego i Zn na frakcyjną aktywność dehydrogenazy mleczanowej w pożywce (A), poziom acetylo-CoA (B) oraz N-acetyloasparaginianu (C) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od : kontroli ($p^{***}<0.001$), 0.15 mmol/L Zn ($\dagger\dagger\dagger p<0.001$); SN56 KN ($\&\& p<0.01$, $\&\&\& p<0.001$). *Skróty*: LA: 0.12 mol/L amid liponowego, Zn dodany: 0.15 mmol/L chlorek cynku.

5.2.3. Ocena jakości rozdziału frakcji mitochondrialnej komórek SN56

W neuronach cholinergicznym, acetylo-CoA zużywany jest w dwóch przedziałach komórkowych: mitochondrialnym oraz cytoplazmatycznym. Dostępność tego metabolitu w przedziale mitochondrialnym warunkuje poziom produkcji energii, natomiast w przedziale cytoplazmatycznym efektywność neuroprzebieżności. W związku z tym, oznaczenie zmian dostępności acetylo-CoA w przedziałach komórkowych ma kluczowe znaczenie w niniejszej pracy. W celu oznaczenia poziomu metabolitu w przedziałach komórkowych zastosowano wirówkową metodę rozdziału frakcji, poprzedzoną 30-sio sekundową inkubacją zawiesiny komórkowej z digitoniną (surfaktant niejonowy) (patrz → podrozdział 4.4.4). Aby ocenić jakość rozdziału oznaczano aktywność enzymów uznanych za markery: mitochondrialny i cytoplazmatyczny. I tak, czystość frakcji cytozolowej potwierdzano oznaczając aktywność enzymu mitochondrialnego (syntaza cytrynianowa), czystość frakcji mitochondrialnej oceniono zaś na podstawie aktywności enzymu cytoplazmatycznego (dehydrogenaza mleczanowa). Czystość badanej frakcji mitochondrialnej wynosiła średnio 85%, zaś zanieczyszczenie frakcji cytoplazmatycznej nie przekroczyło wartości 20% (Tabela 2). Równocześnie zauważono, że zarówno syntaza cytrynianowa, jak i dehydrogenaza mleczanowa nie ulegały supresji jonami cynku.

Tabela 2. Aktywność enzymów w przedziałach komórkowych komórek SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego

PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
Syntaza cytrynianowa (<i>nmol/min/mg białka</i>)				
Aktywność w komórkach SN56	101.7 ±12.1	103.7 ±7.0	117.0 ±11.2	101.5 ±5.5
Aktywność mitochondrialna	83.8 ±8.4	74.9 ±6.9	86.6 ±8.9	68.9 ±5.5
Aktywność cytoplazmatyczna	17.9 ±4.0	28.8 ±2.1	30.4 ±7.0	32.6 ±3.6
Aktywność mitochondrialna (% całkowitej aktywności)	83	72	74	68

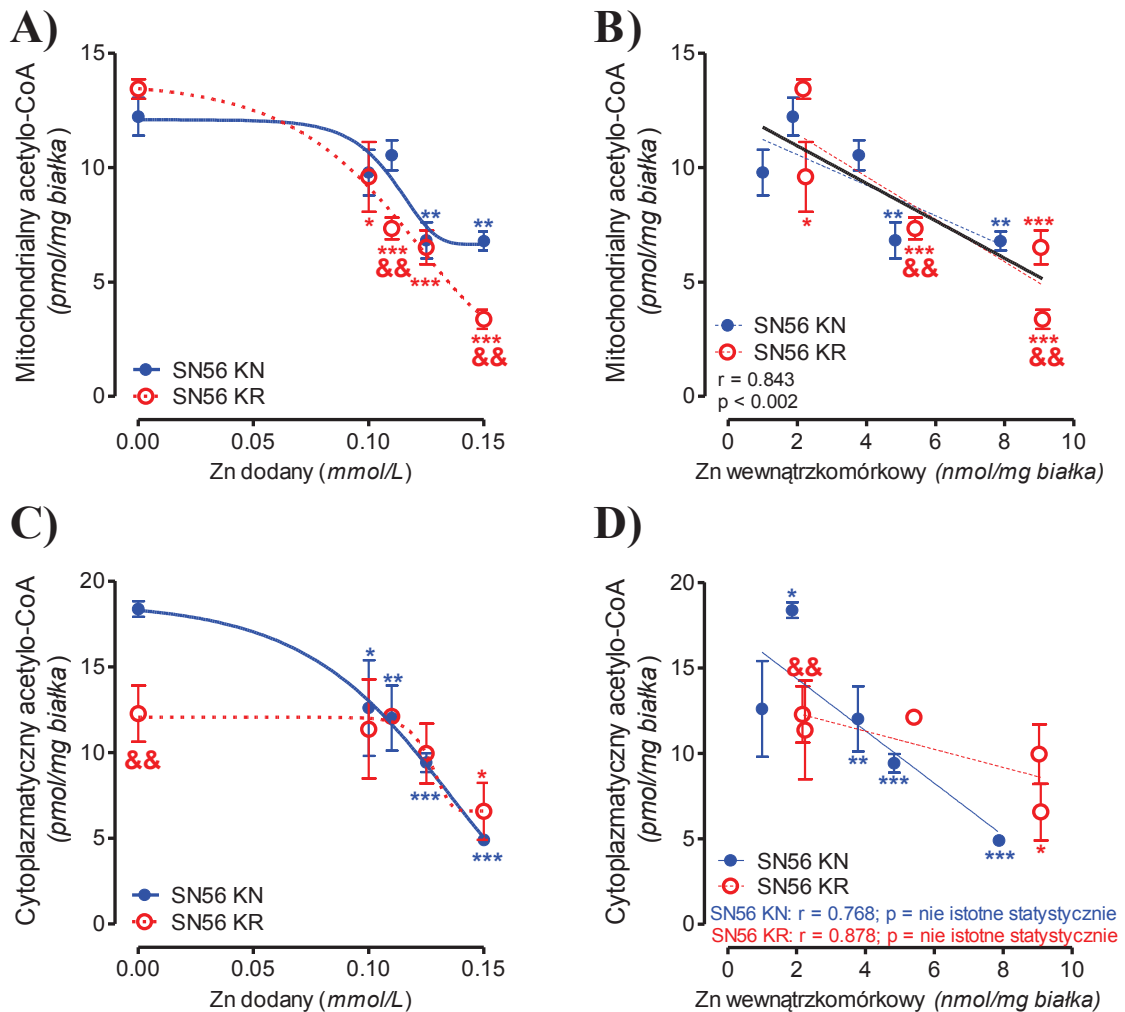
PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
Dehydrogenaza mleczanowa (nmol/min/mg białka)				
Aktywność w komórkach SN56	1 895 ±332	1 609 ±303	1 522 ±257	1 337 ±202
Aktywność mitochondrialna	213 ±32	274 ±60	209 ±19	249 ±37
Aktywność cytoplazmatyczna	1 682 ±340	1 335 ±305	1 313 ±257	1 089 ±205
Aktywność cytoplazmatyczna (% całkowitej aktywności)	89	83	86	81

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); SN56 KN (&p<0.05, &&p<0.01).

5.2.4. Chroniczny wpływ Zn na poziom acetylo-CoA w przedziałach komórkowych

W neuronalnych komórkach SN56 poziom acetylowanego CoA we frakcji mitochondrialnej, zarówno w komórkach różnicowanych, jak i nieróżnicowanych, waha się w zakresie 12-13 pmol/mg białka (Ryc. 14 A). Zmiany poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA są ściśle zależne od poziomu Zn zakumulowanego wewnątrz badanych komórek (Ryc. 14 B). Początkowo zbliżone poziomy kontrolne acetylo-CoA, wraz z narastającym stężeniem Zn ulegają stopniowo odmiennemu procentowo spadkowi. Ostatecznie, 0.15 mmol/L Zn powodował spadek badanego metabolitu o 45% (SN56 KN) i 75% (SN56 KR). Różnicowane komórki SN56 mają niższy poziom acetylo-CoA w cytoplazmie niżeli komórki nieróżnicowane, co najprawdopodobniej jest związane z intensyfikacją cytoplazmatycznej produkcji acetylocholin (Tabela 1). Z drugiej strony, w cytoplazmie komórek nieróżnicowanych eksponowanych na wzrastające stężenia cynku obserwowano znacznie silniejszą deprecjację poziomu acetylo-CoA, niżeli w komórkach różnicowanych. Przepuszczalnie, poziom około 5 pmol/mg białka we frakcji cytoplazmatycznej jest wartością skrajną niezbędną do przeżycia komórki, stąd nie obserwujemy różnic pomiędzy

subkulturami komórkowymi. W świetle tego przypuszczenia odmienne nachylenie prostej przedstawionej na rycinie 14 D nie zdaje się być zaskakujące.



Ryc. 14. Wpływ Zn na poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym (A-B) oraz cytoplazmatycznym (C-D) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (&& $p < 0.01$).

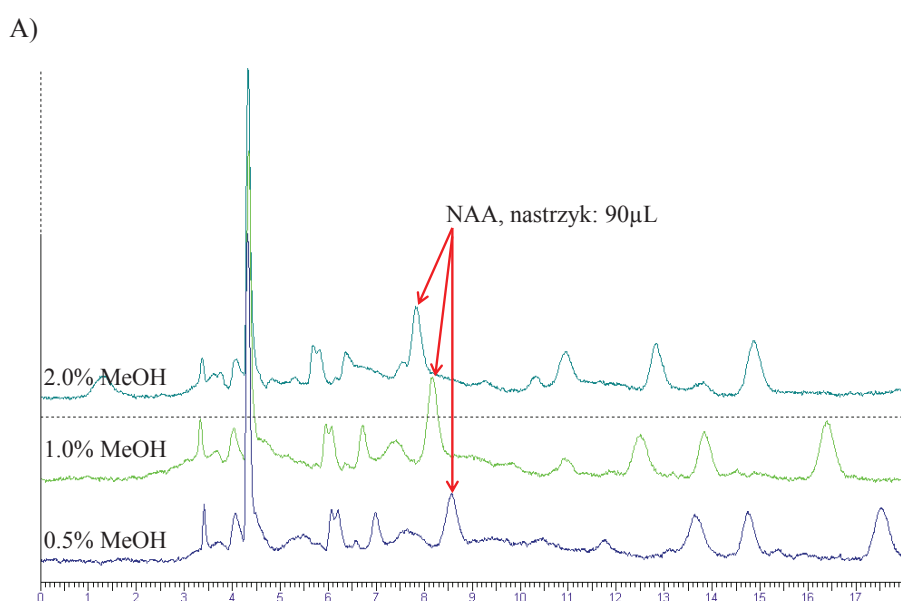
5.2.5. Optymalizacja oznaczenia poziomu *N*-acetyloasparagianu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz

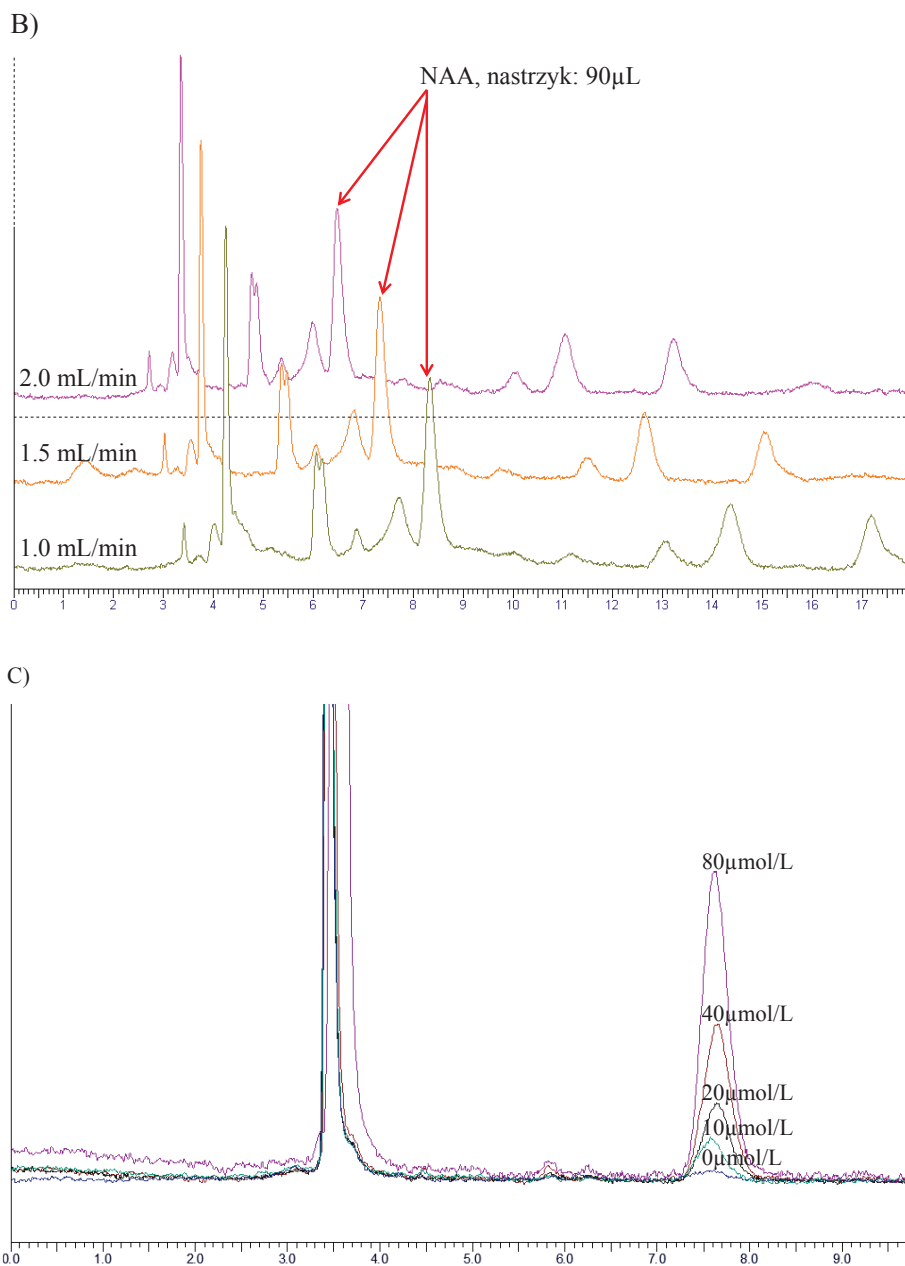
Pierwsze raporty identyfikujące *N*-acetyloasparagian (NAA) w mózgu pochodzą z 1956r. (Tallan et al., 1956). Pomimo upływu lat, wiedza na temat NAA i jego metabolizmu wzrosła nieznacznie. Jednocześnie, ze względu na dużą potencjalną aplikacyjność kliniczną parametru, istnieje zapotrzebowanie na wyjaśnienie mechanizmów rządzących produkcją NAA. W konsekwencji, w niniejszej pracy analizie poddano neurotoksyczny wpływ Zn na poziom *N*-acetyloasparagianu oraz innych parametrów związanych z jego produkcją.

Pierwszą opisaną metodę oznaczenia zawartości NAA opartą o chromatografię cieczową zaprezentował Kerry J. Koller w 1956r. W niniejszej pracy zaproponowano modyfikację tej metody. Do rozdzału chromatograficznego zastosowano kolumnę C18-RP HPLC ze zwiększoną odpornością na zapadanie się fazy stacjonarnej (tzw. *phase collapse*) będące efektem wysokiej zawartości wody w fazie ruchomej.

W fazie ruchomej, zachowano rdzenne stężenie kwasu ortofosforowego (0.1%), jednakże całość wzbogacono o metanol. Badano wpływ metanolu w zakresie stężeń 0-5% na jakość rozdzału. W stężeniach poniżej 0.5% oraz powyżej 1% pik *N*-acetyloasparagianinu był słabo izolowany od pozostałych pików obrazujących pozostałe składniki mieszaniny. W 1% metanolu, pik NAA pozostawał smukły i wysoki. Ponadto, opisany pik pochodzący od NAA był wyraźnie odizolowany od pików reprezentujących pozostałe składniki mieszaniny (Ryc. 15 A). W związku z tym, w dalszych etapach pracy zastosowano fazę ruchomą zawierającą 0.1% kwasu ortofosforowego, 1% metanolu oraz wodę.

W kolejnym etapie optymalizacji poddano czas przepływu. Analizując uzyskane czasy retencji oraz obraz chromatogramu zauważono, że szybkość przepływu powyżej 1.0 mL/min powodowała znaczące skrócenie czasu retencji i towarzyszące mu stopniowe łączenie się piku NAA z pikiem sąsiadującym (Ryc. 15 B). W efekcie zaprezentowane w dalszej części pracy wyniki poziomu NAA badane były metodą C18-RP-HPLC z przepływem 0.9 mL/min. Krzywa kalibracyjna, względem której mierzono poziom NAA miała przebieg liniowy w zakresie stężeń 10-80 $\mu\text{mol/L}$ NAA (Ryc. 15 C).





Ryc. 15. Chromatogram HPLC nadsącza uzyskanego z komórek SN56 (stężenie próby: 0.6mg białka/mL) A) Wpływ procentowego udziału metanolu (0.5-1.5%) w fazie mobilnej na obraz rozdzielania chromatograficznego (obraz zarejestrowany dla prędkości przepływu 0.9 mL/min); B) Wpływ szybkości przepływu fazy mobilnej na obraz rozdzielania chromatograficznego (obraz zarejestrowany dla fazy mobilnej zawierającej 0.1% kwas ortofosforowy / 1% metanol / woda); C) Krzywa kalibracyjna w zakresie stężeń 10-80µmol/L zarejestrowana w warunkach rozdzielania z prędkością przepływu 0.9 mL/min i o składzie fazy mobilnej: 0.1% kwas ortofosforowy / 1% metanol / woda. Obrazy są reprezentatywne dla doświadczeń wykonywanych w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej w latach 2011-2015).

5.2.6. Chroniczny wpływ Zn na subkomórkową lokalizację produkcji

N-acetyloasparagininu w komórkach SN56

Lokalizacja komórkowa *N*-acetylotransferazy asparagininowej (Asp-NAT), a co za tym idzie miejsce syntezy NAA, budzi wciąż wiele kontrowersji. W celu zbadania miejsca produkcji NAA w komórkach SN56 zmierzono zarówno aktywność Asp-NAT, jak i poziom NAA w przedziałach komórkowych (Tabela 3).

W komórkach nieeksponowanych na toksyczne stężenie Zn, we frakcji mitochondrialnej SN56 KN zlokalizowane było ponad 80% całkowitego NAA. W SN56 KR wartość ta przekraczała 90%. 0.15 mmol/L Zn obniżał poziom NAA o około 50 % zarówno w SN56 KN jak i SN56 KR.

W komórkach kontrolnych niemalże 90% całkowitej oznaczonej aktywności Asp-NAT zlokalizowane było we frakcji mitochondrialnej. Natomiast w punktach chronicznie eksponowanych na cytotoksyczne stężenie Zn, aktywność Asp-NAT we frakcji mitochondrialnej oscylowała w zakresie od 80% (SN56 KN) do 70% (SN56 KR) aktywności całkowitej tego enzymu (Tabela3).

Tabela 3. Subkomórkowa lokalizacja *N*-acetyloasparagininu oraz *N*-acetylotransferazy asparagininowej w komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego.

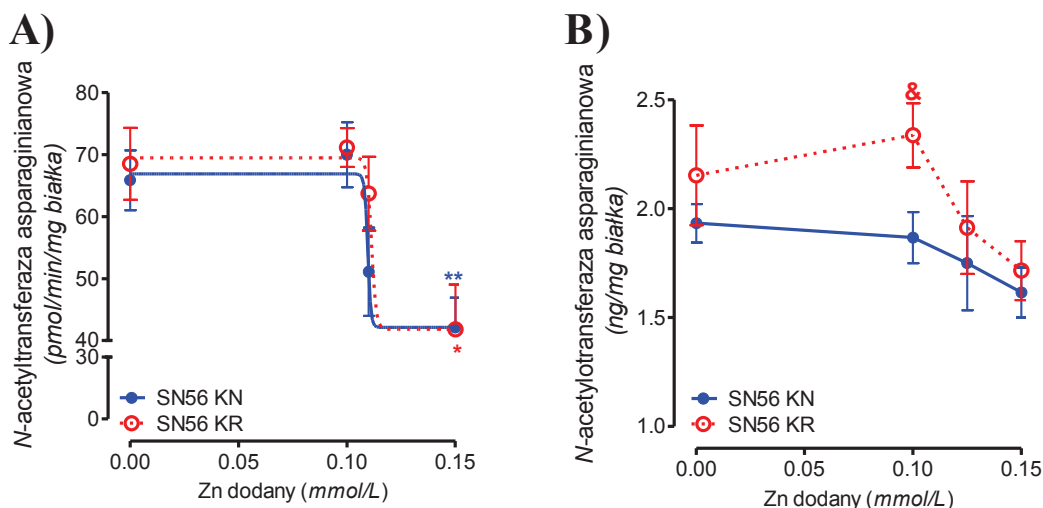
PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
<i>N</i> -acetyloasparaginin (nmol/mg białka)				
Poziom całkowity	70.2 ±1.2	32.5 ±1.3 ^{***}	56.2 ±1.1 ^{&&&}	27.1 ±3.9 ^{***}
Poziom mitochondrialny	57.0 ±1.8	26.3 ±2.2 ^{***}	49.2 ±1.6 ^{&&}	26.8 ±0.1 ^{***}
Poziom cytoplazmatyczny	14.8 ±3.5	4.4 ±2.1 [*]	5.4 ±0.9 ^{&}	2.5 ±0.7 [*]

PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
<i>N</i> -acetylotransferaza asparaginianowa (<i>pmol/min/mg białka</i>)				
Aktywność w komórkach SN56	65.9 ±4.8	42.1 ±4.8**	68.1 ±5.8	41.8 ±7.3*
Aktywność mitochondrialna	56.3 ±9.2	31.1 ±8.1*	55.5 ±11.0	27.8 ±7.5*
Aktywność cytoplazmatyczna	8.4 ±2.3	8.8 ±2.3	6.6 ±3.5	11.2 ±2.9

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$).

5.2.6.1. Chroniczny wpływ stężenia Zn na poziom i aktywność *N*-acetylotransferazy asparaginianowej

Aktywność Asp-NAT jest niezależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego i wynosi około 70 *pmol/min/mg* białka (Tabela 1, Tabela 3, Ryc. 16 B). Chroniczna ekspozycja komórek SN56 na Zn w stężeniach powyżej 0.1 mmol/L powodowała stopniowe obniżenie aktywności Asp-NAT. Ostatecznie, 24-ro godzinna hodowla komórek SN56 w obecności 0.15 mmol/L Zn wywołała znamienne spadki aktywności Asp-NAT o 36% (SN56 KN) oraz 39% (SN56bKR) (Tabela 3, Ryc. 16 B). Równocześnie odnotowano tendencję spadkową w komórkowym poziomie białka Asp-NAT. Przy czym, zmiany poziomu białka Asp-NAT były znacznie wyższe w komórkach SN56 KR i wyniosły około 20%.



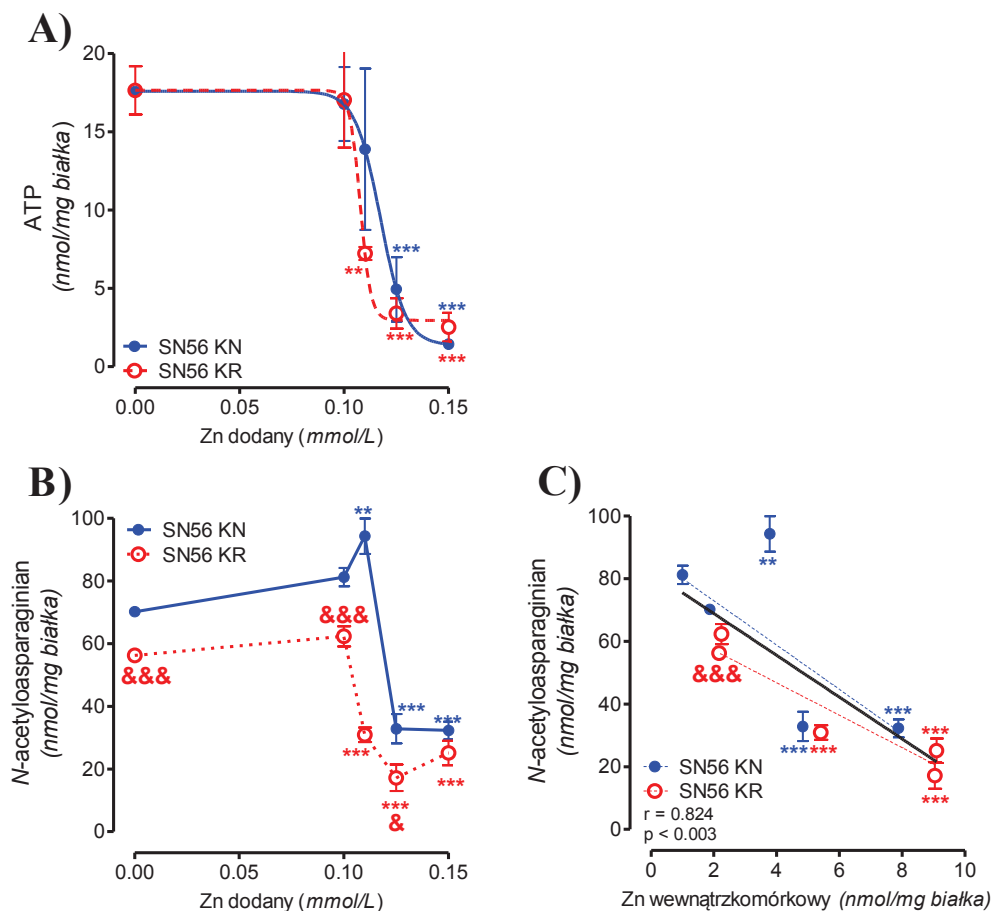
Ryc. 16. Zależna od stężenia Zn aktywność enzymu (A) oraz poziom białka (B) *N*-acetylotransferazy asparaginianowej w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$); SN56 KN (& $p < 0.05$).

5.2.6.2. Chroniczny wpływ stężenia Zn na poziom *N*-acetyloasparaginianu oraz ATP w komórkach SN56

Poziom ATP w warunkach kontrolnych nie różnił się pomiędzy różnicowanymi, a nieróżnicowanymi komórkami SN56 i wynosił 17.6 nmol/mg białka (Tabela 1, Ryc. 17 A). Ekspozycja na 0.1 mmol/L Zn nie wpływała na poziom tego metabolitu zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR. Z drugiej strony, analizując rycinę 17 A w punkcie 0.11 mmol/L Zn zauważono większą wrażliwość komórek SN56 KR na Zn. I tak, w komórkach różnicowanych zaobserwowano 60% spadek poziomu ATP, natomiast w komórkach nieróżnicowanych poziom tego metabolitu obniżył się o 21%. Zn w stężeniu 0.15 mmol/L powodował spadek poziomu ATP o około 90% zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR (Ryc. 17 A).

Poziom NAA w SN56 KN wyniósł 70.2 nmol/mg białka i był o 20% wyższy niżeli w komórkach różnicowanych (Tabela 1, Ryc. 17 B). Ponadto, różnica utrzymywała się w kolejnych punktach eksperymentalnych, w których przewlekłe ekspozycje komórek SN56 na wzrastające stężenia Zn. Natomiast przy ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn redukcja poziomu NAA w SN56 KN i SN56 KR wyniosła około 55%. Obniżenie poziomu dostępnego

NAA było niezależne od ekspresji fenotypu cholinergicznego i jednocześnie ściśle zależne od toksycznego efektu Zn zakumulowanego wewnątrz komórek (Ryc. 17 C).



Ryc. 17. Zależne od stężenia Zn poziomy ATP (A) oraz *N*-acetyloasparagininianu (B-C) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-22 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (&&& $p < 0.0001$).

5.2.7. Przewlekły wpływ Zn na poziom białek regulujących homeostazę wapnia w komórkach SN56

Zarówno produkcja, jak i zużycie acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym są pośrednio zależne od wewnątrzkomórkowej równowagi Ca. Zaburzenia homeostazy Ca mogą być wywoływane napływem jonów z otoczenia, jak również jego wewnątrzkomórkową dystrybucją pomiędzy poszczególnymi strukturami komórki. W początkowej fazie eksperymentów celowe wydało się sprawdzenie obecności analizowanych receptorów i kanałów odpowiedzialnych za transport Ca do wnętrza komórki,

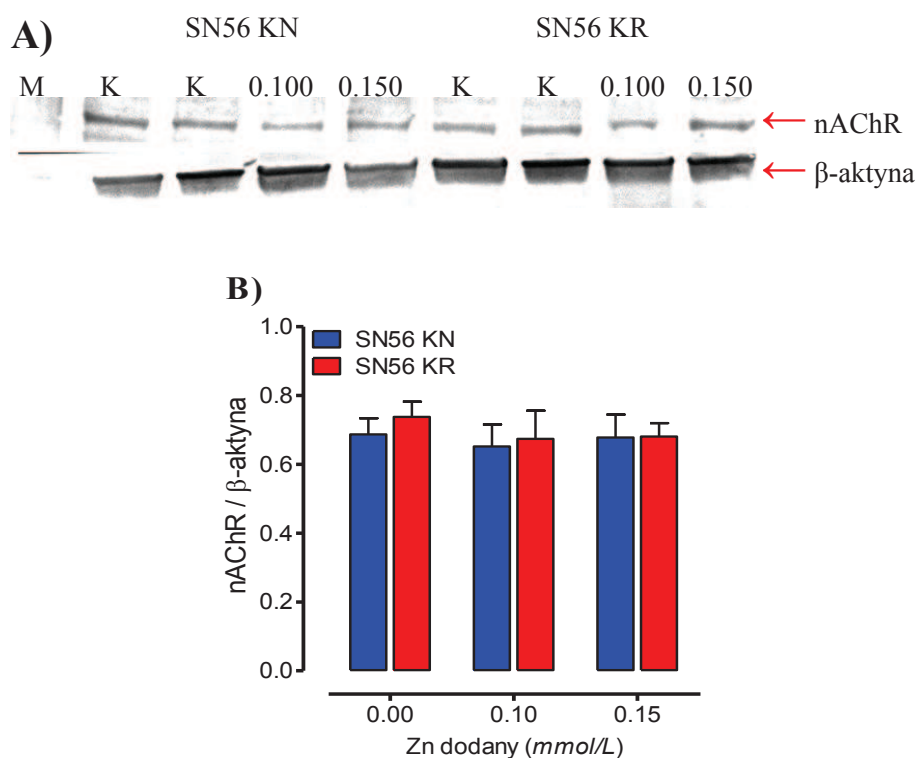
jak i regulujących jego poziom wewnątrzkomórkowy w komórkach SN56 oraz sprawdzenie czy ekspozycja komórek na 0.15 mmol/L Zn wpływa na poziom analizowanych białek.

W dalszej części pracy zbadano potencjalny regulatorowy wpływ białek uczestniczących w transporcie Ca na metabolizm acetylo-CoA i związane z nim zaburzenia metaboliczne oraz neuroprzebieżnicze komórek neuronalnych w warunkach cytotoksycznych. Białka regulujące wewnątrzkomórkową równowagę Ca oznaczono skrótem CaTR (*Calcium-Transport Regulation Proteins*).

5.2.7.1. Przewlekły wpływ Zn na poziom nikotynowego receptora acetylocholin w komórkach SN56

Nieróżnicowane i różnicowane komórki SN56 poddano przewlekłej ekspozycji na 0.1 mmol/L oraz 0.15 mmol/L chlorek cynku. W ten sposób sprawdzano, czy długookresowa ekspozycja komórek SN56 na Zn o niskim (nietoksycznym) oraz wysokim (toksycznym) stężeniu spowoduje zmiany ilościowe w białkach transportujących Ca.

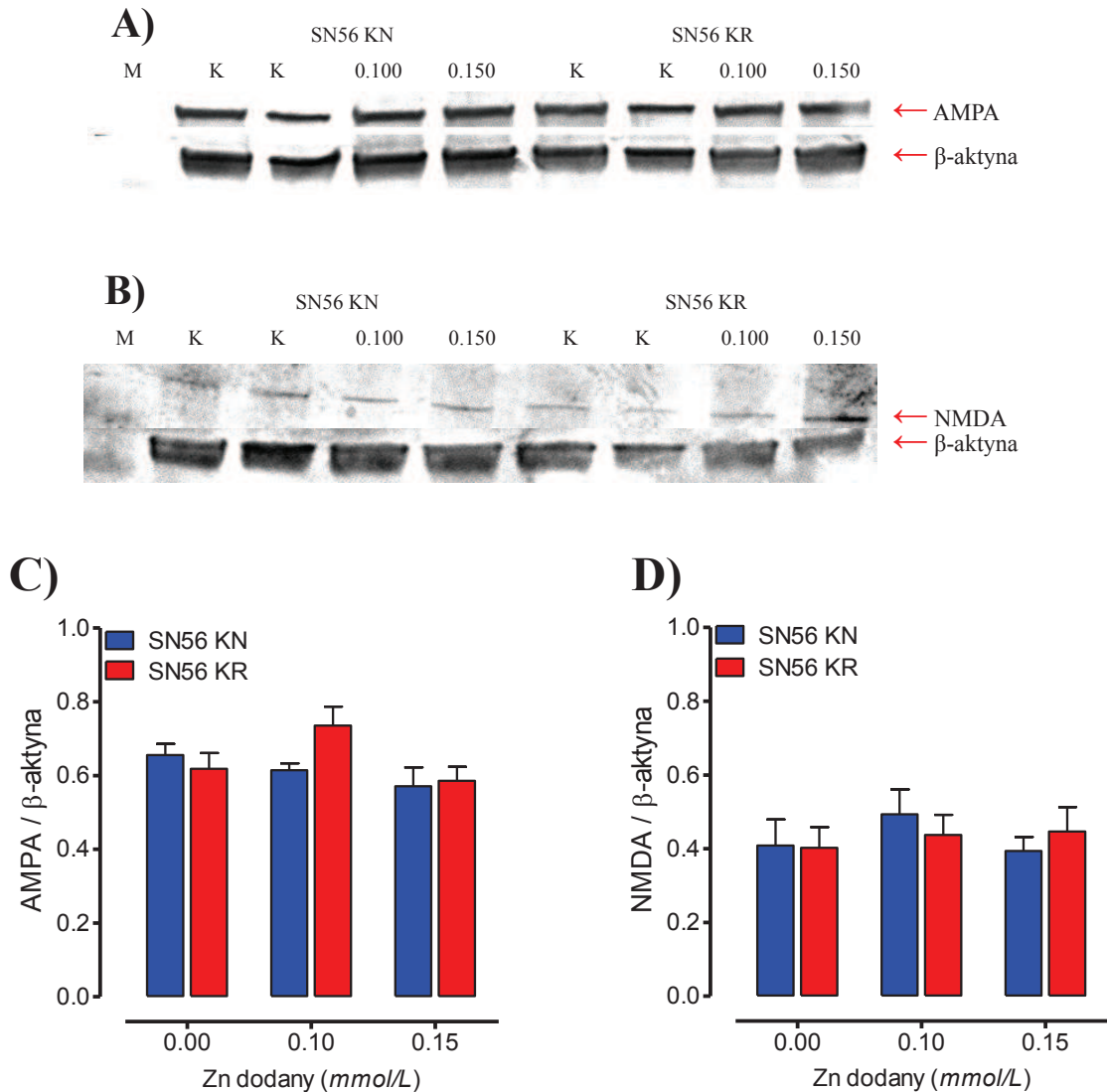
Poziom nAChR nie zależał od ekspresji fenotypu cholinergicznego. Chroniczna ekspozycja komórek SN56 na chlorek cynku nie zmieniła znamiennej poziomu nAChR. Oznacza to, że komórki zachowały zdolność do odbierania sygnałów wysyłanych z otoczenia na drodze neuroprzebieżnictwa cholinergicznego (Ryc. 18 A-B).



Ryc. 18. Chroniczny wpływ Zn na poziom nikotynowego receptora acetylocholiny (nAChR) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. A) obraz rozdziału metodą Western Blot; B) wyliczone względem poziomu β-aktyny zmiany zawartości receptora nAChR. Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 4 doświadczeń. *Skróty*: 0.100: 0.1mmol/L Zn; 0.150: 0.15 mmol/L Zn; K: kontrola; M: białkowy znacznik mas.

5.2.7.2. Przewlekły wpływ Zn na poziom receptorów glutaminianu w komórkach SN56

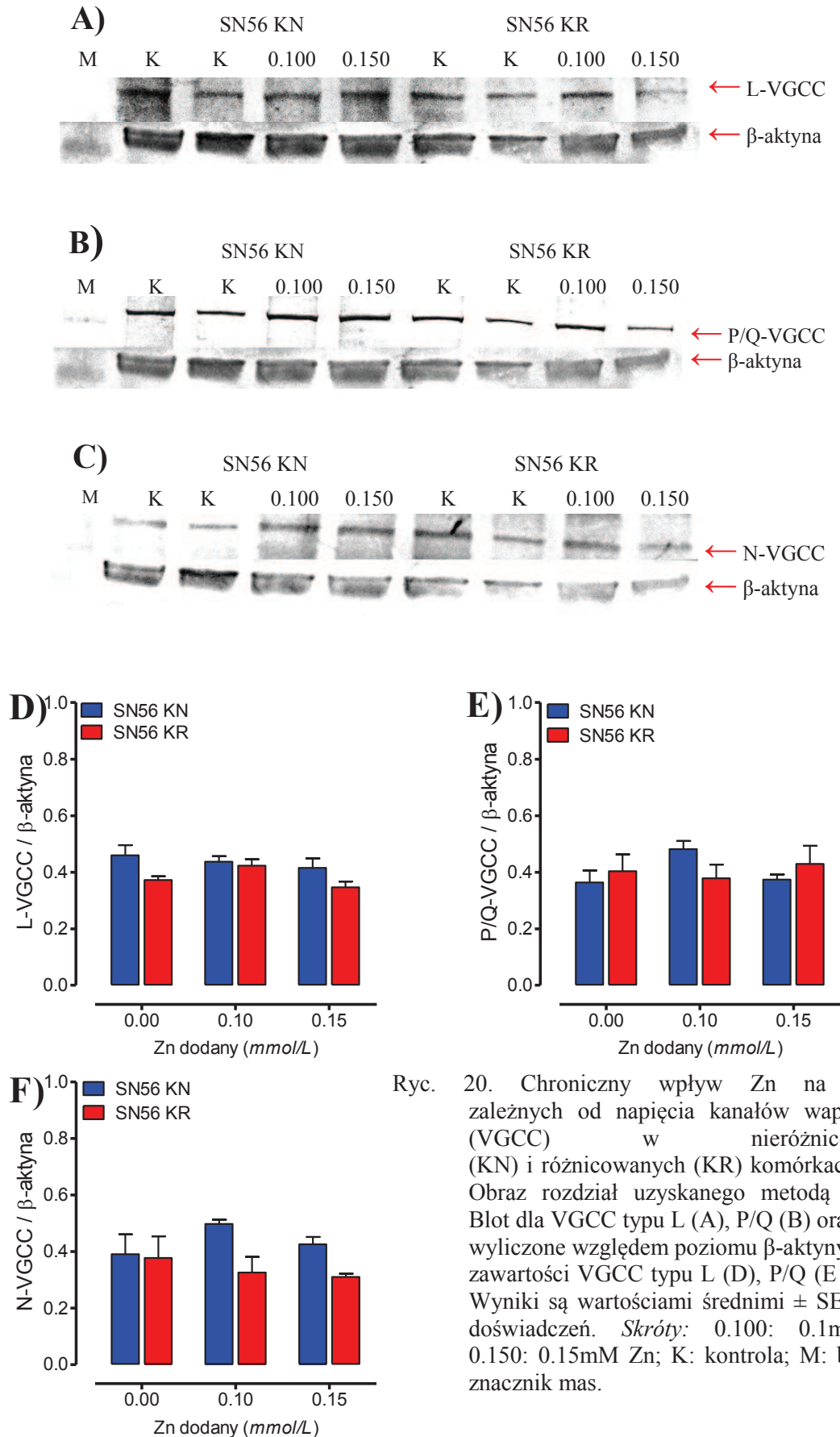
Poziom jonotropowych receptorów glutaminianu, tj. AMPA tudzież NMDA, jest niezależny od ekspresji fenotypu cholinergicznego. Ponadto, analiza półilościowa zawartości białka receptorów glutaminianu wykazała, że przeciętna zawartość białka AMPA w komórkach linii SN56 utrzymuje się w granicy około 65% (KN) oraz 62% (KR) poziomu β-aktyny. W przypadku NMDA, szacowana wartość była znacznie niższa i wyniosła 41% zarówno w SN56 KN, jak i KR (Ryc. 19 A-D).



Ryc. 19. Chroniczny wpływ Zn na poziom receptorów glutaminianu (GluR) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla receptora AMPA (A) oraz NMDA (B); wyliczone względem poziomu β -aktyny zmiany zawartości receptora AMPA (C) oraz NMDA (D). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-4 doświadczeń. *Skróty:* 0.100: 0.1mmol/L Zn; 0.15: 0.15 mmol/L Zn; K: kontrola; M: białkowy znacznik mas.

5.2.7.3. Przewlekły wpływ Zn na poziom bramkowanych napięciem kanałów wapniowych w komórkach SN56

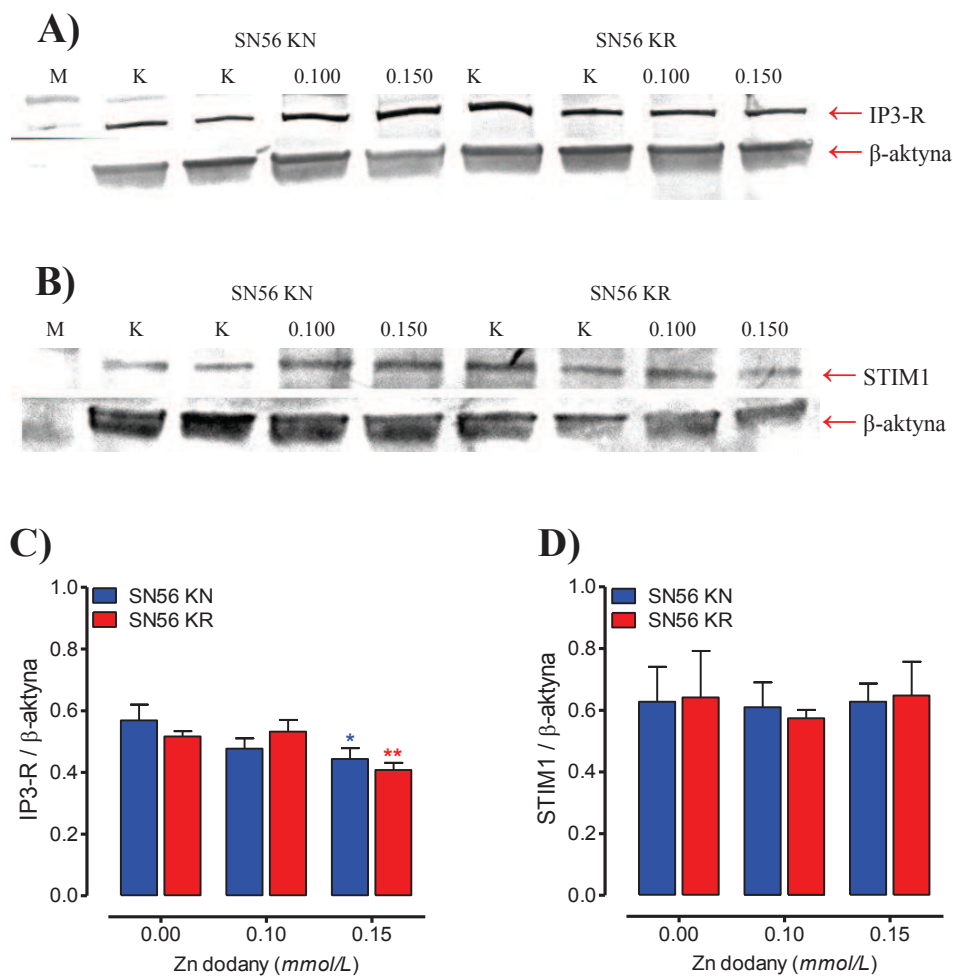
W komórkach SN56 zidentyfikowano obecność kanałów wapniowych bramowanych wysokim napięciem typu L, P/Q oraz N. Ich zawartość była niezależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego. Procentowa zawartość każdego z kanałów była zbliżona i nie ulegała zmianie w wyniku hodowli komórek w obecności 0.15 mmol/L jonów cynku (Ryc. 20 A-F).



Ryc. 20. Chroniczny wpływ Zn na poziom zależnych od napięcia kanałów wapniowych (VGCC) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Obraz rozdział uzyskano metodą Western Blot dla VGCC typu L (A), P/Q (B) oraz N (C); wyliczone względem poziomu β-aktynizmiany zawartości VGCC typu L (D), P/Q (E), N (F). Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-5 doświadczeń. *Skróty:* 0.100: 0.1mM Zn; 0.150: 0.15mM Zn; K: kontrola; M: białkowy znacznik mas.

5.2.7.4. Przewlekły wpływ Zn na poziom białek błony śródplazmatycznej w komórkach SN56

Zarówno w komórkach z niską, jak i wysoką ekspresją fenotypu cholinergicznego zidentyfikowano receptor IP_3 . Zn w stężeniach cytotoksycznych wywołuje znamienne obniżenie poziomu badanego receptora (Ryc. 21 A,C). Za aktywację ścieżki uzupełniającej wspomniane niedobory odpowiada białko STIM 1, którego obecność również potwierdzono w SN56 KN i SN56 KR. Poziom białka STIM1 nie jest regulowany przez zakumulowany Zn (Ryc. 21 B,D).

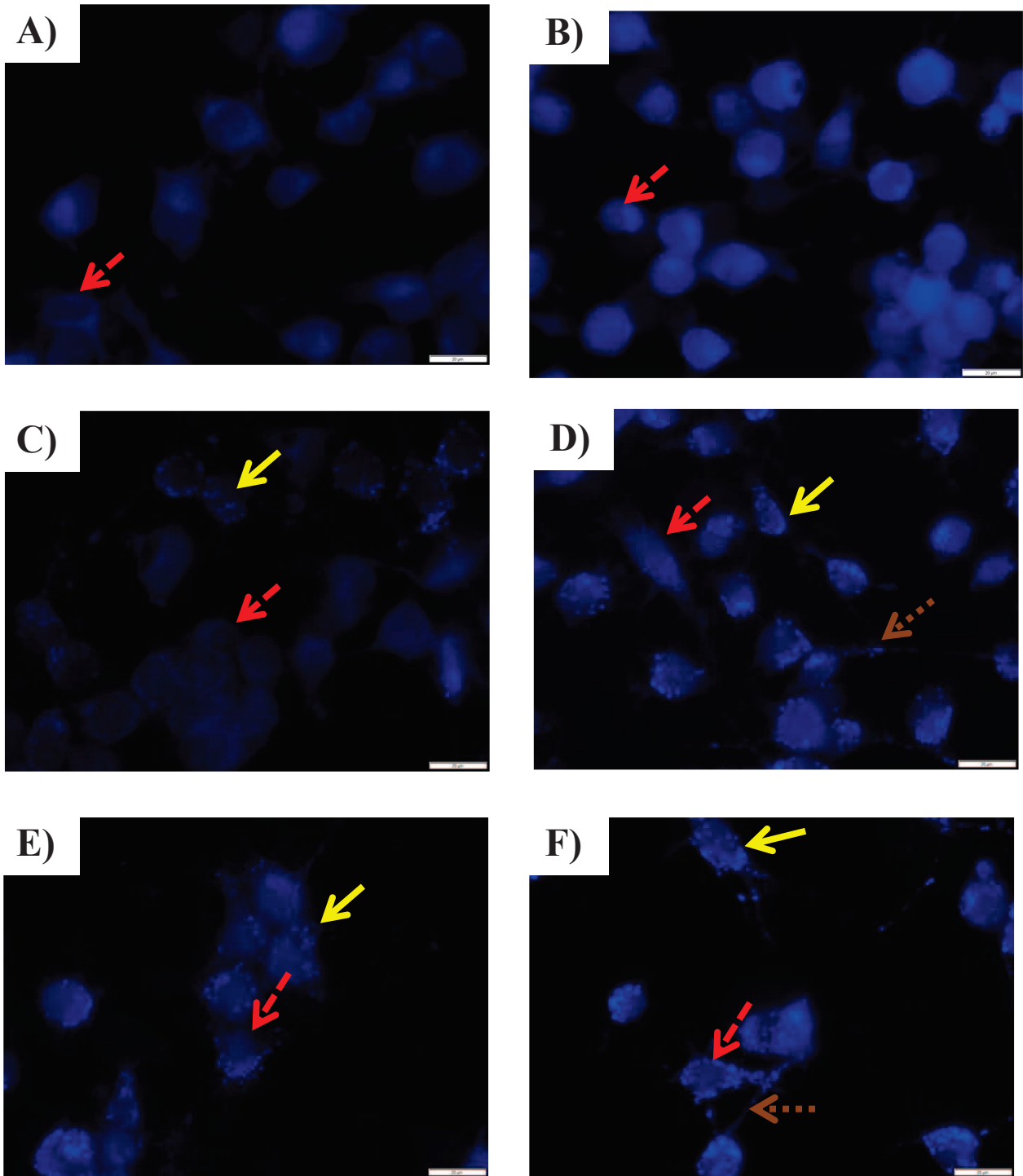


Ryc. 21. Chroniczny wpływ Zn na poziom śródplazmatycznych białek uczestniczących w transporcie wapnia w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Obraz rozdziału metodą Western Blot uzyskany dla receptora IP_3 (A) oraz STIM1 (B). Wyliczone względem poziomu β -aktyny zmiany zawartości receptora IP_3 (C) oraz STIM1 (D). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-4 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (*p < 0.05, **p < 0.01); *Skróty*: 0.100: 0.1mmol/L Zn; 0.15: 0.15 mmol/L Zn; K: kontrola; M: białkowy znacznik mas.

5.3. Neurotoksyczność ostra Zn w komórkach SN56 o różnej ekspresji fenotypu cholinergicznego

Badania 30-sto minutowego wpływu Zn oceniają ostry (zamiennie: krótkoczasowy) wpływ toksyny na komórki linii SN56. Na Ryc. 22 przedstawiono fotografie obrazujące zmiany wewnątrzkomórkowej dystrybucji wolnych jonów cynku wewnątrz komórek inkubowanych przez 30 minut w środowisku polaryzacyjnym, zawierającym 0-0.2 mmol/L chlorku cynku (Ryc. 22). W warunkach kontrolnych obserwowano równomierne rozłożenie Zn w całych komórkach. Brak zabarwienia jądra jest skutkiem zaangażowania Zn w wiązania stabilizujące kwasy nukleinowe. W kontroli, stosunkowo niską fluorescencję obserwowano w połączeniach międzykomórkowych (Ryc. 22).

30-sto minutowa ekspozycja komórek SN56 na 0.1 mmol/L chlorek cynku spowodowała uwypuklenie połączeń międzykomórkowych oraz powstanie skupisk o wyraźnie wyższej fluorescencji (Ryc. 22 C-D). Tendencja ta utrzymywała się, a wręcz pogłębiała w punktach eksperymentalnych z ekspozycją na 0.2 mmol/L chlorek cynku. Oprócz zwiększonej fluorescencji, obserwowano znamienne spadki liczby komórek oraz niemalże kompletną degradację połączeń międzykomórkowych (Ryc. 22 E,F).



— → jądra komórkowe

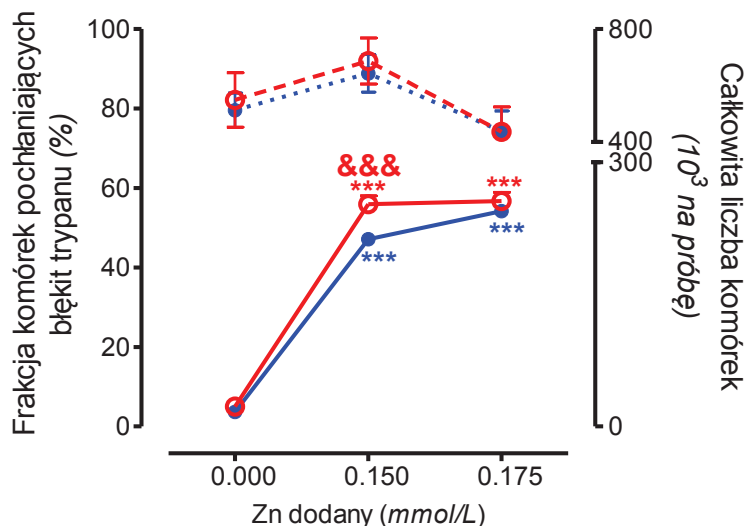
→ struktury komórkowe akumulujące Zn

⋯ → połączenia międzykomórkowe

Ryc. 22. Akumulacja Zn w nieróżnicowanych (KN) oraz różnicowanych (KR) komórkach SN56 inkubowanych przez 30 minut w środowisku polaryzacyjnym. A) SN56 KN: kontrola; B) SN56 KR: kontrola; C) SN56 KN + 0.1 mmol/L Zn; D) SN56 KR + 0.1 mmol/L Zn; E) SN56 KN + 0.2 mmol/L Zn; F) SN56 KN + 0.2 mmol/L Zn. Zdjęcia są reprezentatywne dla 3 doświadczeń.

Zastosowanie schematu eksperymentalnego ostrego wpływu cynku na nieróżnicowane bądź różnicowane komórki linii SN56 nie skutkowało istotnymi zmianami liczby komórek po 30-sto minutowej inkubacji. Równoległe, test eliminacji błękitu trypanu wykazał, że komórki SN56 są wysoce wrażliwe na Zn. Szczególną wrażliwość na sygnał cytotoksyczny w punkcie ekspozycji komórek SN56 na 0.15 mmol/L Zn wykazywały komórki różnicowane. Nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy wpływem 0.15 mmol/L a 0.175 mmol/L chlorku cynku, zarówno na SN56 KN, jak i SN56 KR (Ryc. 23).

- SN56 KN: Frakcja komórek pochłaniających błękit trypanu (%)
- SN56 KN: Całkowita liczba komórek
- SN56 KR: Frakcja komórek pochłaniających błękit trypanu (%)
- SN56 KR: Całkowita liczba komórek

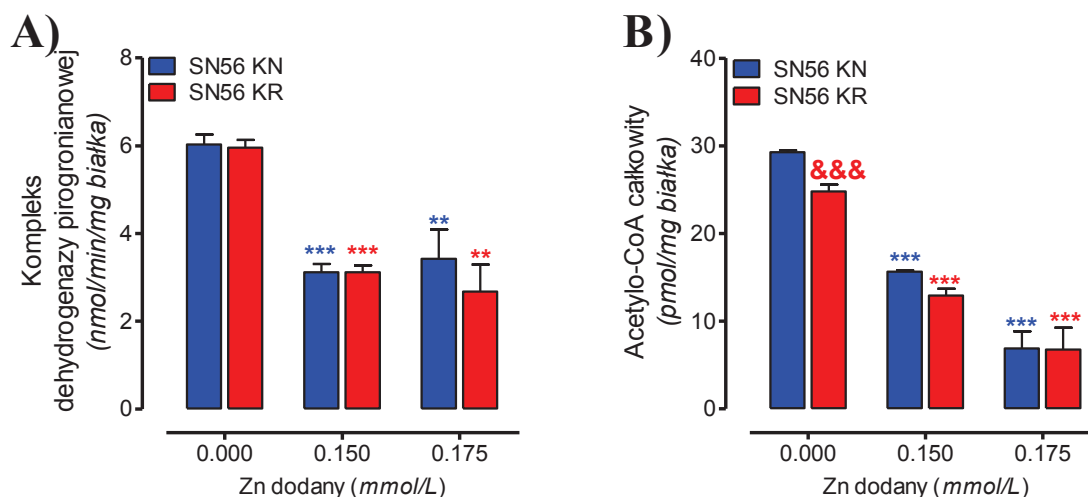


Ryc. 23. Zależny od stężenia ostry wpływ Zn na parametry żywotności nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórek SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z maksymalnie 29 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); SN56 KN (&&& $p < 0.001$).

Aktywność PDHC w komórkach linii SN56 inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym wyniosła odpowiednio 6.4 (SN56 KN) oraz 6.5 nmol/mg białka (SN56 KR). W komórkach SN56 poddanych ostremu wpływowi Zn w stężeniach 0.15 mmol/L oraz 0.175 mmol/L, aktywność PDHC uległa dwukrotnemu obniżeniu w obu subkulturach komórkowych (Ryc. 24 A).

Poziom acetylo-CoA w różnicowanych komórkach SN56 był o 15% niższy niżeli w komórkach nieróżnicowanych. 30-sto minutowa ekspozycja SN56 KN i SN56 KR na 0.15 mmol/L chlorek cynku obniżyła poziom badanego metabolitu o niemalże 50%.

Zwiększenie stężenia donora cynku do końcowego poziomu 0.175 mmol/L wywołało spadek poziomu acetylo-CoA, w stosunku do wartości kontrolnych o ponad 70% zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR (Ryc. 24 B).



Ryc. 24. Ostry wpływ Zn (0-0.175 mmol/L) na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (A) oraz całkowity poziom acetylo-CoA (B) w nieróżnicowanych (KN) i różnicowanych (KR) komórkach SN56. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z maksymalnie 35 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (&& $p < 0.01$).

W związku z uzyskanymi wynikami oraz w nawiązaniu do poprzedniego podrozdziału, oceniającego przewlekły wpływ cynku, w dalszej części pracy postanowiono zastosować 0.15 mmol/L chlorek cynku jako czynnik cytotoksyczny.

Badania ostrego wpływu Zn na komórki SN56 pozwalają zaobserwować rzeczywistą, wywołaną depolaryzacją błony komórkowej, akumulację analizowanego jonu. Krótki czas badania uniemożliwia uruchomienie procesów aktywnego usuwania jonów cynku z wnętrza komórki. (patrz \rightarrow podrozdział 6.3) (Ryc. 11 A, Tabela 4) (Qin et al., 2008).

Akumulacja Zn w SN56 KN poddanych 30-sto minutowej ekspozycji na 0.15 mmol/L chlorek cynku wynosiła 36.8 nmol/mg białka, w SN56 KR zaś 41.7 nmol/mg białka (Tabela 4). W wyniku 30-sto minutowej inkubacji z 0.15 mmol/L Zn poziom wapnia zakumulowany wewnątrz komórek SN56 wzrastał znamienne zarówno w SN56 KN (15%), jak i SN56 KR (30%) (Tabela 4).

Tabela 4. Wpływ toksyczności ostrej Zn na wybrane parametry oznaczone w nieróżnicowanych (KN) oraz różnicowanych (KR) neuronalnych komórkach SN56 w warunkach depolaryzacyjnych.

PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
Akumulacja Zn (nmol/mg białka)	0.4 ±0.06	36.8 ±1.2 ^{***}	0.2 ±0.05	41.7 ±1.6 ^{***}
Ca całkowity (nmol/mg białka)	23.8 ±0.6	27.4 ±1.2 ^{**}	24.7 ±0.6	32.0 ±1.0 ^{***}
Akumulacja TBARS (nmol/mg białka)	2.4 ±0.2	6.6 ±0.3 ^{***}	3.1 ±0.1	6.4 ±0.3 ^{***}
Acetylo-CoA (pmol/mg białka)	29.3 ±0.3	15.7 ±0.2 ^{***}	24.8 ±0.8 ^{***}	12.9 ±0.8 ^{***}
Acetylocholina (pmol/mg białka)	129.5 ±24.2	62.2 ±10.1 [*]	326.6 ±36.0 ^{&&}	120.5 ±19.1 ^{**}
N-acetyloasparaginian (nmol/mg białka)	67.0 ±1.2	39.5 ±1.7 ^{***}	55.6 ±1.5 ^{&&}	32.2 ±1.3 ^{***}
ATP (% kontroli)	100.6 ±8.6	42.9 ±5.5 ^{***}	108.0 ±7.1	21.1 ±2.8 ^{***}

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-11 doświadczeń. Znamienne różne: kontroli (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); SN56 KN (&p<0.05, &&p<0.01).

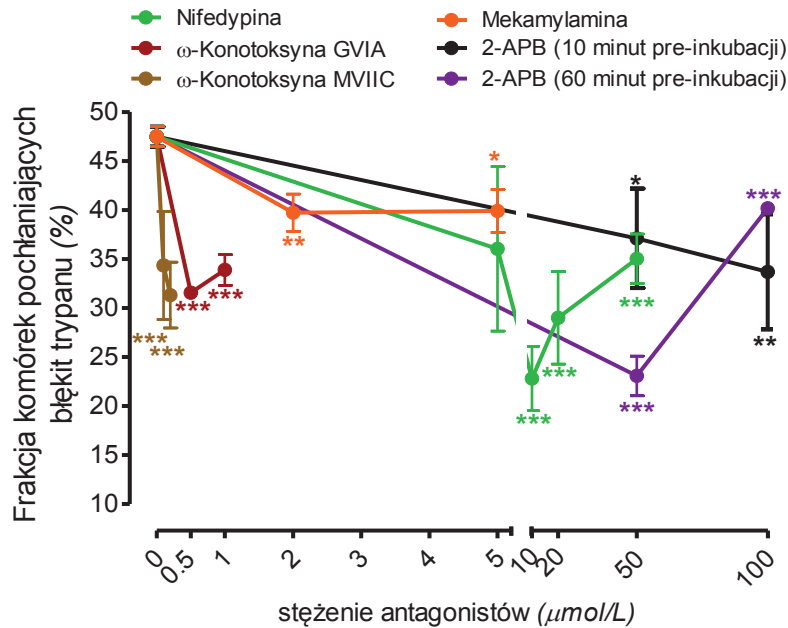
Z doniesień literaturowych wynika, że Zn może być czynnikiem generującym wolne rodniki tlenowe. Pośrednim parametrem identyfikującym ten proces jest akumulacja związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). W obecności 0.15 mmol/L Zn obserwowano około 3-krotny wzrost akumulacji TBARS w SN56 KN, zaś w SN56 KR około 2-krotny (Tabela 4). Cynk wewnątrz komórek SN56 powoduje istotne zmiany w poziomach zarówno acetylo-CoA, jak i jego metabolitów wtórnych, tj. N-acetyloasparaginianu oraz acetylocholin. Poziom NAA spadł o ponad 40% zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR. Równoległe deprecjacja acetylocholin wynosiła ponad 50% (SN56 KN) oraz ponad 60% (SN56 KR). Deprecjacja poziomu ATP wynosiła dla SN56 KR 87% i była znamienne większa niżeli w SN56 KN (58%) (Tabela 4).

5.3.1. Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na neurotoksyczność ostrą Zn w nieróżnicowanych komórkach SN56

W nawiązaniu do tematu pracy w niniejszym podrozdziale, na podstawie wybranych parametrów badawczych, wyselekcjonowano stężenia selektywnych bądź nieselektywnych antagonistów białek regulujących wewnątrzkomórkową równowagę wapniową. Stężenie antagonistów wyznaczono eksperymentalnie wykorzystując nieróżnicowane komórki linii SN56 ekspozowane przez 30 minut na 0.15 mmol/L chlorek cynku w środowisku depolaryzacyjnym. Ponadto sprawdzono, czy zarówno antagoniści kanałów wapniowych, jak i receptorów powierzchniowych tudzież wewnątrzkomórkowych w użytych stężeniach nie wykazują działania toksycznego. Zablokowanie aktywności białek uczestniczących w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu Ca pozwoli ocenić potencjalny udział ścieżek transportu tego jonu w neurotoksyczności cynku.

5.3.1.1. Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na żywotność nieróżnicowanych komórek SN56

Mekamylamina, MEC, jako nieselektywny antagonist niktynowych receptorów acetylocholinoi znamienne obniża frakcję komórek pochłaniających błękit trypanu w zakresie stężeń 2.0-5.0 $\mu\text{mol/L}$. (Ryc. 25). Związanie nifedypiny (NF) w stężeniach 10-20 $\mu\text{mol/L}$ z kanałami wapniowymi typu L dwukrotnie zredukowała frakcję komórek pochłaniającą błękit trypanu (Ryc. 25). Zastosowanie ω -konotoksyn GVIA (Ctx-GVIA) oraz MVIIC (Ctx-MVIIC) w zakresie stężeń 0.2-1.0 $\mu\text{mol/L}$ skutkowało 30% spadkiem frakcji komórek uszkodzonych (Ryc. 24). W przypadku antagonisty receptora IP_3 , 2-aminoetoksydifenylboranu (2-APB) w stężeniu 50-100 $\mu\text{mol/L}$ największe zmiany zaobserwowano przy wydłużeniu czasu wstępnej inkubacji do 60 minut (Ryc. 25).

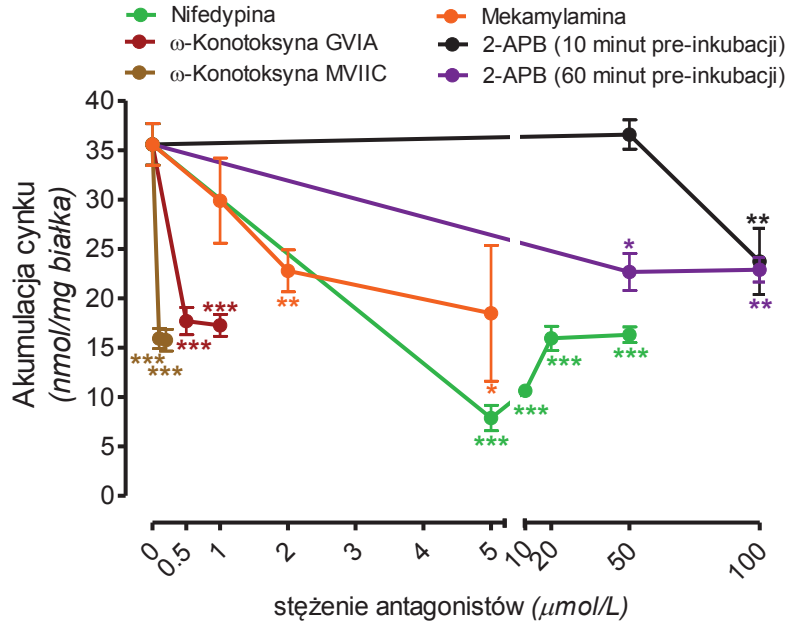


Ryc. 25. Protekcyjny wpływ antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na nieróżnicowane komórki SN56 poddane ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różnie od 0.15 mmol/L Zn: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

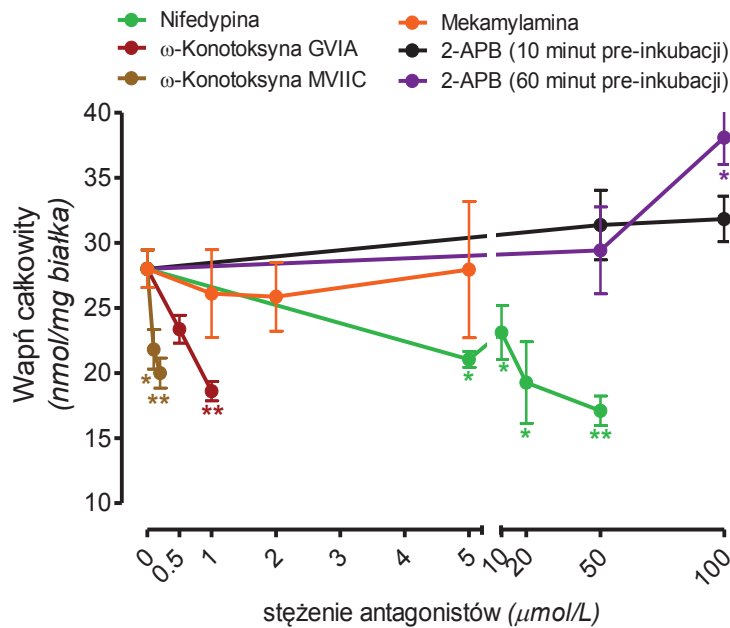
5.3.1.2. Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na akumulację cynku i wapnia w nieróżnicowanych komórkach SN56

Istotną zmianę w akumulacji Zn odnotowano we wszystkich punktach stężeniowych obejmujących wstępną inkubację z 10 μmol/L NF (antagonista kanału wapniowego typu L), 50 μmol/L 2-APB (antagonista receptora IP₃), Ctx-MVIIC (antagonista kanałów wapniowych typu P/Q) oraz Ctx-GVIA (antagonista kanału wapniowego typu N). Wydłużenie czasu wstępnej inkubacji komórek SN56 z 2-APB znacząco zmniejszyło akumulację Zn w komórkach SN56. Znamienny spadek akumulacji cynku poprzez inhibicję aktywności nikotynowego receptora acetylocholinylu jedynie przy stężeniu 2 μmol/L MEC (Ryc. 26).

Zastosowania antagonistów bramkowanych napięciem kanałów wapniowych typu L, N, P/Q spowodowało znamienny spadek wewnątrzkomórkowego poziomu Ca (Ryc. 27). Około 30% redukcję poziomu tego jonu wywołały 10 μmol/L NF, 0.2 μmol/L Ctx-MVIIC oraz 0.5 μmol/L Ctx-GVIA. Dezaktywacja receptorów nAChR oraz IP₃ nie wywołała istotnych zmian w poziomie wapnia (Ryc. 27).



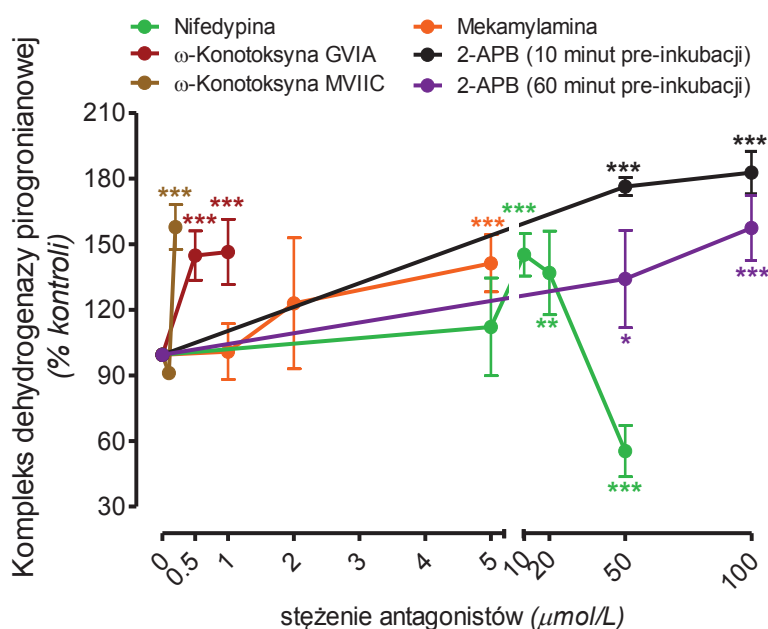
Ryc. 26. Wpływ selektywnych antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na akumulację cynku w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzacyjnym. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różne od 0.15 mmol/L Zn: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Ryc. 27. Wpływ selektywnych antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia na wewnątrzkomórkowy poziom wapnia w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od 0.15 mmol/L Zn: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.3.1.3. Zależny od stężenia wpływ antagonistów CaTR na produkcję acetylo-CoA w nieróżnicowanych komórkach SN56

Większość badanych związków zabezpieczała aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) przed toksycznym działaniem cynku. W porównaniu do aktywności PDHC w punktach toksycznych, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ MEC zabezpieczała wyższą o 42% aktywność PDHC (Ryc. 28). Optymalne, protekcyjne stężenie NF oscyloowało w zakresie 10.0-20.0 $\mu\text{mol/L}$. Przy stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ zauważano niepożądane działanie inhibicyjne wobec PDHC. Aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej była znamienne wyższa w punktach wstępnie inkubowanych w obecności 2-APB zarówno w stężeniach 50 $\mu\text{mol/L}$ i 100 $\mu\text{mol/L}$, niezależnie od czasu wstępnej inkubacji (Ryc. 28).

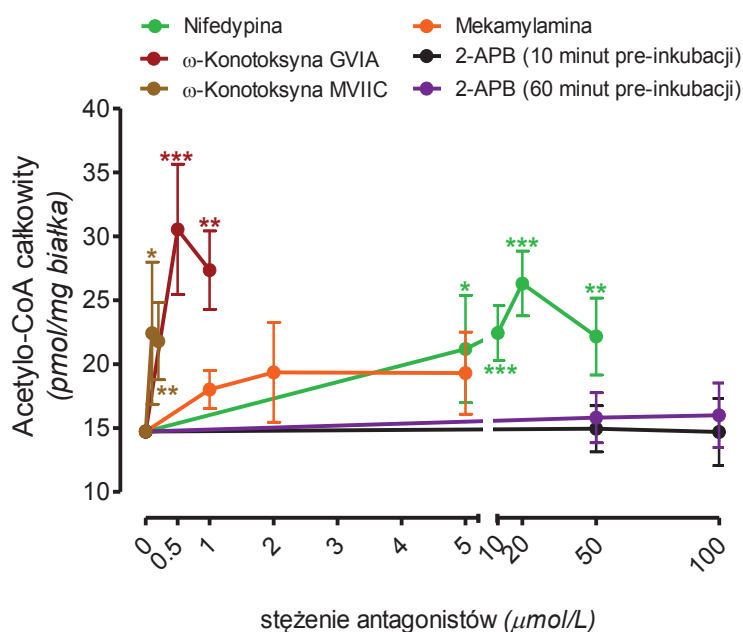


Ryc. 28. Regulatorowy wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od 0.15 mmol/L Zn: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Uwaga: Wartość względną parametru (100%) stanowiła aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oznaczona w punktach kontrolnych SN56 KN wynosząca odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych 6.4 nmol/min/mg białka oraz w warunkach polaryzacyjnych 6.5 nmol/min/mg białka.

Inkubacja nieróżnicowanych komórek SN56 z MEC bądź 2-APB nie zwiększyła znacząco poziomu dostępnego acetylo-CoA (Ryc. 29). Antagoniści bramkowanych napięciem kanałów wapniowych każdorazowo zabezpieczali dostępność acetylo-CoA. Dostępny poziom

acetylo-CoA wzrósł o 44%, 73% oraz 100% odpowiednio dla 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Ctx MVIIC, 20 $\mu\text{mol/L}$ NF oraz 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ctx-GVIA (Ryc. 29).



Ryc. 29. Wpływ białek regulujących homeostazę wapnia na całkowity poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w środowisku depolaryzującym. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od 0.15 mmol/L Zn: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Wykonane badania pozwoliły na wyodrębnienie optymalnych stężeń antagonistów białek odpowiedzialnych za homeostazę wapnia w komórkach SN56. I tak, w kolejnych częściach pracy wpływ białek regulujących homeostazę wapnia będzie oceniany przy zastosowaniu następujących antagonistów:

- 2 $\mu\text{mol/L}$ mekamylamina, MEC (nieselektywny antagonist receptoru nikotynowego)
- 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedypina, NF (antagonista kanału wapniowego (VGCC) typu L);
- 0.5 $\mu\text{mol/L}$ konotoksyna GVIA, Ctx-GVIA (selektywny antagonist VGCC typu N)
- 0.2 $\mu\text{mol/L}$ konotoksyna MVIIC, Ctx-MVIIC (selektywny antagonist VGCC typu P/Q)
- 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-aminoetoksydifenylboran, 2-APB z 60 minutową inkubacją wstępną (selektywny antagonist receptoru IP_3);

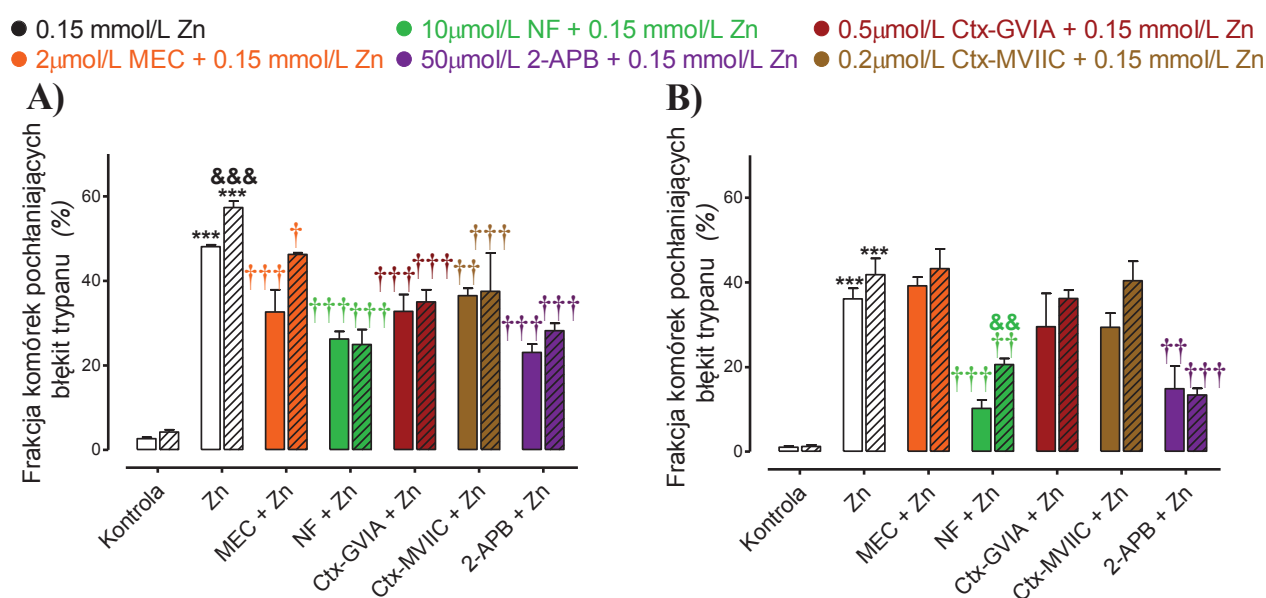
Analizę rozpocznie prezentacja wyników dotyczących wpływu białek transportujących wapń na poziom cynku, wapnia oraz przeżywalność komórek eksponowanych na cytotoksyczne stężenie cynku. Następnie, zbadane zostaną ścieżki utylizacji acetylo-CoA w tych warunkach. W pierwszym kroku jego produkcja, dalej aktywność wybranych enzymów cyklu Krebsa i poziom ATP. W ramach oceny wpływu

antagonistów CaTR na neuroprzeżywalność cholinergiczną, zbadano poziom oraz kwantowe wydzielanie acetylocholiny. Ostatecznie, badano poziom *N*-acetyloasparaginy w środowiskach zawierających antagonistów CaTR.

5.3.2. Rola CaTR w neurotoksyczności Zn w neuronalnych komórkach SN56

5.3.2.1. Wpływ CaTR na żywotność komórek SN56 poddanych ostremu działaniu Zn

W środowisku depolaryzacyjnym, w SN56 KR poddanych 30-minutowej inkubacji z 0.15 mmol/L Zn, frakcja komórek pochłaniających błękit trypanu wynosiła 57%, co było wartością znamienne wyższą niżeli w SN56 KN (48%) (Ryc. 30 A). Natomiast w środowisku polaryzacyjnym zawierającym 0.15 mmol/L Zn, wartość tego parametru w komórkach nieróżnicowanych wyniosła 36%, w różnicowanych zaś frakcja komórek uszkodzonych stanowiła 42%. (Ryc. 30 B)(patrz → podrozdział 6.3).



Ryc. 30. Protekcyjny wpływ antagonistów CaTR na przeżywalność nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórek SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN (&&& $p < 0.001$).

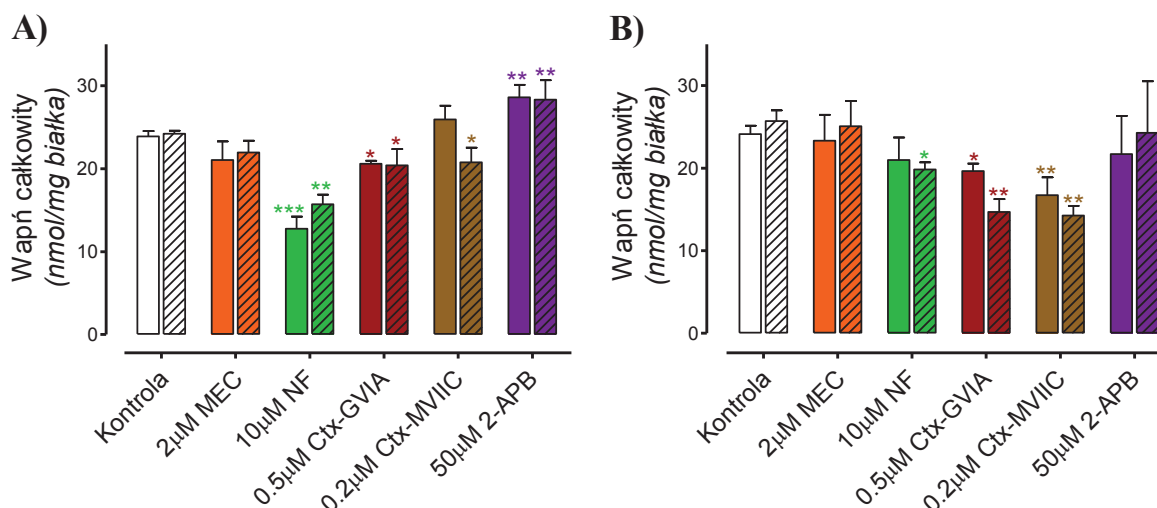
Uwaga: Wartość parametru oznaczona w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR była porównywalna do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 2.7% (SN56 KN), 4.2% (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 1.1% (SN56 KN), 1.2% (SN56 KR).

W warunkach depolaryzacyjnych, wstępna inkubacja komórek SN56 z antagonistami CaTR częściowo zapobiegała cytotoksyczności cynku. Obserwowano znaczące obniżenie frakcji uszkodzonych komórek. Zmiany te nie różniły się statystycznie pomiędzy SN56 KN a SN56 KR i wynosiły około 24% (0.2 $\mu\text{mol/L}$ Ctx-MVIIC), 32% (2 $\mu\text{mol/L}$ MEC oraz 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ctx-GVIA), 45% (10 $\mu\text{mol/L}$ NF), 52% (50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB) (Ryc. 30 A).

W środowisku polaryzacyjnym zawierającym 0.15 mmol/L Zn, jedynie 10 $\mu\text{mol/L}$ NF (antagonista kanału wapniowego typu L) oraz 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB (antagonista receptora IP₃) wywołały znaczne obniżenie frakcji komórek pochłaniających błękit trypanu (Ryc. 30 B). W komórkach nieróżnicowanych nifedypina redukowała frakcję komórek uszkodzonych o 59%, w różnicowanych zaś o 51%. Frakcja komórek niezdolnych do usuwania błękitu trypanu w komórkach wstępnie inkubowanych z 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB wynosiła około 14%, wartość była niezależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego (Ryc. 30 B).

5.3.2.2. Wpływ antagonistów CaTR na wewnątrzkomórkowy poziom wapnia

Na Ryc. 31 oraz 32 zaprezentowano wpływ antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia (CaTR) na poziom Ca w komórkach SN56 inkubowanych w obecności (Ryc. 32 A-B) bądź nieobecności (Ryc. 31 A-B) 0.15 mmol/L chlorku cynku. Poziom Ca w SN56 KN i SN56 KR wynosił odpowiednio 23.8 oraz 24.7 nmol/mg białka. 2 $\mu\text{mol/L}$ MEC (antagonista nikotynowego receptora acetylocholino) nie modyfikowała znacząco poziomu wapnia w SN56 KN i SN56KR (Ryc. 31 A-B). Silne działanie obniżające poziom Ca wykazywała 10 μM nifedypina (antagonista kanału wapniowego typu L), niezależnie od stopnia ekspresji fenotypu cholinergicznego. Efekt był szczególnie widoczny w warunkach depolaryzacji błony komórkowej (Ryc. 31 A). Spadek poziomu Ca w obecności nifedypiny wyniósł 36% (SN56 KN) i 35% (SN56 KR). Pozostali antagoniści kanałów Ca bramkowanych napięciem również obniżali poziom wewnątrzkomórkowego Ca. Szczególnie zauważalne zmiany dotyczą badań w warunkach polaryzacyjnych, w komórkach SN56 KN konotoksyny GVIA (antagonista kanału wapniowego typu N) i MVIIC (antagonista kanałów wapniowych typu P/Q) obniżały poziom Ca o odpowiednio 19% (Ctx-GVIA) tudzież 31% (Ctx-MVIIC), natomiast w komórkach różnicowanych te same czynniki obniżały poziom Ca o około 45%. Natomiast antagonist receptoru IP₃, w stanie depolaryzacji błony komórkowej komórek SN56 zwiększał poziom wapnia o około 15 %, niezależnie od stopnia ekspresji fenotypu cholinergicznego komórek.



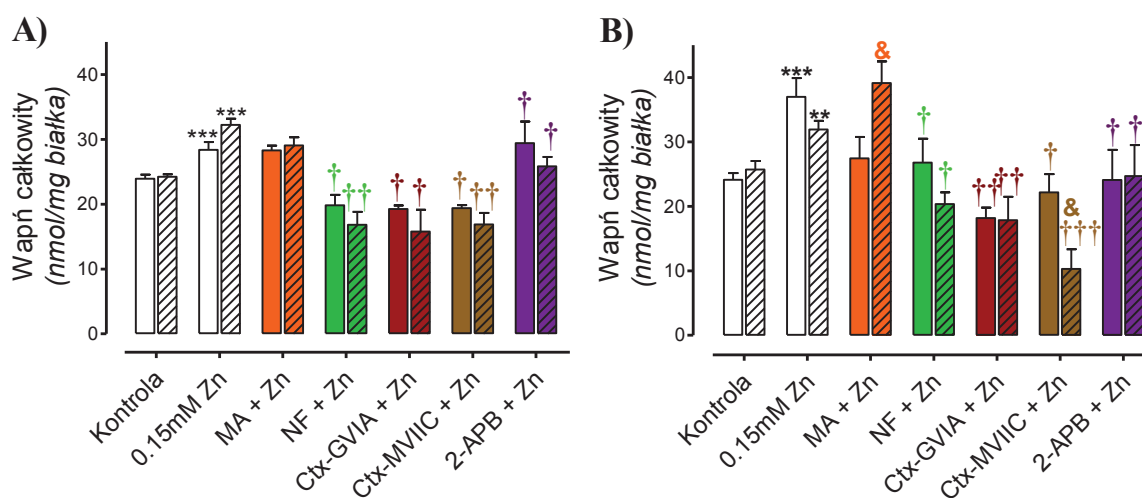
Ryc. 31. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na całkowity poziom wapnia oznaczony w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut (90 minut dla 2-APB) w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

5.3.2.3. Wpływ antagonistów białek regulujących komórkową homeostazę wapnia na poziom tego kationu w komórkach SN56 poddanych ostremu wpływowi Zn

Poziom wapnia wynosił 23.9 nmol/mg białka oraz 23.2 nmol/mg białka odpowiednio w SN56 KN i SN56 KR. W komórkach poddanych ostremu wpływowi 0.15 mmol/L chlorku cynku w warunkach depolaryzacyjnych poziom Ca ulegał 19% (SN56 KN) tudzież 33% (SN56 KR) podwyższeniu (Ryc. 32 A). W środowisku depolaryzacyjnym największą redukcję poziomu Ca wewnątrz komórek linii SN56 wywołali antagoniści kanałów wapniowych. W warunkach depolaryzacyjnych, w komórkach SN56 KN oraz SN56 KR wstępnie inkubowanych w obecności antagonistów VGCC, a następnie poddanych toksycznemu działaniu Zn, oznaczony poziom Ca był niższy o około 20%, zaś w SN56 KR o około 30% niż w obecności jedynie jonów cynku (Ryc. 32 A).

W środowisku polaryzacyjnym poziom Ca wewnątrz komórek nieróżnicowanych spadł odpowiednio o około 30% (10 μ mol/L NF, 2 μ mol/L MEC, 50 μ mol/L 2-APB), 40% (oraz 0.2 μ mol/L Ctx-MVIIC) oraz 50% (0.5 μ mol/L Ctx-GVIA) (Ryc. 32 B). W przypadku komórek różnicowanych najmniejszą istotną zmianę (obniżenie) poziomu Ca wywołał antagonist receptoru IP₃ (23%), największą zaś Ctx-MVIIC (68%) (Ryc. 32 B).

● 0.15 mmol/L Zn ● 10 μ mol/L NF + 0.15 mmol/L Zn ● 0.5 μ mol/L Ctx-GVIA + 0.15 mmol/L Zn
 ● 2 μ mol/L MEC + 0.15 mmol/L Zn ● 50 μ mol/L 2-APB + 0.15 mmol/L Zn ● 0.2 μ mol/L Ctx-MVIIC + 0.15 mmol/L Zn



Ryc. 32. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na całkowity poziom wapnia oznaczony w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różnie od: kontroli (* p <0.05, *** p <0.001); 0.15 mmol/L Zn (\dagger p <0.05, $\dagger\dagger$ p <0.01, $\dagger\dagger\dagger$ p <0.001); SN56 KN (& p <0.05).

5.3.2.4. Wpływ antagonistów CaTR na kompartmentację wapnia w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu Zn

We frakcji mitochondrialnej różnicowanych komórek SN56 poziom Ca jest wyższy niżeli w komórkach nieróżnicowanych o 32% (Tabela 5). MEC pozostawała bez wpływu na poziom wapnia w przedziale mitochondrialnym różnicowanych komórek SN56. W warunkach nietoksycznych jedynie nifedypina (NF) oraz 2-aminoetoksydifenylboran (2-APB) modyfikowały znamienne poziom Ca w nieróżnicowanych komórkach SN56. 10 μ mol/L nifedypina, antagonistka kanału wapniowego typu L, spowodowała obniżenie wapnia w przedziale mitochondrialnym komórek nieróżnicowanych o około 57%. 50 μ mol/L 2-APB wywołał znamienne wzrost akumulacji Ca wewnątrz SN56 KN o 61% (Tabela 5).

W warunkach nietoksycznych, w SN56 KR antagoniści kanałów wapniowych wywołali znamienne obniżenie wapnia w przedziale mitochondrialnym. I tak, antagonistka kanału wapniowego typu L (NF) wywołał spadek poziomu Ca o około 60%, natomiast antagoniści z grupy konotoksyn o ponad 40% spadek (Tabela 5).

Poziom Ca we frakcji mitochondrialnej SN56 KR w warunkach ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn wynosił 10.4 nmol/mg białka i był znacząco wyższy niż poziom Ca oznaczony w tych samych warunkach w SN56 KN (7.7 nmol/mg białka) (Tabela 5). W warunkach toksycznych, komórki różnicowane (SN56 KR) wstępnie inkubowane w obecności kanałów wapniowych we frakcji mitochondrialnej zawierały średnio o 50% mniej wapnia. W warunkach toksycznych, w przypadku SN56 KR inkubowanych wstępnie w obecności 2-APB, ponownie poziom Ca we frakcji mitochondrialnej był wyższy o 60% (Tabela 5).

Tabela 5. Poziom wapnia w przedziale mitochondrialnym komórek SN56 inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym

PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
Kontrola	7.5 ±0.4	7.7±0.6	9.9 ±0.7 ^{&&}	10.4 ±0.5 ^{&&}
2µmol/L MEC	5.3 ±1.6	7.6 ±1.0	9.1 ±0.7	10.2 ±1.1
10µmol/L NF	3.2 ±1.0 ^{***}	6.9 ±2.1	3.8 ±0.9 ^{***}	5.2 ±0.4 ^{†††}
0.5µmol/L ω-Ctx-GVIA	6.6 ±2.4	4.4 ±0.5 ^{†††}	6.2 ±2.0 ^{**}	4.9 ±1.2 ^{†††}
0.2µmol/L ω-Ctx-MVHC	6.5 ±2.2	8.6 ±2.9	6.6 ±1.4 [*]	5.0 ±0.9 ^{†††}
50µmol/L 2-APB	12.1 ±2.1 ^{**}	11.1 ±3.9	12.2 ±1.2	16.5 ±2.0 ^{†††}

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znacząco różne od: kontroli (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); SN56 KN (&&p<0.01), 0.15 mmol/L Zn (†††p<0.001). Inkubacja komórek SN56 w środowisku polaryzacyjnym nie zmieniała istotnie poziomu Ca w przedziale mitochondrialnym.

W nieobecności Zn w środowisku inkubacyjnym, w SN56 KN jedynie nifedypina znacząco obniżała poziom Ca we frakcji cytoplazmatycznej o 50% (Tabela 6). Natomiast w SN56 KR znaczące obniżenie poziomu Ca we frakcji cytoplazmatycznej obserwowano w punktach inkubowanych z antagonistą receptora nikotynowego (mekamylamina, spadek o 33%) tudzież antagonistami kanałów wapniowych spadek o odpowiednio o 48% (nifedypina) oraz około 30% (antagoniści z grupy konotoksyn) (Tabela 6).

W komórkach SN56 ekspozowanych na 0.15 mmol/L Zn, wstępna inkubacja komórek w obecności antagonistów kanałów wapniowych spowodowała obniżenie poziomu Ca we frakcji cytoplazmatycznej, zarówno w SN56 KN (średnio o 30%), jak i SN56 KR

(średnio o 50%). Wstępna inkubacja SN56 KR z antagonistą receptora IP₃ (50 μmol/L 2-APB) spowodowała obniżenie o 38% poziomu Ca w przedziale cytoplazmatycznym komórek eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn (Tabela 6).

Tabela 6. Poziom jonów wapnia w przedziale cytoplazmatycznym komórek SN56 inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym

PARAMETR	SN56 KN		SN56 KR	
	Kontrola	0.15 mmol/L Zn	Kontrola	0.15 mmol/L Zn
Kontrola	17.1 ±1.5	18.6 ±1.9	16.3 ±1.0	20.8±1.0 ^{**}
2μmol/L MEC	14.3 ±1.7	19.6 ±4.3	11.0 ±3.0 [*]	20.8 ±4.1
10μmol/L NF	8.6 ±2.0 ^{**}	12.1 ±1.5 [†]	8.6 ±1.3 ^{**}	9.9 ±2.0 ^{†††}
0.5μmol/L ω-Ctx-GVIA	17.4 ±2.7	13.8 ±0.5 [†]	11.5 ±3.6 [*]	10.9 ±2.6 ^{†††}
0.2μmol/L ω-Ctx-MVIIC	19.1 ±4.1	11.5 ±2.6 [†]	10.8 ±3.3 [*]	9.5 ±3.9 ^{†††}
50μmol/L 2-APB	19.3 ±1.8	16.7 ±1.5	18.0 ±3.4	13.0 ±6.1 [†]

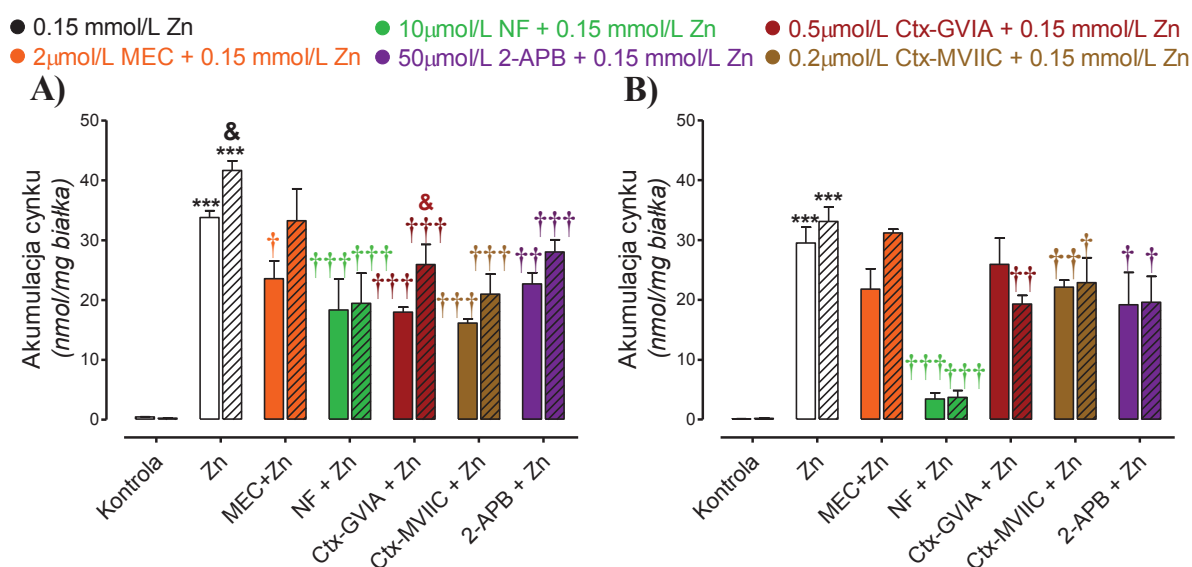
Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-7 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (*p<0.05, **p<0.01); 0.15 mmol/L Zn (p[†]<0.05, †††p<0.001). Inkubacja komórek SN56 w środowisku polaryzacyjnym nie zmieniała istotnie poziomu Ca w przedziale mitochondrialnym.

5.3.2.5. Wpływ CaTR na akumulację cynku w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu cynku

Poziom zakumulowanego Zn w SN56 KR, poddanych 30-sto minutowej ekspozycji na 0.15 mmol/l Zn w warunkach depolaryzacyjnych wyniósł 41.7 nmol/mg białka i był znamienne wyższy niż w SN56 KN (tu: 33.8 nmol/mg białka) (Ryc. 33 A).

W środowisku depolaryzacyjnym, zastosowanie antagonistów CaTR skutkowało obniżeniem akumulacji Zn wewnątrz komórek (Ryc. 33 A). Dla 50 μmol/L 2-APB redukcja akumulacji wyniosła 33%, dla 0.5 μmol/L Ctx-GVIA (antagonista kanału wapniowego typu N) około 40%, zaś dla 10 μmol/L NF i 0.2 μmol/L Ctx-MVIIC (antagonista kanału wapniowego typu P/Q) ponad 50% (Ryc. 33 A). Wyjątek stanowiła 2 μmol/L MEC, która obniżyła znamienne (o 33%) akumulację Zn jedynie w komórkach nieróżnicowanych (Ryc. 33 A).

W warunkach polaryzacyjnych, akumulacja Zn wahała się w zakresie 30-35 nmol/mg białka niezależnie od stopnia ekspresji fenotypu cholinergicznego (Ryc. 33 B). W środowisku zawierającym 5.4 mmol/L K⁺ wstępna inkubacja komórek nieróżnicowanych z antagonistami CaTR nie zmieniła istotnie poziomu zakumulowanego cynku. Wyjątkiem był antagonist kanału typu L (nifedypina), który niezależnie od ekspresji fenotypu cholinergicznego niemalże przywrócił poziom kontrolny Zn (Ryc. 33 B). Komórki różnicowane inkubowane w warunkach polaryzacyjnych z antagonistami bramkowanego napięcia kanałów wapniowych typu N (Ctx-GVIA) oraz P/Q (Ctx-MV1IC) tudzież receptora IP₃(2-APB) akumulowały znacznie mniej Zn. Akumulacja Zn spadała odpowiednio o 42% (antagonista VGCC typu N oraz receptora IP₃) oraz 30% (antagonista VGCC typu P/Q). Pre-inkubacja z 2 μmol/L MEC w tych warunkach pozostawała bez wpływu na poziom Zn (Ryc. 33 B).



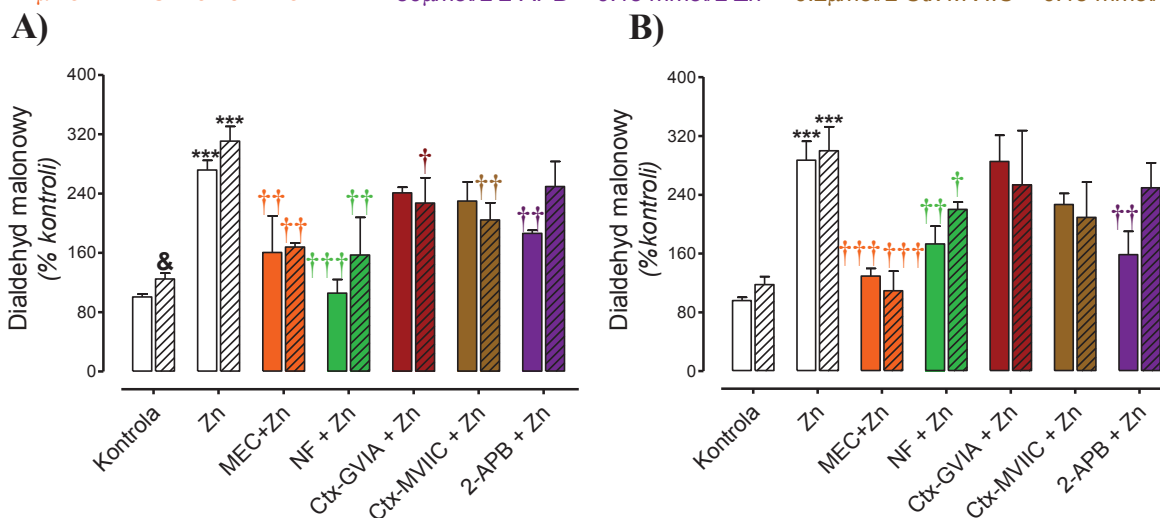
Ryc. 33. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na akumulację cynku w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn († $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$).

Uwaga: Poziom Zn oznaczony w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR był porównywalny do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 0.4 nmol/mg białka (SN56 KN), 0.2 nmol/mg białka (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 0.1 nmol/mg białka (SN56 KN), 0.2 nmol/mg białka (SN56 KR).

5.3.2.6. Wpływ antagonistów CaTR na produkcję związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym

Poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w różnicowanych komórkach linii SN56 wyniósł 3.1 nmol/mg białka i był wyższy o 23% od poziomu oznaczonego w komórkach nieróżnicowanych (2.4 nmol/mg białka) (Ryc. 34 A). Cytotoksyczne stężenie chlorku cynku znacząco zwiększyło akumulację związków TBARS. Niezależnie od ekspresji fenotypu cholinergicznego w komórkach linii SN56 wyniósł on 6.7 nmol/mg białka (Ryc. 34 A). Wstępna inkubacja komórek SN56 z mekamyliną tudzież nifedypiną częściowo przeciwdziałała akumulacji związków TBARS w komórkach eksponowanych na cytotoksyczne stężenia cynku. W warunkach depolaryzacyjnych, 2 μ mol/L MEC (mekamylamina, antagonist receptoru acetylocholino) tudzież 10 μ mol/L NF (nifedypina, antagonist kanału wapniowego typu L) zredukowała poziom związków TBARS ponad dwukrotnie zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR. Pozostali badani antagoniści VGCC modulowali poziom zakumulowanych związków TBARS głównie w środowisku depolaryzacyjnym (Ryc. 34 A). Uzyskane wartości względem zmian wywołanych przez MEC i NF były niewielkie.

● 0.15 mmol/L Zn ● 10 μmol/L NF + 0.15 mmol/L Zn ● 0.5 μmol/L Ctx-GVIA + 0.15 mmol/L Zn
 ● 2 μmol/L MEC + 0.15 mmol/L Zn ● 50 μmol/L 2-APB + 0.15 mmol/L Zn ● 0.2 μmol/L Ctx-MVIIC + 0.15 mmol/L Zn



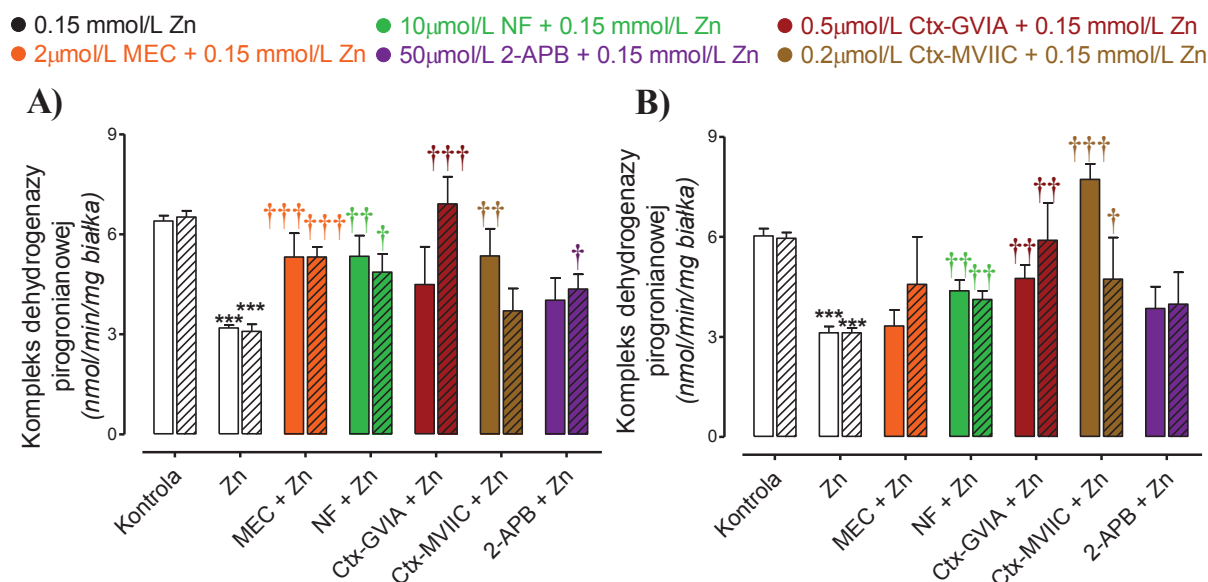
Ryc. 34. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na akumulację związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$; 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN: ($\& p < 0.05$).

Uwaga: Wartość względną parametru (100%) stanowiła akumulacja związków TBARS oznaczona w punktach kontrolnych SN56 KN wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych 2.3 nmol/mg białka oraz w warunkach polaryzacyjnych 2.5 nmol/mg białka.

5.3.2.7. Wpływ antagonistów CaTR na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn

Aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) zarówno w różnicowanych jak i nieróżnicowanych komórkach SN56 wyniosła około 6.0 nmol/min/mg białka. Ostra ekspozycja komórek na 0.15 mmol/L Zn, niezależnie od fenotypu cholinergicznego oraz stężenia K^+ w środowisku inkubacyjnym, wywołała 50% spadek aktywności enzymu (Ryc. 35 A-B). Zablokowanie badanymi antagonistami CaTR, w stężeniach wysycających, zabezpieczyło aktywność PDHC przed inhibycyjnym wpływem Zn (Ryc. 35 A-B). Efekt protekcyjny w stosunku do aktywności PDHC był szczególnie zauważalny w środowisku inkubacyjnym zawierającym 30 mmol/L K^+ . W tych warunkach, obecność 2 μmol/L mekamilaminy tudzież 10 μmol/L nifedypiny zabezpieczyła aktywność PDHC na około 65% wyższym poziomie niżeli w obecności jedynie 0.15 mmol/L Zn (Ryc. 35 A). Opisany wpływ antagonistów był niezależny od ekspresji fenotypu cholinergicznego. Protekcyjny wpływ 0.5 μmol/L Ctx-GVIA oraz 0.2 μmol/L Ctx-MVIIC

na aktywność PDHC w komórkach SN56 KN i SN56 KR eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn był zmienny i wynosił średnio dla warunków depolaryzacyjnych 60%, zaś w warunkach polaryzacyjnych 100% (Ryc. 35 A-B). Właściwości protekcyjne 2 $\mu\text{mol/L}$ MEC oraz 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB zauważalne były jedynie w środowisku depolaryzacyjnym (Ryc. 35 A-B).



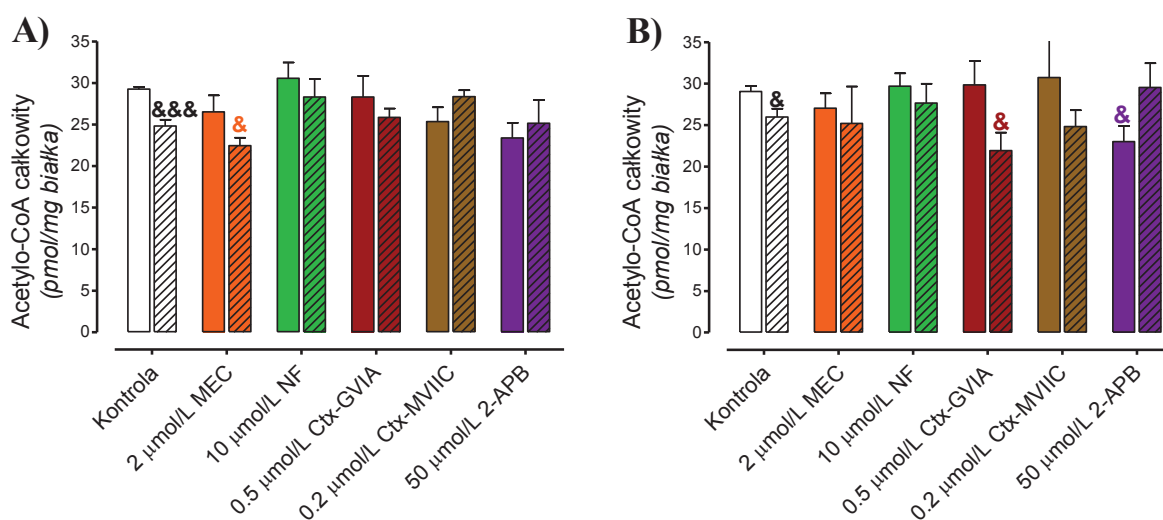
Ryc. 35. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$; 0.15 mmol/L Zn (†) $p < 0.05$, (††) $p < 0.01$, (†††) $p < 0.001$.

Uwaga: Wartość parametru oznaczona w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR była porównywalna (z wyjątkiem 2 $\mu\text{mol/L}$ MEC i 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB, patrz \rightarrow podrozdział 6.6) do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 6.4 nmol/mg białka (SN56 KN), 6.5 nmol/mg białka (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 6.0 nmol/mg białka (SN56 KN oraz KR).

5.3.2.8. Wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56

Poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych komórkach SN56 wynosił 29.3 pmol/mg białka i był znamienne wyższy niżeli w komórkach różnicowanych, gdzie wyniósł 24.8 pmol/mg białka (Ryc. 36 A-B). Inkubacja komórek linii SN56 z antagonistami CaTR nie wpływała na poziom całkowitego acetylo-CoA. Zmian nie obserwowano zarówno w komórkach różnicowanych, jak i nieróżnicowanych. Stężenie jonów potasu w środowisku

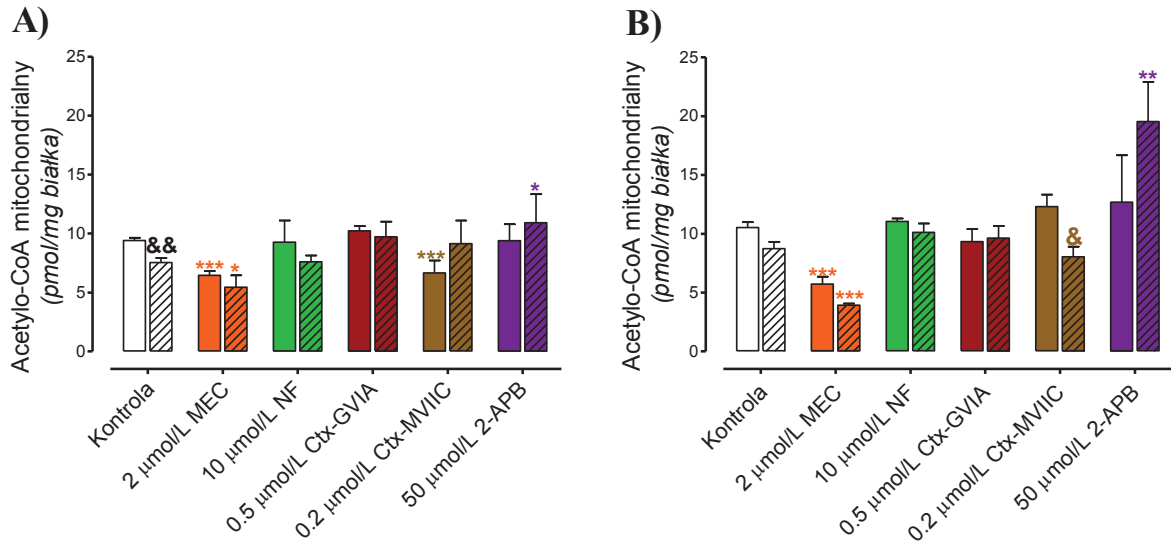
inkubacyjnym również nie modyfikowało wpływu antagonistów CaTR na poziom tego metabolitu w SN56 KN oraz SN56 KR.



Ryc. 36. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut (90 minut dla 2-APB) w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-11 doświadczeń. Znamienne różne od SN56 KN (& $p < 0.05$, &&& $p < 0.001$).

5.3.2.9. Wpływ antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA w przedziałach komórkowych komórek SN56

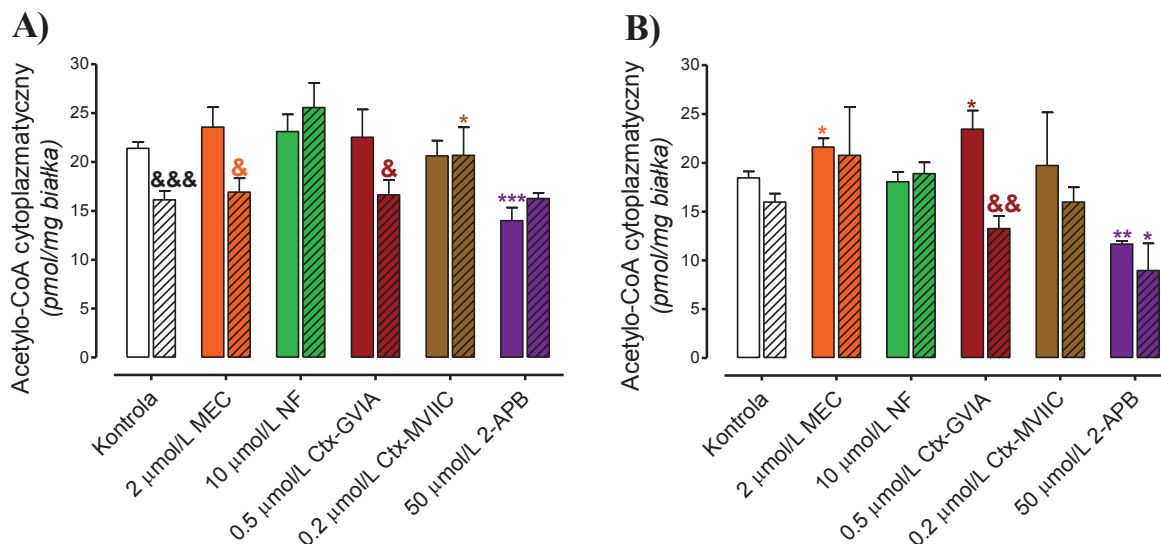
Poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym wyniósł 9.4 (SN56 KN) oraz 7.5 pmol/mg białka (SN56 KR) (Ryc. 37 A). W przedziale cytoplazmatycznym poziom acetylo-CoA wynosił 21.4 i 16.1 pmol/mg białka odpowiednio w SN56 KN i SN56 KR (Ryc. 38 A). W obu przedziałach komórkowych poziom acetylo-CoA w komórkach różnicowanych był znamienne niższy niż w komórkach nieróżnicowanych. Wykazano, że zablokowanie aktywności kanałów wapniowych zależnych od napięcia nie wpływa istotnie na poziom tego metabolitu zarówno w przedziale mitochondrialnym, jak i cytoplazmatycznym. Znamienne, nie zależne od stężenia K^+ w środowisku, zmiany poziomu acetylo-CoA w przedziałach komórkowych odnotowano w przypadku inkubacji komórek w obecności 2 μ mol/L MEC tudzież 50 μ mol/L 2-APB (Ryc. 37 A-B, 38 A-B).



Ryc. 37. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na mitochondrialny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut (90 minut dla antagonisty receptora IP₃) w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-13 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); SN56 KN (&p<0.05, &&p<0.01).

Inkubacja komórek w obecności antagonisty receptora acetylocholiny spowodowała częściowe przesunięcie acetylo-CoA z frakcji mitochondrialnej do frakcji cytoplazmatycznej. Spadek poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej w SN56 KN oraz SN56 KR inkubowanych w obecności MEC (antagonista receptora acetylocholiny) wyniósł około 30% (środowisko depolaryzacyjne) tudzież 50% (środowisko polaryzacyjne) (Ryc. 37 A-B). Równocześnie obserwowano wzrost poziomu acetylo-CoA we frakcji cytoplazmatycznej, wynoszący w środowisku polaryzacyjnym od 20% (SN56 KN) do 30% (SN56 KR) (Ryc. 38 A-B).

Kompartamentacja acetylo-CoA w komórkach inkubowanych w obecności 50 μmol/L 2-APB (2-aminoetoksydifenylboran) wykazywała odwrotną tendencję niżeli w przypadku 2 μmol/L mekamylnaminy. Antagonista receptora IP₃, szczególnie w komórkach różnicowanych, zwiększał o 45% (środowisko depolaryzacyjne) tudzież o ponad 120% (środowisko polaryzacyjne) poziom acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej (Ryc. 37 A-B). Równocześnie spadek poziomu acetylo-CoA we frakcji cytoplazmatycznej wyniósł maksymalnie 44% (SN56 KR inkubowane w środowisku polaryzacyjnym) (Ryc. 37 B, 38 B).

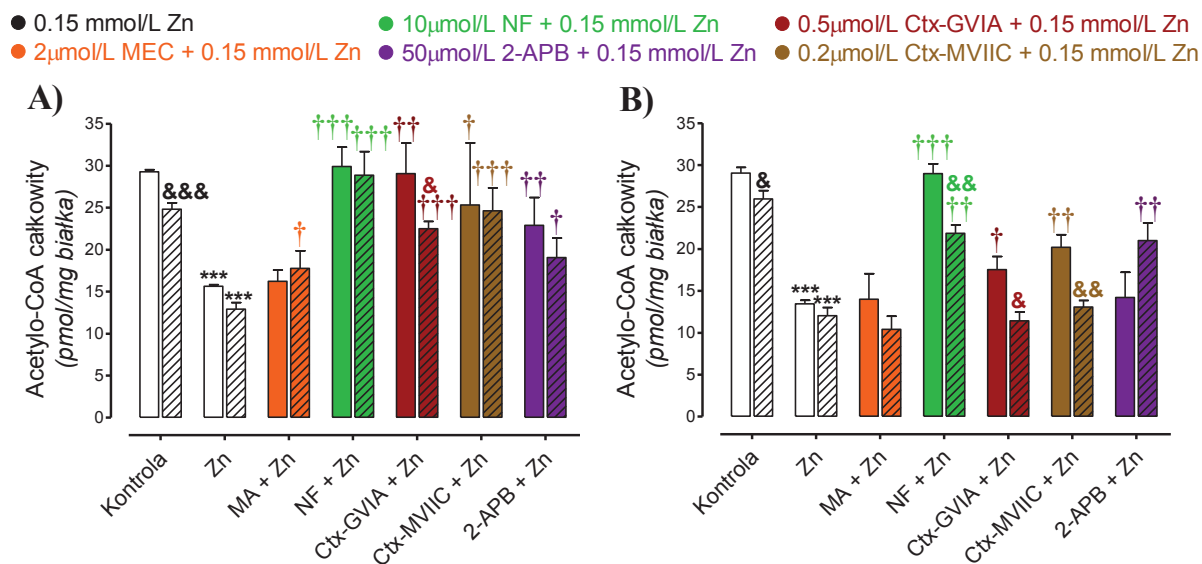


Ryc. 38. Regulatorowy wpływ antagonistów CaTR na cytoplazmatyczny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut (90 minut dla 2-APB) w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-13 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$).

5.3.2.10. Wpływ antagonistów CaTR na całkowity poziom acetylo-CoA w komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn

0.15 mmol/L chlorek cynku spowodował dwukrotny spadek poziomu acetylo-CoA zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR, w których poziom kontrolny acetylo-CoA wynosił odpowiednio 29.3 pmol/mg białka oraz 24.8 pmol/mg białka (Ryc. 36 A, 39 A-B). W warunkach depolaryzacyjnych, badani antagoniści zależnych od potencjału kanałów wapniowych zabezpieczyli, przed inhibicyjnym działaniem Zn, poziom acetylo-CoA w zakresie wartości kontrolnych zarówno dla SN56 KN, jak i SN56 KR (Ryc. 39 A). Wpływ 2 μ mol/L MEC na poziom acetylo-CoA w komórkach ekspozowanych na 0.15 mmol/L Zn był nieznaczny (Ryc. 39 A-B). Obserwowany protekcyjny efekt konotoksyn GVIA i MVIIC (antagoniści kanałów wapniowych odpowiednio typu N oraz P/Q) był szczególnie widoczny w eksperymentach prowadzonych w środowisku zawierającym 30 mmol/L K^+ . W eksperymentach z niskim stężeniem jonów potasu protekcyjne działanie antagonistów obserwowano głównie w komórkach nieróżnicowanych. W przypadku nifedypiny, zabezpieczenie poziomu acetylo-CoA w zakresach kontrolnych było niezależne od ekspresji fenotypu cholinergicznego oraz stanu czynnościowego komórek SN56. 50 μ mol/L 2-APB w środowisku depolaryzacyjnym, zwiększało poziom acetylo-CoA o 46% (SN56 KN

i SN56 KR) w stosunku do komórek eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn (Ryc. 39 A). Natomiast w środowisku polaryzacyjnym, wstępna inkubacja z 50 μ mol/L 2-APB zwiększała poziom acetylo-CoA o 75% jedynie w SN KR (Ryc. 39 B).



Ryc. 39. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-11 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (***) $p < 0.001$; 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN (&& $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$).

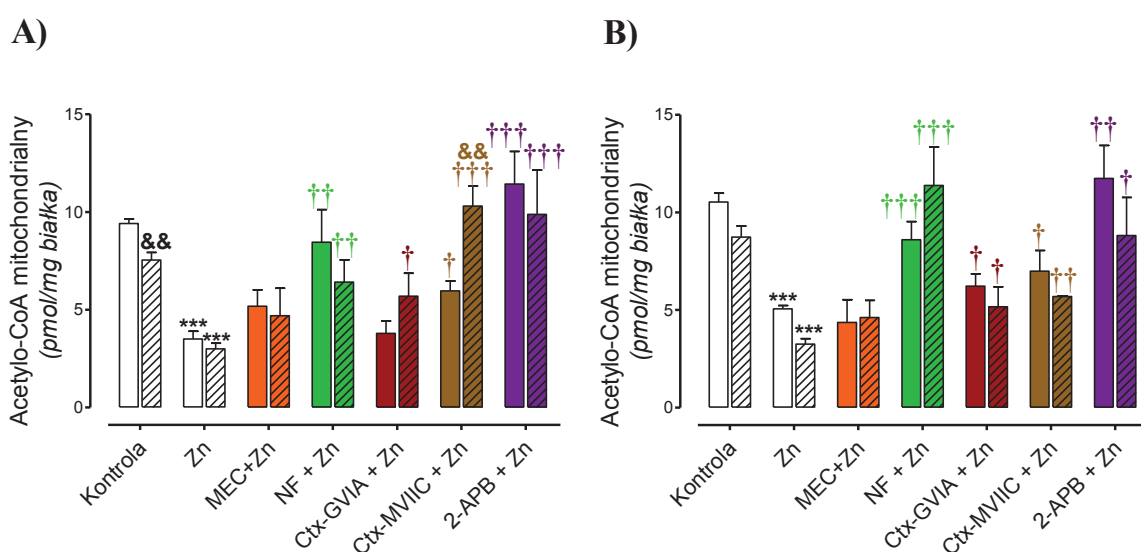
5.3.2.11. Wpływ antagonistów CaTR na poziom acetylo-CoA we frakcjach komórkowych komórek SN56 poddanych ostrej ekspozycji na Zn

Krótkoczasowa ekspozycja nieróżnicowanych i różnicowanych komórek linii SN56 na 0.15 mmol/L Zn spowodowała około 60% spadek poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej zarówno w SN56 KN jak i SN56 KR oraz 50% (SN56 KN) tudzież 30% (SN56 KR) we frakcji cytoplazmatycznej (Ryc. 40 A, Ryc. 41 A).

Wstępna inkubacja komórek SN56 z 10 μ mol/L nifedypiną (antagonista kanału wapniowego typu L) bądź 50 μ mol/L 2-APB (antagonista receptora IP_3) zabezpieczyły dostępność acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej na poziomach kontrolnych, niezależnie od stopnia ekspresji fenotypu cholinergicznego tudzież stanu czynnościowego komórek (Ryc. 40 A-B). 2 μ mol/L MEC (antagonista receptora acetylocholino) nie modyfikowała poziomu acetylo-CoA w obu subkulturach komórek SN56 zarówno we frakcji

mitochondrialnej, jak i cytoplazmatycznej (Ryc. 40A-B, Ryc. 41A-B). Konotoksyny GVIA oraz MVIIC (antagoniści kanałów wapniowych odpowiednio typu N oraz P/Q) zabezpieczały przed toksycznym wpływem cynku na poziom acetylo-CoA. (Ryc. 40 A-B), aczkolwiek w eksperymentach prowadzonych w środowisku depolaryzacyjnym efekt konotoksyn był zależny od ekspresji fenotypu cholinergicznego. SN56 KR były zamiennie bardziej niżeli SN56 KN podatne na protekcyjny efekt antagonistów VGCC typu N oraz P/Q (Ryc. 40 A-B). Poziom acetylo-CoA był nawet o ponad trzykrotnie wyższy (SN56 KR, warunki depolaryzacyjne, Ctx-MVIIC) niżeli w obecności tylko 0.15 mmol/L Zn (Ryc. 40 A).

● 0.15 mmol/L Zn ● 10 μmol/L NF + 0.15 mmol/L Zn ● 0.5 μmol/L Ctx-GVIA + 0.15 mmol/L Zn
 ● 2 μmol/L MEC + 0.15 mmol/L Zn ● 50 μmol/L 2-APB + 0.15 mmol/L Zn ● 0.2 μmol/L Ctx-MVIIC + 0.15 mmol/L Zn



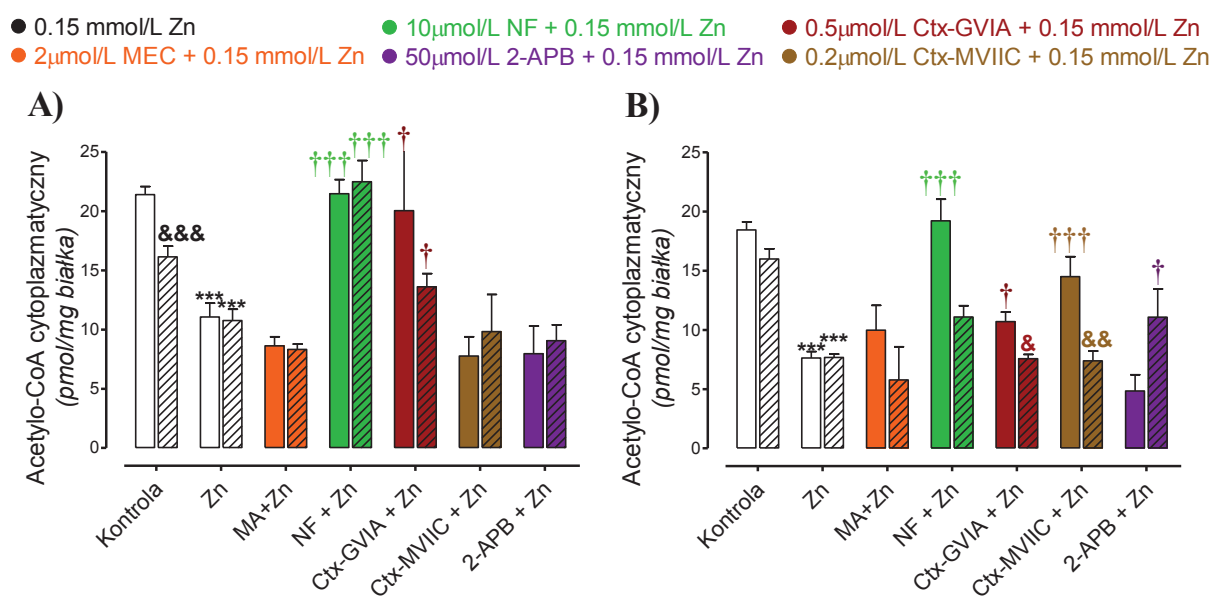
Ryc. 40. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na mitochondrialny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN ($\& p < 0.05$, $\&\& p < 0.01$, $\&\&\& p < 0.001$).

Poziom acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym SN56 KN oznaczony w warunkach depolaryzacji błony komórkowej wyniósł 21.4 pmol/mg białka. W przedziale cytoplazmatycznym, różnicowane komórki linii SN56 zawierały 16.1 pmol/mg białka acetylo-CoA. Krótkoczasowa ekspozycja komórek na 0.15 mmol/L Zn obniżyła poziom acetylowanego CoA do wartości poniżej 12 pmol/mg białka (SN56 KN i SN56 KR) (Ryc. 41 A-B).

Pre-inkubacja z 10 μmol/L NF w warunkach depolaryzacyjnych zabezpieczała dostępność acetylo-CoA na poziomie kontrolnym niezależnie od ekspresji fenotypu

cholinergicznego. Natomiast w warunkach polaryzacyjnych efekt ten był widoczny jedynie w SN56 KN. Protekcyjny wpływ pozostałych badanych antagonistów kanałów wapniowych na poziom acetylo-CoA w warunkach cytotoksycznych był nieznaczny.

W obecności niskiego stężenia jonów potasu (5 mmol/L) w środowisku inkubacyjnym antagoniści kanałów wapniowych znacząco zwiększali dostępność acetylo-CoA w SN56 KN, podczas gdy w SN56 KR dostępność acetylo-CoA nie ulegała znaczącej zmianie (Ryc. 41 A-B). 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB nie zwiększał dostępności acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym komórek SN56. Jednakże, w świetle wykazanej regulacji kompartmentacji acetylo-CoA w komórkach SN56 przez 2-APB (patrz \rightarrow 5.3.2.9), uzyskany wynik nie budzi zastrzeżeń (Ryc. 41 A-B).

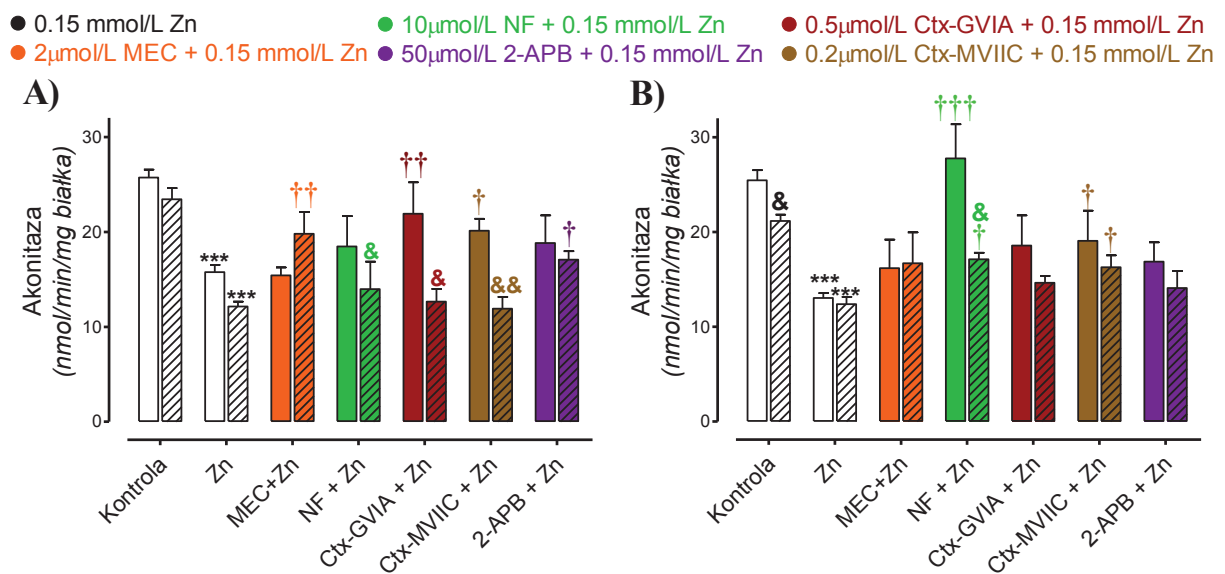


Ryc. 41. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na cytoplazmatyczny poziom acetylo-CoA w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-9 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN ($\& p < 0.05$, $\&\& p < 0.01$, $\&\&\& p < 0.001$).

5.3.2.12. Wpływ antagonistów CaTR na aktywność wybranych enzymów cyklu kwasów trójkarboksyłowych w komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu Zn

W warunkach kontrolnych aktywność akonitazy wynosiła odpowiednio 25.7 (SN56 KN) oraz 23.4 nmol/min/mg białka (SN56 KR). W wyniku ekspozycji na

0.15 mmol/L Zn, w SN56 KN aktywność akonitazy obniżyła się 38, podczas gdy w różnicowanych komórkach SN56 aktywność spadła o 47% (Ryc. 42 A). Częściowe ograniczenie napływu Zn do wnętrza komórek różnicowanych poprzez zablokowanie VGCC nie zabezpieczyło aktywności akonitazy przed inhibicyjnym wpływem tego czynnika toksycznego (Ryc. 42 A-B). W przypadku komórek nieróżnicowanych w środowisku depolaryzacyjnym zaobserwowano, że wstępna inkubacja z antagonistami kanałów wapniowych ograniczyła jedynie częściowo toksyczny wpływ Zn (Ryc. 42 A-B). Aktywność akonitazy w tych komórkach była wyższa niżeli w obecności 0.15 mmol/L Zn o odpowiednio 16% (10 μ mol/L NF), 27% (0.2 μ mol/L Ctx-MV1IC) oraz 38% (0.5 μ mol/L Ctx-GVIA). Pre-inkubacja z 50 μ mol/L 2-ABP nie zabezpieczała przed toksycznym wpływem cynku na aktywność akonitazy, jedynie w SN56 KR, w warunkach depolaryzacyjnych, obserwowano nieznaczny wpływ tego antagonisty na aktywność akonitazy w komórkach eksponowanych na Zn (Ryc. 42 A-B).

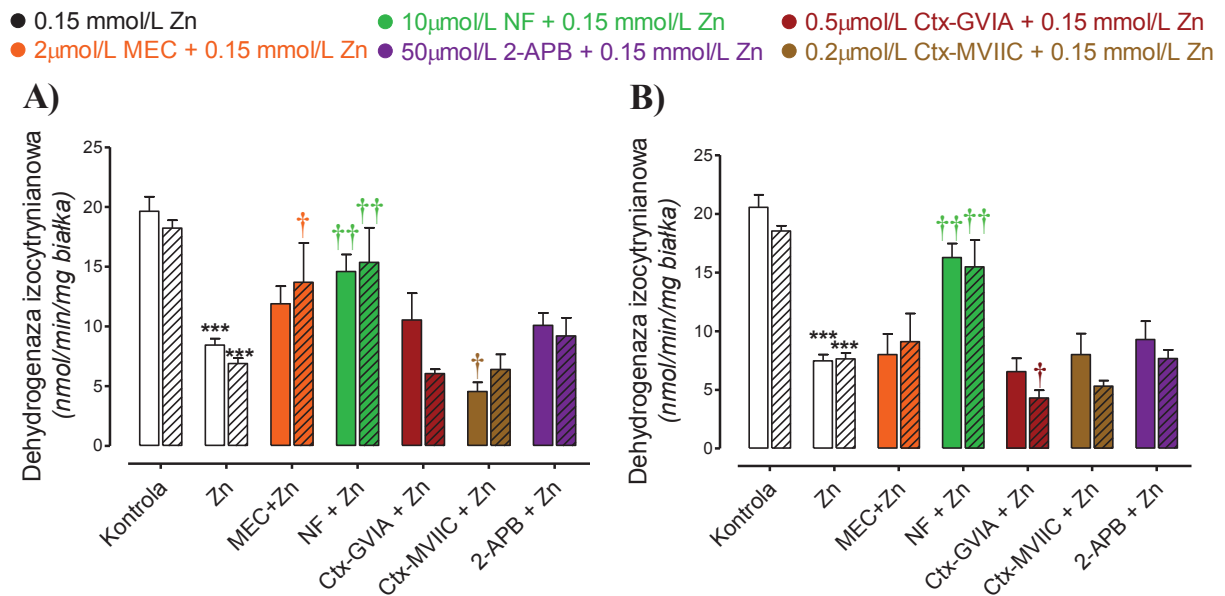


Ryc. 42. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność akonitazy w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-11 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$; 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN ($\& p < 0.05$, $\&\& p < 0.01$).

Uwaga: Aktywność akonitazy oznaczona w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR była porównywalna do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 25.7 nmol/min/mg białka (SN56 KN), 23.4 nmol/min/mg białka (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 25.5 nmol/min/mg białka (SN56 KN), 21.2 nmol/min/mg białka (SN56 KR).

Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej wynosiła odpowiednio 19.6 (SN56 KN) oraz 18.2 nmol/min/mg białka (SN56 KR). Krótkoczasowa ekspozycja komórek

na 0.15 mmol/L Zn wywołała ponad 50% inhibicję aktywności tego enzymu, niezależnie od ekspresji fenotypu cholinergicznego tudzież stanu czynnościowego komórek (Ryc. 43 A-B). W przypadku dehydrogenazy izocytrynianowej jedynie wstępna inkubacja z 10 μ mol/L NF (antagonista kanału wapniowego typu L) zabezpieczała przed toksycznym wpływem Zn na aktywność tego enzymu. Aktywność akonitazy po wstępnej inkubacji z nifedypiną w komórkach nieróżnicowanych SN56 była wyższa niżeli jedynie w obecności 0.15 mmol/l Zn o ponad 60%. W przypadku komórek różnicowanych aktywność enzymu była około 2-krotnie wyższa niżeli oznaczona w SN56 KR eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn. W środowisku depolaryzacyjnym zauważono również niewielki protekcyjny wpływ 2 μ mol/L MEC (antagonista receptora acetylocholinowego) wobec dehydrogenazy izocytrynianowej (Ryc. 43 A-B).

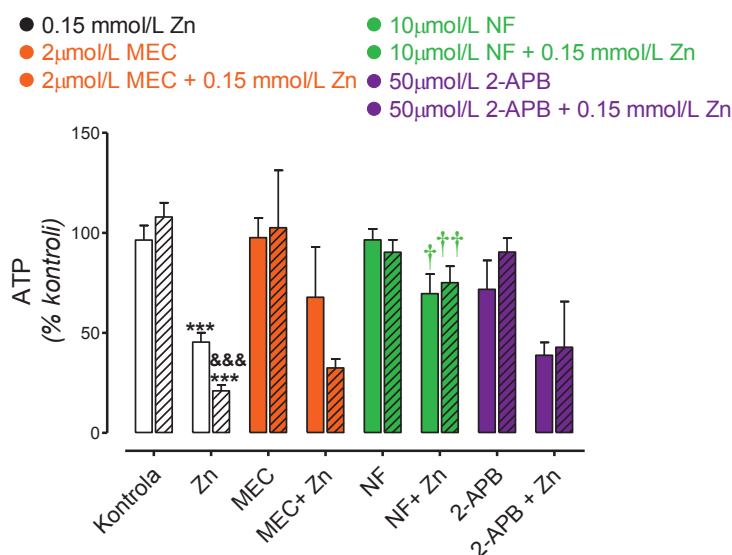


Ryc. 43. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn (†) $p < 0.05$, (††) $p < 0.01$.

Uwaga: Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej oznaczona w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR była porównywalna do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 19.6 nmol/min/mg białka (SN56 KN), 18.2 nmol/min/mg białka (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 20.6 nmol/min/mg białka (SN56 KN), 18.5 nmol/min/mg białka (SN56 KR).

5.3.2.13. Wpływ antagonistów CaTR na poziom ATP w komórkach SN56 poddawanych ostremu wpływowi Zn

Poziom ATP w SN56 KN i SN56 KR oznaczony w eksperymencie krótkoczasowej inkubacji komórek SN56 w środowisku depolaryzacyjnym nie różnił się znamienne. W wyniku ostrej ekspozycji SN56 KN na 0.15 mmol/L Zn, poziom ATP spadł o 58%. Natomiast w SN56 KR zmiana wynosiła aż 87% i była to różnica statystycznie znamienne w stosunku do SN56 KN znamienne statystycznie (Ryc. 44). Badani antagoniści CaTR nie zmieniali poziomu dostępnego ATP. Wyjątek stanowiła 10 μ mol/L nifedypina jako antagonistka kanału wapniowego typu L, która zabezpieczała dostępność ATP niemalże w zakresach kontrolnych (Ryc. 44).



Ryc. 44. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom ATP w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddawanych ostremu działaniu 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$); SN56 KN (&&& $p < 0.001$).

Uwaga: Wartość względną stanowił poziom ATP oznaczony w SN56 KN, tj. 6.0 nmol/mg białka.

5.3.2.14. Wpływ antagonistów CaTR na poziom i wydzielanie acetylocholin w komórkach SN56 poddawanych ostremu działaniu Zn

Komórki SN56 hodowane przez 48 godzin w obecności czynników różnicujących, a następnie inkubowane przez 30 minut w środowisku depolaryzacyjnym

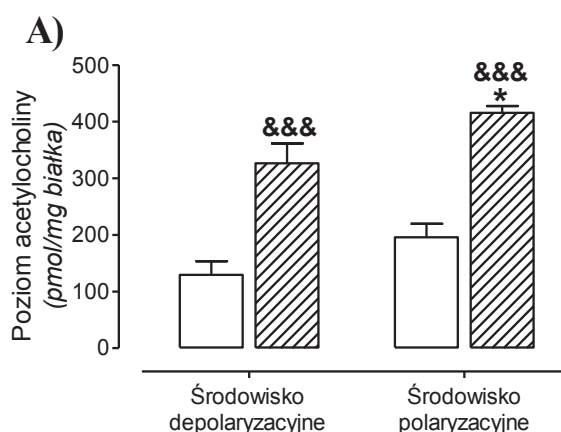
bądź polaryzacyjnym wykazywały ponad dwukrotny wzrost poziomu acetylocholin w stosunku do komórek nieróżnicowanych (Ryc. 45 A-C, Tabela 4).

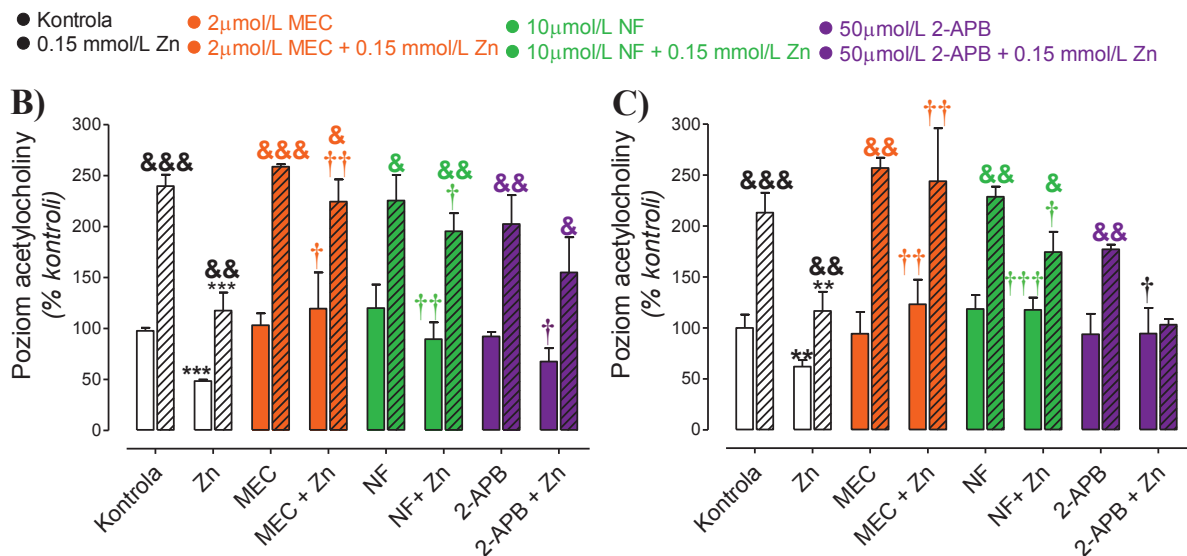
Poziom acetylocholin w warunkach depolaryzacji błony komórkowej w SN56 KN i SN56 KR wynosił odpowiednio 129.5 oraz 326.6 pmol/mg białka (Ryc. 45A). W warunkach polaryzacyjnych poziom acetylocholin w różnicowanych komórkach SN56 wynosił 415.5 pmol/mg białka i był wyższy o 57% od poziomu oznaczonego w warunkach depolaryzacyjnych (326.6 pmol/mg białka) (Ryc. 45 A).

Wstępna inkubacja komórek z 2 $\mu\text{mol/L}$ MEC (antagonista receptora acetylocholin), 10 $\mu\text{mol/L}$ NF (antagonista kanału wapniowego typu L) tudzież 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB (antagonista receptora IP_3) nie modyfikowała poziomu Ach.

Krótkoczasowa ekspozycja na 0.15 mmol/L chlorek cynku powodowała około dwukrotną deprecjację poziomu w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach, niezależnie od stanu czynnościowego (Ryc. 45 A-B).

W warunkach depolaryzacyjnych, wstępna inkubacja SN56 KN oraz SN56 KR z badanymi antagonistami (mekamylamina, nifedypina, 2-APB) zabezpieczała komórki przed toksycznym wpływem 0.15 mmol/L Zn na poziom acetylocholin.





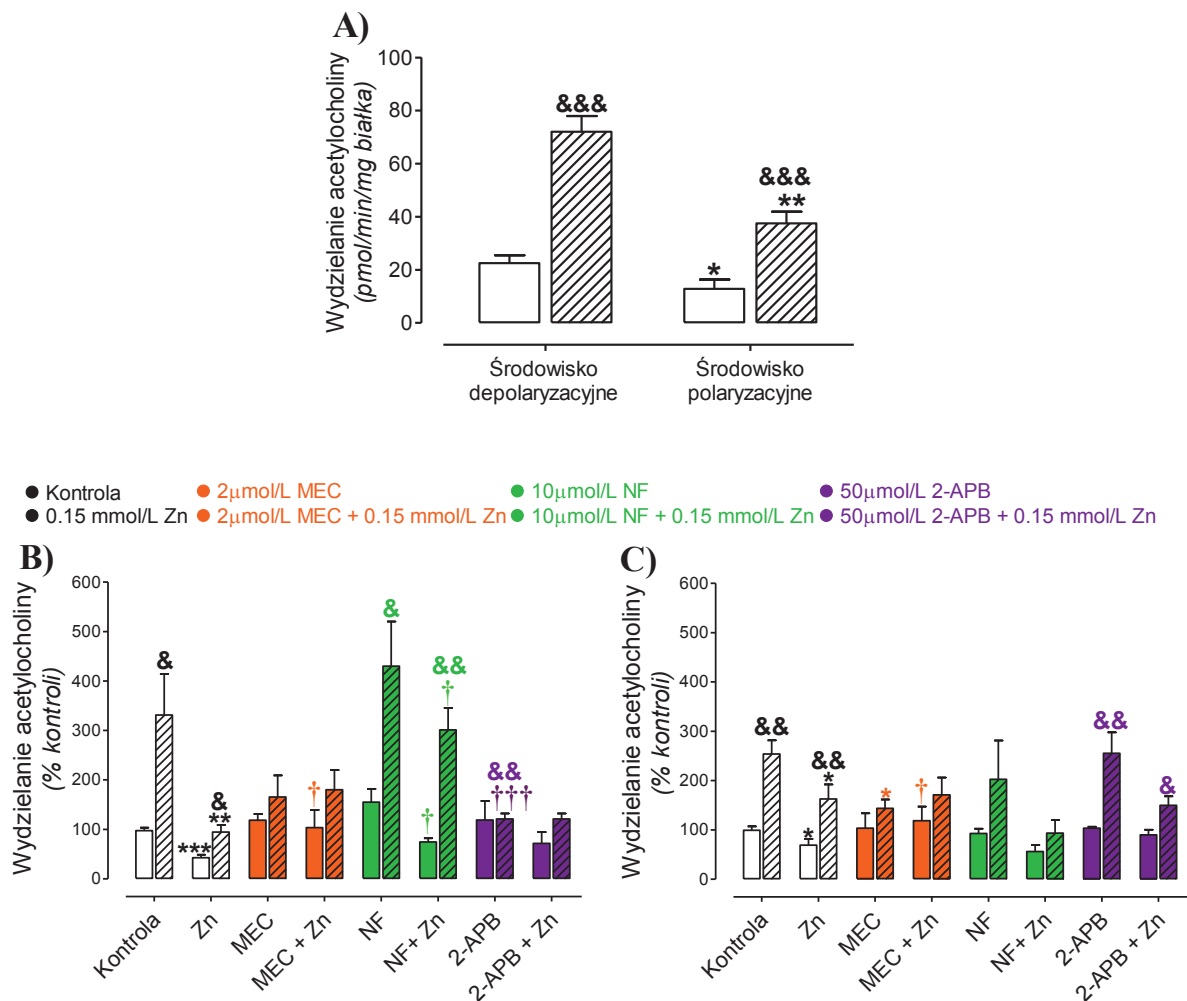
Ryc. 45. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom acetylocholiny w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (B) tudzież polaryzacyjnych (C). Na rycinie A podano wartości bezwzględne oznaczone w komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2-9 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); 0.15mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN: ($\&\& p < 0.01$, $\&\&\& p < 0.001$).

W eksperymentach krótkoczasowych, wzrostowi syntezy acetylocholiny towarzyszyła intensyfikacja kwantowego wydzielania tego metabolitu do środowiska (Ryc. 45 A-C, 46 A-C). Ponadto, wydzielanie acetylocholiny było ponad trzykrotnie wyższe w komórkach różnicowanych w stosunku do komórek nieróżnicowanych (Ryc. 46 A-C).

Wydzielanie acetylocholiny było wyższe w stanie depolaryzacji niżeli w polaryzacji. Wartości wynosiły odpowiednio 72.0 pmol/min/mg białka oraz 37.5 pmol/min/mg białka (Ryc. 46 B-C). Zgodnie z krótkoczasowym schematem badawczym, SN56 KR pozostawały przez okres 40 minut w środowisku inkubacyjnym. W tym czasie SN56 KR wydzieliły 2.9 nmol ACh/mg białka do środowiska depolaryzacyjnego. Natomiast SN56KR inkubowane 40 minut w środowisku polaryzacyjnym wydzieliły około 1.5 nmol ACh/mg białka, czyli o 48% mniej metabolitu w porównaniu do komórek inkubowanych w środowisku depolaryzacyjnym (Ryc. 46 A).

Wstępna inkubacja komórek z 10 μ mol/L NF nie wpływała na wydzielanie ACh. Z drugiej strony, 2 μ mol/L MEC oraz 50 μ mol/L 2-APB obniżały kwantowe wydzielanie tego metabolitu w SN56 KR ponad dwukrotnie, niezależnie od stanu czynnościowego komórek. Krótkoczasowa ekspozycja na 0.15 mmol/L chlorek cynku

powodowała ponad dwukrotną supresję wydzielania acetylocholino w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach, niezależnie od stanu czynnościowego (Ryc. 46 B-C). Pre-inkubacja z 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedypiną częściowo odwracała hamujący wpływ Zn na wydzielanie ACh w warunkach depolaryzacji komórek różnicowanych SN56. Pozostałe białka regulujące poziom wapnia w komórkach pozostawały bez wpływu na wydzielanie Ach w warunkach cytotoksycznych.

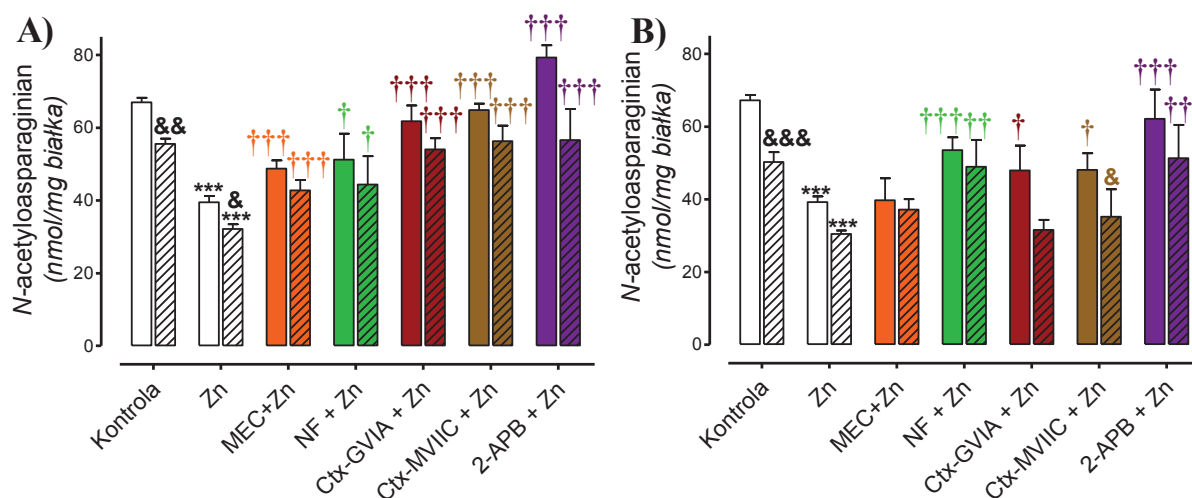


Ryc. 46. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na wydzielanie acetylocholino w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych krótkoczasowej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (B) tudzież polaryzacyjnych (C). Na rycinie A podano wartości bezwzględne kwantowego wydzielania acetylocholino przez komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 2-9 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$); SN56 KN: (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$).

5.3.2.15. Wpływ antagonistów CaTR na poziom *N*-acetyloasparagianu w komórkach SN56 poddanych ostremu wpływowi Zn

Poziom *N*-acetyloasparagianu w SN56 KR wynosił 55.6 nmol/mg białka i był o 17% niższy niżeli w komórkach nieróżnicowanych (67.0 nmol/mg białka) (Tabela 4). W wyniku ekspozycji SN56 na 0.15 mmol/L Zn, poziom metabolitu obniżył się o około 40% (SN56 KN i SN56 KR), niezależnie od stanu czynnościowego komórek (Ryc. 47 A). Wstępna inkubacja komórek nieróżnicowanych z antagonistami CaTR zabezpieczała produkcję NAA przed inhibicyjnym wpływem Zn (Ryc. 47 A-B). Największe zmiany poziomu NAA odnotowano w warunkach depolaryzacyjnych, gdzie oznaczony poziom metabolitu w próbach wstępnie inkubowanych w obecności antagonistów był wyższy od poziomu oznaczonego w próbach badających toksyczny wpływ Zn o średnio 25% (2 μ mol/L mekamylamina oraz 10 μ mol/L nifedypina), 60% (konotoksyna GVIA oraz MVIIC) tudzież o 100% (50 μ mol/L 2-APB). Zmiany poziomu NAA oznaczone w różnicowanych komórkach SN56 były procentowo zbliżone. Ponadto, poziom NAA w komórkach nieróżnicowanych był średnio wyższy o ponad 10% niżeli w komórkach różnicowanych (Ryc. 47 A-B). Efekt protekcyjny konotoksyn MVIIC oraz GVIA (antagoniści odpowiednio kanałów wapniowych typu N oraz P/Q) obserwowano tylko w warunkach depolaryzacyjnych (Ryc. 47 A). 10 μ mol/L NF (antagonista kanału wapniowego typu L) oraz 50 μ mol/L 2-APB (antagonista receptora IP₃) zabezpieczały znamiennie wyższy poziom NAA, niezależnie od rodzaju środowiska inkubacyjnego (Ryc. 47 A-B).

● 0.15 mmol/L Zn ● 10 μ mol/L NF + 0.15 mmol/L Zn ● 0.5 μ mol/L Ctx-GVIA + 0.15 mmol/L Zn
 ● 2 μ mol/L MEC + 0.15 mmol/L Zn ● 50 μ mol/L 2-APB + 0.15 mmol/L Zn ● 0.2 μ mol/L Ctx-MV1IC + 0.15 mmol/L Zn



Ryc. 47. Wpływ selektywnych antagonistów CaTR na poziom *N*-acetyloasparaginianu w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w warunkach depolaryzacyjnych (A) tudzież polaryzacyjnych (B). Antagoniści CaTR nie wpływały istotnie na poziom NAA w punktach kontrolnych. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (***) $p < 0.001$); 0.15 mmol/L Zn ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$); SN56 KN (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$).

Uwaga: Poziom *N*-acetyloasparaginianu oznaczony w komórkach inkubowanych jedynie z antagonistami CaTR była porównywalna do wartości kontrolnych wynoszących odpowiednio w warunkach depolaryzacyjnych: 67.0 nmol/mg białka (SN56 KN), 55.6 nmol/mg białka (SN56 KR) oraz polaryzacyjnych: 67.3 nmol/mg białka (SN56 KN), 50.2 nmol/mg białka (SN56 KR).

6. DYSKUSJA

6.1. SN56 jako komórkowy model neuronów cholinergiczych

Linia komórkowa SN56 posiada szerokie zastosowanie jako komórkowy model neuronów cholinergiczych służący do badania wpływu czynników neurotoksycznych na metabolizm neuronów cholinergiczych (Albers et al., 2014; del Pino et al., 2015; Del Pino et al., 2015; Eibing et al., 2012; Hartnett et al., 2014; Hettiarachchi et al., 2010). Od niemal 2 dekad w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej (ZML) prowadzone są badania z zakresu wpływu sygnałów neurotoksycznych towarzyszących rozwojowi AD (tj. obniżony poziom tiaminy, zwiększona akumulacja β -amyloidu, tlenków azotu tudzież jonów glinu) na metabolizm energetyczny neuronów cholinergiczych (Bielarczyk et al., 2006; Bielarczyk et al., 2003a; Bielarczyk et al., 2005; Bielarczyk et al., 2003b; Bizon-Zygmańska et al., 2011; Jankowska-Kulawy et al., 2008; Klimaszewska-Łata et al., 2015; Madziar et al., 2003; Suwalsky et al., 2013; Szutowicz et al., 2005; Szutowicz et al., 2004). W ostatnich latach pracy ZML wiodącym tematem pozostaje pobudzenie ekscytotoksyczne neuronów glutaminergiczych oraz toksyczny wpływ wydłużonej ekspozycji neuronów cholinergiczych na wysokie stężenia jonów cynku (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007; Suwalsky et al., 2009; Szutowicz et al., 2013).

Aktywności enzymów mitochondrialnych w różnicowanych komórkach linii SN56 różnią się znacznie od oznaczonych w modelach zwierzęcym tudzież mózgu człowieka. Zaprezentowane w tabeli 7 aktywności enzymów (kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, syntaza cytrynianowa, acetylotransferaza asparaginianową) są znacznie niższe w różnicowanych komórkach linii SN56, niżeli w pozostałych porównywanych preparatach. Jednakże odwołując się do podrozdziału 5.1, hodowla komórek SN56 w obecności mieszaniny 0.5 mmol/L db-cAMP oraz 0.001 mmol/L RA skutkowała znamienym wzrostem markerów fenotypu cholinergicznego. Zaobserwowane zmiany morfologiczne oraz metaboliczne jednoznacznie wskazywały na celowość zastosowania wspomnianego modelu komórkowego. Istotną zaletą linii komórkowej SN56 jest fakt, że nie stawia ona ograniczeń z punktu widzenia dostępności materiału biologicznego, czego nie można potwierdzić w przypadku pozostałych modeli badawczych opisanych w tabeli 7. Ponadto, istotną część niniejszej pracy stanowią badania wpływu czynników (lipoamid, jony cynku, czynniki różnicujące) na poziom NAA. Oznaczony poziom metabolitu w różnicowanych komórkach SN56 zdaje się być bliski poziomom oznaczanym w pozostałych modelach

badawczych. Oznacza to, że zmiany poziomu NAA w różnicowanych komórkach SN56 są dobrą wykładnią zmian zachodzących wewnątrz mózgu ulegającego neurodegeneracji.

Tabela 7. Porównanie wybranych parametrów związanych z metabolizmem acetylo-CoA oznaczonych w różnych modelach badawczych

PARAMETR	Człowiek	Model zwierzęcy*	SN56 KR
PDHC (<i>nmol/min/mg białka</i>)	B: 11.4 ±1.5 (Bubber et al., 2004b)	B: 29.5 ±0.9 (Bubber et al., 2005)	5.2 ±0.5 (niniejsza praca)
CS (<i>nmol/min/mg białka</i>)	H: 164.0 ±18.0 (Bettendorff et al., 1997)	B: 223.4 ±7.0 (Bubber et al., 2004a)	117.0 ±11.2 (niniejsza praca)
ChAT (<i>nmol/min/mg białka</i>)	H: 0.91 ±0.16 (DeKosky et al., 2002)	H: 1.7 ±0.1 (Li, 2000)	0.23 ±0.02 (niniejsza praca)
NAA** (<i>nmol/mg białka</i>)	H: 58.5±0.4 (Li et al., 2013)	H: 76.3 ±7.9 (Harte et al., 2005)	56.2 ±1.1 (niniejsza praca)

*model zwierzęcy stanowiły myszy szczepu C57BL/6, wyjątek: poziom *N*-acetyloasparaginanu oznaczono w hipokampie szczurów szczepu Long-Evans.

** z uwagi na niedostateczną ilość danych charakteryzujących *N*-acetylotransferazę asparaginianową (Asp-NAT), w tabeli podano poziom *N*-acetyloasparaginanu, jako metabolitu syntezowanego w obecności Asp-NAT.

Skróty: PDHC: kompleks dehydrogenazy pirogronianowej; CS: syntaza cytrynianowa; ChAT: acetylotransferaza asparaginianową; NAA: *N*-acetyloasparaginan; B: mózg; H: hipokamp.

6.2. Optymalizacja metod badawczych

Odmienne wykorzystanie acetylo-CoA w mitochondrium (produkcja energii) oraz cytoplazmie (produkcja acetylocholino) neuronów cholinergicznym warunkuje konieczność oznaczenia jego poziomu we frakcjach komórkowych (patrz → podrozdziały 2.5 oraz 5.2.3). Transport acetylo-CoA odbywa się m. in. w obecności jonów wapnia, stąd również oznaczenie jego poziomu w przedziałach komórkowych zdaje się mieć istotny wpływ na poprawną interpretację uzyskanych wyników. Ponadto, efektywny rozdział frakcji komórkowych ma istotne znaczenie w punktu widzenia analizy neuronalnej produkcji *N*-acetyloasparaginanu. Brak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie: gdzie dochodzi do neuronalnej produkcji NAA?, skutkuje problemami w zakresie interpretacji wpływu czynników neurotoksycznych na poziom i dostępność acetylo-CoA w przedziałach komórkowych a w konsekwencji stanu energetycznego komórki (Ariyannur et al., 2008; Arun et al., 2009; Harte et al., 2005; Lu et al., 2004; Zaroff et al., 2015).

W celu wyjaśnienia wymienionych wątpliwości zastosowano opracowaną w ZML metodę rozdziału. Metoda oparta jest na połączeniu solubilizacji błony komórkowej z rozdziałem frakcji komórkowych w warstwie olei organicznych o gęstości 1.022 g/cm^3 przy prędkości wirowania 14 tys. obr. na minutę (patrz → podrozdział 4.4.4) (Szutowicz and Bielarczyk, 1987). Jakość rozdziału oceniono na podstawie oznaczenia aktywności znanych markerów enzymatycznych w uzyskanych frakcjach komórkowych (Madhavarao et al., 2003; Szutowicz et al., 2005). Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (enzymu cytoplazmatycznego) we frakcji mitochondrialnej wahała się w granicach 10-20% aktywności enzymu oznaczanej dla całych komórek SN56. Ponadto średnio 75% oznaczonej aktywności syntazy cytrynianowej lokowało się we frakcji mitochondrialnej. Uzyskane wyniki, szczególnie w aspekcie niskiej aktywności LDH we frakcji mitochondrialnej, zezwoliły na kontynuowanie pracy badawczej z wykorzystaniem opisanej powyżej metody rozdziału frakcji komórkowych.

W niniejszej pracy, z uwagi na istotność analizy parametrów związanych z produkcją *N*-acetyloasparaginianu, optymalizowano metodę ilościowego oznaczenia poziomu tego metabolitu w komórkach neuronalnych (Arai et al., 2008; Howells et al., 2014; Jessen et al., 2011; Jung et al., 1999; Llufríu et al., 2014; Moffett et al., 2007; Rigotti et al., 2007a; Zaroff et al., 2015). Metoda angażująca technikę chromatograficznego rozdziału na fazach odwróconych spotkała się z dużym zainteresowaniem. Jednakże problemy z jakością uzyskanych chromatogramów, odzysku próby, jak również częste przypadki uszkodzenia fazy stacjonarnej skłoniły autorów badań do wprowadzania modyfikacji (Harte et al., 2005; Jalil et al., 2005; Sager et al., 2000; Tranberg et al., 2004; Tranberg et al., 2005). Modyfikacje opisane w literaturze nie rozwiązywały w pełni wspomnianych problemów. Zaproponowana w niniejszej pracy modyfikacja zdaje się godzić wszystkie kwestie, polepszając jakość rozdziału, zachowując wysoki odzysk próbki (nie wprowadzono pośrednich etapów obróbki uzyskanego materiału), jak i ograniczając negatywny wpływ pH fazy mobilnej (patrz → podrozdział 5.2.5).

6.3. Zmiennoczasowy wpływ Zn na komórki SN56

Wydłużenie czasu depolaryzacji błony neuronalnej jest jedną z przyczyn rozwoju AD. Pobudzenie ekscytotoksyczne neuronów skutkuje wydłużeniem okresu akumulacji cynku w synapsie z jednoczesnym zwiększeniem ekspozycji neuronów na wysokie stężenia Zn (patrz → podrozdział 2.6) (Bertoni-Freddari et al., 2006; Brown et al., 2000; Chen and

Liao, 2003a; Colvin et al., 2000; Cuajungco and Lees, 1997b). W efekcie, napływ Zn do wnętrza neuronów cholinergicznym ulega intensyfikacji, implikując tym samym degenerację komórek neuronalnych (Pochwat et al., 2015).

W niniejszej pracy, komórki linii SN56 poddano ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w czasie 30 min bądź 24 godzin. Pomimo znaczącej różnicy w czasie ekspozycji na tożsamy czynnik toksyczny, obserwowano zbliżone wartości oznaczanych parametrów wrażliwości komórek linii SN56, tj. wewnątrzkomórkowej akumulacji jonów cynku i wapnia, jak również parametry metabolizmu acetylo-CoA (Ryc. 10-14, 16-17, 23-24, Tabela 4).

Zarówno krótkoczasowa, jak i 24-godzinna ekspozycja komórek SN56 Ekspozycja komórek różnicowanych SN56 na 0.15 mmol/L Zn prowadziła do jednakowego wzrostu frakcji komórek uszkodzonych, który wynosił 60%. Z drugiej jednak strony, akumulacja Zn wewnątrz różnicowanych komórek SN56 ekspozycjonowanych przez 30 minut na 0.15 mmol/L Zn wyniosła 33.1 nmol/mg białka (5.4 mmol/L K^+) oraz 41.7 nmol/mg białka (30 mmol/L K^+). W schemacie 24-ro godzinnej ekspozycji na Zn, akumulacja jonu wyniosła jedynie 9.1 nmol/mg białka (5.4 mmol/L K^+). Zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdziałach 4.4.2 i 4.4.3, badania długoczasowego wpływu Zn prowadzono w środowisku zawierającym 10% surowicę wołową (FBS), zaś badania krótkoczasowego wpływu Zn prowadzono w środowisku bezbiałkowym (patrz → podrozdział 5.2). Środowisko hodowlane wzbogacane było surowicą wołową w celu zwiększenia adhezji oraz proliferacji komórkowej. Niestety, zawarta w FBS albumina oraz inne składniki białkowe posiadają wysokie powinowactwo do jonów cynku. Skutkuje to obniżeniem poziomu wolnych jonów cynku na rzecz powstawania nietoksycznych kompleksów cynkowo-białkowych. W tej sytuacji, stężenie wolnych jonów cynku ulega obniżeniu z wyjściowego mikromolowego, nawet do stężenia rzędu nanomoli wolnych jonów cynku na litr środowiska (Haase et al., 2015). Dla porównania, w ZML przeprowadzono badania, w których w miejsce FBS do środowiska hodowlanego wprowadzono ubogo-białkowy suplement N2 (Ronowska et al., 2007). W punkcie ekspozycjonowanym na 0.05 mmol/L Zn, 40% komórek linii SN56 było niezdolne do eliminacji błękitu trypanu. Oznacza to, że zastosowanie dodatku FBS do środowiska hodowlanego nie stanowiło idealnego modelu badawczego. Z drugiej strony, zmiana schematu badawczego eliminowałaby możliwość porównywania toksyczności Zn z innymi badanymi w ZML neurotoksynami (Bielarczyk et al., 2006; Bielarczyk et al., 2003a; Bielarczyk et al., 2005; Bielarczyk et al., 2003b; Bizon-

Zygmańska et al., 2011; Jankowska-Kulawy et al., 2008; Klimaszewska-Lata et al., 2015; Madziar et al., 2003; Suwalsky et al., 2013; Szutowicz et al., 2005; Szutowicz et al., 2004). W związku z tym, nie modyfikowano schematu badawczego, a kwestię wpływu wolnych jonów cynku rozwiązano na drodze pomiaru ich akumulacji wewnątrz komórek linii SN56. Analizę kolejnych parametrów metabolizmu acetylo-CoA prezentowano w ujęciu zależności od dodanego do środowiska eksperymentalnego Zn oraz równoległe w zależności od poziomu Zn zakumulowanego wewnątrz komórek (Ryc. 10, 14, 17).

Istotny wpływ na wartości oznaczanych parametrów ma także liczba komórek poddana analizie. W schemacie przewlekłego wpływu Zn pomiary prowadzone są w materiale badawczym (komórkach), który po upływie 24 godzin pozostają przytwierdzone do powierzchni naczynia hodowlanego. W praktyce, materiał stanowi pulę około 30% komórek stanowiących punkt kontrolny eksperymentu (Ryc. 10 A). W schemacie badającym 30-minutowy wpływ 0.15 mmol/L Zn, pula komórek zebranych w punkcie toksycznego wpływu 0.15 mmol/L Zn jest równa liczbie komórek zebranych w punkcie kontrolnym (Ryc. 23). Wnioskując z uzyskanych wyników, w przypadku badań angażujących schemat 24-godzinnej ekspozycji na czynnik toksyczny, znamienna frakcja uszkodzonych komórek pozostaje niezbadana. Związane jest to z ich oderwaniem się od podłoża na skutek utraty zdolności do dalszego funkcjonowania. W drugim schemacie badawczym, niezależnie od stanu komórek, wszystkie stanowią materiał badawczy. Ze względu na technikę badawczą, ostateczny obraz zmian metabolicznych daje potencjalnie zbliżone rezultaty badawcze, aczkolwiek porównywanie uzyskanych wartości jest w pewnym stopniu niewłaściwe.

Z doniesień literaturowych wynika, że neurony są zdolne do aktywnego usuwania jonów cynku z wnętrza komórki (Ohana et al., 2004; Qin et al., 2008). Największa efektywność tego procesu, zależnego od dostępności Na^+ , przypada na czas powyżej 30-tej minuty (Qin et al., 2008). Dodatkowo, obniżony poziom Na^+ w środowisku depolaryzacyjnym może znacząco obniżać efektywność procesu eliminacji Zn z wnętrza komórek SN56. Równoległe, depolaryzacja błony komórkowej zwiększa napływ Zn do wnętrza komórek SN56 na drodze aktywacji alternatywnych ścieżek napływu Zn, m.in. kanałów wapniowych bramkowanych wysokim potencjałem (Ryc. 33 A-B) (Frederickson et al., 2005; Paoletti et al., 2009; Sensi et al., 2009). Nałożenie się tych dwóch zjawisk prowadzi do ponad czterokrotnie wyższej akumulacji Zn wewnątrz komórek SN56 poddanych 30-minutowej ekspozycji na Zn. Jednocześnie porównanie obu wartości prezentuje długofalowe, wysoce efektywne mechanizmy usuwania Zn z wnętrza neuronów

cholinergicznym, angażujące mitochondria, metalotioneiny, wymienniki $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ oraz białka z rodziny ZnT, m.in. ZnT-1, ZnT-5, ZnT-7 (Colvin et al., 2008; Colvin et al., 2000; Devergnas et al., 2004; Ohana et al., 2004). W komórkach linii SN56 potwierdzono obecność transportera ZnT-1 (Dyś, 2014 rozprawa doktorska). Niestety, pomimo obecności wspomnianych mechanizmów obronnych, najwyższy toksyczny efekt Zn przypada na pierwsze minuty ekspozycji (Ryc. 35 A-B, 39 A-B, 42 A-B, 43 A-B). Z drugiej strony pozostały zakumulowany wewnątrz komórek Zn jest wciąż kilkukrotnie wyższy od poziomu kontrolnego i pogłębia zapoczątkowane w pierwszych minutach ekspozycji procesy neurotoksyczne (Ryc. 11 A).

6.4. Wpływ białek regulujących homeostazę Ca na toksyczność Zn

Toksyczność Zn oznaczono testem frakcyjnej aktywności dehydrogenazy mleczanowej w środowisku hodowlanym oraz eliminacji błękitu trypanu (Ryc. 12 A-D, 32 A-B). Pierwszy z testów jest miernikiem mechanicznego uszkodzenia błony komórkowej. Zdolność eliminacji błękitu trypanu jest parametrem prezentującym zarówno stopień uszkodzenia błony komórkowej, jak i stan energetyczny samej komórki. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką cytotoxycywność Zn (Ryc. 13, 23, Tabela 4) i pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi (Bouron and Oberwinkler, 2014; Brown et al., 2000; Chen and Liao, 2003b; Colvin et al., 2000; Dineley et al., 2003; Kim et al., 1999; Ohana et al., 2004; Paoletti et al., 2009; Pivovarova et al., 2014; Sheline et al., 2000).

Uzyskane wyniki potwierdza obraz mikroskopowy komórek SN56 poddanych 24-ro godzinnej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn. Błony komórkowe uległy deformacji i przerwaniu, a liczba komórek w polu widzenia była znamienne niższa niżeli w punktach kontrolnych (Ryc. 9 C-D). Barwienie komórek *in vivo* znacznikiem fluorescencyjnym (TSQ) wykazało, że w warunkach nietoksycznych wolne jony cynku pozostają równomiernie rozłożone w całej objętości komórki. Wyjątek stanowiły połączenia międzykomórkowe, które nie wykazywały fluorescencji w warunkach kontrolnych (Ryc. 22) (Ballestín et al., 2011; Kukic et al., 2013; Lo et al., 2004). Zwiększony napływ jonów cynku do wnętrza komórek SN56 powodował akumulację cynku w strukturach komórkowych zlokalizowanych w ciele komórki, jak i połączeniach międzykomórkowych (Ryc. 22). Dodatkowo, wspomniane połączenia międzykomórkowe, podobnie jak na Ryc. 9 C-D, ulegały zerwaniu.

W schemacie ostrego wpływu Zn na komórki SN56 prowadzonego w środowisku depolaryzacyjnym, inkubacja z wybranymi antagonistami białek regulujących

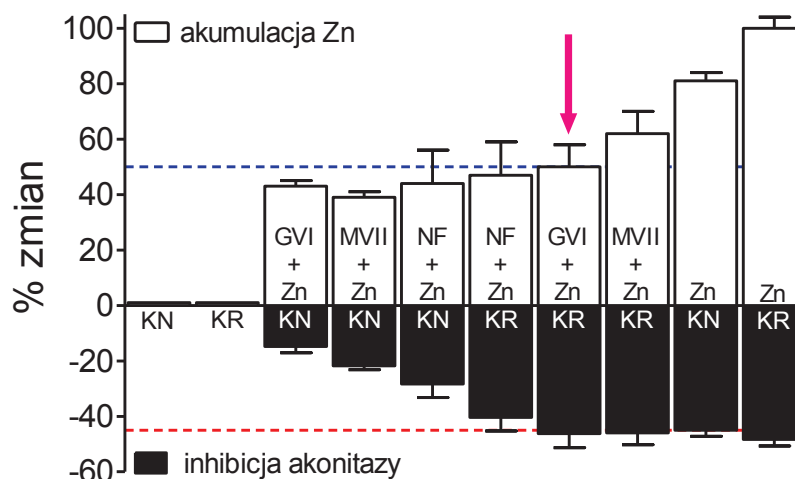
wewnątrzkomórkową równowagę wapnia wywołuje znamienne obniżenie akumulacji Zn i w następstwie zmniejszenie frakcji komórek uszkodzonych (Ryc. 25 A-B, 26 A-B, 32 A-B, 33 A-B). Szczególną intensyfikację procesu obserwowano w przypadku antagonistów kanałów wapniowych oraz receptora IP₃. Przypuszcza się, że z uwagi na zbliżone parametry jonów wapnia i cynku tj. ładunek, gęstość elektronowa (Atchison, 2003; Inoue et al., 2015; Kerchner et al., 2000), w określonych warunkach (np. depolaryzacja, wysokie stężenie Zn w przestrzeni około neuronalnej) Zn może napływać do wnętrza komórek neuronalnych poprzez kanały typu L (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001; Pivovarova et al., 2014; Snider et al., 2000). Z naszych badań wynika, że zarówno kanał typu L, jak i kanały typu N oraz P/Q częściowo uczestniczą w transporcie Zn do wnętrza komórek SN56 (Ryc. 33 A-B).

Badania poziomu Zn w przedziałach komórkowych wykazały, że chroniczna ekspozycja komórek SN56 na cytotoksyczne stężenie Zn (0.15 mmol/L) spowodowała 59 (SN56 KN) a nawet 99 (SN56 KR) krotny wzrost akumulacji tego jonu wewnątrz mitochondrium (Ryc. 11 C). Jednocześnie, oznaczony we frakcji mitochondrialnej poziom wapnia nie uległ znacznej zmianie. Zmiany akumulacji jonów we frakcji cytoplazmatycznej były znacznie niższe niżeli we frakcji mitochondrialnej i wynosiły odpowiednio dla Zn: 4 (SN56 KN) i 6 (SN56 KR) razy, a dla Ca: 1.5 (SN56 KN) i 2 (SN56 KR) (Ryc. 11 D). Obserwacje pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi prezentującymi wysoką supresję aktywności enzymów mitochondrialnych neuronów mózgu oraz udział Zn w procesach wywołujących stres oksydacyjny (Dineley et al., 2003; Kim et al., 1999; Pivovarova et al., 2014).

Z poprzednich badań ZML wynika, że ponad 80% aktywności akonitazy w komórkach linii SN56 stanowi aktywność izoformy mitochondrialnej enzymu. Ponadto te same badania udowodniły silnie inhibicyjny, nieodwracalny wpływ jonu na aktywność akonitazy (Ronowska et al., 2007). W niniejszej pracy badano akumulację Zn oraz aktywność akonitazy w nieróżnicowanych i różnicowanych komórkach SN56. Komórki poddawano wstępnej inkubacji w obecności bądź nieobecności antagonisty bramkowanych napięciem kanałów wapniowych (tj. nifedypiną, konotoksyną GVIA tudzież konotoksyną MVIIC) a następnie eksponowano przez 30 minut na 0.15 mmol/L Zn. Badanie prowadzono w warunkach wymuszających depolaryzację błony komórkowej (30 mmol/L K⁺).

Na rycinie 48 przedstawiono wyniki procentowych zmian akumulacji cynku oraz inhibicji enzymu. Akumulacja Zn powyżej 20 nmol/mg białka (niebieska linia) nie zmieniała znacząco właściwości inhibicyjnych cynku wobec akonitazy utrzymujących

się na poziomie 45% (czerwona linia). Z drugiej strony, akumulacja Zn na poziomie około 20 nmol/mg białka wywołała zmienną inhibicję enzymu. Przepuszczalnie, wytłumaczeniem zaistniałego zjawiska może być wewnątrzkomórkowa kompartmentacja Zn. Pomimo tożsamej akumulacji Zn w całych komórkach, jego poziom wewnątrz mitochondrium może być zmienny.



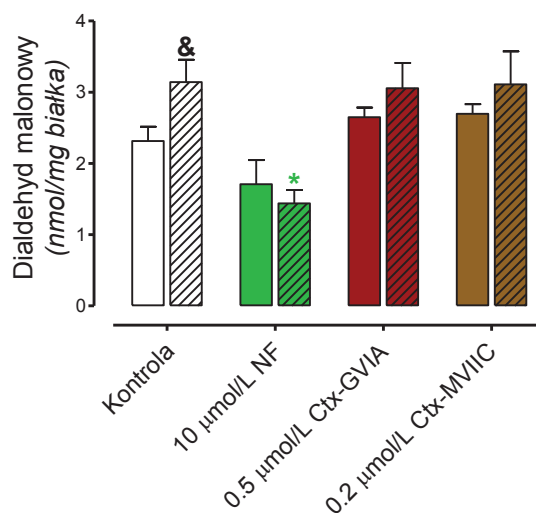
Ryc. 48. Wpływ wewnątrzkomórkowego poziomu Zn na inhibicję akonitazy w komórkach SN56. Procentowe zmiany akumulacji Zn oraz równoległej inhibicji akonitazy wyliczono na podstawie danych prezentowanych na Ryc. 33 A oraz 42 A. 100% stanowiła aktywność akonitazy w kontroli SN56 KR (23.4 nmol/min/mg białka). 100% akumulację Zn stanowiła akumulacja Zn w SN56 KR eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn (41.7 nmol/mg białka).

Skróty: GVI: 0.5 μ mol/L konotoksyna GVIA; KN: niezróżnicowane komórki SN56; KR: zróżnicowane komórki SN56; MVII: 0.2 μ mol/L konotoksyna MVIIIC; NF: 10 μ mol/L nifedypina, Zn: cynk.

Analizując rycinę 48 w aspekcie antagonistów kanałów wapniowych zauważono, że ograniczenie aktywności bramkowanych napięciem kanałów wapniowych skutkowało niemal każdorazowo dwukrotnym spadkiem akumulacji Zn. W warunkach rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, obserwowane pobudzenie ekscytotoksyczne zwiększa znacząco akumulację Zn w synapsie neuronalnej (Bertoni-Freddari et al., 2006). Brak całkowitego zahamowania transportu Zn do wnętrza komórek świadczy o tym, że kanały wapniowe stanowią jedną ze ścieżek napływu Zn do wnętrza neuronów cholinergicznyc. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi (Bouron and Oberwinkler, 2014). Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że stosowanie antagonistów kanałów wapniowych, które w znacznym stopniu regulują homeostazę wapnia może stanowić jedną z dróg opóźniających lub hamujących postęp rozwoju chorób neurodegeneracyjnych (Ryc. 31 A-B, Ryc. 33 A-B, 48).

Krótkoczasowa ekspozycja komórek SN56 na cytotoksyczne stężenie cynku prowadziła do wzrostu stresu oksydacyjnego, prowadząc do 3-krotnego wzrostu akumulacji związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, pośredni parametr stresu oksydacyjnego) (Ryc. 34 A-B). Ograniczenie napływu Zn, poprzez zablokowanie aktywności białek regulujących homeostazę Ca, do wnętrza różnicowanych i nieróżnicowanych komórek SN56 nie wpłynęło znacząco na syntezę TBARS. Wyjątek stanowiły nifedypina. Nifedypina jako antagonistę kanałów wapniowych typu L stosuje się zarówno w badaniach naukowych, jak i w praktyce klinicznej. W krótkoczasowych badaniach prowadzonym w warunkach depolaryzacji błony komórkowej komórek SN56, 10 $\mu\text{mol/L}$ NF obniżała akumulację związków TBARS zarówno w komórkach SN56 eksponowanych, jak i nie eksponowanych na cytotoksyczne stężenia Zn (Ryc. 49). Jej zauważalne właściwości antyoksydacyjne pozostają tematem wielu badań naukowych (Jia et al., 2013; Kito et al., 2012, Serada et al., 2012).

Dodanie NF do środowiska hodowlanego nie wpływało na żywotność komórek, niezależnie od czasu inkubacji SN56 z antagonistą (dane niepublikowane). Zastosowanie nifedypiny jako antagonisty w krótkoczasowych schematach eksperymentalnych ujawniło jej zarówno cytoprotekcyjne, jak i antyoksydacyjne właściwości (Ryc. 32, 34, 49, 50).

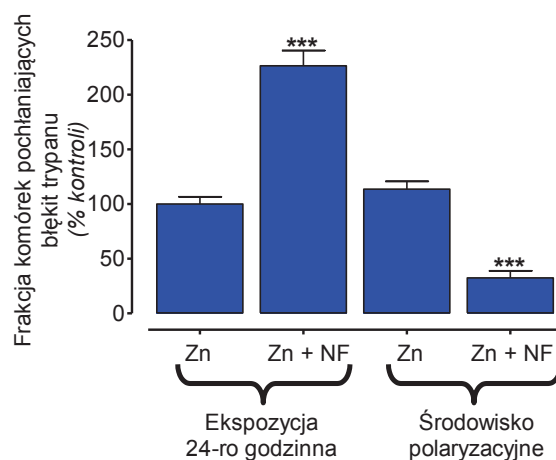


Ryc. 49. Akumulacja związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w nieróżnicowanych i różnicowanych (pola zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych w obecności antagonistów bramkowanych wysokim napięciem kanałów wapniowych. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od kontroli (* $p < 0.05$); od SN56 KN (& $p > 0.05$).

Z drugiej strony, nifedypina zastosowana w schemacie badającym chroniczny wpływ Zn na SN56 wykazywała odmienne działanie. W eksperymencie długoczasowym, w którym nieróżnicowane komórki SN56 inkubowano wstępnie przez 2 godziny z 10 $\mu\text{mol/L}$ NF,

a następnie eksponowano przez 24 godziny na 0.15 mmol/L Zn uzyskane wyniki wskazały na cytotoksyczne działanie nifedypiny. Żywotność komórek była ponad dwukrotnie niższa w stosunku do oznaczonej w punkcie eksponowanym tylko na 0.15 mmol/L Zn. Dla potwierdzenia toksyczności układu nifedypina-cynk, mieszaninę inkubowano w środowisku polaryzacyjnym przez 24 h w temperaturze 37⁰C, a następnie dodano do środowiska inkubacyjnego zawierającego komórki SN56. Po 30 minutach ekspozycji frakcja komórek niezdolnych do eliminacji błękitu trypanu wzrosła dwukrotnie w stosunku do badań krótkoczasowych. Uzyskane wyniki pokrywały się z rezultatami badań przewlekłego wpływu czynników (dane nie publikowane).

Podsumowując, przewlekłe stosowanie nifedypiny w warunkach pobudzenia ekscytotoksycznego może prowadzić do aktywacji procesów neurodegeneracyjnych i śmierci komórek neuronalnych. Niestety obserwacje te nie znalazły odzwierciedlenia w dostępnej literaturze naukowej. W praktyce klinicznej, uzyskana obserwacja implikuje konieczność wprowadzenia terapii monitorowania stężenia nifedypiny oraz efektywności jej eliminacji. Szczególna ostrożność jest wskazana u pacjentów podatnych na zaburzenia równowagi jonowej cynku (np. stany niedokrwienne oraz niedotlenienie mózgu, demencja starcza).



Ryc. 50. Zmiennoczasowy wpływ 10 μ mol/L nifedypiny (NF) na przeżywalność nieróżnicowanych komórek SN56 eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn (Zn). Wstępna inkubacja komórek SN56 z NF wynosiła 2 godziny (ekspozycja 24-ro godzinna) bądź 10 minut (środowisko polaryzacyjne). Znamienne różne od kontroli (***) $p < 0.001$.

Uwaga: Kontrolę (100%) stanowiły komórki SN56 poddane 24-ro godzinnej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn, wartość kontrolna wynosiła 31.5%.

Obniżenie akumulacji związków TBARS wywołał również antagonistę receptorów nikotynowych, czyli mekamylamina (szczególnie w warunkach niskiego stężenia K⁺) (Ryc. 34 A-B). Ze względu na brak istotnego wpływu mekamylaminy na akumulację Zn

z jednoczesnym protekcyjnym wpływem antagonisty wobec PDHC należy rozważać nowe ścieżki wpływu MEC na metabolizm neuronów cholinergicznym (Ryc. 33 A-B, 35 A-B). Antyoksydacyjne właściwości wobec SN56 KN obserwowane są również w badaniach angażujących 2-APB (antagonista receptora IP_3). Jego działanie według doniesień literaturowych powinno być związane z ograniczeniem zależnej od depolaryzacji wewnątrzkomórkowej kompartmentacji Ca (Ruiz et al., 2009; Suen et al., 2003). Niestety, uzyskane w niniejszej pracy wyniki nie wykazywały wspomnianych zależności (Ryc. 34 A-B).

6.5. Homeostaza Ca w komórkach SN56 w warunkach toksyczności ostrej Zn

W neuronach cholinergicznym jony wapnia odgrywają kluczową rolę jako wewnątrzkomórkowy wtórny przekaźnik, inicjujący uwalnianie acetylocholin. Depolaryzacja błony neuronalnej oraz zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych jonów wapnia jest nieodłącznym etapem inicjującym neuroprzekaznictwo. Zmiana potencjału błonowego wywołana przez receptory neuroprzekaznikowe aktywuje transport jonów wapnia do wnętrza komórki między innymi przy udziale kanałów wapniowych zależnych od wysokiego napięcia typu L, P/Q, N (patrz → podrozdziały 2.2 oraz 2.3.3) (Jones et al., 1999; Satin and Kinard, 1998; Nakai et al. 1998; Grienberg and Konnerth, 2012, Hisatsune et al., 2005). W kolejnym etapie zmiana wewnątrzkomórkowej kompartmentacji Ca zapoczątkowuje wydzielanie acetylocholin do szczeliny synaptycznej (patrz → podrozdział 2.3.2) (Berridge, 1993). Kationy o zbliżonej budowie do dwuwartościowego jonu wapnia (np. Zn^{2+} , Al^{3+}) transportowane są do wnętrza neuronu poprzez zależne od napięcia kanały wapniowe, prowadząc do zaburzeń stanu równowagi wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , szczególnie widocznym w procesie depolaryzacji błony neuronalnej. W rozwoju chorób neurodegeneracyjnych obserwowane są nasilające się incydenty pobudzenia ekscytotoksycznego, w efekcie którego w synapsie dochodzi do wzrostu poziom jonów cynku. Wydłużona ekspozycja neuronów cholinergicznym na zwiększone stężenie cynku istotnie zwiększa ich wrażliwość na sygnały toksyczne w mózgu (Brown et al., 2000; Colvin et al., 2008; Colvin et al., 2000; Cuajungco and Lees, 1997b; Dineley et al., 2003; Galasso and Dyck, 2007; Gazaryan et al., 2007). Dlatego celowe wydało się sprawdzenie udziału białek regulujących transport Ca w warunkach cytotoksycznych. Jako badany czynnik cytotoksyczny zastosowano cytotoksyczne stężenie cynku (0.15mmol/L).

Wysoka toksyczność Zn związana jest z jego akumulacją wewnątrz neuronów cholinergicznym. Alternatywną ścieżką napływu Zn są bramkowane wysokim napięciem kanały wapniowe (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001; Pivovarova et al., 2014; Snider et al., 2000). Pobudzenie ekscytotoksyczne implikuje konieczność współzawodniczenia jonów cynku i wapnia o dostęp do transporterów wapniowych. W związku z tym, w niniejszej pracy przeanalizowano poziom Ca w przedziałach komórkowych w warunkach kontrolnych, ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn oraz obecności antagonistów białek uczestniczących w transporcie Ca. W badaniach przewlekłej ekspozycji komórek SN56 odnotowano zależną od stężenia Zn zwiększoną wewnątrzkomórkową akumulację Ca. Potencjalnie jest to związane z zależną od Ca implikacją ścieżek apoptotycznych komórki. Jednocześnie porównując SN56 KN i SN56 KR zauważono trend wyższej akumulacji Ca w komórkach różnicowanych. W eksperymencie przewlekłej ekspozycji na Zn, pomimo znamienne wyższego całkowitego poziomu Ca, we frakcji mitochondrialnej poziom wapnia pozostaje w zakresach kontrolnych. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami ZML, podwyższony poziom Ca we frakcji cytoplazmatycznej z równoczesnym obniżeniem, bądź brakiem zmian, we frakcji mitochondrialnej najprawdopodobniej związany jest z ograniczeniem przepuszczalności błony mitochondrialnej jako skutek zaawansowanych procesów apoptotycznych komórki (Ryc. 11 C-D) (Bielarczyk et al., 1998; Bielarczyk et al., 2003a; Ronowska et al., 2010 ; Szutowicz et al., 2005; Szutowicz et al., 1989; Szutowicz et al., 1997).

Zastosowani antagoniści białek regulujących homeostazę Ca obniżali poziom całkowitego wapnia z różną skutecznością. Zablockowanie aktywności kanałów wapniowych w SN56 KR skutkowało znamienym obniżeniem Ca w obu badanych przedziałach, zarówno w obecności, jak i nieobecności 0.15 mmol/L Zn. W SN56 KN znamienny spadek poziomu wapnia obserwowano głównie w przedziale cytoplazmatycznym (Tabela 5, 6). Zastosowanie nifedypiny okazało się być efektywnym supresantem poziomu Ca w obu przedziałach komórkowych, niezależnie od ekspresji fenotypu cholinergicznego (Tabela 5, 6). Brak zmian odnotowano w trakcie badań angażujących 2-APB, co jest związane z funkcją receptora IP₃. Receptor nie uczestniczy w regulacji napływu Ca do wnętrza komórki z otoczenia, ale zmienia wewnątrzkomórkową kompartmentację jonu, uwalniając pokłady Ca z siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy (Fernández de Sevilla et al., 2008; Fraiman and Dawson, 2004; Hisatsune et al., 2005). W przypadku mekamyminy nie zaobserwowano zmian, natomiast zastosowanie konotoksyny GVIA i MVIIC jedynie nieznacznie regulowało napływ Ca.

Wpływ antagonistów (z pominięciem nifedypiny) na akumulację Ca i Zn należy rozpatrywać również względem ekspresji fenotypu cholinergicznego. W SN56 KR obserwuje się każdorazowo wyższą akumulację Zn niżeli w SN56 KN (Ryc. 31 A-B, 33 A-B). Równocześnie niższej akumulacji Zn towarzyszy wyższa akumulacja Ca (Ryc. 31 A-B, 33 A-B). W badaniach oceniających ilość wapniowych kanałów wapniowych typu L, N oraz P/Q (kanały zależne od wysokiego napięcia) nie odnotowano różnic w zawartości białek pomiędzy komórkami z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego (Ryc. 20 A-F). Zależności te stanowią pośredni dowód wpływu Zn na wewnątrzkomórkową homeostazę Ca. Z uwagi na kluczową rolę Ca w neuroprzekaznictwie cholinergicznym (depolaryzacja błony neuronalnej, implikacja produkcji ATP, zależny od dostępności wapnia bezpośredni transport acetylo-CoA do frakcji cytoplazmatycznej celem produkcji acetylocholino), współzawodnictwo jonów wapnia i cynku o ścieżkę transportu (bramkowane napięciem kanały wapniowe) stanowi dodatkowy aspekt neurotoksyczności cynku. Zaburzenia homeostazy wapnia wywołane przez Zn zaburza poprawne funkcjonowanie neuroprzekaznictwa w całym układzie nerwowym. Zmienne powinowactwo białek regulujących homeostazę wapnia wobec Ca i Zn nie znalazło wytłumaczenia w dostępnej literaturze naukowej. Przypuszczalnie, kanały typu N i P/Q mają różne powinowactwo do opisanych jonów, a regulacja równowagi wapniowo-cynkowej pozostaje podstawą przyszłych badań ZML.

Receptor IP_3 jest regulatorem poziomu wolnych jonów wapnia w komórce. Odnosząc funkcję receptora IP_3 do uzyskanymi poziomów wapnia w przedziałach komórkowych można przypuszczać, że w czasie depolaryzacji, zablokowanie receptora spowodowało lokalny niedobór jonów wapnia w cytoplazmie. Skutkowało to intensyfikacją napływu Ca z otoczenia do wnętrza komórek SN56 (wzrost Ca w SN56 wynosił odpowiednio dla komórek nieróżnicowanych 22%, zaś dla różnicowanych 15%) (Ryc. 30 A). Zwiększona akumulacja Ca w cytoplazmie uruchomiła funkcje buforujące mitochondrium względem wapnia (Tabela 5). Parametrem pośrednio potwierdzającym tą hipotezę jest test eliminacji błękitu trypan jako indykator właściwości apoptotycznych Ca. W warunkach depolaryzacyjnych, bez cynku w środowisku inkubacyjnym, frakcja nieróżnicowanych komórek SN56 niezdolnych do eliminacji barwnika wynosiła 4.6%, zaś frakcja komórek różnicowanych 6%. Uzyskane wartości nie były znamienne, aczkolwiek były wyższe o ponad 30% od poziomów kontrolnych. Odwołując się do działania receptora IP_3 w czasie depolaryzacji. Aktywny w trakcie neuroprzekaznictwa receptor zwiększa poziom wolnych jonów wapnia wewnątrz mitochondrium, wskutek czego dochodzi do czasowego zwiększenia

produkcji ATP. Pomimo zablokowania aktywności receptora, poziom Ca wewnątrz mitochondrium zwiększył się, ale poziom ATP nie. Ponadto, wydzielanie acetylocholiny została znamienne obniżone. Pozostaje pytanie dlaczego? Otóż badania aktywności biologicznej receptora IP₃, ujawniły, że lokalizacja białka w siateczce śródplazmatycznej względem mitochondrium nie jest przypadkowa i zawsze pozostaje w bliskim sąsiedztwie mitochondrialnych białek transportujących wapń do wnętrza mitochondrium (Dingsdale et al., 2012; Fraiman and Dawson, 2004). Przypuszczalnie, fala uwalnianych zasobów jonów wapnia przez receptor IP₃ posiada odmienną charakterystykę od tej związanej z napływem z otoczenia, tj. szybkość migracji jonów tudzież lokalne stężenie jonów w otoczeniu uniportu mitochondrialnego (patrz → podrozdział 2.3.2) (Dingsdale et al., 2012; Fernández de Sevilla et al., 2008; Fraiman and Dawson, 2004; Hisatsune et al., 2005). Badania zawartości białka receptora IP₃ ujawniły, że przewlekła ekspozycji komórek SN56 na narastające stężenia Zn (0-0.15 mmol/L) powoduje zależne od stężenia Zn obniżenie zawartości białka receptora IP₃. Potencjalnie, mechanizmy wywołane przez zablokowanie aktywności receptora (dodatek 50 μmol/L 2-APB) tj. zahamowanie produkcji ATP skutkujące obniżeniem wydzielania acetylocholiny, prezentowały zmiany zachodzące w neuronach na skutek znamienego obniżenia gęstości receptora w siateczce śródplazmatycznej.

6.6. Zależna od białek regulujących poziom wapnia aktywność enzymów mitochondrialnych cholinergicznym komórek SN56 ekspozowanych na warunki toksyczne

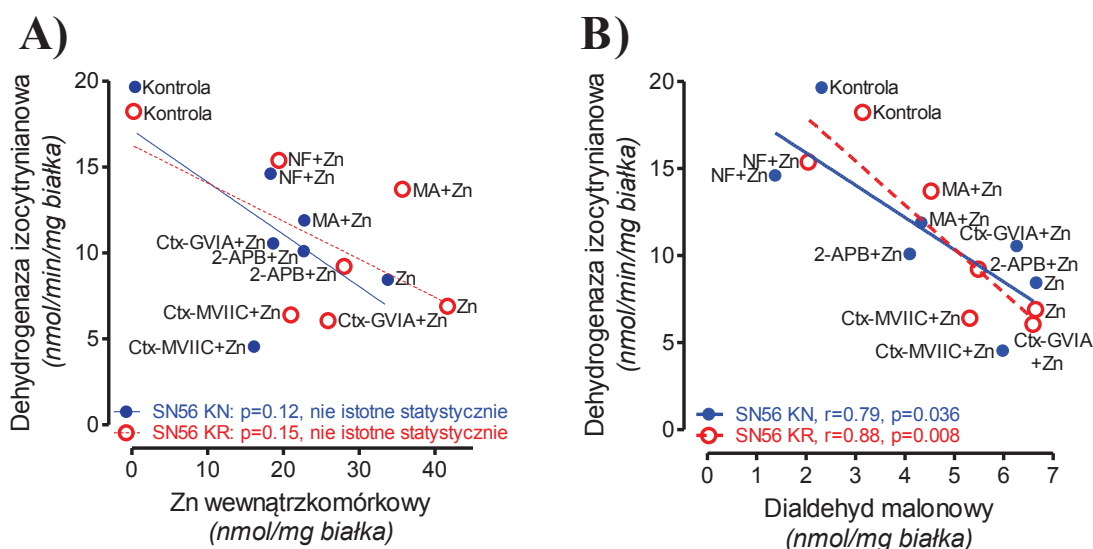
Niemal 100-krotne zwiększenie poziomu Zn we frakcji mitochondrialnej różnicowanych komórek SN56 skutkuje inhibicją enzymów mitochondrialnych (PDHC oraz niektórych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, tj. akonitaza, dehydrogenaza izocytrynianowa oraz α-ketoglutaranowa) (Gazaryan et al., 2007; Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007). W niniejszej pracy, dehydrogenaza mleczanowa (enzym cytoplazmatyczny) oraz syntaza cytrynianowa okazały się być niewrażliwe na Zn, co pozostaje w zgodzie z cytowanymi pracami naukowymi (Tabela 2). Mechanizm inhibicji Zn wobec PDHC prawdopodobnie oparty jest na kompetycji z lipoamidem o miejsce aktywne w podjednostce E2 (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007). W niniejszej pracy, inhibicję aktywności PDHC obserwowano w punktach eksperymentalnych chronicznej ekspozycji komórek SN56 na 0.125-0.15 mmol/L Zn (Ryc. 12). Jednocześnie, poziom metabolitów komórkowych zależnych bezpośrednio (acetylo-CoA) bądź pośrednio (ATP,

NAA) ulegał znamiennej obniżeniu przy stężeniu Zn na poziomie 0.1 mmol/L (Ryc. 12, 14, 17). Różnice mogą wynikać z metody prowadzonych oznaczeń. Dostępność metabolitów w neuronalnych komórkach SN56 oznaczano denaturując próbkę natychmiast po zakończeniu eksperymentu. W rezultacie, stosowana technika pozwoliła oznaczyć rzeczywisty, zależny od dostępności substratów reakcji, poziom badanego parametru w momencie zakończenia badania (patrz → podrozdział 4.10.1, 4.10.2, 4.10.4) (Bizon-Zygmańska et al., 2011; Szutowicz and Bielarczyk, 1987). Oznaczenie aktywności PHDC angażowało technikę wykorzystującą wysycające stężenia niezbędnych kofaktorów i substratów reakcji. W związku z tym, uzyskane wyniki aktywności oddają jedynie adaptacyjną supresję podjednostek enzymu przez Zn (patrz → podrozdział 4.9.2) (Bizon-Zygmańska et al., 2011; Jankowska-Kulawy et al., 2010; Ronowska et al., 2010; Szutowicz et al., 1981).

W schemacie ostrego wpływu Zn, zależnie od zastosowanego antagonisty CaTR, poziom zakumulowanego Zn wewnątrz komórek SN56 zmalał 30-50% (Ryc. 22). Ponadto, pre-inkubacja z antagonistami zabezpiecza aktywność PDHC na poziomie kontrolnych, pomimo, że w warunkach toksycznych była niższa od kontroli o połowę (Ryc. 24 A). Obserwacja nabiera istotnego znaczenia w porównaniu z wynikami aktywności PDHC oznaczonymi po zakończeniu chronicznej ekspozycji komórek na Zn. Tu aktywność enzymu ulega ponad 40% supresji, pomimo dwukrotnie niższej wartości zakumulowanego Zn (Ryc. 11 A,C, 12 A). Uzyskane wyniki sugerują, że najwyższa efektywność inhibicji Zn przypada na pierwsze minuty ekspozycji komórek na czynnik, tzn. w czasie niskiej efektywności mechanizmów usuwania Zn z wnętrza komórek. Nasza obserwacja pozostaje w zgodzie z doniesieniami w zakresie udziału jonów cynku w procesie neurodegeneracji (Kim et al., 2015; Medvedeva and Weissb, 2015).

Z drugiej strony, właściwości inhibicyjne Zn wobec wybranych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (akonitaza, dehydrogenaza izocytrynianowa) nie zostały efektywnie stłumione poprzez zablokowanie aktywności białek CaTR (Ryc. 42, 43). W przypadku dehydrogenazy izocytrynianowej, pomimo zbliżonego działania antagonistów wobec akumulacji Zn, jedynie nifedypina i nieznacznie mekamylamina zabezpieczyły aktywność enzymu. Ponadto, wykazano brak korelacji pomiędzy akumulacją Zn, a aktywnością dehydrogenazy izocytrynianowej (Ryc. 50). Jednocześnie, dodatnią korelację obserwowano pomiędzy aktywnością dehydrogenazy izocytrynianowej a akumulacją związków TBARS. Oznacza to, że czynnikiem determinującym aktywność enzymu

jest najprawdopodobniej stres oksydacyjny generowany w wyniku akumulacji Zn. Uzyskane dane pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi prezentującymi inhibicyjny wpływ czynników generujących reaktywne formy tlenu na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (Bériault et al., 2007; Kwon et al., 2015; Nair et al., 2015).



Ryc. 51. Korelacja pomiędzy aktywnością dehydrogenazy izocytrynianowej a akumulacją cynku (A) tudzież związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (B). Wartości parametrów oznaczono w komórkach SN56 poddanych ostrej ekspozycji na 0.15 mmol/L Zn w obecności antagonistów białek regulujących homeostazę wapnia. Korelacje wyliczono na podstawie danych prezentowanych na Ryc. 33, 34 oraz 43.

Aktywność akonitazy natomiast była ściśle zależna od poziomu zakumulowanego Zn w komórkach (Ryc. 33 A-B, 42 A-B, 48). Zależność ta jest szczególnie widoczna pomiędzy punktami eksperymentalnymi różniącymi się wyłącznie ekspresją fenotypu cholinergicznego. Różnicowane komórki SN56 wstępnie inkubowane w obecności antagonistów CaTR akumulują około 5-7 nmol/mg białka więcej Zn niżeli nieróżnicowane. Kilku nanomolowa różnica akumulacji Zn skutkuje znamiennymi różnicami w aktywności akonitazy. W SN56 KN, wstępna inkubacja komórek w obecności konotoksyn GVIA bądź MVIIC zabezpiecza aktywność enzymu na poziomie niewiele niższym od kontrolnego. Natomiast aktywność akonitazy w SN56 KR jest porównywalna do aktywności w punkcie ekspozycji komórek na cytotoksyczne stężenie Zn. Z drugiej strony, analiza pomijająca fenotyp cholinergiczny wykazała, że aktywność akonitazy jest regulowana najprawdopodobniej akumulacją Zn w przedziale mitochondrialnym, stąd niewielka różnica w akumulacji Zn w komórkach SN56 skutkuje znamiennymi różnicami w aktywności enzymu (Ryc. 48). Hipoteza ta wymaga potwierdzenia poprzez oznaczenie poziomu cynku i aktywności akonitazy w przedziale mitochondrialnym komórek SN56.

6.7. Zależne od aktywności białek transportujących wapń zmiany poziomów acetylo-CoA, ATP i acetylocholin w komórkach SN56 eksponowanych na Zn

Inhibicyjny wpływ Zn na parametry metabolizmu acetylo-CoA w komórkach SN56 jest silnie zależny od wewnątrzkomórkowej akumulacji tego jonu (Ryc. 11 A,C, 12 A-D, 14 A, B, D, 17 A-C, 24 A-B) (patrz → podrozdział 6.3). Ponadto, wykazano większą akumulację tego kationu w komórkach różnicowanych. Prawdopodobnie jest to związane z wyższą zawartością transporterów Zn w różnicowanych komórkach SN56 w stosunku do komórek SN56 nieróżnicowanych. Wiadomo, że zmiany takie nie dotyczą bramkowanych napięciem kanałów wapniowych typu L, N, P/Q oraz transporterów Zn-T1 (Ryc. 20) (Dyś, 2014 rozprawa doktorska, Devergnas et al., 2004).

W neuronach cholinergicznym, zużycie acetylo-CoA jest bezpośrednio związane nie tylko z produkcją energii, ale również z produkcją acetylocholin (Blusztajn and Wurtman, 1983). Poprzednie badania zespołu ZML potwierdziły analogiczne jak w neuronach cholinergicznym zużycie acetylo-CoA w różnicowanych komórkach SN56 (Bielarczyk et al., 2006; Bizon-Zygmańska et al., 2011).

W niniejszej pracy, w badaniach chronicznego wpływu Zn na komórki SN56, odnotowano 33% mniejszą dostępność acetylo-CoA we frakcji cytoplazmatycznej w komórkach SN56 KR niżeli SN56 KN. Poziom acetylo-CoA oznaczony w punkcie chronicznej ekspozycji komórek SN56 na 0.15 mmol/L oscylował w granicach 5-7 pmol/mg białka w obu subkulturach komórkowych. Przypuszczalnie, oznaczony poziom acetylo-CoA jest wartością graniczną, niezbędną do przeżycia komórki (Ryc. 14 C-D, 41 A-B).

Wyjściowy poziom acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej mieścił się w zakresie 12-14 pmol/mg białka zarówno w SN56 KN, jak i SN56 KR (Ryc. 14 A-B, 40 A-B). Przewlekła ekspozycja neuronalnych komórek SN56 wykazała zależną od ekspresji fenotypu cholinergicznego wrażliwość na sygnały cytotoksyczne. W SN56 KN poziom acetylo-CoA w komórkach eksponowanych na 0.15 mmol/L Zn spadł o około 44%, natomiast w komórkach różnicowanych różnica wyniosła niemalże 75% (Ryc. 14 A-D). Z danych tych wynika, że oporność neuronów cholinergicznym na czynniki cytotoksyczne w dużej mierze zależy od stopnia ich zróżnicowania (Ryc. 17 A).

Z poprzednich badań zespołu ZML wynika, że acetylo-CoA w warunkach depolaryzacji, tzn. zwiększonego wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych jonów wapniowych ulega bezpośredniemu transportowi do frakcji cytoplazmatycznej celem produkcji acetylocholin (Bielarczyk et al., 2003a; Bielarczyk and Szutowicz, 1989;

Bielarczyk et al., 1998; Szutowicz et al., 1994; Szutowicz et al., 1989; Szutowicz et al., 1981; Szutowicz et al., 1996). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozostają w zgodzie z opisanymi badaniami. Porównując poziomy acetylo-CoA oznaczone w różnych stanach czynnościowych komórek SN56, depolaryzacja spowodowała znamienne obniżenie poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej na rzecz cytoplazmy. Tendencja jest szczególnie widoczna w przypadku nieróżnicowanych komórek SN56. W przypadku komórek ze zwiększoną ekspresją fenotypu cholinergicznego nie obserwujemy wzrostu poziomu acetylo-CoA we frakcji cytoplazmatycznej. Przyrównując oznaczone poziomy metabolitu z poziomem i wydzielaniem acetylcholinu, brak zmian we frakcji cytoplazmatycznej jest efektem intensyfikacji ścieżki produkcji acetylcholinu w komórkach różnicowanych.

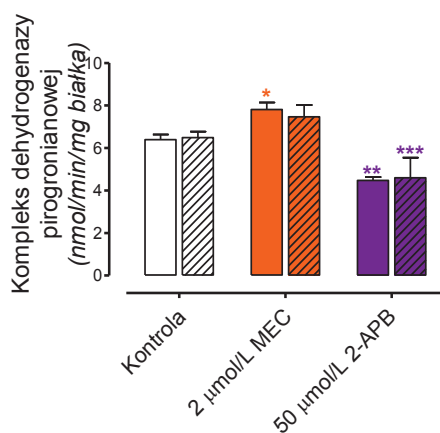
Tabela 8. Poziom acetylo-CoA we frakcjach mitochondrialnych zależny od stanu czynnościowego komórek SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego

PARAMETR	Środowisko depolaryzacyjne		Środowisko polaryzacyjne	
	SN56 KN	SN56 KR	SN56 KN	SN56 KR
Acetylo-CoA mitochondrialny (<i>pmol/mg białka</i>)	9.4 ±0.2*	7.5 ±0.4*	10.5 ±0.4	8.7 ±0.6
Acetylo-CoA cytoplazmatyczny (<i>pmol/mg białka</i>)	21.4 ±0.7**	16.1 ±0.9	18.5 ±0.7	16.0 ±0.9

Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-13 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Jako kontrolę przyjęto wartości oznaczone w warunkach polaryzacyjnych.

Inkubacja komórek SN56 w obecności mekamylaminy skutkowała zauważalnym (szczególnie w warunkach niskiego stężenia K^+) obniżeniem poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej na rzecz zwiększenia dostępności tego metabolitu we frakcji cytoplazmatycznej (Ryc. 37 A-B, 38 A-B). Z badań literaturowych wynika, że mekamylamina powoduje obniżenie aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) i poziomu acetylcholinu, jak również znaczne zahamowanie jej kwantowego wydzielania (Hiramatsu et al., 2008; Ray et al., 2014). Nasze badania pozostają w zgodzie z tymi doniesieniami (Ryc. 46 A-B, 47 A-B). Obniżona aktywność ChAT skutkująca zahamowaniem wydzielaniem acetylcholinu może być sygnałem aktywującym produkcję acetylo-CoA w obecności PDHC (Ryc. 35, 51) oraz transport acetylo-CoA z frakcji mitochondrialnej do cytoplazmatycznej (Ryc. 37 A-B, 38 A-B), czyli do miejsca syntezy acetylcholinu (patrz → podrozdziały 2.3 oraz 2.5.1). Spadek poziomu acetylo-CoA

we frakcji mitochondrialnej jest wynikiem prawdopodobnie wewnątrzkomórkowego oddziaływania mekamyminy na transport pośredni bądź bezpośredni. Pośrednio mekamymina może wspomagać zależny od wapnia transport transmitochondrialny poprzez zwiększenie przepuszczalności megakanałów mitochondrialnych. Pośrednio zaś może zwiększać przepuszczalność mitochondrialnego transportera cytrynianu oraz/bądź zwiększać aktywność zależnej od ATP liazy cytrynianowej (patrz → 2.5.1.). Mekamymina prowadziła również do zahamowania transportu Zn do wnętrza komórek neuronalnych, zwiększając tym samym ich przeżywalność, co świadczy o jej właściwościach cytoprotekcyjnych (Ryc. 32 A-B, 33 A-B).



Ryc. 52. Wpływ mekamyminy (MEC) i 2-aminoetoksydifenylboranu (2-APB) na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w nieróżnicowanych oraz różnicowanych (poła zakreskowane) komórkach SN56 inkubowanych przez 40 minut (90 minut dla 2-APB) w warunkach depolaryzacyjnych. Wyniki są wartościami średnimi ± SEM z 3-10 doświadczeń. Znamienne różne od: kontroli (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Dokładnie odwrotne działanie wykazuje 2-APB, jako antagonistę receptora IP_3 . W tym przypadku, zablokowanie transportu Ca z siateczki śródplazmatycznej do mitochondrium powoduje zwiększenie poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej. Efekt ten zauważalny jest zarówno w warunkach nietoksycznych, jak i toksycznych. Wiadomo, że receptor IP_3 uwalniając Ca z siateczki śródplazmatycznej stymuluje mitochondria do zwiększenia produkcji ATP o około 30%, jako zapoczątkowanie etapu wydzielania neuroprzekaźnika (patrz → podrozdział 6.5). Potencjalnie, z uwagi na brak sygnału wyzwalamy produkcję ATP, acetylo-CoA pozostaje we frakcji mitochondrialnej, co skutkuje zubożeniem acetylo-CoA w cytoplazmie (Ryc. 37 A, 38 A, 44). W efekcie, widoczne jest obniżenie poziomu acetylocholinyl. Brak dodatkowej puli ATP hamuje zależne od energii magazynowanie i wydzielanie acetylocholinyl, co widoczne jest szczególnie w różnicowanych komórkach SN56 (Ryc. 45 A, 46 A). Ponadto, 2-APB wykazuje wyraźne

właściwości inhibicyjne wobec PDHC (Ryc. 51). Pomimo zmniejszonej aktywności PDHC, globalny poziom acetylo-CoA nie zmienia się (Ryc. 36 A-B). Prawdopodobnie jest to związane ze zmniejszonym jego zużyciem do produkcji acetylocholin i energii (Ryc. 44, 45, 46).

Antagoniści bramkowanych napięciem kanałów wapniowych (VGCC) nie wpływają na wewnątrzkomórkową kompartmentację acetylo-CoA (Ryc. 39 A-B, 40 A-B). Natomiast w warunkach cytotoksycznych, wstępna inkubacja komórek z antagonistami VGCC zabezpiecza całkowity poziom metabolitu na poziomie kontrolnym. Zastosowanie nifedypiny jako antagonisty VGCC typu L oraz przeciwutleniacza skutkuje znamiennej najwyższą dostępnością acetylo-CoA, zarówno w przedziale mitochondrialnym, jak i cytoplazmatycznym, w stosunku do pozostałych antagonistów.

Poziom ATP w komórkach SN56 jest niezależny od ekspresji fenotypu cholinergicznego (Ryc. 17 A, 44, Tabela 1, Tabela 4). Chroniczna ekspozycja komórek na Zn w stężeniach powyżej 0.1 mmol/L znacząco obniżała poziom ATP. Potencjalnie, tak znaczne obniżenie poziomu ATP może być wynikiem obniżenia aktywności PDHC, akonitazy dehydrogenaz izocytrynianowej i α -ketogluutaranowej, jak również zahamowania przez cynk kompleksu III łańcucha oddechowego (Brown et al., 2000; Dineley et al., 2003; Lemire et al., 2008; Morris and Levenson, 2012; Ronowska et al., 2010).

Wstępna inkubacja komórek SN56 z 10 μ M nifedypiną, antagonistą kanałów wapniowych typu L znosiła ostry wpływ cynku na aktywność akonitazy, dehydrogenazy izocytrynianowej oraz przywracała poziom ATP do warunków kontrolnych. Zaobserwowano również w tych warunkach zmniejszoną akumulację cynku i TBARS.

Cytoprotekcyjnego efektu nie uzyskano w przypadku zablokowania receptora IP₃. Niski poziom ATP związany jest prawdopodobnie z rolą receptora IP₃ w neuroprzekaznictwie. Magazynowanie acetylocholin w pęcherzykach transportowych jest procesem zależnych od ATP, potencjalnie obniżenie aktywności receptora IP₃ może skutkować ograniczeniem neuroprzekaznictwa cholinergicznego (Blusztajn and Wurtman, 1983; Szutowicz et al., 1989; Tucek, 1993).

6.8. Produkcja *N*-acetyloasparagianu w neuronach cholinergicznym eksponowanych na sygnały cytotoksyczne

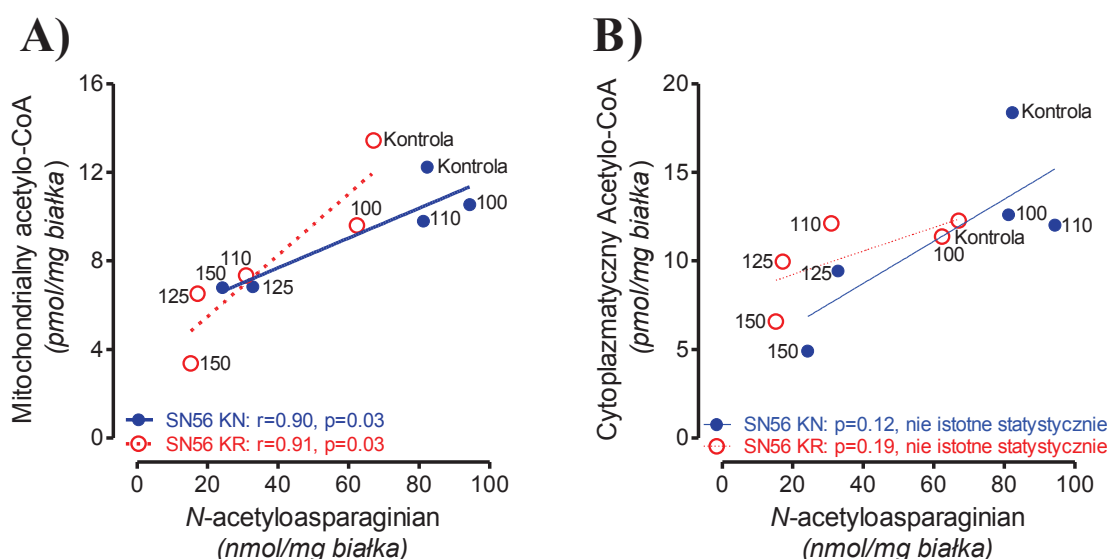
N-acetyloasparagian (NAA) jest wtórnym metabolitem acetylo-CoA produkowanym w wysokich stężeniach. Wiedza na temat wpływu postępującej neurodegeneracji na poziom

NAA jest niewielka. Dostępne dane wskazują na lokalną redukcję poziomu metabolitu u osób cierpiących na AD. W tylnej części zakrętu obręczy mózgow pacjentów odnotowano 15-20% spadek parametru NAA/Cr (bądź stężenia NAA) (Kantarci and Jack, 2003; Moats et al., 1994; Moffett et al., 2007). Badania prowadzone u pacjentów z łagodną postacią AD ujawniły znamienne obniżony poziom metabolitu w hipokampie mózgu (Jessen et al., 2011; Watanabe et al., 2012). W związku z tym, celowym jest ocena wpływu czynników toksycznych towarzyszących rozwojowi AD na produkcję NAA.

Produkcja NAA, w obecności Asp-NAT, odbywa się wyłącznie w neuronach mózgu. W efekcie oznaczona aktywność tudzież zawartość Asp-NAT w komórkach SN56 była odpowiednio ponad 2 i 3 krotnie wyższa niżeli w homogenacie całego mózgu (Ryc. 16 A-B, Tabela 3) (Di Pietro et al., 2014; Madhavarao et al., 2003). Równolegle, poziom NAA oznaczony w komórkach linii SN56 był zbliżony do poziomu oznaczonego w hipokampie mózgu (Tabela 7, Ryc. 17 B-C). Wskazuje to na konieczność prowadzenia pomiarów z zakresu metabolizmu NAA w regionach mózgu bogatych w neurony, jak również ponownie potwierdza celowość pracy z zastosowaniem komórek linii SN56 jak modelu neuronów cholinergicznym. Wyznaczona na podstawie krzywej Hanes-Wolff'a wartość K_m dla acetylo-CoA jako substratu reakcji syntezy NAA wyniosła około 170 μM (Lu et al., 2004). Niestety dostępność acetylo-CoA w różnicowanych komórkach SN56 tudzież zakończeniach nerwowych mieści się w zakresie 3-8 μM (Ryc. 14) (Bielarczyk et al., 2015; Szutowicz et al., 2006; Szutowicz et al., 2004). W związku z tym, niższy poziom NAA w SN56 KR niżeli SN56 KN może odzwierciedlać stan niższej dostępności acetylo-CoA w komórkach różnicowanych w wyniku czego dochodzi do kompetycji 3 ścieżek utylizacji acetylo-CoA, tj. produkcji energii, syntezy NAA oraz syntezy acetylocholino. Nawiązując do charakterystyki neuronów cholinergicznym należy przypuszczać, że w stosunku do pozostałych typów neuronów, są mniej efektywnym producentem NAA (patrz → podrozdziały 2.3, 2.5, 2.5.2) (Ryc. 17 B-C).

Miejsce produkcji wewnątrz neuronów pozostaje wciąż nie do końca nieustalone. Obecność Asp-NAT potwierdzono w przedziale mitochondrialnym i bądź mikrosomalnym komórki (Ariyannur et al., 2010; Arun et al., 2009; Li et al., 2013; Lu et al., 2004; Madhavarao et al., 2003; Wiame et al., 2010). Niestety, w kwestii fizjologicznej aktywności Asp-NAT w przedziałach komórkowych skutkującej produkcją NAA, cytowane prace wzajemnie się wykluczają. W niniejszej pracy, uzyskane wyniki wskazują na mitochondrialną produkcję NAA. Pierwszym, pośrednim dowodem jest wysoka korelacja pomiędzy całkowitym poziomem NAA a mitochondrialnym poziomem acetylo-CoA (substratu reakcji)

z jednoczesnym brakiem korelacji pomiędzy wspomnianym poziomem NAA a cytoplazmatycznym poziomem acetylo-CoA (Ryc. 52 A-B). W trakcie badań wykazano również, że w komórkach SN56 niemalże 90% aktywności Asp-NAT przypadała na przedział mitochondrialny. Uzyskane wyniki pokrywały się z oznaczonym poziomem NAA, który w tożsamej frakcji wahał się w zakresie 80-90% całkowitej puli metabolitu. Pozostałe około 10% przypadało na frakcję cytoplazmatyczną zawierającą w swoim składzie m.in. mikrosomy. Niestety, na obecnym etapie badań nie można jednoznacznie stwierdzić, czy uzyskany wynik 10% związany jest z ograniczoną czystością badanego materiału, czy można aktywnością Asp-NAT we frakcji mikrosomalnej. Druga z możliwości pozostawałaby w zgodzie z badaniami sugerującymi znikomą aktywność fizjologiczną Asp-NAT we frakcji mikrosomalnej neuronu (Ariyannur et al., 2010; Madhavarao et al., 2003; Pessentheiner et al., 2013).



Ryc. 53. Korelacja pomiędzy całkowity poziomem *N*-acetyloasparaginianu a mitochondrialnym (A) tudzież cytoplazmatycznym (B) poziomem acetylo-CoA w komórkach SN56 z różną ekspresją fenotypu cholinergicznego. Poziomy metabolitów oznaczono w komórkach SN56 chronicznie eksponowanych na Zn (0-0.15 mmol/L). Wartość stężenia Zn ($\mu\text{mol/L}$) podano przy odpowiednim punkcie eksperymentalnym. Korelacje wyliczono na podstawie danych prezentowanych na Ryc. 14 i Ryc. 17 B.

Badania prowadzone na mysim modelu rodzinnej postaci choroby Alzheimera (5xFAD) wskazywały na wysoką korelację pomiędzy zmianami stanu energetycznego neuronów mózgu a poziomem NAA (Zaroff et al., 2015). Podobną relację prezentowano w publikacjach badających wpływ mechanicznego uszkodzenia mózgu na stan energetyczny neuronów (Di Pietro et al., 2014). W związku z udowodnionym inhibycyjnym wpływem Zn na produkcję energii (Ronowska et al., 2010; Ronowska et al., 2007) przeanalizowano

uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań. W efekcie oprócz potwierdzenia wspomnianej zależności, uzyskano silną dodatnią korelację pomiędzy poziomem NAA a acetylo-CoA. Zależność tą zaobserwowano również w badaniach z wykorzystaniem kofaktora PDHC (tj. lipoamidu), który zwiększając wydajność enzymu zwiększa dostępność acetylo-CoA w komórkach SN56. Zwiększenie poziomu acetylo-CoA skutkuje znamienym podwyższeniem poziomu NAA (Ryc. 13), co potwierdzają badania ostrego wpływu Zn. Zastosowanie antagonistów białek regulujących homeostazę Ca spowodowało obniżenie akumulacji Zn z równoczesnym zwiększeniem poziomu całkowitego acetylo-CoA (Ryc. 33 A-B, 39 A-B). W efekcie, poziom NAA utrzymywał się w zakresach kontrolnych (Ryc. 47 A-B). Ostatnim badanym aspektem był wpływ procesu różnicowania na poziom acetylo-CoA i NAA. Z uprzednich badań ZML wynika, że najwyższą efektywność różnicowania uzyskano w trakcie hodowli komórek SN56 w obecności kwasu *trans*-retinowego oraz dibutyrylowej pochodnej cAMP (Bielarczyk et al., 2003a; Szutowicz et al., 2000). Powtórzenie schematu badań ponownie potwierdziło, że spadek dostępności acetylo-CoA, będący wynikiem zwiększenia produkcji acetylocholino, skutkuje obniżeniem poziomu NAA (Ryc. 7 A-B, 8 A-B). W dotychczas opublikowanych rezultatach badawczych prezentowany jest wpływ RA (Li et al., 2013) bądź db-cAMP (Arun et al., 2006) na poziom NAA oznaczony w komórkach SH-SY5Y. W przypadku RA, autorzy nie prezentowali poziomu NAA w komórkach nieróżnicowanych, w komórkach po 24-ro godzinnej hodowli w obecności 1mmol/L db-cAMP poziom NAA znamienne się zwiększył. Niestety, w obu przypadkach nie badano markerów ekspresji fenotypu. Z drugiej strony wiadomo, że obecność wymienionych czynników w hodowli komórek SH-SY5Y zwiększa ekspresję fenotypu dopaminergicznego (Edsjö et al., 2003; Ferreira et al., 2013; Presgraves et al., 2004). Oznacza to, że ścieżka NAA w każdym z typów neuronów ma inny priorytet produkcyjny, prawdopodobnie zależny od funkcji neuronów. W komórkach SN56, nie zaobserwowano istotnych zmian w aktywności Asp-NAT, co tym silniej wskazuje na acetylo-CoA jako czynnik warunkujący szybkość syntezy NAA w neuronach cholinergicznym (Ryc. 12 C-D, 16 A-B, 17 B-C).

Pozwala to na uszczegółowienie stawianej w cytowanych publikacjach hipotezy, że poziom NAA może odzwierciedlać zarówno stan energetyczny neuronów mózgu, jak i samą dostępność acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym neuronów mózgu (Ryc. 14 A-B, 37, 52 A).

7. WNIOSKI

Wyniki przedstawione w pracy potwierdzają hipotezę o wpływie białek regulujących wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia na metabolizm energetyczny w neuronalnych komórkach cholinergicznym eksponowanych na toksyczne stężenia Zn. Z uzyskanych wyników można wysunąć następujące wnioski:

1. Patologicznie wysoki napływ Zn do wnętrza komórek powoduje jego niejednorodną kompartmentację wewnątrzkomórkową i wysoką akumulacją wewnątrzmitochondrialną. Cynk wywołuje, zależne od jego akumulacji, obniżenie aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz akonitazy. Efekt inhibicyjny jonu Zn następuje w pierwszych minutach ekspozycji na ten czynnik. Ponadto, Zn promuje produkcję reaktywnych form tlenu, które powodują supresję aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej.
2. Zn obniża zawartość receptora trójfosforanu inozytolu. Zawartości zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L, N oraz P/Q w komórkach SN56 jest niezależna od ekspresji fenotypu cholinergicznego tudzież Zn. Kanały te stanowią alternatywną ścieżkę napływu cynku do wnętrza komórek neuronalnych.
3. Blokery kanałów wapniowych zależnych od napięcia hamują napływ cynku do wnętrza komórek neuronalnych, znosząc równocześnie zaburzenia homeostazy wapnia.
4. Zależne od napięcia kanały wapniowe typu L są główną alternatywną drogą transportu cynku do wnętrza komórek w warunkach pobudzenia ekscytotoksycznego.
5. Nifedypina jest nie tylko efektywnym antagonistą kanałów wapniowych typu L, wykazuje również właściwości antyoksydacyjne.
6. Mekamylamina jest efektywnym antagonistą nikotynowych receptorów acetylocholiny wykazującym właściwości antyoksydacyjne. Przypuszczalnie, reguluje także bezpośredni lub pośredni transport acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy neuronu.
7. Produkcja *N*-acetyloasparaginan (NAA) odbywa się w mitochondriach neuronów cholinergicznym.

8. Poziom NAA jest pośrednio zależny od hamowanego przez Zn kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC, enzym katalizujący produkcję acetylo-CoA). Zn obniża poziom NAA także poprzez inhibicję aktywności enzymatycznej oraz obniżenie zawartości białka *N*-acetylotransferazy asparaginianowej.
9. Antagoniści białek regulujących wewnątrzkomórkową równowagę wapniową zabezpieczają ścieżkę produkcji NAA przed toksycznym wpływem Zn.
10. W rozwoju chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z zaburzeniami równowagi wapniowo-cynkowej, zastosowanie antagonistów kanałów wapniowych zależnych od napięcia może być jedną ze ścieżek terapeutycznych zapobiegających zarówno śmierci neuronów jak i procesom demielinizacyjnym w centralnym układzie nerwowym.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Adams DJ and Berecki G (2013) Mechanisms of conotoxin inhibition of N type(Ca_v2.2) calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, v. 1828, p. 1619-28.
2. Albers S, Inthathirath F, Gill SK, Winick-Ng W, Jaworski E, Wong DY, Gros R and Rylett RJ (2014) Nuclear 82-kDa choline acetyltransferase decreases amyloidogenic APP metabolism in neurons from APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, v. 69, p. 32-42.
3. Arai K, Fukushima T, Tomiya M, Mitsuhashi S, Sasaki T, and Toyo'oka T (2008) Simultaneous determination of N-acetylaspartylglutamate and N-acetylaspartate in rat brain homogenate using high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 875, p. 358-62.
4. Ariyannur PS, Madhavarao CN and Namboodiri AM (2008) N-acetylaspartate synthesis in the brain mitochondria vs. microsomes. *Brain Res*, v. 1227, p. 34-41.
5. Ariyannur PS, Moffett J R, Manickam P, Pattabiraman N, Arun P, Nitta A, Nabeshima T, Madhavarao CN, and Namboodiri AM (2010) Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res*, v. 1335, p. 1-13.
6. Arun P, Madhavarao CN, Moffett JR and Namboodiri MA (2006) Regulation of N acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate biosynthesis by protein kinase activators. *J Neurochem*, v. 98, p. 2034-42.
7. Arun P, Moffett JR and Namboodiri AM (2009) Evidence for mitochondrial and cytoplasmic N-acetylaspartate synthesis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Int*, v. 55, p. 219-25.
8. Assaf SY and Chung SH (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature*, v. 308, p. 734-6.
9. Atchison WD (2003) Effects of toxic environmental contaminants on voltage-gated calcium channel function from past to present. *J Bioenerg Biomembr*, v. 35, p. 507-32.
10. Ballestín R, Molowny A, Marín MP, Esteban-Pretel G, Romero AM, Lopez-Garcia C, Renau-Piqueras J and Ponsoda X (2011) Ethanol reduces zincosome formation in cultured astrocytes. *Alcohol Alcohol*, v. 46, p. 17-25.
11. Baslow MH (2000) Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L aspartylglutamate in the vertebrate brain role in glial cell-specific signaling. *J Neurochem*, v. 75, p. 453-9.
12. Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, v. 361, p. 315-25.
13. Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 1, p. 11-21.
14. Bériault R, Hamel R, Chenier D, Mailloux RJ, Joly H and Appanna VD (2007) The overexpression of NADPH-producing enzymes counters the oxidative stress evoked by gallium, an iron mimetic. *Biomaterials*, v. 20, p. 165-76.

15. Bertoni-Freddari C, Mocchegiani E, Malavolta M, Casoli T, Di Stefano G and Fattoretti P (2006) Synaptic and mitochondrial physiopathologic changes in the aging nervous system and the role of zinc ion homeostasis. *Mech Ageing Dev*, v. 127, p. 590-6.
16. Bettendorff L, Mastrogiacomo F, Wins P, Kish SJ, Grisar T and Ball MJ (1997) Low thiamine diphosphate levels in brains of patients with frontal lobe degeneration of the non-Alzheimer's type. *J Neurochem*, v. 69, p. 2005-10.
17. Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Bizon-Zygmanska D, Pawelczyk T and Szutowicz A (2006) RS-alpha-lipoic acid protects cholinergic cells against sodium nitroprusside and amyloid-beta neurotoxicity through restoration of acetyl-CoA level. *J Neurochem*, v. 98, p. 1242-51.
18. Bielarczyk H, Jankowska A, Madziar B, Matecki A, Michno A and Szutowicz A (2003a) Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid beta-peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem Int*, v. 42, p. 323-31.
19. Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Gul S, Pawelczyk T and Szutowicz A (2005) Phenotype dependent differential effects of interleukin-1beta and amyloid-beta on viability and cholinergic phenotype of T17 neuroblastoma cells. *Neurochem Int*, v. 47, p. 466-73.
20. Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Höfling C, Ronowska A, Gul-Hinc S, Roßner S, Schliebs R, Pawelczyk T and Szutowicz A (2015) AβPP-transgenic 2576 mice mimic cell type-specific aspects of acetyl-CoA-linked metabolic deficits in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, v. 48, p. 1083-94.
21. Bielarczyk H and Szutowicz A (1989) Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Biochem J*, v. 262, p. 377-80.
22. Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Madziar B, Cwikowska J, Pawelczyk T and Szutowicz A (2003b) Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J Neurosci Res*, v. 73, p. 717-21.
23. Bielarczyk H, Tomaszewicz M and Szutowicz A (1998) Effect of aluminum on acetyl CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J Neurochem*, v. 70, p. 1175-81.
24. Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ and Kessler JA (2011) The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, v. 29, p. 802-11.
25. Bizon-Zygmańska D, Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawelczyk T, Ronowska A, Marszał M and Szutowicz A. (2011) Acetyl-CoA metabolism in amprolium evoked thiamine pyrophosphate deficits in cholinergic SN56 neuroblastoma cells. *Neurochem Int*, v. 59, p. 208-16.
26. Blass JP, Sheu RK and Gibson GE (2000) Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann NY Acad Sci*, v. 903, p. 204-21.
27. Blass JP and Zemcov A (1984) Alzheimer's disease. A metabolic systems degeneration? *Neurochem Pathol*, v. 2, p. 103-14.

28. Blusztajn JK and Wurtman RJ (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science*, v. 221, p. 614-20.
29. Bouron A and Oberwinkler J (2014) Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflugers Arch*, v. 466, p. 381-7.
30. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54.
31. Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, López-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH and Blusztajn JK (2004) Choline transporter 1 maintains cholinergic function in choline acetyltransferase haploinsufficiency. *J Neurosci*, v. 24, p. 5459-66.
32. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K and Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, v. 3, p. 186-91.
33. Brown AM, Kristal BS, Effron MS, Shestopalov AI, Ullucci PA, Sheu KF, Blass JP and Cooper AJ (2000) Zn^{2+} inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J Biol Chem*, v. 275, p. 13441-7.
34. Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP and Gibson GE (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain mechanistic implications. *Ann Neurol*, v. 57, p. 695-703.
35. Bubber P, Ke ZJ and Gibson GE (2004a) Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int*, v. 45, p. 1021-8.
36. Bubber P, Tang J, Haroutunian V, Xu H, Davis KL, Blass JP and Gibson GE (2004b) Mitochondrial enzymes in schizophrenia. *J Mol Neurosci*, v. 24, p. 315-21.
37. Caldwell CC, Yao J and Brinton RD (2015) targeting the prodromal stage of Alzheimer's disease bioenergetic and mitochondrial opportunities. *Neurotherapeutics*, v. 12, p. 66-80.
38. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 3, p. a003947.
39. Chen CJ and Liao SL (2003a) Neurotrophic and neurotoxic effects of zinc on neonatal cortical neurons. *Neurochem Int*, v. 42, p. 471-9.
40. Chen CJ and Liao SL (2003b) Zinc toxicity on neonatal cortical neurons involvement of glutathione chelation. *J Neurochem*, v. 85, p. 443-53.
41. Colvin RA, Bush AI, Volitakis I, Fontaine CP, Thomas D, Kikuchi K and Holmes WR (2008) Insights into Zn^{2+} homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 294, p. C726-42.
42. Colvin RA, Davis N, Nipper RW and Carter PA (2000) Zinc transport in the brain routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr*, v. 130, p. 1484S-7S.
43. Cuajungco MP and Lees GJ (1997a) Zinc and Alzheimer's disease is there a direct link? *Brain Res Brain Res Rev*, v. 23, p. 219-36.
44. Cuajungco MP and Lees GJ (1997b) Zinc metabolism in the brain relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis*, v. 4, p. 137-69.

45. Cuello AC and Sofroniew MV (1984) The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *Trends in Neurosciences*, v. 7, p. 74-78.
46. De Villafranca GW and Haines VE (1974) Paramyosin from arthropod cross-striated muscle. *Comp Biochem Physiol B*, v. 47, p. 9-26.
47. Decker ER and Dani JA (1990) Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci*, v. 10, p. 3413-20.
48. DeKosky ST, Ikonomovic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S,
49. Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH and Mufson EJ (2002) Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, v. 51, p. 145-55.
50. Del Pino J, Zeballos G, Anadón MJ, Moyano P, Díaz MJ, García JM and Frejo MT (2015) Cadmium-induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons mediated by muscarinic M1 receptor blockade, increase in GSK-3 β enzyme, β -amyloid and tau protein levels. *Archives of Toxicology*.
51. Denton RM and Halestrap AP (1979) Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues. *Essays Biochem*, v. 15, p. 37-77.
52. Devergnas S, Chimienti F, Naud N, Pennequin A, Coquerel Y, Chantegrel J, Favier A and Seve M (2004) Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels a real-time RT-PCR study. *Biochem Pharmacol*, v. 68, p. 699-709.
53. Di Pietro V, Amorini AM, Tavazzi B, Vagnozzi R, Logan A, Lazzarino G, Signoretti S and Belli A (2014) The molecular mechanisms affecting N-acetylaspartate homeostasis following experimental graded traumatic brain injury. *Mol Med*, v. 20, p. 147-57.
54. Dickson DW (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 56, p. 321-39.
55. Dineley KE, Votyakova TV and Reynolds IJ (2003) Zinc inhibition of cellular energy production implications for mitochondria and neurodegeneration. *J Neurochem*, v. 85, p. 563-70.
56. Dingsdale H, Voronina S, Haynes L, Tepikin A and Lur G (2012) Cellular geography of IP3 receptors, STIM and Orai a lesson from secretory epithelial cells. *Biochem Soc Trans*, v. 40, p. 108-11.
57. Dyś A (2014) Cytotoksyczne działania cynku na komórki cholinergiczne i astroglejowe, rozprawa doktorska, *Gdański Uniwersytet Medyczny*.
58. Edsjö A, Lavenius E, Nilsson H, Hoehner JC, Simonsson P, Culp LA, Martinsson T, Larsson C and Pählman S (2003) Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Lab Invest*, v. 83, p. 813-23.
59. Eißing A, Fischer D, Rauch I, Baumann A, Schebb NH, Karst U, Rose K, Klumpp S and Krieglstein J (2012) Acetylcholine content and viability of cholinergic neurons are influenced by the activity of protein histidine phosphatase. *BMC Neuroscience*, v. 13.
60. Fernández de Sevilla D, Núñez A, Borde M, Malinow R and Buño W (2008) Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, v. 28, p. 1469-78.

61. Ferreira PS, Nogueira TB, Costa VM, Branco PS, Ferreira LM, Fernandes E, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F and Capela JP (2013) Neurotoxicity of "ecstasy" and its metabolites in human dopaminergic differentiated SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett*, v. 216, p. 159-70.
62. Fonnum F (1975) A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* v. 24, p. 407-409.
63. Fraiman D and Dawson SP (2004) A model of IP₃ receptor with a luminal calcium binding site stochastic simulations and analysis. *Cell Calcium*, v. 35, p. 403-13.
64. Frederickson CJ, Giblin LJ, Krezel A, McAdoo DJ, Mueller RN, Muelle RN, Zeng Y, Balaji RV, Masalha R, Thompson RB, Fierke CA, Sarvey JM, de Valdenebro M, Prough DS, and Zornow MH (2006) Concentrations of extracellular free zinc (pZn)_e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Exp Neurol*, v. 198, p. 285-93.
65. Frederickson CJ, Koh JY, and Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, p. 449-62.
66. Galasso SL and Dyck RH (2007) The role of zinc in cerebral ischemia. *Mol Med*, v. 13, p. 380-7.
67. Gazaryan IG, Krasinskaya IP, Kristal BS and Brown AM (2007) Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, v. 282, p. 24373-80.
68. Glenner GG and Wong CW (1984) Alzheimer's disease initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 120, p. 885-90.
69. Goedert M (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, v. 16, p. 460-5.
70. Gorman MW, Marble DR, Ogimoto K and Feigl EO (2003) Measurement of adenine nucleotides in plasma. *Luminescence*, v. 18, p. 173-81.
71. Grienberger C., and Konnerth A. (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron*, v. 73, p. 862-85.
72. Haase H, Hebel S, Engelhardt G and Rink L (2015) The biochemical effects of extracellular Zn²⁺ and other metal ions are severely affected by their speciation in cell culture media. *Metallomics*, v. 7, p. 102-11.
73. Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH and Wainer BH (1990) Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res*, v. 512, p. 190-200.
74. Harte MK, Bachus SB and Reynolds GP (2005) Increased N-acetylaspartate in rat striatum following long-term administration of haloperidol. *Schizophr Res*, v. 75, p. 303-8.
75. Hartnett S, Zhang F, Abitz A and Li Y (2014) Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 interacts with choline transporter in cholinergic cells. *Neuroscience Letters*, v. 564, p. 115-119.
76. Hasreiter J, Goldnagl L, Böhm S and Kubista H (2014) Ca_v1.2 and Ca_v1.3 L-type calcium channels operate in a similar voltage range but show different coupling to

- Ca²⁺-dependent conductances in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 306, p. C1200-13.
77. Hettiarachchi NT, Dallas ML, Pearson HA, Bruce G, Deuchars S, Boyle JP and Peers C (2010) Gap junction-mediated spontaneous Ca²⁺ waves in differentiated cholinergic SN56 cells. *BBRC*, v. 397, p. 564-568.
 78. Hiramatsu M, Miwa M, Hashimoto K, Kawai S and Nomura N (2008) Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamylamine-induced learning and memory impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat. *Brain Res*, v. 1195, p. 96-103.
 79. Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T and Mikoshiba K (2005) Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5 trisphosphate production. *J Biol Chem*, v. 280, p. 11723-30.
 80. Howells FM, Uhlmann A, Temmingh H, Sinclair H, Meintjes E, Wilson D and Stein DJ (2014) (1)H-magnetic resonance spectroscopy ((1)H-MRS) in methamphetamine dependence and methamphetamine induced psychosis. *Schizophr Res*, v. 153, p. 122-8.
 81. Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR and Gardner PD (2010) The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog Neurobiol*, v. 92, p. 212-26.
 82. Inoue K, O'Bryant Z and Xiong ZG (2015) Zinc-permeable ion channels effects on intracellular zinc dynamics and potential physiological/pathophysiological significance. *Curr Med Chem*, v. 22, p. 1248-57.
 83. Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ and Grundke-Iqbal I (1998) Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl*, v. 53, p. 169-80.
 84. Israël M and Lesbats B (1982) Application to mammalian tissues of the chemiluminescent method for detecting acetylcholine. *J Neurochem*, v. 39, p. 248-50.
 85. Jalil MA, Begum L, Contreras L, Pardo B, Iijima M, Li MX, Ramos M, Marmol P, Horiuchi M, Shimotsu K, Nakagawa S, Okubo A, Sameshima M, Isashiki Y, Del Arco A, Kobayashi K, Satrústegui J and Saheki T (2005) Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol Chem*, v. 280, p. 31333-9.
 86. Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Wróblewska M and Szutowicz A (2010) Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain. *J Neurochem*, v. 115, p. 333-42.
 87. Jankowska-Kulawy A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Suszkiw JB, Pawełczyk T, Dyś A, and Szutowicz A (2008) Effects of lead on cholinergic SN56 neuroblastoma cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, v. 68, p. 453-62.
 88. Jensen BL, Friis UG, Hansen PB, Andreasen D, Uhrenholt T, Schjerning J and Skøtt O (2004) Voltage- dependent calcium channels in the renal microcirculation. *Nephrol Dial Transplant*, v. 19, p. 1368-73.

89. Jessen F, Lewczuk P, Gür O, Block W, Ende G, Frölich L, Hammen T, Arlt S, Kornhuber J, Kucinski T, Popp J, Peters O, Maier W, Träber F and Wiltfang J (2011) Association of N-acetylaspartate and cerebrospinal fluid A β 42 in dementia. *J Alzheimers Dis*, v. 27, p. 393-9.
90. Jia Y, Xu J, Yu Y, Guo J, Liu P, Chen S and Jiang J (2013) Nifedipine inhibits angiotensin II-induced cardiac fibrosis via downregulating Nox4-derived ROS generation and suppressing ERK1/2, JNK signaling pathways. *Pharmazie*, v. 68, p. 435-41.
91. Jonas EA, Porter GA and Alavian KN (2014) Bcl-xL in neuroprotection and plasticity. *Front Physiol*, v. 5, p. 355.
92. Jones S, Sudweeks S and Yakel JL (1999) Nicotinic receptors in the brain correlating physiology with function. *Trends Neurosci*, v. 22, p. 555-61.
93. Jung RE, Yeo RA, Chiulli SJ, Sibbitt WL, Weers DC, Hart BL and Brooks WM (1999) Biochemical markers of cognition a proton MR spectroscopy study of normal human brain. *Neuroreport*, v. 10, p. 3327-31.
94. Kantarci K and Jack CR (2003) Neuroimaging in Alzheimer disease an evidence based review. *Neuroimaging Clin N Am*, v. 13, p. 197-209.
95. Kerchner GA, Canzoniero LM, Yu SP, Ling C and Choi DW (2000) Zn²⁺ current is mediated by voltage-gated Ca²⁺ channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurons. *J Physiol*, v. 528 Pt 1, p. 39-52.
96. Kim AH, Sheline CT, Tian M, Higashi T, McMahan RJ, Cousins RJ and Choi DW (2000) L-type Ca²⁺ channel-mediated Zn²⁺ toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. *Brain Res*, v. 886, p. 99-107.
97. Kim EY, Chang SY, Chung JM, Ryu BR, Joo CK, Moon HS, Kang K, Yoon SH, Han PL and Gwag BJ (2001) Attenuation of Zn²⁺ neurotoxicity by aspirin role of N-type Ca²⁺ channel and the carboxyl acid group. *Neurobiol Dis*, v. 8, p. 774-83.
98. Kim EY, Koh JY, Kim YH, Sohn S, Joe E and Gwag BJ (1999) Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur J Neurosci*, v. 11, p. 327-34.
99. Kim J, Basak JM and Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, v. 63, p. 287-303.
100. Kim S, Seo J-W, Oh S, Kim SH, Kim I, Suh N and Lee J-Y (2015) Disparate roles of zinc in chemical hypoxia-induced neuronal death. *Front Cell Neurosci*, v. 9, p 1.
101. Kito T, Shibata R, Kondo M, Yamamoto T, Suzuki H, Ishii M and Murohara T (2012) Nifedipine ameliorates ischemia-induced revascularization in diet-induced obese mice. *Am J Hypertens*, v. 25, p. 401-6.
102. Klimaszewska-Łata J, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Ronowska A, Zyśk M, Gruzewska K, Pawelczyk T and Szutowicz A (2015) Differential effects of lipopolysaccharide on energy metabolism in murine microglial N9 and cholinergic SN56 neuronal cells. *J Neurochem*, v. 133, p. 284-97.
103. Kodirov SA, Takizawa S, Joseph J, Kandel ER, Shumyatsky GP, and Bolshakov VY (2006) Synaptically released zinc gates long-term potentiation in fear conditioning pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 15218-23.

104. Koh JY and Choi DW (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*, v. 20, p. 83-90.
105. Koller KJ, Zaczek R and Coyle JT (1984) N-acetyl-aspartyl-glutamate regional levels in rat brain and the effects of brain lesions as determined by a new HPLC method. *J Neurochem*, v. 43, p. 1136-42.
106. Kukic I, Lee JK, Coblenz J, Kelleher SL and Kiselyov K (2013) Zinc-dependent lysosomal enlargement in TRPML1-deficient cells involves MTF-1 transcription factor and ZnT4 (Slc30a4) transporter. *Biochem J*, v. 451, p. 155-63.
107. Kwon B, Gamache T, Lee HK and Querfurth HW (2015) Synergistic effects of β amyloid and ceramide-induced insulin resistance on mitochondrial metabolism in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1852, p. 1810-23.
108. Laxminarayan R, Mills AJ, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Jha P, Musgrove P, Chow J, Shahid-Salles S and Jamison DT (2006) Advancement of global health key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet*, v. 367, p. 1193-208.
109. Lefresne P, Guyenet P and Glowinski J (1973) Acetylcholine synthesis from (2- 14 C) pyruvate in rat striatal slices. *J Neurochem*, v. 20, p. 1083-97.
110. Lemire J, Mailloux R and Appanna VD (2008) Zinc toxicity alters mitochondrial metabolism and leads to decreased ATP production in hepatocytes. *J Appl Toxicol*, v. 28, p. 175-82.
111. Li H (2000) Reduction of choline acetyltransferase activities in APP770 transgenic mice. *Chin Sci Bulletin*, v. 45, p. 834-838.
112. Li S, Clements R, Sulak M, Gregory R, Freeman E and McDonough J (2013) Decreased NAA in gray matter is correlated with decreased availability of acetate in white matter in postmortem multiple sclerosis cortex. *Neurochem Res*, v. 38, p. 2385-96.
113. Llufriu S, Kornak J, Ratiney H, Oh J, Brenneman D, Cree BA, Sampat M, Hauser SL, Nelson SJ and Pelletier D (2014) Magnetic Resonance Spectroscopy Markers of Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*.
114. Lo HS, Chiang HC, Lin AM, Chiang HY, Chu YC and Kao LS (2004) Synergistic effects of dopamine and Zn^{2+} on the induction of PC12 cell death and dopamine depletion in the striatum possible implication in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, v. 17, p. 54-61.
115. Lu ZH, Chakraborty G, Ledeen RW, Yahya D and Wu G (2004) N-Acetylaspartate synthase is bimodally expressed in microsomes and mitochondria of brain. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 122, p. 71-8.
116. MacDonald RS, Wollard-Biddle LC, Browning JD, Thornton WH and O'Dell BL (1998) Zinc deprivation of murine 3T3 cells by use of diethylenetrinitriolpentaacetate impairs DNA synthesis upon stimulation with insulin-like growth factor-1 (IGF-1). *J Nutr*, v. 128, p. 1600-5.
117. Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, v. 3, p. 91-101.

118. Madhavarao CN, Chinopoulos C, Chandrasekaran K and Namboodiri MA (2003) Characterization of the N-acetylaspartate biosynthetic enzyme from rat brain. *J Neurochem*, v. 86, p. 824-35.
119. Madziar B, Tomaszewicz M, Matecki A, Bielarczyk H and Szutowicz A (2003) Interactions between p75 and TrkA receptors in differentiation and vulnerability of SN56 cholinergic cells to beta-amyloid. *Neurochem Res*, v. 28, p. 461-5.
120. Majewski L and Kuznicki J (2015) SOCE in neurons Signaling or just refilling? *Biochim Biophys Acta*.
121. Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, v. 6, p. 337-50.
122. Mattson MP, Rychlik B, Chu C and Christakos S (1991) Evidence for calcium reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, v. 6, p. 41-51.
123. Medvedeva YV and Weissb JH (2015) Intramitochondrial Zn²⁺ accumulation via the Ca²⁺ uniporter contributes to acute ischemic neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, v. 68, p. 137-144.
124. Mesulam MM, Volicser L, Marquis JK, Mufson EJ and Green RC (1986) Systematic regional differences in the cholinergic innervation of the primate cerebral cortex distribution of enzyme activities and some behavioral implications. *Ann Neurol*, v. 19, p. 144-51.
125. Miyazawa A, Fujiyoshi Y and Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, v. 423, p. 949-55.
126. Moats RA, Ernst T, Shonk TK and Ross BD (1994) Abnormal cerebral metabolite concentrations in patients with probable Alzheimer disease. *Magn Reson Med*, v. 32, p. 110-5.
127. Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F and Malavolta M (2005) Brain, aging and neurodegeneration role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol*, v. 75, p. 367-90.
128. Moffett JR, Arun P, Ariyannur PS and Namboodiri AM (2013) N-acetylaspartate reductions in brain injury impact on post-injury neuroenergetics, lipid synthesis, and protein acetylation. *Front Neuroenergetics*, v. 5, p. 11.
129. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN and Namboodiri AM (2007) N acetylaspartate in the CNS from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*, v. 81, p. 89-131.
130. Morris DR and Levenson CW (2012) Ion channels and zinc mechanisms of neurotoxicity and neurodegeneration. *J Toxicol*, v. 2012, p. 785647.
131. Mukherjee S and Brooks WH (2014) Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochim Biophys Acta*, v. 1843, p. 2307-14.
132. Nair SS, Prathibha P, Rejitha S and Indira M (2015) Ethanol induced hepatic mitochondrial dysfunction is attenuated by all trans retinoic acid supplementation. *Life Sci*, v. 135, p. 101-9.
133. Nakai J., Sekiguchi N., Rando T. A., Allen P. D., and Beam K. G. (1998) Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, v. 273, p. 13403-6.

134. Nakashima AS and Dyck RH (2009) Zinc and cortical plasticity. *Brain Res Rev*, v. 59, p. 347-73.
135. Namboodiri AM, Moffett JR, Arun P, Mathew R, Namboodiri S, Potti A, Hershfield J, Kirmani B, Jacobowitz DM and Madhavarao CN (2006) Defective myelin lipid synthesis as a pathogenic mechanism of Canavan disease. *Adv Exp Med Biol*, v. 576, p. 145-63; discussion 361-3.
136. Newcomer JW, Farber NB and Olney JW (2000) NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci*, v. 2, p. 219-32.
137. Nickerson Poulin A, Guerci A, El Mestikawy S and Semba K (2006) Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *J Comp Neurol*, v. 498, p. 690-711.
138. Nilbratt M, Friberg L, Mousavi M, Marutle A and Nordberg A (2007) Retinoic acid and nerve growth factor induce differential regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in SN56 cells. *J Neurosci Res*, v. 85, p. 504-14.
139. Nilbratt M, Porras O, Marutle A, Hovatta O and Nordberg A (2010) Neurotrophic factors promote cholinergic differentiation in human embryonic stem cell-derived neurons. *J Cell Mol Med*, v. 14, p. 1476-84.
140. Nimmrich V and Eckert A (2013) Calcium channel blockers and dementia. *Br J Pharmacol*, v. 169, p. 1203-10.
141. Nimmrich V and Gross G (2012) P/Q-type calcium channel modulators. *Br J Pharmacol*, v. 167, p. 741-59.
142. Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A and Tikkanen R (2013) Non neuronal functions of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Genes (Basel)*, v. 4, p. 171-97.
143. Oda Y (1999) Choline acetyltransferase the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int*, v. 49, p. 921-37.
144. Ohana E, Segal D, Palty R, Ton-That D, Moran A, Sensi SL, Weiss JH, Hershinkel M, and Sekler I (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J Biol Chem*, v. 279, p. 4278-84.
145. Pandya JD, Nukala VN and Sullivan PG (2013) Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Front Neuroenergetics*, v. 5, p. 10.
146. Panse M, Block HU, Förster W and Mest HJ (1985) An improved malondialdehyde assay for estimation of thromboxane synthase activity in washed human blood platelets. *Prostaglandins*, v. 30, p. 1031-40.
147. Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B and Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, v. 158, p. 126-36.
148. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA and Welsh KA (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*, v. 48, p. 1034-50.

149. Pessentheiner AR, Pelzmann HJ, Walenta E, Schweiger M, Groschner LN, Graier WF, Kolb D, Uno K, Miyazaki T, Nitta A, Rieder D, Prokesch A and Bogner-Strauss JG (2013) NAT8L (N-acetyltransferase 8-like) accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. *J Biol Chem*, v. 288, p. 36040-51.
150. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG and Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*, v. 56, p. 303-8.
151. Pivovarova NB, and Andrews SB (2010) Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*, v. 277, p. 3622-36.
152. Pivovarova NB, Hongpaisan J, Andrews SB and Friel DD (1999) Depolarization induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons spatial and temporal characteristics. *J Neurosci*, v. 19, p. 6372-84.
153. Pivovarova NB, Stanika RI, Kazanina G, Villanueva I and Andrews SB (2014) The interactive roles of zinc and calcium in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *J Neurochem*, v. 128, p. 592-602.
154. Plaut, GW and Aogaichi T (1968) Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase of mammalian liver. *J Biol Chem*, v. 243, p. 5572-83.
155. Pochwat B, Nowak G and Szewczyk B (2015) Relationship between Zinc and glutamate receptors in the processes underlying neurodegeneration. *Neural Plast*, v. 2015, p. 591563.
156. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S and Joyce JN (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res*, v. 5, p. 579-98.
157. Qin Y, Thomas D, Fontaine CP and Colvin RA (2008) Mechanisms of Zn²⁺ efflux in cultured cortical neurons. *J Neurochem*, v. 107, p. 1304-13.
158. Rabinovici GD and Jagust WJ (2009) Amyloid imaging in aging and dementia testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behav Neurol*, v. 21, p. 117-28.
159. Ray RS, Rai S and Katyal A (2014) Cholinergic receptor blockade by scopolamine and mecamylamine exacerbates global cerebral ischemia induced memory dysfunction in C57BL/6J mice. *Nitric Oxide*, v. 43, p. 62-73.
160. Richardson PJ (1981) Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. *J Neurochem*, v. 37, p. 258-60.
161. Rigotti DJ, Inglese M, Babb JS, Rovaris M, Benedetti B, Filippi M, Grossman RI, and Gonen O (2007a) Serial whole-brain N-acetylaspartate concentration in healthy young adults. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 28, p. 1650-1.
162. Rigotti DJ, Inglese M and Gonen O (2007b) Whole-brain N-acetylaspartate as a surrogate marker of neuronal damage in diffuse neurologic disorders. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 28, p. 1843-9.
163. Ronowska A, Dyś A, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Bielarczyk H, Romianowski P, Pawełczyk T and Szutowicz A (2010) Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *Neurochem Int*, v. 56, p. 143-51.

164. Ronowska A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Pawełczyk T and Szutowicz A (2007) Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. *J Neurochem*, v. 103, p. 972-83.
165. Ruiz A, Matute C and Alberdi E (2009) Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 46, p. 273-81.
166. Sager TN, Hansen AJ and Laursen H (2000) Correlation between N-acetylaspartate levels and histopathologic changes in cortical infarcts of mice after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 20, p. 780-8.
167. Satin LS, and Kinard TA (1998) Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas what messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit? *Endocrine*, v. 8, p. 213-23.
168. Scarpa A (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods Enzymol*, v. 56, p. 301-38.
169. Seaton G, Hogg EL, Jo J, Whitcomb DJ and Cho K (2011) Sensing change the emerging role of calcium sensors in neuronal disease. *Semin Cell Dev Biol*, v. 22, p. 530-5.
170. Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA and Choi DW (1997) Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons routes of entry. *J Neurosci*, v. 17, p. 9554-64.
171. Sensi SL, Paoletti P, Bush AI and Sekler I (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, p. 780-91.
172. Serada SKS, Veeramohan, Himadri P, Titto M, Saumya S, and Chitharanjan M (2012) Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NFkB. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 183, p. 26-34.
173. Sheline CT, Behrens MM and Choi DW (2000) Zinc-induced cortical neuronal death contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J Neurosci*, v. 20, p. 3139-46.
174. Simms BA, and Zamponi GW (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels structure, function, and dysfunction. *Neuron*, v. 82, p. 24-45.
175. Snider BJ, Choi J, Turetsky DM, Canzoniero LM, Sensi SL, Sheline CT, Wang X, Yu SP and Choi DW (2000) Nitric oxide reduces Ca²⁺ and Zn²⁺ influx through voltage gated Ca²⁺ channels and reduces Zn²⁺ neurotoxicity. *Neuroscience*, v. 100, p. 651-61.
176. Snutch TP, and Reiner PB (1992) Ca²⁺ channels diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol*, v. 2, p. 247-53.
177. Srere PA (1992) The molecular physiology of citrate. *Curr Top Cell Regul*, v. 33, p. 261-75.
178. Stathopoulos PB and Ikura M (2013) Structure and function of endoplasmic reticulum STIM calcium sensors. *Curr Top Membr*, v. 71, p. 59-93.
179. Stathopoulos PB, Schindl R, Fahrner M, Zheng L, Gasmi-Seabrook GM, Muik M, Romanin C and Ikura M (2013) STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun*, v. 4, p. 2963.

180. Stathopoulos, PB, Zheng L, Li GY, Plevin MJ and Ikura M (2008) Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell*, v. 135, p. 110-22.
181. Suen KC, Lin KF, Elyaman W, So KF, Chang RC and Hugon J (2003) Reduction of calcium release from the endoplasmic reticulum could only provide partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. *J Neurochem*, v. 87, p. 1413-26.
182. Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y and Swanson RA (2004) Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*, v. 16, p. 538-45.
183. Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, Ronowska A, Zysk M and Szutowicz A (2013) Effects of sodium metavanadate on in vitro neuroblastoma and red blood cells. *Arch Biochem Biophys*, v. 535, p. 248-56.
184. Suwalsky M, Novoa V, Villena F, Sotomayor CP, Aguilar LF, Ronowska A, and Szutowicz A (2009) Structural effects of Zn^{2+} on cell membranes and molecular models. *J Inorg Biochem*, v. 103, p. 797-804.
185. Szutowicz A and Bielarczyk H (1987) Elimination of CoA-SH interference from acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride. *Anal Biochem*, v. 164, p. 292-6.
186. Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawełczyk T and Jankowska Kulawy A (2006) Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis*, v. 21, p. 149-61.
187. Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Zieliński P, Pawełczyk T, and Tomaszewicz M (2005) Nerve growth factor and acetyl-L-carnitine evoked shifts in acetyl-CoA and cholinergic SN56 cell vulnerability to neurotoxic inputs. *J Neurosci Res*, v. 79, p. 185-92.
188. Szutowicz A, Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Pawełczyk T and Ronowska A (2013) Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, v. 38, p. 1523-42.
189. Szutowicz A, Bielarczyk H, Kisielewski Y, Jankowska A, Madziar B and Tomaszewicz M (1998a) Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria. *J Neurochem*, v. 71, p. 2447-53.
190. Szutowicz A, Bielarczyk H and Skulimowska H (1994) Effect of dichloroacetate on acetyl-CoA content and acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res*, v. 19, p. 1107-12.
191. Szutowicz A, Bielarczyk H, Sosnowska D and Ciszek B (1989) Regulation of citrate metabolism and acetylcholine synthesis by Ca^{2+} in rat brain synaptosomes. *Neurochem Int*, v. 15, p. 403-9.
192. Szutowicz A, Jankowska A, Blusztajn JK and Tomaszewicz M (1999) Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J Neurosci Res*, v. 57, p. 131-6.
193. Szutowicz A, Madziar B, Pawełczyk T, Tomaszewicz M and Bielarczyk H (2004) Effects of NGF on acetylcholine, acetyl-CoA metabolism, and viability of differentiated and non-differentiated cholinergic neuroblastoma cells. *J Neurochem*, v. 90, p. 952-61.

194. Szutowicz A, Morrison MR and Srere PA (1983) The enzymes of acetyl-CoA metabolism in differentiating cholinergic (s-20) and noncholinergic (NIE-115) neuroblastoma cells. *J Neurochem*, v. 40, p. 1664-70.
195. Szutowicz, A, Stepien M and Piec G (1981) Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal Biochem*, v. 115, p. 81-7.
196. Szutowicz A, Tomaszewicz M and Bielarczyk H (1996) Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, v. 56, p. 323-39.
197. Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H and Jankowska A (1998b) Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbances of cholinergic transmission in brain. *Dev Neurosci*, v. 20, p. 485-92.
198. Szutowicz A, Tomaszewicz M, Jankowska A, Madziar B and Bielarczyk H (2000) Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis*, v. 15, p. 29-44.
199. Takeda A (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 34, p. 137-48.
200. Takeda A (2010) Insight into glutamate excitotoxicity from synaptic zinc homeostasis. *Int J Alzheimers Dis*, v. 2011, p. 491597.
201. Takeda A, Takefuta S, Okada S and Oku N (2000) Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. *Brain Res*, v. 859, p. 352-7.
202. Tallan H. H, Moore S and Stein WH (1956) N-acetyl-L-aspartic acid in brain. *J Biol Chem*, v. 219, p. 257-64.
203. Tanaka Y, Obata T, Sassa T, Yoshitome E, Asai Y, Ikehira H, Suhara T, Okubo Y and Nishikawa T (2006) Quantitative magnetic resonance spectroscopy of schizophrenia relationship between decreased N-acetylaspartate and frontal lobe dysfunction. *Psychiatry Clin Neurosci*, v. 60, p. 365-72.
204. Tranberg M, Stridh MH, Guy Y, Jilderos B, Wigström H, Weber SG and Sandberg M (2004) NMDA-receptor mediated efflux of N-acetylaspartate physiological and/or pathological importance? *Neurochem Int*, v. 45, p. 1195-204.
205. Tranberg M, Stridh MH, Jilderos B, Weber SG and Sandberg M (2005) Reversed phase HPLC with UV detection for the determination of N-acetylaspartate and creatine. *Anal Biochem*, v. 343, p. 179-82.
206. Tucek S (1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J Neurochem*, v. 44, p. 11-24.
207. Tucek S (1993), Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog Biophys Mol Biol*, v. 60, p. 59-69.
208. Tucek S and Cheng SC (1970) Precursors of acetyl groups in acetylcholine in the brain in vivo. *Biochim Biophys Acta*, v. 208, p. 538-40.
209. Watanabe T, Shiino A and Akiguchi I (2012) Hippocampal metabolites and memory performances in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*, v. 97, p. 289-93.

210. Weber JT (2012) Altered calcium signaling following traumatic brain injury. *Front Pharmacol*, v. 3, p. 60.
211. Wiame E, Tyteca D, Pierrot N, Collard F, Amyere M, Noel G, Desmedt J, Nassogne MC, Vikkula M, Octave JN, Vincent MF, Courtoy PJ, Boltshauser E and van Schaftingen E (2010) Molecular identification of aspartate N-acetyltransferase and its mutation in hypacetylaspartia. *Biochem J*, v. 425, p. 127-36.
212. Williams S, Serafin M, Mühlethaler M and Bernheim L (1997) Distinct contributions of high- and low-voltage-activated calcium currents to afterhyperpolarizations in cholinergic nucleus basalis neurons of the guinea pig. *J Neurosci*, v. 17, p. 7307-15.
213. World Health Organization., and Alzheimer's Disease International. (2012) Dementia a public health priority, Geneva London, World Health Organization; *Alzheimer's Disease International*, p. 1-112, online resource (updated: 18.01.2016)
214. Wright JA, Maeba P and Sanwal BD (1967), Allosteric regulation of the activity of citrate synthetase of *Escherichia coli* by alpha-ketoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 29, p. 34-8.
215. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT and Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 14670-5.
216. Zaroff S, Leone P, Markov V and Francis JS (2015) Transcriptional regulation of N acetylaspartate metabolism in the 5xFAD model of Alzheimer's disease Evidence for neuron-glia communication during energetic crisis. *Mol Cell Neurosci*, v. 65, p. 143-52.
217. Zatta P, Lucchini R, van Rensburg SJ and Taylor A (2003) The role of metals in neurodegenerative processes aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull*, v. 62, p. 15-28.