

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU**

**Katedra Biochemii Klinicznej  
Zakład Medycyny Laboratoryjnej**

**Hanna Bielarczyk**

**METABOLIZM ACETYLO-CoA W KOMÓRKACH  
CHOLINERGICZNYCH A ICH WRAŻLIWOŚĆ NA  
CZYNNIKI NEUROTOKSYCZNE**

**Rozprawa habilitacyjna**

**GDAŃSK 2006**

Praca została wykonana w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedry Biochemii  
Klinicznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik Katedry: **Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz**

Panu Profesorowi Andrzejowi Szutowiczowi,  
za wkład w mój rozwój edukacyjny,  
zainteresowanie przedmiotem badań,  
okazaną życzliwość w trakcie realizacji projektu,  
wszechstronną pomoc w rozwiązywaniu problemów,  
konstruktywną dyskusję nad wynikami badań  
oraz pomoc w redagowaniu prac i codzienną  
życzliwość  
bardzo serdecznie dziękuję

*Hanna Bielarczyk*

**WYKAZ PRAC DOŚWIADCZALNYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM**

<b>ROZPRAWYHABILITACYJNEJ</b> .....	4
1. WSTĘP .....	5
1.1 Neurony cholinergiczne mózgu .....	5
1.2 Regulacja ekspresji fenotypu cholinergicznego i metabolizmu ACh w neuronach cholinergicznym .....	5
1.2.1. Metabolizm choliny w neuronach cholinergicznym .....	9
1.2.2. Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym .....	9
1.3. Neurony cholinergiczne w doświadczalnych modelach encefalopatii .....	11
2. CEL BADAŃ .....	13
3. WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA .....	14
3.1. Neurotoksyczność glinu .....	14
3.1.1. Cytotoksyczne działanie glinu pozakomórkowego .....	15
3.1.2. Wpływ glinu wewnątrzkomórkowego na metabolizm acetylo-CoA .....	17
3.2. Znaczenie puli synaptoplazmatycznej acetylo-CoA dla funkcji neuronów cholinergicznym .....	19
3.3. Zależna od fenotypu wrażliwość neuronów cholinergicznym na bodźce neurodegeneracyjne .....	21
3.3.1. Wpływ glinu, amyloidu- $\beta$ i NO na metabolizm ACh, acetylo-CoA i żywotność cholinergicznym komórek neuroblastom SN56 .....	22
3.3.2. Ekspresja ChAT a cytotoksyczność cholinergiczna .....	24
3.3.3. Rola czynnika wzrostu nerwów (NGF) w zróżnicowanej wrażliwości neuronów cholinergicznym na bodźce neurodegeneracyjne .....	25
3.3.4. Wpływ acetylo-L-karnityny na komórki cholinergiczne .....	28
3.3.5. Interleukina-1 $\beta$ a cytotoksyczność amyloidu- $\beta$ .....	29
4. PODSUMOWANIE .....	31
5. PIŚMIENNICTWO .....	32

**WYKAZ PRAC DOŚWIADCZALNYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM  
ROZPRAWY HABILITACYJNEJ:**

1. **Bielarczyk H.**, Tomaszewicz M., Szutowicz A.: Effect of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J. Neurochem.* 70, 1175-1181, 1998. **(IF 4.604, KBN 16)**
2. Szutowicz A., **Bielarczyk H.**, Kisielewski Y., Jankowska A., Madziar B. and Tomaszewicz M.: Effect of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 71, 2447-2453, 1998a. **(IF 4,604, KBN 16)**
3. Szutowicz A., Tomaszewicz M., **Bielarczyk H.**, Jankowska A.: Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbances of cholinergic transmission in rat brain. *Dev. Neurosci.* 20, 485-492, 1998b. **(IF 1,616, KBN 10)**
4. **Bielarczyk H.**, Jankowska A., Madziar B., Matecki A., Michno A., Szutowicz A.: Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid  $\beta$ -peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem. Int.* 42, 1-9, 2003a. **(IF 2,994, KBN 12)**
5. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Jankowska A., Madziar B., **Bielarczyk H.**: Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. *Met. Brain Dis.* 15, 29-44, 2000. **(IF 1,721, KBN 10)**
6. **Bielarczyk H.**, Tomaszewicz M., Madziar B., Ćwikowska J., Pawełczyk T., Szutowicz A.: Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J. Neurosci. Res.* 73; 717-721, 2003b. **(IF 3.239, KBN 13)**
7. Madziar B., Tomaszewicz M., Matecki A., **Bielarczyk H.**, Szutowicz A.: Interactions between p75 and TrkA receptors in differentiation and vulnerability of SN56 cholinergic cells to beta-amyloid. *Neurochemical Res.* 28, 461-465, 2003. **(IF 2,187, KBN 11)**
8. Szutowicz A., Madziar B., Pawełczyk T., Tomaszewicz M. and **Bielarczyk H.**: Effects of NGF on acetylcholine, acetyl-CoA metabolism, and viability of differentiated and non-differentiated cholinergic neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 90, 952-961, 2004. **(IF 4.604, KBN 16)**
9. Szutowicz A., **Bielarczyk H.**, Gul S., Zieliński P., Pawełczyk T., and Tomaszewicz M.: Nerve growth factor and acetyl-L-carnitine evoked shifts in acetyl-CoA and cholinergic SN56 cell vulnerability to neurotoxic inputs. *J. Neurosci. Res.* 79, 185-192, 2005. **(IF 3.239, MEN 24)**
10. **Bielarczyk H.**, Jankowska-Kulawy A., Gul S., Pawełczyk T., Szutowicz A.: Phenotype dependent differential effects of interleukin- $1\beta$  and amyloid- $\beta$  on viability and cholinergic phenotype of T17 neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 47, 466-473, 2005. **(IF 2,994, MEN 20)**

**IF: 31.802, KBN/MEiN: 146**

## **1. Wstęp**

### **1.1. Neurony cholinergiczne mózgu**

Neurony cholinergiczne stanowią 5-10% całkowitej populacji komórek nerwowych mózgu. Charakterystyczną cechą neuronów cholinergicznych jest ich zdolność do syntezy acetylocholiny (ACh). Jej kwantowe uwalnianie z presynaptycznych zakończeń nerwowych stanowi podstawę neuroprzekąźnictwa cholinergicznego (Dowdall 1976, Fonnum 1975). Ponadto, neurony cholinergiczne wykazują obecność markerów cholinergicznych stanowiących strukturalną podstawę ich funkcji. Podstawowym markerem cholinergicznym jest acetylotransferaza cholinowa (O-acetylotransferaza acetylo-CoA cholina, ChAT, EC 2.3.1.6), enzymem katalizujący reakcję syntezy ACh. Układem dostarczającym cholinę do miejsca syntezy ACh jest transporter o wysokim do niej powinowactwie występujący wyłącznie w neuronach cholinergicznych. Trzecim markerem jest transporter pęcherzykowy ACh (VACHT) zapewniający akumulację tego przekąźnika w pęcherzykach synaptycznych, co następnie umożliwia jej kwantowe wydzielanie (Sorter i Parikh 2005, Szutowicz i wsp. 1997, Tucek 1993). Zastosowanie metod immunohistochemicznych z wykorzystaniem przeciwciał anti-ChAT oraz techniki hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na wykrycie i lokalizację ośrodków cholinergicznych w mózgu zwierząt i człowieka. Komórki cholinergiczne są zgrupowane w kilku ośrodkach centralnego układu nerwowego znajdujących się głównie w podstawie przodomózgowia oraz na pograniczu nakrywki konarów i mostu (Mesulam 1995). Przewodnictwo cholinergiczne odgrywa bardzo ważną rolę w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Neurony cholinergiczne są odpowiedzialne za formowanie pamięci krótko- i długoterminowej, funkcji kojarzeniowych a także uczestniczą w odbiorze i analizie różnego rodzaju bodźców.

Precyzyjna krótko- i długoczasowa modyfikacja wydzielania i syntezy acetylocholiny, transportu i syntezy choliny, syntezy i transportu acetylo-CoA do przedziału synaptoplazmatycznego zapewniają adekwatne do potrzeb neuroprzekąźnictwo cholinergiczne.

### **1.2. Regulacja ekspresji fenotypu cholinergicznego i metabolizmu ACh w neuronach cholinergicznym**

ACh jest syntetyzowana w reakcji katalizowanej przez ChAT, której stała równowagi równa 14 wskazuje na przesunięcie jej w kierunku syntezy tego

neuroprzekaźnika. Wydzielanie ACh powoduje zaburzenie stanu równowagi i natychmiastową syntezę neuroprzekaźnika. Dzięki temu zawartość ACh w neuronach cholinergicznym jest utrzymywana na stałym poziomie nawet przy wysokiej ich aktywności. Wielkość puli ACh w neuronach cholinergicznym pozostaje w dodatniej korelacji z zawartością ChAT i VAcHT. Mechanizm tej zależności pozostaje jednak niewyjaśniony. Niemniej zakłada się, że parametry te odzwierciedlają stopień zróżnicowania neuronu cholinergicznego oraz jego wydolności neuroprzekaźniczej. Ekspresja ChAT i VAcHT zależy od aktywności locus cholinergicznego zawierającego geny kodujące sekwencję obydwóch białek i pozostające pod kontrolą tego(ych) samego(ych) promotora(ów). Promotor ten zawiera sekwencje CRE (cyclic AMP response element) i RAR (retinoic acid receptor) podlegające aktywacji przez CREB (CRE binding protein) i kwas all-trans retinowy (RA). I tak, wiadomo, że cAMP i RA zwiększały zarówno aktywności jak i poziom białka ChAT i VAcHT, ekspresję mRNA tych markerów jak również morfologiczne zróżnicowanie neuronów cholinergicznym (Berse i Blusztajn 1997, Blusztajn i wsp. 1987, Eberwine 1998). Z kolei galanina i angiotensyna obniżały aktywność i poziom ChAT, co wiązało się z zahamowaniem funkcji neuronów cholinergicznym (Bartfai i wsp. 1991, Fisone i wsp. 1987, Micossi i wsp. 1992). Również czynnik wzrostu nerwów (NGF) poprzez receptory TrkA zwiększał ekspresję fenotypu cholinergicznego (Auld i wsp. 2000, Hefti i wsp. 1985, Oosawa i wsp. 1999, Pongrac i Rylett 1998, Ruberti i wsp. 2000, Takei i wsp. 1997) oraz ułatwiał regenerację uprzednio uszkodzonych neuronów cholinergicznym (Dawson i Dawson 1996, Holtzman i wsp. 1996, Klain i wsp. 2000, Shimode i wsp. 2003). Drogi przenoszące te troficzne sygnały obejmują zależną od autofosforylacji domenę cytoplazmatyczną receptora TrkA, która aktywuje drogi Shc-Sos-Ras- MEK-MAPK oraz Sec-Grb2-Sos-Ras-PI-3K. Z drugiej strony galanina lub aktywacja receptora p75 przez NGF lub inne neurotrofiny wywierają supresyjne działanie na neurony cholinergiczne. Wykazano, że brak genu p75 u myszy powodował wzrost wielkości i ilości neuronów cholinergicznym podstawy przodomózgowia z jednoczesnym wzrostem aktywności ChAT w regionach tej części mózgu (Greferath i wsp. 2000, Naumann i wsp. 2002, Ward i Hagg 1999, Yeo 1997). Z kolei nadekspresja tego genu obniżała gęstość neuronów cholinergicznym w przegrodzie, korze mózgowej oraz jądrze podstawnym Meynerta mózgu myszy i zwiększała ich podatność na neurodegenerację (Bhakar i wsp. 2003, Oh. i wsp. 2000). Stopień ekspresji fenotypu cholinergicznego ma niewątpliwy wpływ na sprawność funkcjonalną neuronów cholinergicznym. I tak wzrostowi ekspresji ChAT/VAcHT

pod wpływem różnych bodźców/sygnali fizjologicznych takich jak NGF, acetylo-L-karnityna towarzyszyło polepszenie zależnych od niego funkcji poznawczych i pamięciowych u zwierząt doświadczalnych. Wykazano między innymi, że wymuszony trening pamięciowy zwiększał ekspresję markerów cholinergicznym w mózgu myszy. Podobne działanie wywierał NGF. Również u ludzi z chorobą Alzheimera pośrednie lub bezpośrednie pobudzenie układu cholinergicznego przez inhibitory acetylocholinesterazy polepszało przejściowo funkcje pamięciowe i poznawcze. Pobudzenie presynaptycznych receptorów nikotynowych może również dodatnio wpływać na przekaźnictwo cholinergiczne poprzez stymulację wydzielania i syntezy ACh. Z oczywistych względów nie można jednak stwierdzić czy u człowieka zmiany te wiążą się ze zwiększeniem ekspresji mRNA i poziomu białek odpowiedzialnych za funkcje neuroprzekaźnicze. Takie zmiany fenotypowe stwierdzano natomiast u zwierząt doświadczalnych.

Zmianom fenotypu cholinergicznego towarzyszą istotne zmiany zużycia acetylo-CoA do syntezy ACh. Zróżnicowane wydzielanie i synteza ACh towarzyszące tym zmianom fenotypu są stosunkowo dobrze opisane. Jednakże dane dotyczące zmian metabolizmu acetylo-CoA w tych sytuacjach były przedmiotem zainteresowania stosunkowo niewielkiej ilości badaczy (Gibson i wsp. 2000, Szutowicz i wsp. 1994, Szutowicz 2001).

Wynikać to może z faktu, że w badaniach na całym mózgu trudno jest oddzielić „cholinergiczną” pulę acetylo-CoA od puli „niecholinergicznej”. Wzrost ekspresji fenotypu cholinergicznego u zwierząt dorosłych niewątpliwie zwiększa zużycie acetylo-CoA do syntezy neuroprzekaźnika. Z drugiej strony nie wiadomo czy zmianom tym nie towarzyszą jakiegokolwiek zmiany przystosowujące neurony do zwiększonego zużycia acetylo-CoA. Można, więc założyć, że wysoce zróżnicowane sprawnie funkcjonujące neurony cholinergiczne będą miały mniejsze rezerwy acetylo-CoA do produkcji energii. Natomiast nisko zróżnicowane neurony będą znajdować się w dużo lepszej kondycji, jeśli chodzi o zabezpieczenie ich funkcji życiowych. Można mówić tu o zjawisku większej zdolności przeżycia kosztem niższego poziomu funkcji neuroprzekaźniczej. Podobne funkcje ochronne spełniają leki uspokajające, które zmniejszają wydzielanie ACh, np. poprzez aktywację neuronów GABA-ergicznym lub obniżenie szybkości metabolizmu energetycznego (Jones 2004).



### **1.2.1. Metabolizm choliny w neuronach cholinergicznym**

Istotnym czynnikiem determinującym integralność funkcjonalną i strukturalną neuronów cholinergicznym jest dostępność choliny. Cholina transportowana przez układ o dużej pojemności i niskim powinowactwie jest zużywana głównie do syntezy fosfolipidów strukturalnym. Natomiast do syntezy ACh zużywana jest cholina transportowana przez specyficzny dla neuronów cholinergicznym układ transportowy o wysokim do niej powinowactwie (SDHACU). Wykazano współzależność między wydolnością transporterów choliny o wysokim powinowactwie a sprawnością funkcji przekaźniczej u zwierząt doświadczalnym (Sarter i Parikh 2005). Największa gęstość tego układu znajduje się na błonach plazmatycznym cholinergicznym zakończeń nerwowych (Happe i wsp. 1992, Manager i wsp. 1986, Sorimahi i wsp. 1985, Vicroy i wsp. 1984). Transport ten wymaga obecności jonów sodowych i jest napędzany potencjałem błonowym (Atweh i wsp. 1975, Breer i Knipper 1985, Sandberg i wsp. 1985). Dlatego też depolaryzacja neuronów powoduje zahamowanie tego transportu. Przedłużająca się depolaryzacja spotykana w różnych stanach patologicznym (niedotlenienie, pobudzenie ekscytotoksyczne) powoduje zahamowanie syntezy ACh wskutek niedoboru tego substratu. Co więcej, aktywacja fosfolipaz przez napływające do komórki jony Ca powoduje hydrolizę fosfolipidów błonowych i ewentualną syntezę ACh kosztem zniszczenia struktury błony komórkowej. Wurtman nazwał to zjawiskiem "autokanibalizmu neuronów cholinergicznym" (Wurtman, 1992). Uważa się, że może to być jedna z przyczyn szczególnej wrażliwości neuronów cholinergicznym na neurodegenerację (Blusztajn i Wurtman 1987).

### **1.2.2. Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym**

Głównym substratem energetycznym dla ośrodkowego układu nerwowego u osobników dorosłych w warunkach fizjologicznym jest glukoza. Około 90% glukozy wychwytywanej przez tkankę mózgową ulega w cytoplazmie glikolitycznej przemianie do pirogronianu, który po przetransportowaniu do mitochondriów jest metabolizowany do acetylo-CoA w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę pirogronianową (oksydoreduktaza pirogronian: liponian acetylująca akceptor, PDH EC 1.2.4.1.) (Browing i Shulman 1968). Około 99% powstałego acetylo-CoA jest wykorzystywane do produkcji energii w cyklu kwasów trójkarboksylowym. Natomiast pozostała ilość jest zużywana do syntezy kwasów tłuszczowym i lipidów a

w neuronach cholinergicznym dodatkowo do syntezy ACh. Szacuje się, że w stanach aktywacji tych neuronów synteza ACh może zużywać kilka procent puli acetylo-CoA.

Nasze badania *in vitro* wykazały, że zakończenia nerwowe mogą równie efektywnie wykorzystywać zarówno pirogronian jak i glukozę do produkcji energii i syntezy ACh (Szutowicz i Bielarczyk 1991). Również badania *in vivo* innych autorów wskazują, że w stanach niedotlenienia czy/i hipoksji wytwarzane przez komórki glejowe mleczan i pirogronian mogą być substratami energetycznymi dla neuronów (Izumi i wsp. 1997, Schurr i wsp. 1997). Dlatego inhibicja/degradacja PDH przez niedotlenienie, stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w uszkodzaniu neuronów (Martin i wsp. 2005).

Powstający w mitochondriach, w reakcji utlenienia pirogronianu, acetylo-CoA jest źródłem reszt acetylowych do syntezy ACh. O istotnej roli mitochondrialnej syntezy acetylo-CoA dla metabolizmu cholinergicznego świadczy fakt, że inhibicja PDH przez amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ), tlenek azotu (NO) hamowała syntezę ACh (Hoshi i wsp. 1997). Synteza ACh odbywa się jednak w cytoplazmie zakończeń nerwowych. Dlatego też, acetylo-CoA musi być przetransportowany przez błonę mitochondrialną do cytoplazmy, aby mógł zostać zużyty do syntezy tego neuroprzekaźnika. Błony mitochondrialne komórek wątroby, mięśni, tkanki tłuszczowej jak również mózgu są względnie nieprzepuszczalne dla CoA i jego acetylowych pochodnych (Lowenstein 1968, Srere 1965, Szutowicz i wsp. 1998). Dlatego też, reszty acetylowe są transportowane do cytoplazmy za pomocą metabolitów pośrednich transportowanych przez błonę mitochondrialną, dla których w cytoplazmie istnieją enzymy pozwalające odtworzyć z nich acetylo-CoA. Wykazano istnienie kilku równoległych dróg transportu acetylo-CoA przez błonę mitochondrialną. Jedną z nich jest droga za pośrednictwem cytrynianu. W mitochondriach acetylo-CoA jest metabolizowany do cytrynianu, który na drodze wymiany z L-jabłczanem jest transportowany do cytoplazmy. W cytoplazmie w reakcji katalizowanej przez liazę ATP-cytrynianową (szczawiooctano-liaza ATP: cytrynian, ACL, EC 2.3.3.8) z cytrynianu odtwarza się acetylo-CoA (Szutowicz i wsp. 1977, 1981, 1994). Czynnikiem ułatwiającym ten transport do miejsca syntezy ACh byłaby preferencyjna lokalizacja ACL w cholinergicznym zakończeniach nerwowych (Szutowicz 1978, Szutowicz i wsp. 1980, 1982, 1983). Według naszej oceny aktywność ACL w zakończeniach cholinergicznym jest około 10 razy wyższa niż w niecholinergicznym (Szutowicz 1978). O istotnej roli cytrynianu w syntezie ACh świadczy jej hamowanie przez (-)hydroksycytrynian, specyficzny inhibitor ACL. Na tej podstawie ocenia się, że około

30% reszt acetylowych do syntezy ACh w mózgu jest dostarczane poprzez tą drogę metaboliczną (Bielarczyk i Szutowicz 1989).

Do innych metabolitów pośrednich, transportujących reszty acetylowe do cytoplazmy należą acetylo-L-karnityna i octan (Carroll 1997, Ricny i wsp. 1992, Tucek 1993, Szutowicz i wsp. 1994). Nasze badania wykazały, że w zdepolaryzowanych zakończeniach nerwowych możliwy jest również bezpośredni transport acetylo-CoA przez błonę mitochondrialną za pośrednictwem wrażliwych na wapń kanałów hydrofilowych, zlokalizowanych w wewnętrznych błonach mitochondrialnych (Bielarczyk i Szutowicz 1989). Odpowiadają one prawdopodobnie za powstawanie tzw. „permeability transition pores” aktywowanych przez Ca i hamowanych przez cyklosporynę A (Kristian i wsp. 2000).

O istotnej roli metabolizmu reszty acetylowej w utrzymaniu integralności neuronów cholinergicznym świadczy również fakt, że w chorobie Alzheimera spadkowi ilości neuronów cholinergicznym w dotkniętych zmianami regionach mózgu towarzyszył proporcjonalny spadek aktywności dehydrogenazy pirogronianowej i liazy ATP-cytrynianowej (Kalaria i wsp. 1989, Perry i wsp. 1980, Sheu i wsp. 1985). Natomiast w tych samych warunkach neurony innych układów neuroprzekąźnikowych (neurony glutaminianergiczne, GABA-ergiczne) zachowywały integralność czynnościową i strukturalną (Gsell i wsp. 1996).

*Pozostaje to w zgodzie z naszą hipotezą, że szczególna podatność neuronów cholinergicznym na neurodegenerację może wynikać z faktu, że acetylo-CoA jest w nich zużywany nie tylko do produkcji energii i syntezy lipidów strukturalnym, ale również do syntezy ACh.*

### **1.3. Neurony cholinergiczne w doświadczalnych modelach encefalopatii**

Badania kliniczne i obrazowe (MRI) z użyciem znakowanych pochodnym glukozy wykazują, że w chorobie Alzheimera uszkodzeniu ulegają w pierwszej kolejności neurony cholinergiczne przegrody mózgu, podczas gdy neurony wewnętrzne prążkowiec pozostają nietknięte (Auld i wsp. 2002, Kasa i wsp. 1997). Szereg modeli doświadczalnych neurotoksyczności dostarcza podobnym obserwacji. Wykazano, że systemowe podawanie glinu powodowało spadek aktywności i ekspresji ChAT i HACU w hipokampie i w przegrodzie mózgu szczura (Julka i wsp. 1995). Amyloid- $\beta$  zwiększał śmiertelność komórek RN46A pochodzących z jądra szwu po ich transformacji do fenotypu cholinergicznym przez CNTF (ciliary

neurotrophic factor). Nie zmieniał on natomiast żywotności tych samych neuronów po transformacji do fenotypu serotonergicznego przez BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Olesen i wsp. 1998).

Niedotlenienie mózgu, często występujące u osób starszych, może być jedną z istotnych przyczyn rozwoju neurodegeneracji. Powoduje ono pobudzenie dominującego w mózgu układu neuronów glutaminianergicznych. Zwiększone wydzielanie L-glutaminianu w połączeniu z upośledzeniem jego transportu zwrotnego, przez niedotlenione astrocyty powoduje nadmierne pobudzenie receptorów NMDA (N-metylo-D-asparaginian) na również depolaryzowanych neuronach cholinergicznym (Hind i wsp. 2004). W wyniku takiego działania dochodzi do pobudzenia ekscytotoksycznego, zwiększonego napływu Ca, który powodowałby dalsze przedłużenie depolaryzacji i wydzielania ACh (Kato i wsp. 2005, Obrenovich i wsp. 2000). Jednoczesna aktywacja przez Ca neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS) we wszystkich komórkach, prowadziłaby do większej produkcji NO (Dawson, Dawson 1996). Powoduje to uszkodzenie szeregu enzymów związanych z produkcją energii oraz zabezpieczeniem integralności błon komórkowych takich jak akonitaza, dehydrogenaza pirogronianowa (PDH) lub enzymy łańcucha oddechowego. Uszkodzenie komórek stymuluje amyloidogenną proteolizę białka prekursorowego amyloidu- $\beta$  (APP) zwiększając nagromadzenie się amyloidu- $\beta$  w niedotlenionym mózgu. W neuronach cholinergicznym nadmierne wydzielanie ACh uruchamiałoby zwiększoną resyntezę jej wewnątrzkomórkowej puli przy zahamowaniu oksydacyjnej przemiany pirogronianu (Bielarczyk i wsp. 1998).

Również i w przypadku NO jego toksyczność w stosunku do neuronów cholinergicznym zależała od ich fenotypu. Badania wpływu NO na pierwotne hodowle neuronów z różnych regionów mózgu wykazały, że neurony cholinergiczne pnia mózgu są znacznie odporniejsze na działanie S-nitrozo-N-acetyloopenicylaminy (SNAP) niż neurony przegrody mózgu (Fass i wsp. 2000). Podobnie zróżnicowane neuroblastoma SN56 wykazywały w takich warunkach większą fragmentację DNA (TUNEL) i uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) niż komórki niezróżnicowane (Personett i wsp. 2000).

***Dane te wskazują, że stopień zużycia prekursorów ACh przez neurony cholinergiczne może być jednym z istotnych czynników determinujących ich podatność na neurodegenerację.***

## 2. CEL BADAŃ

Celem badań, których wyniki opublikowano w pracach stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej było wykazanie, że:

- ↪ zróżnicowanie fenotypowe wpływa na podatność neuronów cholinergicznyc<sup>h</sup> na bodźce neurodegeneracyjne,
- ↪ dostępność acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym spełnia istotną rolę w zróżnicowanej podatności neuronów cholinergicznyc<sup>h</sup> na bodźce neurodegeneracyjne,
- ↪ poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA reguluje metabolizm ACh.

### 3. WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

#### 3.1. Neurotoksyczność glinu

Glin jest trzecim, co do zawartości składnikiem skorupy ziemskiej. Organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów zabezpieczających przed jego nadmierną absorpcją z przewodu pokarmowego. Niemniej, aniony tworzące z Al rozpuszczalne kompleksy, takie jak cytrynian lub witamina C, powszechnie używane w napojach chłodzących, wielokrotnie zwiększają wchłanianie glinu z jelit. Glin tworzy wolno dysocjujące kompleksy drobnocząsteczkowe z anionami PPK w postaci, których jest niemal w całości wydalany przez nerki. Jednakże, z wiekiem następuje stopniowe zwiększenie poziomu Al w tkankach, w tym również i w mózgu (Meiri i wsp, 1993, Szutowicz 2001).

U pacjentów z niewydolnością nerek upośledzenie wydalania Al z moczem powodowało znaczne zwiększenie poziomu tego kationu w osoczu krwi i tkankach, do stężeń rzędu 0.1-1.0 mM. Sprzyjało temu przyjmowanie przez tą grupę chorych leków antycydów zawierających glin, jak również dializy płynem zawierającym zbyt wysokie stężenia Al (Starkey 1987). Akumulacja Al w mózgu dializowanych pacjentów prowadziła do encefalopatii, w których jednym z głównych uszkodzeń była degeneracja neuronów cholinergicznym z otępieniem, stanami drgawkowymi i śpiączkowymi.

Również w chorobie Alzheimera wykazywano gromadzenie się glinu w obrębie płytek amyloidowych i ognisk neurodegeneracji w stężeniach przekraczających kilkakrotnie poziomy kationu w odpowiednich wiekowo mózgu osób zdrowych (Good i wsp. 1992, Mantyh i wsp. 1993). Wydaje się jednak, że akumulacja glinu jest w tych przypadkach następstwem a nie przyczyną zmian neurodegeneracyjnych. Do mózgu glin jest transportowany w postaci kompleksów z transferyną (Roskams i Connor 1990). Zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg w chorobie Alzheimera (AD) oraz kompleksowanie Al z amyloidem- $\beta$  proces ten przyspiesza. Jednakże, nawet wtórnie zakumulowany w przestrzeni pozakomórkowej glin może wywierać swoje działanie cytotoksyczne nasilając agregację amyloidu- $\beta$  (House i wsp. 2004, Kawahara i wsp. 2001, Mantyh i wsp. 1993, Ricchelli i wsp. 2005) i interferując z transportem Ca i Fe do wnętrza komórek (Abreo i wsp. 1999, Busselberg i wsp. 1993, Gandolfi i wsp. 1998, Oshiro i wsp. 1998).

Zewnątrzkomórkowy glin jako kompetytywny inhibitor kanałów wapniowych bramkowanych napięciem może zaburzać kwantowe wydzielanie acetylocholiny. Natomiast toksyczne działanie wewnątrzkomórkowego glinu może być wynikiem wypierania wapnia i żelaza z kompleksów z białkami i anionami drobnocząstkowymi (Mantyh i wsp. 1993). Z kolei wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  może inicjować proces apoptozy czy też stres oksydacyjny. Ponadto, wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia może z jednej strony hamować syntezę acetylo-CoA, z drugiej zwiększać jego transport do cytoplazmy (Bielarczyk i Szutowicz 1989). Dane te pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że glin poprzez interferencję z procesami transportu reszt acetylowych przez błony mitochondriów może wpływać na syntezę i wydzielanie ACh.

*Jednakże wzajemne zależności między dystrybucją acetylo-CoA w zakończeniach nerwowych a metabolizmem ACh nie były przedmiotem badań przed podjęciem przez nas tego tematu.*

### **3.1.1. Cytotoksyczne działanie glinu pozakomórkowego**

Celem pracy **nr 1 (Bielarczyk i wsp. 1998)** było sprawdzenie czy toksyczne działanie glinu na neurony cholinergiczne może być spowodowane zmianami metabolizmu i dystrybucji wewnątrzsynaptosomalnej puli acetylo-CoA. Zakończenia nerwowe badano w warunkach depolaryzacji (30 mM KCl), co zapewniało ciągłe wydzielanie a co za tym idzie i syntezę ACh. Użycie środowisk niezawierających i zawierających 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  pozwoliło zbadać zarówno spontaniczne jak i kwantowe wydzielanie ACh. W celu izolacji mitochondriów synaptosomalnych błony plazmatyczne synaptosomów rozpuszczano digitoniną (Bielarczyk i Szutowicz 1989, Janski i wsp. 1980). Mitochondria oddzielano od cytoplazmy za pomocą wirowania przez mieszaninę olei silikonowych. Umożliwiło to ocenę dystrybucji acetylo-CoA w obu podstawowych przedziałach zakończeń nerwowych w warunkach symulujących stany fizjologiczne i patologiczne. Dzięki temu możliwa była obserwacja puli mitochondrialnej acetylo-CoA używanej do produkcji energii w cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz cytoplazmatycznej używanej do syntezy ACh.

Wykazano, że Al hamuje zużycie pirogronianu prawdopodobnie wskutek zwiększenia akumulacji Ca w mitochondriach. Mogło to być spowodowane inhibicją wymiennika Na/Ca, ponieważ dodanie Ca do środowiska hamowało utlenianie pirogronianu i znosiło inhibicyjny wpływ Al na ten proces (**Bielarczyk i wsp. 1998**,

**Szutowicz i wsp. 1998a**). Jednakże ku mojemu zaskoczeniu Al zwiększał poziom acetylo-CoA w mitochondriach synaptosomalnych. Wynikało to z zahamowania przez Al transportu acetylo-CoA przez błonę mitochondrialną. Świadczyło o tym jednoczesne obniżenie zawartości acetylo-CoA w synaptoplazmie (**Bielarczyk i wsp. 1998**). Następowало to prawdopodobnie wskutek inhibicji przez Al napływu zewnątrzkomórkowego Ca do wnętrza zakończeń nerwowych wskutek inhibicji bramkowanych napięciem, kanałów wapniowych w błonach plazmatycznych, wrażliwych na werapamil i nifedypinę (Carvalho i wsp. 1986, Saydoff i Zaczek 1996). Spadek cytoplazmatycznego Ca hamowałby z kolei transport acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy przez kanały jonowe o wysokiej przewodności.

Wpływ glinu na wydzielanie i syntezę ACh okazał się być wypadkową jego działania na transport acetylo-CoA do cytoplazmy oraz na proces wydzielania tego neuroprzekaźnika na poziomie błony plazmatycznej. Z jednej strony Al aktywował niezależny od Ca proces niekwantowego wydzielania ACh, z drugiej zaś silnie hamował kwantowe wydzielanie tego neuroprzekaźnika (**Bielarczyk i wsp. 1998**).

*Tak, więc doświadczenia te wykazały po raz pierwszy, że szybkość syntezy ACh zależy od poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie zakończeń nerwowych. Supresyjne działanie zewnątrzkomórkowego Al na te parametry tłumaczyłoby istnienie ubytków przewodnictwa cholinergicznego w encefalopatiach glinowych.*

Wykazano również istnienie kompetycji między inhibicyjnym działaniem werapamilu i Al na wydzielanie ACh i zawartość acetylo-CoA w cytoplazmie synaptosomów. Al jako słabszy inhibitor kanałów Ca odwracał częściowo silniejsze działanie werapamilu (**Bielarczyk i wsp. 1998**). Wskazuje to, że Al wiąże się z tym samym co werapamil miejscem kanałów wapniowych w błonach plazmatycznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że użyte w pracy stężenia Al odpowiadały jego poziomowi stwierdzanemu w mózgach chorych z encefalopatią dializacyjną i AD (Meiri i wsp. 1993). Należy pamiętać, że Al w przestrzeni pozakomórkowej (PPK) i wewnątrzkomórkowej (PWK) istnieje niemal wyłącznie w postaci kompleksów z białkami i anionami drobnocząsteczkowymi. Poziom wolnych jonów  $Al^{3+}$  jest rzędu  $10^{-12}$  mola/l. Powstaje, więc pytanie, który z kompleksów Al w PPK może wykazywać swoje działanie patogenne.

Wykazano po raz pierwszy, że działanie inhibicyjne Al znikало w środowisku niezawierającym fosforanu. W związku z tym należy sądzić, że aktywną formą Al w



PPK mózgu jest kompleks anionowy  $\text{Al}(\text{PO}_4)(\text{OH})^-$ , który stanowi 90% zewnątrzkomórkowych kompleksów glinu *in vivo* (Bielarczyk i wsp. 1998).

*Podstawowym osiągnięciem tej pracy było wykazanie po raz pierwszy, że inhibicja kwantowego wydzielania ACh przez Al jest ściśle związana z jednoczesnym ograniczeniem dostępności acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym. W ten sposób nadmierna akumulacja Al u chorych z encefalopatią może pogarszać ubytki funkcji behawioralnych i poznawczych wynikające z już istniejących strat strukturalnych w populacji neuronów cholinergicznym mózgu. Należy podkreślić, że opisane zjawiska dotyczą efektów wywoływanych przez Al zewnątrzkomórkowy.*

### 3.1.2. Wpływ glinu wewnątrzkomórkowego na metabolizm acetylo-CoA

Al stosunkowo łatwo przedostaje się do wnętrza komórek poprzez receptory transferynowe. Wiele danych wskazuje, że działanie patogenne Al wewnątrz komórki związane jest z wypieraniem przez niego Ca i Fe z ich kompleksów z białkami strukturalnymi, związanymi z wewnątrzkomórkowym przekaznictwem sygnałów i przemianami oksydacyjnymi. Sprzyja temu fakt, że szybkość dysocjacji kompleksów glinowych jest 1000 razy wolniejsza niż wapniowych. Sytuacja byłaby, więc odmienna niż w przypadku zewnątrzkomórkowego Al, który zmniejszał szybki, bramkowany potencjałem, transport Ca do wnętrza neuronów. Wywołany przez Al wzrost wewnątrzkomórkowego wolnego  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  aktywowałby proces syntezy wolnych rodników tlenowych (Xie i wsp. 1996). Wykazano, że w mózgach szczurów traktowanych przewlekle glutaminianem glinu wzrastał poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (Deloncle i wsp. 1999). W podobnym układzie doświadczalnym Al zwiększał poziom peroksydacji lipidów w mózgu myszy (Xie i wsp. 1996). Powodem tego zjawiska byłoby hamowanie przez Al zależnej od ATP akumulacji Ca w retikulum endoplazmatycznym jak również usuwanie  $\text{Fe}^{2+}$  z centrum aktywnego akonitazy (Mundy i wsp. 1994, Julka i Gill 1996). I tak, wzrost stężenia wolnego  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  w mitochondriach hamowałby utlenianie w cyklu kwasów trójkarboksylowych w wyniku inhibicji aktywności PDH, która jest spowodowana aktywacją specyficznej kinazy oraz akonitazy przez zwiększenie stężenia wolnych rodników (Xie i wsp. 1996, Zatta i wsp. 2000).

Wykazano szereg interferencji Al z układami wewnątrzkomórkowego przekaznictwa sygnałów. Al zwiększał poziom cAMP poprzez bezpośrednią inhibicję

specyficznej fosfodiesterazy (Richardt i wsp. 1985). Powodowało to wzrost aktywności kinazy fosforanowej A (PKA) i fosforylacji zależnych od niej substratów białkowych. Stan fosforylacji białek zależnych od PKA regulowany jest przez aktywację tego enzymu oraz bezpośrednią inhibicję fosfatazy A2 (Nakamura i wsp. 1990, Yamamoto i wsp. 1990) i fosfodiesterazy cAMP (Richardt i wsp. 1985). Ponadto, glin hamuje hydrolizę fosfatydyloinozytoli, które są kluczowym etapem przekazywania sygnałów z receptorów muskarynowych, katecholaminergicznych i neurotropowych (Fisher i wsp. 1992, Nostrandt i wsp. 1995, Shafer i wsp. 1994). Wzrost poziomu mitochondrialnego  $Ca^{2+}$  pod wpływem Al powodowałby aktywację kanałów o wysokiej przepuszczalności (MPT) w błonie mitochondrialnej (Julka i Gill 1996, Kristiann i wsp. 2000), które stymulowałyby proces apoptozy poprzez uwalnianie cytochromu c i innych białek proapoptotycznych z mitochondriów (Szutowicz i wsp. 2006, przyjęta do druku).

***Należało więc, przypuszczać, że wewnątrzkomórkowy Al będzie wywierał odmienne od Al zewnątrzkomórkowego działanie na dystrybucję wewnątrzkomórkowego acetylo-CoA.***

Hipoteza ta była weryfikowana w pracy **nr 2** na izolowanych mitochondriach mózgu szczura (Szutowicz i wsp. 1998a). Okazało się, że przy stężeniach  $1 \mu M$   $Ca^{2+}$ , spotykanych w cytoplazmie zdepolaryzowanych komórek nerwowych dochodziło do inhibicji aktywności PDH, jak również nieproporcjonalnie dużego spadku acetylo-CoA w izolowanych mitochondriach. Działanie to nasilało się w obecności Al, który zwiększał stężenie wolnego  $Ca^{2+}$  w środowisku inkubacyjnym mitochondriów. Tłumaczyłoby to upośledzenie procesów utleniania w mózgach osób z chorobą Alzheimera i innymi encefalopatiami. Co więcej, dochodziło do stymulacji przez Al akumulacji Ca w mitochondriach wskutek inhibicji wrażliwego na werapamil wymiennika Na/Ca. Również i w tym przypadku wykazano, że aktywną formą Al był kompleks  $Al(PO_4)OH$ . Tak, więc Al po wejściu do komórki nerwowej zwiększałby poziom  $Ca^{2+}$  zarówno w przedziale cytoplazmatycznym jak i mitochondrialnym.

***Badania te wykazały, że sposób, w jaki Al wpływa na metabolizm neuronów i innych komórek zależy od stosunku stężeń tego kationu w PPK i PWK.***

### 3.2. Znaczenie puli synaptoplazmatycznej acetylo-CoA dla funkcji neuronów

#### cholinergicznym

Stężenie acetylo-CoA w zakończeniach nerwowych wynosi 1.6-6.0 nmoli/g tkanki. Natomiast  $K_m$  dla tego substratu wynosi około 5-20  $\mu\text{M}$  (Tucek 1993). Należy jednak pamiętać, że stężenie acetylo-CoA w cytoplaźmie jest 10 krotnie niższe niż w mitochondriach (Bielarczyk i Szutowicz 1989). W spolaryzowanych neuronach cholinergicznym istnieje stan równowagi dla reakcji ChAT, determinowany w tych warunkach stałą równowagi reakcji  $K$  równą 14 (Tucek 1993). W spoczynkowych neuronach mała szybkość niekwantowego wydzielania ACh powoduje, że stężenia substratów nie stanowią czynnika ograniczającego szybkość jej syntezy. Jednakże w warunkach depolaryzacji wydzielanie ACh znacznie zwiększa resyntezę tego neuroprzekaźnika. Ma to na celu przywrócenie stanu równowagi reakcji ChAT, co wiąże się z odtworzeniem puli ACh niezbędnej do utrzymania neuroprzekaźnictwa. Staje się oczywiste, że proces ten może być ograniczany dostępnością choline i acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym neuronów cholinergicznym. Wiadomo, że wzrost poziomu acetylo-CoA w mózgu spowodowany podaniem acetylo-L-karnityny lub beta-hydroksymaślanu powodował wzrost zawartości ACh (White i wsp. 1990, Tomaszewicz i wsp. 1997). Co więcej, zabezpieczał funkcję neuronów w warunkach nadmiernego pobudzenia wywołanego przedłużoną depolaryzacją. Z kolei nadmiar NO hamował aktywność dehydrogenazy pirogronianowej powodując, jak można się domyślać, niedobór acetylo-CoA w mitochondriach (Bolanos i wsp. 1997, Stewart i wsp. 2000, Tomaszewicz i wsp. 1997). Wzrost stężenia rodników nitrozylowych prowadził do zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych dla związków drobnocząsteczkowych i białek proapoptycznych (Kindler i wsp. 2003, Stewart i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 2006, przyjęta do druku).

*Nie było jednak bezpośrednich danych wykazujących czy modyfikacja dystrybucji acetylo-CoA w synaptosomach przez różne inhibitory i związki cytotoksyczne zmienia w sposób dający się przewidzieć kwantowe i niekwantowe wydzielania ACh.*

Uzyskanie tych informacji było celem pracy **nr 3 (Szutowicz i wsp. 1998b)**. Wykazano między innymi, że w zdepolaryzowanych synaptosomach w obecności Ca w środowisku inkubacyjnym, nitroprusydek sodu (SNP) zwiększał poziom

cytoplazmatycznego acetylo-CoA a Al odwracał ten efekt. Spowodowane to było zahamowaniem przez Al transportu zewnątrzkomórkowego Ca do cytoplazmy. Również sam niedobór pirofosforanu tiaminy oraz werapamil obniżały poziom acetylo-CoA w cytoplazmie zakończeń nerwowych, odpowiednio poprzez zahamowanie syntezy acetylo-CoA przez PDH w mitochondriach i ograniczenie zależnego od Ca transportu przez błonę mitochondrialną. Z kolei beta-hydroksymaślan za pośrednictwem beta-ketotiolazy zwiększał poziom acetylo-CoA w cytoplazmie.

Na podstawie tych wyników można było utworzyć wykres korelacji, w którym wzrastającym stężeniom acetylo-CoA cytoplazmatycznego odpowiadały wzrastające szybkości kwantowego wydzielania ACh, w obecności różnych efektorów takich jak: werapamil < Al= (-)hydroksycytrynian < niedobór pirofosforanu tiaminy < kontrola < Al+SNP < beta-hydroksymaślan < SNP. W rezultacie stwierdzono istnienie wysoce znamiennej prostoliniowej korelacji między kwantowym wydzielaniem ACh a poziomem cytoplazmatycznego acetylo-CoA ( $r=0.98$ ,  $p<0.001$ ).

Nie wykazano natomiast korelacji między innymi parametrami metabolizmu acetylo-CoA, szybkością utleniania pirogronianu czy też poziomem acetylo-CoA w mitochondriach i kwantowym wydzielaniem ACh. Nie było również korelacji między niekwantowym wydzielaniem ACh a poziomem acetylo-CoA w mitochondriach czy też w cytoplazmie zakończeń nerwowych.

Wskazuje to, że nie ma prostej zależności między syntezą acetylo-CoA w mitochondriach a jego transportem do cytoplazmy. Wynika to z faktu, że transport ten odbywa się różnymi drogami regulowanymi przez niezależne mechanizmy, różnie reagujące na bodźce cytotoksyczne. Dla przykładu Al zmniejszał a NO zwiększał przepuszczalność błon mitochondrialnych dla acetylo-CoA, przy podobnym stopniu inhibicji jego syntezy przez dehydrogenazę pirogronianową. Nie zmniejsza to znaczenia acetylo-CoA jako substratu do produkcji energii i utrzymania integralności neuronów. Ioudina i wsp. wykazali w swojej pracy, że obniżenie stężenia glukozy w hodowli neuronów hipokampa zwiększało ich wrażliwość na toksyczne działanie glutaminianu (Ioudina i wsp. 2004). Są one zgodne z naszymi danymi wykazującymi, że zahamowanie syntezy acetylo-CoA w mitochondriach powoduje spadek poziomu tego metabolitu w cytoplazmie i inhibicję syntezy ACh w zakończeniach nerwowych (Szutowicz i wsp. 1998b).

*Wyniki te stanowią dowód na to, że zaburzenia funkcji neuroprzekazniczej neuronów cholinergicznycch pod wpływem bodźców cytotoksycznych są ściśle*

*związane z poziomem acetylo-CoA w ich przedziale synaptoplazmatycznym. Nie wyklucza to współistnienia innych mechanizmów neurotoksycznego działania NO i A1 na neurony cholinergiczne.*

### **3.3. Zależna od fenotypu wrażliwość neuronów cholinergicznych na bodźce neurodegeneracyjne**

Opisane wyżej badania metabolizmu acetylo-CoA przeprowadzane były we frakcji synaptosomalnej, w której zakończenia cholinergiczne stanowiły jedynie około 10% populacji (Richardson 1981). Dlatego interpretacja zarówno naszych wyników, jak i wyników innych badaczy opierała się na założeniu, że metabolizm acetylo-CoA w zakończeniach cholinergicznych i niecholinergicznych jest podobny (Szutowicz *wsp.* 1982a, Bielarczyk i Szutowicz 1989). Niemniej, chociażby różnice w rozmieszczeniu różnych typów receptorów cholinergicznych i glutaminianergicznych (NMDA) w obu populacjach są na tyle istotne, że mogą one determinować różnice w ich reakcjach na bodźce neurodegeneracyjne. Sprawiają one, że w wielu encefalopatiach, w których dochodzi do upośledzenia metabolizmu energetycznego uszkodzeniu czynnościowemu lub strukturalnemu ulegają w pierwszej kolejności neurony cholinergiczne (Blass i *wsp.* 1997, Perry i *wsp.* 1980, Szutowicz i *wsp.* 1996). Co więcej, różne grupy neuronów cholinergicznych mózgu wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na podobne bodźce cytotoksyczne (Fass i *wsp.* 2000, Andsberg i *wsp.* 2001, Szutowicz 2001). Zgodnie z naszą hipotezą zjawisko to można by wiązać ze zmiennym stosunkiem szybkości metabolizmu ACh do szybkości metabolizmu acetylo-CoA w poszczególnych grupach neuronów cholinergicznych mózgu. Na taką możliwość wskazują badania subfrakcji synaptosomalnych hipokampa szczura wykazujące ponad dwukrotnie niższą niż w ogólnej populacji aktywność heksokinazy w podfrakcji dużych synaptosomów o wysokiej aktywności acetylocholinesterazy (Gorini i *wsp.* 1999).

Dlatego też istotnym uzupełnieniem badań całego mózgu są badania prowadzone na pierwotnych hodowlach cholinergicznych neuronów mózgu lub też komórek cholinergicznych neuroblastoma takich jak S-20 czy SN56, w których całość metabolizmu acetylo-CoA znajduje się w „przedziale cholinergicznym” (Szutowicz i *wsp.* 1983, Berse i *wsp.* 1997). Komórki te wydają się być szczególnie przydatnym modelem do badań wpływu metabolizmu acetylo-CoA na funkcję neuroprzebieżniczą i

integralność neuronów cholinergicznym w obecności różnych czynników cytotoksycznych.

Zaburzenia metabolizmu acetylo-CoA mogą być oczywiście tylko jednym z wielu czynników powodujących zróżnicowaną wrażliwość na bodźce neurotoksyczne takie jak amyloid- $\beta$ , NO czy też A $\beta$  w różnych grupach neuronów cholinergicznym. W istocie wykazano, że neurony cholinergiczne pnia mózgu były mniej wrażliwe na SNAP lub SNP niż neurony prążkowania i przegrody mózgu, dzięki wysokiej ekspresji trzech grup białek antyapoptotycznych (McKinney i wsp. 2004). Zróżnicowane neurony były również bardziej wrażliwe na amyloid- $\beta$ , wskutek zwiększonej fosforylacji białek tau przez zależną od cykliny kinazę 5 (Cdk5) (Liu i wsp. 2004).

*Obserwacje te potwierdzają zasadność stosowania hodowli pierwotnych neuronów cholinergicznym czy też linii komórek cholinergicznym o różnym stopniu zróżnicowania, do przeprowadzenia oceny współzależności między zmianami ich fenotypu i śmiertelnością pod wpływem bodźców fizjologicznym i patologicznym.*

### **3.3.1. Wpływ glinu, amyloidu- $\beta$ i NO na metabolizm ACh, acetylo-CoA i żywotność cholinergicznym komórek neuroblastoma SN56**

Wyniki badań uzyskane na synaptosomach i mitochondriach mózgach szczura wymagały dalszej weryfikacji z użyciem populacji komórek w 100% cholinergicznym. Do tego celu w pracach nr 4 i 5 (Bielarczyk i wsp. 2003a, Szutowicz i wsp. 2000) użyto cholinergicznym hybrydowym neuroblastoma SN56 (dar prof. J.K. Blusztajna) utworzonych w wyniku fuzji niecholinergicznym mysich komórek neuroblastoma N18TG2 z neuronami cholinergicznym z przegrody mózgu 21 dniowej myszy (Hammond i wsp. 1990, Lee i wsp. 1990). Komórki te dawały się różnicować w kierunku fenotypu cholinergicznym przez addytywny wpływ cAMP i RA, które ponad czterokrotnie zwiększały aktywność ChAT i zawartość ACh przy jednoczesnym spadku aktywności PDH i szybkości zużycia pirogronianu oraz poziomu acetylo-CoA. Różnicowanie zwiększało również akumulację Ca w mitochondriach SN56 (Bielarczyk i wsp. 2003a). Nieróżnicowane i uprzednio zróżnicowane cAMP/RA komórki SN56 hodowano następnie w obecności jednego lub kilku czynników neurotoksycznych takich jak A $\beta$ , SNP i amyloid- $\beta$ . Uważa się, że związki te odgrywają istotną rolę w patomechanizmie choroby Alzheimerera. Można

również przypuszczać, że podprogowe stężenie jednego z tych czynników może nasilać działanie innego dając wspólnie wyraźny efekt cytotoksyczny. Wiadomo też, że długotrwała depolaryzacja powodująca pobudzenie ekscytotoksyczne zwiększała nie tylko produkcję NO, ale również amyloidogenną przemianę białka prekursorowego amyloidu- $\beta$  (APP) (Pierrot i wsp. 2004). Wykazano również, że Al przyśpieszał powstawanie i agregację amyloidu- $\beta$  i przedłużał otwarcie kanałów Ca (Pratico i wsp. 2002, Kawahara i wsp. 2001, Haust i wsp. 2004).

Przeprowadzone badania wykazały, że amyloid- $\beta$  (25-35), toksyczny fragment amyloidu- $\beta$  1-42, SNP i Al nie wpływały na aktywność PDH w komórkach nieróżnicowanych, obniżały natomiast znamienne aktywność tego enzymu w komórkach zróżnicowanych. Co więcej, łączne dodanie dwóch neurotoksyn powodowało spadek aktywności PDH również w komórkach nieróżnicowanych i dalsze pogłębienie inhibicji aktywności tego enzymu w neuronach zróżnicowanych (**Bielarczyk i wsp. 2003a**). Spadek aktywności PDH w komórkach zróżnicowanych spowodowany był zarówno wzrostem stężenia Ca w mitochondriach komórek jak i zmniejszeniem poziomu dwóch spośród trzech podjednostek katalitycznych enzymu: dekarboksylazy pirogronianowej i dehydrogenazy dihydroliponianowej (**Bielarczyk i wsp. 2003a**). Natomiast niższy poziom Ca i nieobecność zmian zawartości białek kompleksu PDH tłumaczyłoby znacznie mniejszą inhibicję jego aktywności przy jednoczesnym dodaniu Al i SNP do hodowli komórek nieróżnicowanych (**Bielarczyk i wsp. 2003a, Szutowicz i wsp. 2000**). Tłumaczy to znacznie większe obniżenie przez te neurotoksyny żywotności komórek różnicowanych niż nieróżnicowanych. Przejawiało się to obecnością w populacji komórek zróżnicowanych większej procentowej zawartości komórek pochłaniających błękit trypanu, przy znacznym spadku całkowitej liczby komórek oraz cofnięciu się ich różnicowania morfologicznego (**Bielarczyk i wsp. 2003a**). Natomiast w komórkach nieróżnicowanych wzrost pochłaniania błękitu trypanu nie wiązał się ze zmniejszeniem ogólnej liczby komórek ani też ze zmianami morfologicznymi. Świadczy to o tym, że ich odpowiedź na neurotoksyny była słabsza i opóźniona w czasie (**Szutowicz i wsp. 2000**). Czynnikiem zapewniającym lepszą przeżywalność komórek nieróżnicowanych mógł być wysoki poziom acetylo-CoA niezmienny się pod wpływem bodźców neurotoksycznych jak również stosunkowo niski poziom wewnątrzkomórkowego Ca (**Szutowicz i wsp. 2000**). Z kolei w komórkach zróżnicowanych neurotoksyny obniżały poziom acetylo-CoA do wartości o 50% niższych niż w komórkach niezróżnicowanych, co przy wysokiej zawartości Ca i

dużej szybkości wydzielania ACh, mogło powodować powstanie niedoborów energetycznych w komórkach i ich trwałe uszkodzenia (**Bielarczyk i wsp. 2003a, Szutowicz i wsp. 2000**).

*Przedstawione dane wskazują, że dostępność acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym może modyfikować zarówno ich aktywność neuroprzekąznikową jak i podatność na bodźce neurodegeneracyjne.*

### **3.3.2. Ekspresja ChAT a cytotoksyczność cholinergiczna**

Niezdifferencjowane komórki SN56 posiadają stosunkowo niską aktywność ChAT, rzędu 0.1-0.3 nmola/min/mg białka. W zdifferencjowanych SN56 wahała się ona od 0.6 do 0.8 nmola/min/mg białka (**Szutowicz i wsp. 2000, Bielarczyk i wsp. 2003a**). Tymczasem aktywność specyficzna ChAT w dojrzałych neuronach cholinergicznym mózgu jest szacowana ok. 10 nmoli/min/mg białka.

Celem pracy **nr 6 (Bielarczyk i wsp. 2003b)** było uzyskanie komórek cholinergicznym z wysoką ekspresją ChAT. Umożliwiłoby to weryfikację przedstawianej wyżej hipotezy w warunkach zbliżonych do panujących w dojrzałych neuronach mózgu. Dlatego poprzez transfekcję natywnym komórek SN56 wytworzono komórki SN56ChAT2. Transfekcja natywnym komórek SN56 plazmidem PSR $\alpha$  neo zawierającym szczurzy gen ChAT i gen oporności na genetycyne (G-418) dała linię komórkową SN56ChAT2 zawierającą dodatkową kopię genu ChAT i aktywność enzymu rzędu 4 nmoli/min/mg białka. Co więcej, wbudowany gen pozostawał pod kontrolą promotorów CRE i RAR ponieważ cAMP i RA zwiększały aktywność ChAT w tych komórkach do poziomu około 7 nmoli/min/mg białka a więc do wartości spotykanych w dojrzałych neuronach cholinergicznym (**Bielarczyk i wsp. 2003b**).

Badania wydzielania ACh i poziomu acetylo-CoA potwierdziły istnienie mechanizmu zależnej od niego oporności komórek na bodźce cytotoksyczne. Okazało się, że komórki z SN56ChAT2 wykazywały wyższą wrażliwość na nadmiar NO mierzony spadkiem zdolności redukcji błękitu tiazolu (MTT) niż komórki natywne (**Bielarczyk 2003b**). Co więcej, SN56ChAT2 miały o 60% mniej acetylo-CoA i zawierały o 100% więcej ACh niż komórki nie modyfikowane. Tłumaczy to większą wrażliwość SN56ChAT2 na uszkadzające działanie NO.

W tych warunkach wykazano istnienie znamiennej prostej korelacji między poziomem acetylo-CoA a przeżywalnością komórek obu grup w obecności SNP



( $r=0.98$ ), przy istnieniu odwrotnej korelacji między aktywnością ChAT i poziomem acetylo-CoA ( $r=0.93$ ) (Bielarczyk i wsp. 2003b).

*Dane te wykazały po raz pierwszy, że w wysoko zróżnicowanych neuronach cholinergicznym względny niedobór acetylo-CoA jest spowodowany jego zwiększonym zużyciem do syntezy ACh. W związku z tym w neuronach tych bodźce cytotoksyczne znacznie łatwiej powodowałyby pogłębienie niedoboru mitochondrialnego acetylo-CoA wskutek zahamowania jego syntezy przez dehydrogenazę pirogronianową. Inhibicja tego enzymu byłaby wywoływana zarówno bezpośrednim działaniem cytotoksyn jak i nadmierną akumulacją Ca powodującego aktywację kinazy PDH (Sheu i wsp. 1985). Tłumaczy to zwiększoną wrażliwość wysoko zróżnicowanych neuronów cholinergicznym na neurodegenerację.*

### **3.3.3. Rola czynnika wzrostu nerwów (NGF) w zróżnicowanej wrażliwości neuronów cholinergicznym na bodźce neurodegeneracyjne**

NGF odgrywa istotną rolę w regulacji wzrostu, różnicowania i żywotności neuronów cholinergicznym mózgu (Delcroix i wsp. 2000). Aktywacja specyficznych dla NGF receptorów TrkA zwiększała przeżywalność neuronów w obecności NO, amyloidu- $\beta$  i innych związków cytotoksycznych. Natomiast aktywacja niespecyficznego receptora p75 o niskim powinowactwie do neurotrofin, powodowała supresję fenotypu cholinergicznym i uczulała neurony na działanie neurotoksyn (Bhakar i wsp. 2003, Coulson i wsp. 2000, Oh i wsp. 2000, Yaar i wsp. 1997). Wykazano między innymi, że nadekspresja receptora p75 zmniejsza gęstość neuronów cholinergicznym i aktywność ChAT w przegrodzie mózgu myszy. Aktywacja receptora p75 indukowała apoptotyczną zależną od ceramidu śmierć neuronów hipokampa (Brann i wsp. 2002). Z drugiej strony istnieją doniesienia o ochronie komórek przez receptory p75 przed toksycznym działaniem amyloidu- $\beta$  (Zhang i wsp. 2003).

Wydaje się, że rozbieżne wyniki dotyczące działania NGF mogą wynikać z różnego stopnia zróżnicowania fenotypowego neuronów cholinergicznym w różnych modelach doświadczalnych. Natywne komórki SN56(p75+TrkA-) nie posiadają receptorów TrkA. Dlatego w dalszych badaniach użyto linii SN56 o symbolu T17 transfekowanej plazmidem pDM115 zawierającym szczurzy gen TrkA (dar prof. J.K.

Blusztajna) (Berse i wsp. 1999, Chao i wsp. 1998, Verdi i wsp. 1994) i receptory TrkA na powierzchni błon plazmatycznych.

Celem badań przedstawionych w pracach 7, 8 i 9 ( **Madziar i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 2004, Szutowicz i wsp. 2005**) było zróżnicowanie działań wywieranych przez receptory TrkA i p75 na fenotyp cholinergiczny, metabolizm reszty acetylowej i przeżywalność neuronów cholinergicznyc. Komórki obu linii różnicowano cAMP/RA a następnie poddawano działaniu NGF w stężeniach 100 ng/ml, aktywujących zarówno receptory TrkA jak i p75. NGF nie zmieniał aktywności ChAT i metabolizmu ACh w niezróżnicowanych SN56. Zwiększał natomiast aktywność ChAT, zawartość i wydzielanie ACh w niezróżnicowanych T17. Z kolei cAMP/RA powodował wzrost aktywności ChAT, poziomu i wydzielania ACh w komórkach obu linii. Nieoczekiwanie w tak zróżnicowanych komórkach obu linii NGF powodował podobny spadek aktywności ChAT i poziomu ACh. Co więcej, to hamujące działanie było znoszone przez przeciwciało anti-p75. Wskazuje to, że aktywacja szlaków CREB/RAR powoduje zablokowanie sygnalizacji TrkA oraz zwiększenie supresyjnej sygnalizacji receptorów p75 (**Madziar i wsp. 2003**).

Dane te potwierdzają obserwacje wykazujące, że różnicowanie cAMP/RA komórek SN56 i T17 zwiększa poziom receptorów p75 w błonach komórkowych. (Szutowicz i wsp. 2006, przyjęta do druku). Przeciwciało to znosiło również aktywujące działanie NGF na niezróżnicowane komórki T17. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje, że receptor p75 jest koaktywatorem receptora TrkA (Ross i wsp. 1998).

*Oryginalnym osiągnięciem przedstawianyc prac jest wykazanie, że działanie to występuje tylko w nisko zróżnicowanych neuronach cholinergicznyc. Dane te wskazują, że NGF może spełniać rolę dwukierunkowego zwrotnego regulatora stabilizującego poziom ekspresji fenotypu cholinergicznego neuronów cholinergicznyc. Z jednej strony aktywowałby on neurony o niskiej ekspresji fenotypu cholinergicznego, z drugiej zaś obniżałby aktywność wysoko zróżnicowanych neuronów cholinergicznyc.*

Wzrost ekspresji fenotypu cholinergicznego pod wpływem różnicowania cAMP/RA powodował spadek zawartości acetylo-CoA w mitochondriach i jego wzrost w cytoplazmie obu grup komórek (**Szutowicz i wsp. 2004**). Supresja fenotypu cholinergicznego przez NGF częściowo przywracała wyższy poziom mitochondrialnego acetylo-CoA. Podobnie w nieróżnicowanych komórkach T17

wzrost ekspresji fenotypu cholinergicznego pod wpływem NGF wiązał się, ze spadkiem mitochondrialnego i wzrostem cytoplazmatycznego acetylo-CoA. Takiego zjawiska nie obserwowano w nieróżnicowanych komórkach SN56. Amyloid- $\beta$  nie wpływał na poziom acetylo-CoA ani w mitochondriach ani w cytoplazmie nieróżnicowanych komórek T17. Powodował natomiast dalszy spadek poziomu acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej zróżnicowanych komórek T17 (**Szutowicz i wsp. 2004**).

Wykazano odwrotną korelację pomiędzy aktywnością cholinergiczną a poziomem acetylo-CoA w mitochondriach komórek neuroblastoma ( $r=0.97$ ) (**Szutowicz i wsp. 2005**). Dane te dowodzą, że aktywność neuroprzekaźnikowa neuronów cholinergiczných istotnie zmniejsza pulę mitochondrialnego acetylo-CoA wskutek przyspieszenia jego transportu do przestrzeni cytoplazmatycznej i większego zużycia do syntezy ACh. Przechodzeniu acetylo-CoA do cytoplazmy sprzyjał wzrost akumulacji Ca w mitochondriach komórek różnicowanych cAMP/RA (**Szutowicz i wsp. 2005**). Zwiększony poziom Ca i zmniejszony acetylo-CoA w mitochondriach komórek zróżnicowanych powodowałyby ich zwiększoną śmiertelność w obecności amyloidu- $\beta$  i/lub nadmiaru NO. Co więcej, wykazano, że NGF zwiększał cytotoksyczne, mierzone testem z błękitem trypanu, działanie A $\beta$  i NO w tych warunkach w stosunku do obu linii komórek (**Madziar i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 2004, Szutowicz i wsp. 2005**). Jednym z czynników zwiększających śmiertelność komórek byłaby stymulacja przez NGF akumulacji Ca w ich mitochondriach i cytoplazmie. Wykazano również, że efekt ten był mediowany przez receptor, p75 ponieważ, występował on w obu zróżnicowanych liniach komórkowych i był znoszony przez przeciwciało anti-p75 (**Szutowicz i wsp. 2004**). Okazało się, że NGF obniżał aktywność PDH w komórkach SN56TrkA(-) lecz nie w T17TrkA(+). Natomiast różnicowanie komórek cAMP/RA znacznie wyraźniej obniżało aktywność PDH w T17 niż w SN56. Co więcej supresja PDH pod wpływem A $\beta$  i NO była wyraźniejsza w komórkach SN56TrkA(-). Pozwala to sądzić, że receptor TrkA pełni rolę ochronną w stosunku do poziomu PDH w neuronach cholinergiczných. Z kolei zróżnicowany fenotyp cholinergiczny był bardziej podatny na supresyjne działanie amyloidu- $\beta$  i NO w neuronach T17 TrkA(+). W tych ostatnich toksyny te zmniejszały aktywność ChAT do poziomu stwierdzanego w komórkach nieróżnicowanych (**Madziar i wsp. 2003, Szutowicz i wsp. 2004**). NGF nasilał inhibicyjny wpływ toksyn na aktywność ChAT w komórkach TrkA(-). Działanie to było odwracane przez przeciwciało anti-p75 (**Szutowicz i wsp. 2004**).

Istotnym elementem zależnej od fenotypu podatności komórek na neurotoksyny okazały się zmiany wewnątrzkomórkowej puli acetylo-CoA. Różnicowanie, niezależnie od mechanizmu, czy to przez cAMP/RA czy przez NGF powodowało spadek acetylo-CoA w mitochondriach i jego redystrybucję do przedziału cytoplazmatycznego (Szutowicz i wsp. 2004). W połączeniu ze zwiększoną akumulacją Ca względny niedobór acetylo-CoA w mitochondriach może odgrywać istotną rolę w zwiększonej wrażliwości neuronów cholinergicznym na czynniki neurodegeneracyjne.

*Uzyskane wyniki wskazują, że ważnym elementem zwiększonej wrażliwości wysoko zróżnicowanych neuronów cholinergicznym jest zależna od aktywacji CREB i RAR supresja sygnalizacji receptorów TrkA i aktywacja receptorów p75. I tak, zależnie od aktywacji różnych dróg przekazywania sygnałów, różnicowanie neuronów cholinergicznym może zmieniać ich wrażliwość na bodźce cytotoksyczne poprzez wewnątrzkomórkową redystrybucję acetylo-CoA. Zmiany wewnątrzneuronalne poziomu i dystrybucji acetylo-CoA pod wpływem różnych bodźców fizjologicznym i patologicznym mogą, więc być końcowym sygnałem wykonawczym zmieniającym zarówno funkcje neuroprzekazywające jak i wywierającym działanie ochronne lub uszkodzające na neurony cholinergiczne mózgu. Dlatego zmiany kompartmentacji acetylo-CoA wydają się być centralnym elementem patomechanizmów różnym encefalopatii cholinergicznym.*

#### **3.3.4. Wpływ acetylo-L-karnityny na komórki cholinergiczne**

W tkankach obwodowych takich jak mięśnie, wątroba L-karnityna spełnia istotną rolę w transporcie reszt długo łańcuchowych acylo-CoA do wnętrza mitochondriów (Berthon i wsp. 1997, Łysiak i wsp. 1988). W ten sposób dochodzi do zwiększonej produkcji acetylo-CoA i poprawy bilansu energetycznym tych tkanek. Natomiast w mózgu, który nie zużywa kwasów tłuszczowych jako substratów energetycznym, L-karnityna bierze udział w transporcie reszt acetylowych z mitochondriów do cytoplazmy. Wykazano, że zarówno *in vivo* jak i *in vitro* egzogenna L-karnityna zwiększała poziom acetylo-CoA w różnym preparatach tkankowych mózgu (Bigini i wsp. 2002, Gibson i Shimada 1980, Ricny i wsp. 1992, Sharman i wsp. 2002). Równocześnie obserwowano wzrost zawartości ACh w mózgu. Podanie karnityny zabezpieczało mózg przed spadkiem zawartości ACh w przypadku

ekscytotoksycznego pobudzenia benzylanem quinuclidynyli (Rigny 1993). Acetylo-L-karnityna spowalniała neurodegenerację i upośledzenie czynności poznawczych u starych szczurów (Prickaerts i wsp. 1998, Sharman i wsp. 2002). Jednakże nie wiadomo było, w jakim przedziale komórkowym neuronów cholinergicznym dochodzi do zmiany poziomu acetylo-CoA.

Praca nr 9 (Szutowicz i wsp. 2005) wykazuje, że w komórkach niezróżnicowanych T17 acetylo-L-karnityna podwyższała jedynie poziom mitochondrialnego acetylo-CoA, nie wpływając na jego poziom w cytoplazmie. Natomiast w komórkach zróżnicowanych T17 związek ten podwyższał poziom acetylo-CoA tylko w przedziale cytoplazmatycznym. Co więcej, acetylo-L-karnityna odwracała inhibicyjny wpływ amyloidu- $\beta$  na poziom tego metabolitu w przedziale mitochondrialnym i cytoplazmatycznym. W zgodzie z tymi danymi pozostawał fakt, że acetylo-L-karnityna odwracała również inhibicyjny wpływ amyloidu- $\beta$  na aktywność ChAT w zróżnicowanych komórkach T17. Jednakże, nie odwracała ona cytotoksycznego działania amyloidu- $\beta$ , który powodował wzrost komórek pochłaniających błękit trypanu. W komórkach niezróżnicowanych amyloid- $\beta$  nie wpływał na aktywność ChAT oraz tylko nieznacznie zwiększał ilość komórek uszkodzonych. W związku z tym, działania cytoprotekcyjne i cholinotropowe acetylo-L-karnityny w komórkach niezróżnicowanych były nieobecne.

*Przedstawione dane wskazują, że działanie cholinotropowe acetylo-L-karnityny w komórkach zróżnicowanych wynika ze zwiększenia poziomu acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym. Zwiększenie poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA tłumaczy zdolność acetylo-L-karnityny do przywracania funkcji neuroprzekazniczych w warunkach cytotoksycznych. Z kolei brak działania cytoprotekcyjnego acetylo-L-karnityny można natomiast tłumaczyć tym, że zwiększenie syntezy ACh uczula jednocześnie te neurony na działanie bodźców neurotoksycznych.*

### **3.3.5. Interleukina-1 $\beta$ a cytotoksyczność amyloidu- $\beta$**

Poziomy interleukin-1 $\beta$  i interleukina 6 jak również czynnika martwicy nowotworów (TNF) ulegają zwiększeniu w różnych chorobach neurodegeneracyjnych mózgu (McGeer i McGeer 2003, Rothwell i Luheshi 2000). Źródłem tych cytokin są głównie pobudzone zapalnie komórki mikrogleju. Amyloid- $\beta$  i glin nagromadzające się w mózgu chorych na chorobę Alzheimera również wykazywały zdolność do

zwiększania syntezy cytokin pozapalnych (Giovannini i wsp. 2002). Z drugiej strony również same interleukiny zwiększały syntezę amyloidu- $\beta$ , aktywując w ten sposób błędny cykl neurodegeneracji (Rothwell i Luheshi 2000).

Jednakże nie ma wielu doniesień dotyczących związku pomiędzy zwiększonym poziomem cytokin zapalnych a utratą neuronów cholinergicznym w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Dlatego też, zbadanie tego zagadnienia było celem pracy **nr 10 (Bielarczyk i wsp. 2005)**.

Wykazano, że zarówno niskie jak i wysokie stężenia interleukiny-1 $\beta$  zwiększały śmiertelność komórek niezróżnicowanych T17 zarówno w obecności jak i nieobecności amyloidu- $\beta$ . Natomiast w komórkach zróżnicowanych sama interleukina-1 $\beta$  niezależnie od stężenia nie wywierała działania cytotoksycznego i nie pogłębiała cytotoksycznego działania amyloidu- $\beta$ . Niskie stężenia interleukiny-1 $\beta$  zwiększały aktywność ChAT nie zwiększając znamienne wydzielania ACh w komórkach zróżnicowanych. Amyloid- $\beta$  obniżał aktywność ChAT i wydzielanie ACh oraz poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA w tych komórkach. Interleukina-1 $\beta$  odwracała całkowicie supresyjne działanie amyloidu- $\beta$  na poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA i wydzielanie ACh w komórkach zróżnicowanych. Jednakże zawartość komórek uszkodzonych w tych warunkach pozostawała niezmienną.

*Wyniki te wskazują, że interleukina-1 $\beta$  w niskich stężeniach może częściowo stanowić element mechanizmu kompensacyjnego, zmierzającego do przywrócenia funkcji neuroprzewodzącej wysoko zróżnicowanych neuronów cholinergicznym mózgu, których funkcja została upośledzona przez amyloid- $\beta$ . Wydaje się, że w tym cholinotropowym działaniu interleukiny-1 $\beta$  istotną rolę odgrywa jej zdolność do przywracania prawidłowego poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie neuronów cholinergicznym. Z drugiej jednak strony to cholinotropowe działanie byłoby znoszone przez inne cytokiny prozapalne takie jak TNF- $\alpha$  lub IL6 (Bielarczyk i wsp. 2005).*

#### 4. PODSUMOWANIE

- ↳ Zróźnicowanie fenotypowe neuronów cholinergicznycy powoduje powstanie względnycy niedoborów acetylo-CoA poprzez zahamowanie aktywności PDH i wzrostu jego zużycia do syntezy acetylocholino. Wzrost zawartości Ca w zróźnicowanycy neuronach jest przyczyną spadku aktywności tego enzymu i zwiększonego bezpośredniego transportu acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy. Zmiany te z jednej strony zwiększają aktywność przekaźniczą neuronów cholinergicznycy z drugiej zaś uwrażliwiają je na działanie czynnikóv neurotoksycznycy
- ↳ Wysoka śmiertelność zróźnicowanycy neuronów cholinergicznycy w obecności czynnikóv neurotoksycznycy takich jak: amyloid- $\beta$ , glin lub nadmiar NO wynika z zahamowania przez nie aktywności PDH, prowadzącej do zwiększenia niedoborów acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym. Względna odporność niezróźnicowanycy neuronów cholinergicznycy na bodźce cytotoksyczne wynika z stosunkowo wysokiej zawartości acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym i jego mniejszego zużycia do syntezy acetylocholino.
- ↳ Wzrost poziomu cytoplazmatycznego poziomu acetylo-CoA jest niezbędnycy do zwiększenia ekspresji fenotypu cholinergicznego w neuronach cholinergicznycy. Spadek jego poziomu w warunkach cytotoksycznycy powoduje obniżenie aktywności neuroprzekaźniczej zróźnicowanycy neuronów cholinergicznycy. Czynniki zwiększające podaż acetylo-CoA w neuronach cholinergicznycy, takie jak acetylo-L-karnityna przywracają zahamowane przez neurotoksyny funkcje neuroprzekaźnicze przez wzrost poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA.
- ↳ W neuronach cholinergicznycy poszczególne elementy składowe drogi metabolicznej pirogronian-acetylo-CoA-acetylocholino tworzą jednostkę czynnościową odpowiadającą w skorelowany sposób na bodźce neurotoksyczne i neuroprotekcycjne.

## 5. Piśmiennictwo

1. Abreo K., Abreo F., Sella M.L., Jain S.: Aluminum enhances iron uptake and expression of neurofibrillary tangle protein in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 75, 2059-2064, 1999.
2. Andsberg G., Kokaia Z., Lindvall O.: Upregulation of p75 neurotrophin receptor after stroke in mice does not contribute to differential vulnerability of striatal neurons. *Exp. Neurol.* 169, 351-63, 2001.
3. Atweh S., Simon J.R., Kuhar M.J.: Utilization of sodium-dependent high affinity choline uptake in vitro as a measure of the activity of cholinergic neurons in vivo. *Life Sci.* 17, 1535-1544, 1975.
4. Auld D.S., Day J.C., Mennicken F., Quirion R.: Pharmacological characterization of ACh release from rat basal forebrain neurons. *J. Physiol.* 515, 93-107, 2000.
5. Auld D.S., Kornecook T.J., Bastianetto S., Quirion R.: Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* 68, 209-245, 2002.
6. Bartfai T., Bedecs K., Land T., Langel U., Bertolelli R., Girotti P., Consolo S., Xu X., Wiesenfeld-Hallin Z., Nilsson S., Pieribone V.A., and Hokfelt T.: M-15 high affinity chimeric peptide that blocks the neuronal actions of galanin in the hippocampus, locus coeruleus, and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10961-10965, 1991.
7. Berse B., Blusztajn J.K.: Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid in cell-type specific. *FEBS Letters* 410, 175-179, 1997.
8. Berse B., Lopez-Covella I., Blusztajn J.K.: Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor. *Biochem. J.* 342, 301-308, 1999.
9. Berthon P., Van DerVeer M., Denis C., Freyssenet D.: L-Carnitine stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation rate in isolated rat skeletal muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* 117, 141-145, 1997.
10. Bhakar A.L., Howell J.I., Paul C.E., Salehi A.H., Becker E.B.E., Said F., Bonii A., Barker P.A.: Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J. Neurosci.* 23, 11373-11381, 2003.
11. Bielarczyk H., Szutowicz A.: Evidence for the regulatory function of



- synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *J. Biochem.*, 262, 377-380 1989.
12. Bigini P., Larini S., Pasquali C., Muzio V., Mennimi T.: Acetyl-L-carnitine shows neuroprotective and neurotrophic activity in primary culture of rat embryo motoneurons. *Neurosci. Lett.* 329, 334-338, 2002.
  13. Blass J.P.: Energy/glucose metabolism in neurodegenerative diseases. W: *Molecular mechanisms of dementia.* (red. Wasco W., Tanzi R.E.), Human Press Inc., Totowa, NJ, 7, 91-101, 1997.
  14. Blusztajn J.K., Liscovitch M., Richardson U.I.: Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in human neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5474-5477, 1987.
  15. Blusztajn J.K., Wurtman R.J.: Choline and cholinergic neurons. *Science.* 291, 614, 1987.
  16. Bolanos J.P., Almeida A., Stewart V.S., Land J.M., Clark J.B., Heales S.J.R.: Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanism and implications for neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 68, 2227-2240, 1997.
  17. Brann A.B., Tcherpakow M., Williamst I.M., Futerman H., Fainzilber M.: Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 9813-9818, 2002.
  18. Breer H., Knipper M.: Choline fluxes in synaptosomal membrane vesicles. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 285-296, 1985.
  19. Browning E.T., Schulman M.P.: [<sup>14</sup>C] acetylcholine synthesis by cortex slices of rat brain. *J. Neurochem.* 15, 1391-1405, 1968.
  20. Busselberg D., Platt B., Hass H.L., Carpenter D.O.: Voltage gated calcium channel currents of rat dorsal root ganglion (DRG) cells are blocked by Al<sup>3+</sup>. *Brain Res.* 622, 163-168, 1993.
  21. Carroll P.T.: Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release. *Brain Res.* 753, 47-55, 1997.
  22. Carvalho C.A.M., Coutinho O.P., Carvalho A.P.: Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on Ca<sup>2+</sup> translocation across synaptosomal membranes. *J. Neurochem.* 47, 1774-1784, 1986.
  23. Chao M., Casaccia-Bonnel P., Carter B., Chittka A., Kong H., Yoon S. O.:

- Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res. Rev.* 26, 295-301, 1998.
24. Coulson J.E., Reid K., Baca M., Shiphon K.A., Hulett S.M., Kilpatrick T.J., Bartlett P.F.: Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal death. *J. Biol. Chem.* 275, 30537-30545, 2000.
  25. Dawson V.L., Dawson T.M.: Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 33-40. 1996.
  26. Delcroix J-D., Valletta J., Wu C., Howe C.L., Lai C.F., Cooper J.D., Belichenko P.V., Salehi A., Mobley W.C.. Trafficking the NGF signal: implications for normal and degenerating neurons. *Progr. Brain Res.* 146, 3-23, 2004.
  27. Deloncle R., Huguet F., Babin P., Fernandez B., Quellard N., Quellard O.: Chronic administration of aluminum L-glutamate in young mature rats: Effect on iron level and lipid peroxydation in selected brain areas. *Toxicol. Lett.* 104, 65-73. 1999.
  28. Dowdall M.J.: Synthesis and storage of acetylcholine in cholinergic nerve terminals. W: *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission* (edd. Berl D., Clarke D.D., Schneider D.), Plenum Publishing Co., New York, 585-607, 1976.
  29. Eberwine J.: Transcription factors. W: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, Sixth Edition, Raven Press, 1998.
  30. Fass U., Panickar K., Personett D., Bryan D., Williams K., Gonzales J., Sugaya K., McKinney M.: Differential vulnerability of primary cultured cholinergic neurons to nitric oxide excess. *Neuroreport.* 11, 931-936, 2000.
  31. Fisher S.K., Heacock A.M., Agranoff B.W.: Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an uptake. *J. Neurochem.* 58, 18-38, 1992.
  32. Fisone G., Wu Ch.F., Konsolo S., Nordstrom O., Brynne N., Bartfdai T., Melander T., Hokfelt T.: Galanin inhibits acetylcholine release in ventral hippocampus of the rat: Histochemical, autoradiographic, in vivo, and in vitro study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 7339-7343, 1987.
  33. Fonnum, F.: Review of recent progress in the synthesis, storage and release of acetylcholine: W: *Cholinergic mechanisms.* (red. Waser P.G.) Raven Press, New York, 145-159, 1975.
  34. Gandolfi L., Stella M.P., Zambenedetti P., Zatta P.: Aluminum alters interacellular calcium homeostasis in vitro. *Biochim. BioPhys. Acta.* 1406,

- 315-320, 1998.
35. Gibson E.G., Park L.C.H., Sheu K-F.R., Blass J.P., Calingasan N.Y.: The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 36, 97-112, 2000.
  36. Gibson G., Shimada M.: Studies of metabolic pathway of the acetyl group for acetylcholine synthesis. *Biochem. Pharmacol.* 29, 167-174, 1980.
  37. Giovanini M.G., Scali C., Prosperi C., Bellucci A., Vannucchi M.G., Rosi S., Pepeu G., Casamenti F.:  $\beta$ -Amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol. Dis.* 11, 257-274, 2002.
  38. Good P.F., Peri D.P., Bierer L.M., Schmeidler J.: Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann. Neurol.* 31, 286-292, 1992.
  39. Gorini A., D'Angelo A., Villa R.F.: Energy metabolism of synaptosomal subpopulations from different neuronal systems of rat hippocampus: effect of L-acetylcarnitine administration in vivo. *Neurochem. Res.* 24, 617-24, 1999.
  40. Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.
  41. Greferath U., Bennie A., Kourakis A., Barlett P.F., Murphy M., Barret G.L.: Enlarged cholinergic forebrain neurons and improved spatial learning in p75 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 885-893, 2000.
  42. Gsell W., Strein I., Riederer P.: The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared. *J. Neural. Transm. Suppl.* 47, 73-101, 1996.
  43. Hammond D.N., Lee H.J., Tonsgard J.H., Wainer B.H.: Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 512, 190-200, 1990.
  44. Happe H.K., Murrin L.C.: Development of high affinity choline transport sites in rat forebrain a quantitative autoradiography study with [ $^3$ H] Hemicholinium-3. *J. Comp. Neurol.* 321, 591-611, 1992.
  45. Hefti F., Hartikka J., Eckenstein F., Gnahn H., Heumann R. and Schwab M.: Nerve growth factor increases choline acetyltransferase but not survival or fiber outgrowth in cultured fetal septal cholinergic neurons. *Neurosci.* 14, 55-68, 1985.
  46. Holzmann D.M., Lee S., Li Y., Chua-Couzens J., Xia H., Brecht D.S., Mobley

- W.C.: Expression of neuronal-NOs in developing basal forebrain cholinergic neurons: regulation by NGF. *Neurochem. Res.* 21, 861-868, 1996.
47. Hoshi M., Takashima A., Murayama M., Yasutake K., Yoshida N., Ishiguro K., Hoshino T., Imahori K.: Nontoxic amyloid  $\beta$  peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. *J. Biol. Chem.* 272, 2038-2041, 1997.
  48. House E., Collingwood J., Khan A., Korchazkina O., Berthon G., Exley Ch.: Aluminum, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A $\beta$  42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 6, 291-301, 2004.
  49. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R.: Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45, 583-595, 2004.
  50. Ioudina M, Uemura E, Greenlee H.W.: Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. *Brain Res.* 1004, 188-192, 2004.
  51. Izumi Y., Benz A.M., Katsuki H., Zorumski C.F.: Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Neurosci.* 17, 9448-9457, 1997.
  52. Jankowska A., Blusztajn J.K., Szutowicz A.: Activities of enzymes of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in SN56 hybrid cholinergic cell line differentiated by dibutyryl cyclic AMP and all-trans retinoic acid. *Folia Neuropathol.* 54, 247-249, 1997.
  53. Janski A.M., Cornell N.W.: Subcellular distribution of enzymes determined by rapid digitonin fractionation of isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 186, 423-429, 1980.
  54. Jones B.E.: Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 145, 157-169, 2004.
  55. Julka D., Gill K.D.: Altered calcium homeostasis: possible mechanisms of aluminum-induced neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1315, 47-54, 1996.
  56. Julka D., Sandhir R., Gill K.D.: Altered cholinergic metabolism in rat CNS following aluminium exposure: implications on learning performance. *J. Neurochem.* 65, 2157-2164, 1995.
  57. Kalaria R.N., Harik S.I.: Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 53, 1083-1088, 1989.
  58. Kasa P., Rakonczay Z., Gulya K.: The cholinergic system in Alzheimer's

- disease. *Prog. Neurobiol.* 52, 511-535, 1997.
59. Kato K., Murota S.: NMDA receptor stimulation in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  potentiates  $\text{Ca}^{2+}$  influx-dependent cell death system. *Brain Res.* 1035, 177-187, 2005.
  60. Kawahara M., Kato M., Kuroda Y.: Effects of aluminium on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of  $\beta$ -amyloid protein. *Brain Res. Bull.* 55, 211-217, 2001.
  61. Kindler D.D., Thiffault C., Solenski N.J, Dennis J., KostECKI V., Jenkins R., Keeney P.M., Bennett J.P. Jr.: Neurotoxic nitric oxide rapidly depolarizes and permeabilizes mitochondria by dynamically opening the mitochondrial transition pore. *Mol Cell Neurosci.* 23, 559-73, 2003.
  62. Klein R.L., Hirko A.C., Meyers C.A., Grimes J.R., Muzyczka N., Meyer E.M.: NGF gene transfer to intrinsic basal forebrain neurons increases cholinergic cell size and protects from age-related, spatial memory deficits in middle-aged rats. *Brain Res.* 875, 144-151, 2000.
  63. Koenig M.L., Jope R.S.: Aluminum inhibits the fast phase of voltage-dependent calcium influx into synaptosomes. *J. Neurochem.* 49, 316-320, 1984.
  64. Kristian T., Gertsch, J., Bates T.E., Siesjo B.K.: Characteristics of the calcium-triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effect of cyclosporin A and ubiquinone O. *J. Neurochem.* 74, 1999-2009, 2000.
  65. Lee H.J., Hammond D.N., Large T.H., Wainer B.H.: Immortalized young adult neurons from septal region: generation and characterization. *Dev. Brain Res.* 52, 219-228, 1990.
  66. Liu T., Perry G., Chan H.W., Verdile G., Martins R.N., Smith M.A., Atwood C.S.: Amyloid- $\beta$ -induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J. Neurochem.* 88, 554-563, 2004.
  67. Lowenstein J.K.: Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. W: *Metabolic roles of citrate* (Goodwin T.W. ed.), Academic Press, New York, 61-86, 1968.
  68. Łysiak W., Lilly K., di Lisa F., Toth P.P., Bieber L.I.: Quantitation of the effect of L-carnitine on the levels of acid-soluble short-chain acyl-CoA and CoASH in rat and liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 263, 1151-1156, 1988.

69. Manaker S., Wieczorek C.M., Rainbow T.C.: Identification of sodium-dependent, high-affinity choline uptake sites in rat brain with [<sup>3</sup>H] HC-3. *J. Neurochem.* 46, 483-488, 1986.
70. Mantyh P.W., Ghilardi J.R., Rogers S., DeMaster E., Allen C.J., Stimson E.R., Maggio J.E.: Aluminum, iron and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of  $\beta$ -amyloid peptide. *J. Neurochem.* 61, 1171-1174, 1993.
71. Martin E., Rosenthal R.E., Fiskum G.: Pyruvate dehydrogenase complexes: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 79, 240-247, 2005.
72. McGeer E.G., McGeer P.L.: Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 741-749, 2003.
73. McKinney M., Williams K., Personett D., Kent C., Bryan D., Gonzalez J., Baskerville K.: Pontine cholinergic neurons depend on three neuroprotection systems to resist nitrosative stress. *Brain Res.* 1002, 100-109, 2004.
74. Meiri H., Banin E., Roll M., Riusseau A.: Toxic effects of aluminum on nerve cells and synaptic transmission. *Progr. Neurobiol.* 40, 89-121, 1993.
75. Mesulam M.M.: Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 757, 169-179, 1995.
76. Micossi L.G., Tomaszewicz M., Bielarczyk H., Luszawska D., Trogoni A., Szutowicz A.: Effect of angiotensin II and eledoisin on cholinergic neurons in rat hippocampus. *Neuroreport* 3, 36-38, 1992.
77. Mundy W.R., Kodavanti P.R., Dulchinos V.F., Tilson H.A.: Aluminum alters calcium transport in plasma membrane and endoplasmic reticulum from rat brain. *J. Biochem. Toxicol.* 9, 17-23, 1994.
78. Nakamura Y., Takeda M., Angelides K.J., Tanaka T., Tada K., Nishimura T.: Effect of phosphorylation on 68 KDa neurofilament subunit protein assembly by cyclic AMP dependent protein kinase in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 744-750, 1990.
79. Naumann T., Casademunt E., Hollerbach E., Hofmann J., Dechant G., Frotscher M., Barde YA.: Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in number of basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 2409-2418, 2002.
80. Nostrandt A.C., Shafer T.J., Mundy W.R., Padilla S.: Inhibition of rat phosphatidylinositol-specific phospholipase C by aluminum: regional

- differences, interactions with aluminum salts, and mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 118-125, 1996.
81. Obrenovitch T.P., Urenjak J., Zilkha E., Jay T.M.: Excitotoxicity in neurological disorders-the glutamate paradox. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 281-287, 2000.
  82. Oh J.D., Chartisathian K., Chase T.N., Butcher L.L.: Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res.* 853,174-185, 2000.
  83. Olesen O.F., Dago L., Mikkelsen J.D.: Amyloid beta neurotoxicity in the cholinergic but not in the serotonergic phenotype of RN46A cells. *Brain Res. Mol.* 57, 266-74 1998.
  84. Oosawa H., Furi T. and Kawashima K.: Nerve growth factor increases the synthesis and release of acetylcholine and expression of vesicular acetylcholine transporter in primary cultured embryonic septal cells. *J. Neurosci. Res.* 57, 381-387, 1999
  85. Oshiro S., Kawahara M., Mika S., Muramoto K., Kobayashi K., Ishige R., Nozawa K., Hori M., Yung C., Kitajima S. and Kuroda Y.: Aluminum taken up by transferrin-independent iron uptake affects the iron metabolism in rat cortical cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 123, 42-46, 1998.
  86. Patricio D., Uryu K., Sung S., Tang S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16, 1138-1140. 2002.
  87. Perry E.K., Perry R.H., Tomlinson B.E., Blessed G., Gibson P.H.: Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic compartment of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci. Lett.* 18, 105-110, 1980.
  88. Personett D., Fass U., Panickar K., McKinney M.: Retinoic acid-mediated enhancement of the cholinergic/neuronal nitric oxide synthase phenotype of the medial septal SN56 clone: establishment of a nitric oxide-sensitive proapoptotic state. *J. Neurochem.* 74, 2412-24, 2000.
  89. Pierrot N., Ghisdai P., Caumont A.S., Octave J.N.: Intraneuronal amyloid- $\beta$  1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J. Neurochem.* 88, 1140-1150, 2004.
  90. Pongrac J.L., Rylett R.J.: NGF-induction of the expression of ChAT mRNA in PC12 cells and primary cultures of embryonic rat basal forebrain. *Mol. Brain Res.* 62, 25-43, 1998.
  91. Prickaerts J., Blokland A., Bochmer J., Homg W., Markerink-Van Irtersum M.,

- Jollies J.: Acute effects of acetyl-L-carnitine on sodium cyanide-induced behavioral and biochemical deficits. *Neurochem. Int.* 33, 435-443, 1998.
92. Ricchelli F., Drago D., Filippi B., Tognon G., Zatta P.: Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of  $\beta$ -amyloids. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1-10, 2005.
93. Richardson P. J.: Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. *J. Neurochem.* 37, 258-60, 1981.
94. Richardt G., Frederolf G., Haberman E.: The interaction of aluminum and other metal ions with calcium-calmodulin dependent phosphodiesterase. *Arch. Toxic.* 57, 257-250, 1985.
95. Ricny J., Tucek S., Novakova J.: Acetylcarnitine, carnitine and glucose diminish the effect of muscarinic antagonist quinuclidynyl benzilata on striatal acetylcholine content. *Brain Res.* 576, 215-219, 1992.
96. Roskams A.J., Connor J.R.: Aluminum access to the brain: a role for transferrin and its receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9024-9027 1990.
97. Ross G.M., Shamovsky I.L, Lawrence G., Solc M., Dostaler S.M., Weaver D.F., Riopelle R.J.: Reciprocal modulation of TrkA and p75NTR affinity states is mediated by direct receptor interactions. *Europ. J. Neurosci.* 10, 890-898, 1998.
98. Rothwell N.J., Iuheshi G.N.: Interleukin 1 in the brain biology, pathology and therapeutic target. *TINS* 23, 618-625, 2000.
99. Ruberti F., Capsoni S., Comparini A., Di Daniel E., Franzot Gonfloni S., Rossi G., Berardi N., Cattaneo A.: Phenotypic knockout of nerve growth factor in adults transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen and skeletal muscle dystrophy. *J. Neurosci.* 20, 2589-2601, 2000.
100. Sandberg J., Cyole J.T.: Characterization of [ $^3$ H] hemicholinium-3 binding associated with neuronal choline uptake sites in rat brain membranes. *Brain Res.* 348, 321-330, 1985.
101. Sarter M., Parik V.: Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature Rev.* 6, 48-56, 2005.
102. Saydoff J.A., Zaczek R.: Blocade of N- and Q-type  $Ca^{2+}$  channels inhibits  $K^+$  - evoked [ $^3$ H] acetylcholine release in rat hippocampal slices. *Brain Res. Bull.* 40, 283-286, 1996.
103. Schurr A., Payne R.S., Miller J.J., Rigor B.M.: Brain lactate, not glucose fuels



the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation. *Brain Res.* 744, 105, 1997.

104. Shafer T.J., Mundy W.R.: Effects of aluminum on neuronal transduction: mechanisms underlying disruption of phosphoinositide hydrolysis. *Ge. Pharmac.* 26, 889-895, 1995.
105. Sharman E.H., Vaziri N.D., Zhenman N., Sharman K.G., Bondi S.C.: Reversal of biochemical and behavioral parameters of brain ageing by melatonin and acetyl-L-carnitine. *Brain Res.* 957, 223-230, 2002.
106. Sheu K.R.F., Kim Y.T., Blass J.P., Weksler M.E.: An immunological study of pyruvate dehydrogenase deficit in Alzheimer's disease brain. *Ann. Neurol.* 17, 444-449, 1985.
107. Shimode H., Ueki A., Morita Y.: Nerve growth factor attenuates hippocampal cholinergic deficits and operant learning impairment in rats with entorhinal cortex lesions. *Behav. Pharmacol.* 14, 179-190, 2003.
108. Sorimachi M., Kataoka K.: High affinity Choline uptake: an early index of cholinergic innervation in rat brain. *Brain Res.* 94, 325- 336, 1975.
109. Srere P.A.: The molecular physiology of citrate. *Nature* 205, 766-770, 1959.
110. Starkey B.J.: Aluminum in renal disease: current knowledge and future development. *Ann. Clin. Biochem.* 24,337-344,1987
111. Stewart V.C. Sharpe M.A., Clark J.B., Heales S.J.R.: Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J. Neurochem.* 75, 694-700, 2000.
112. Stewart V.C, Heales S.J.: Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 287-303, 2003.
113. Szutowicz A., Bielarczyk H., Gul S., Ronowska A., Pawełczyk T., Jankowska-Kulawy A.: Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cell to neurotoxic inputs. *Met. Brain Dis.* Przyjęta do druku, DOI 10.1007/s11011-006-9007-4, 2006.
114. Szutowicz A., Bielarczyk H.: Elimination of CoA-SH interference from acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride. *Anal. Biochem.* 164, 292-296, 1987.
115. Szutowicz A., Bielarczyk H., Skulimowska H.: Effect of dichloroacetate on acetyl-CoA content and acetylcholine synthesis in rat synaptosomes. *Neurochemical Res.* 9, 1107-1112, 1994.
116. Szutowicz A., Bielarczyk H., Łysiak W.: The role of citrate derived from glucose in the acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Int. J.*

Biochem. 13, 887-892, 1981.

117. Szutowicz A., Bielarczyk H.: Relationships between pyruvate oxidation, acetyl-CoA compartmentalization and acetylcholine synthesis in nerve terminals. In Thiamine-Dependent Enzymes. (Bisswanger H., Ulrich J. eds) VCH Publishers, Weinheim, 376-374, 1991.
118. Szutowicz A., Harris N.F., Srere P.A., Crawford I.L.: ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in fractions of small and large synaptosomes from rat brain hippocampus and cerebellum. *J. Neurochem.* 41, 1502-1505, 1983.
119. Szutowicz A., Kabata J., Bielarczyk H.: The contribution of citrate to the transport of acetyl units in nerve endings of developing rat brain. *J. Neurochem.* 38, 1196-1204, 1982.
120. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S.: The effect of (-) hydroxycitrate on pyruvate metabolism in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 29, 375-378, 1977.
121. Szutowicz A., Łysiak W.: Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 35, 775-785, 1980.
122. Szutowicz A., Morrison M.R., Srere P.A.: The enzymes of acetyl-CoA metabolism in differentiating cholinergic (S-20) and noncholinergic (NIE-115) neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 40, 1664-1670, 1983.
123. Szutowicz A., Stępień M., Bielarczyk H., Kabata J., Łysiak W.: ATP citrate lyase in cholinergic nerve endings. *Neurochem. Res.* 7, 799-810, 1982.
124. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Bielarczyk H.: Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 323-339, 1996.
125. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Bielarczyk H.: Key role of acetyl-CoA in cytoplasm of nerve terminals in disturbances of acetylcholine metabolism in brain. *Folia Neuropathol.* 35, 241-243, 1997.
126. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Jankowska A., Kisielewski Y.: Acetylcholine synthesis in nerve terminals of diabetic rats. *Neuro. Rep.* 5, 2421-2424, 1994.
127. Szutowicz A.: Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 1009-1018, 2001.
128. Szutowicz A.: Regional and developmental correlations between choline acetyltransferase and ATP-citrate oxaloacetate lyase in rat brain. In: *Biological*

- aspects of learning, memory formation and ontogeny of the CNS. (Matthies H., Krug M., Popov N. eds.) Akademie Verlag, Berlin 489-499, 1978.
129. Takei N., Kuramoto H., Mendo Y. and Hatanaka H.: NGF and BDNF increase in immunoreactivity of vascular acetylcholine transporter in cultured neurons from embryonic rat septum. *Neurosci. Lett.* 226, 207-207, 1997.
  130. Tomaszewicz M., Bielarczyk H., Jankowska A., Szutowicz A.: Modification by nitric oxide of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J. Neurochem.* 167, 993-997, 1997b.
  131. Tomaszewicz M., Bielarczyk H., Jankowska A., Szutowicz A.: Pathways of  $\beta$ -hydroxybutyrate contribution to metabolism of acetyl-CoA and acetylcholine in rat brain nerve terminals. *Folia Neuropathol.* 53, 4 244-246, 1997a.
  132. Tucek S.: Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 60, 59-69, 1993.
  133. Verdi J.M., Birren S.J., Ibaez C.F., Persson H., Kaplan D.R., Benedetti M., Chao M.V., Anderson D.J.: p75 LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron.* 12, 733-745, 1994.
  134. Vickroy T.W., Roeske W.R., Yamamura H.I.: Sodium dependent high-affinity binding of [3H] hemicholinium-3 in the rat brain: a potentially selective marker of presynaptic cholinergic sites. *Life Sci.* 35, 2335-2343, 1984.
  135. Ward N.L., Hagg T.: p75<sup>NGFR</sup> and cholinergic neurons in the developing forebrain: a re-examination. *Dev. Brain Res.* 118, 79-91, 1999.
  136. White H.L., Scates P.W.: Acetyl-L-carnitine as a precursor of acetylcholine. *Neurochem. Res.* 15, 597-601, 1990.
  137. Wurtman R J.: Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *Trend Neurosci.* 15, 117, 1992.
  138. Xie C.X., Pattson M.P., Lovell M., Yokel R.A.: Intraneuronal aluminum potentiated iron-induced oxidative stress in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 743, 271-277, 1996.
  139. Yaar M., Zhai S., Pilch P.F., Doyle S.M., Eisenhauer P.B., Fine R.E., Gilchrist B.A.: Binding of  $\beta$ -amyloid to the p-75 neuroprophn receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 100, 2333-2340, 1997.
  140. Yamamoto H., Saitoh Y., Yasugawa S., Miyamoto E.: Dephosphorylation of tau

factor by protein phospholipase 2A in synaptosomal cytosol fractions and inhibition by aluminum. *J. Neurochem.* 55, 683-690, 1990.

141. Yeo T.T., Chua-Cauzens J., Butcher L.L., Cooper J.D., Valletta J.S., Mobley W.C., Longo F.M.: Absence of p75<sup>NTR</sup> causes increased basal forebrain cholinergic neurons size, ChAT activity and target innervation. *J Neurosci.* 17, 7594-7605, 1997.
142. Zatta P., Lain E., Cagnolini C.: Effects of aluminum on activity of Krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur. J. Biochem.* 267, 3049-3055, 2000.
143. Zhang Y., Hong Y., Bounhar Y., Blacker M., Roucou X., Tounekti O., Vereker E., Bowers W.J., Federoff H.J., Goodyer C.G., LeBlanc A.: p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid  $\beta$  peptide cytotoxicity. *J. Neurosci.*, 23, 7385 – 7394, 2003.