

Dominik Diamandakis

Rozprawa doktorska

**Badanie mechanizmów ekscytotoksyczności w ostrym
toksycznym działaniu tetrabromobisfenolu A na komórki
ziarniste mózdzku szczura w hodowli pierwotnej**

Promotor: dr hab. n. med. Elżbieta Ziemińska

Promotor pomocniczy: dr Jacek Lenart

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Zakład Neurochemii – Pracownia Farmakoneurochemii

Warszawa 2020

W niniejszej pracy serdecznie dziękuję dr hab. Elżbiecie Ziemińskiej, ś. p. dr Jackowi Lenartowi oraz prof. dr hab. med. Jerzemu Łazarewiczowi za patronat naukowy, cenne wskazówki oraz pomoc w rozwiązywaniu napotkanych problemów w pracy badawczej, jak również za ogromne wsparcie.

Ponadto serdecznie dziękuję koleżankom i kolegom z zespołu Zakładu Neurochemii za owocną współpracę oraz przyjazną atmosferę.

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie zostały umieszczone w publikacjach:

1. Zieminska, E., Lenart, J., Diamandakis, D., Lazarewicz, J. W. (2017). The Role of Ca²⁺ Imbalance in the Induction of Acute Oxidative Stress and Cytotoxicity in Cultured Rat Cerebellar Granule Cells Challenged with Tetrabromobisphenol A. *Neurochemical Research*, 42(3), 777–787. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2075-x>. (2018 IF 2,782)
2. Lenart, J., Zieminska, E., Diamandakis, D., Lazarewicz, J. W. (2017). Altered expression of genes involved in programmed cell death in primary cultured rat cerebellar granule cells acutely challenged with tetrabromobisphenol A. *NeuroToxicology*, 63, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.014>. (2018 IF 3,263)
3. Diamandakis, D., Zieminska, E., Siwiec, M., Tokarski, K., Salinska, E., Lenart, J., Lazarewicz, J. W. (2019). Tetrabromobisphenol A-induced depolarization of rat cerebellar granule cells: ex vivo and in vitro studies. *Chemosphere*, 223, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.032>. (2018 IF 5,108)

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego NCN grant nr 2012/05/B/NZ7/03225

Wykaz najważniejszych skrótów użytych w rozprawie:

- 7-CKA** (ang. *7-chlorokynurenic acid*) – kwas 7-chlorokynureninowy
- AMPA** (ang. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)
– kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolepropionowy
- AP5** (ang. *(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid*) – kwas DL-2-amino-5-fosfopentanowy
- ATP** (ang. *Adenosine triphosphate*) – adenozy-no-5'-trifosforan
- BFR** (ang. *Brominated Flame Retardants*) – bromowane opóźniacze spalania
- BHA** (ang. *Butylated hydroxyanisole*) – butylowany hydroksyanizol
- BKCa** (ang. *large conductance calcium-activated potassium channels*) – kanały potasowe o dużym przewodnictwie regulowane jonami wapniowymi
- BSO** (ang. *buthionine sulfoximine*) – sulfoksymina butioniny
- CGC** (ang. *Cerebellar Granule Cells*) – komórki ziarniste mózdzku
- CNQX** (ang. *6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione*) – antagonistą AMPAR
- cpm** (ang. *counts per minute*) – zliczenia na minutę
- CREB** (ang. *cAMP response element-binding protein*) - czynnik transkrypcyjny
- DAG** (ang. *diacylglycerol*) – diacyloglicerol
- EAA** (ang. *excitatory aminoacids*) – aminokwasy pobudzające
- EAAT** (ang. *excitatory amino acid transporter*) – transportery aminokwasów pobudzających
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) – surowica płodowa cielęca
- GCL** (ang. *glutamate cysteine ligase*) – ligaza glutaminianowo-cysteinowa
- Glu** (ang. *glutamate*) – glutaminian
- GPT** (ang. *glutamate-pyruvate transaminase*) – transaminaza glutaminianowo-pirogronianowa
- GSH** (ang. *glutathione*) – zredukowany glutation
- iNOS** (ang. *inducible nitric oxide synthase*) - indukowana forma syntazy tlenku azotu
- IP₃** (ang. *inositol trisphosphate*) – 1,4,5-trisfosforan inozytolu
- L-PDC** (ang. *L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate*) – kwas L-trans-pirolidynowy-2,4-dikarboksylowy
- MPTP** (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) – kanały mitochondrialne o wysokiej przepuszczalności
- MK-801** (ang. *dizocilpine; (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzof[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate*) – dizocilpina; maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyklohepteno-5,10-iminy
- NCX** (ang. *Na⁺/Ca²⁺ exchanger*) – wymiennik sodowo-wapniowy

- NMDA** (ang. *N-methyl- D-aspartic acid*) – kwas N-metylo-D-asparaginowy
- OUN** Ośrodkowy układ nerwowy
- PCD** (ang. *programmed cell death*) – programowana śmierć komórkowa
- PMCA** (ang. *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) – pompa błonowa Ca²⁺-ATPazy
- pyr** (ang. *pyruvate acid*) – kwas pirogronowy
- ROS** (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu
- RNS** (ang. *reactive nitrogen species*) – reaktywne formy azotu
- RSL3** (ang. *RAS-selective lethal*) – czynnik selektywny dla RAS
- RT** (ang. *room temperature*) – temperatura pokojowa
- SAS** (ang. sulfasalazine) – sulfasalazyna
- TBBPA** (ang. *tetrabromobisphenol A*) – tetrabromobisfenol A
- VGLUT** (ang. *vesicular glutamate transporter*) – pęcherzykowy transporter glutaminianu
- VGSC** (ang. *voltage-gated sodium channels*) – napięciowo zależne kanały sodowe
- VGCC** (ang. *voltage-gated Ca²⁺ channels*) – bramkowane napięciem kanały wapniowe

Streszczenie

Tetrabromobisfenol A (TBBPA) jest bromowanym opóźniaczem spalania powszechnie stosowanym w przemyśle przy produkcji urządzeń elektrycznych, tekstyliów, mebli, wyposażenia samochodów i samolotów, a także w budownictwie. TBBPA jest potencjalną toksyną środowiskową, która jak dowiedziono w eksperymentach *in vivo* jest toksyczna m. in. dla zwierząt wodnych. Pomimo zapewnień technologów, że TBBPA jest związkiem trwale wiążącym się z produktem i przez to bezpiecznym, wykazano jego obecność w środowisku, a także w próbkach tkanek i płynów ustrojowych człowieka i zwierząt. Liczne dane uzyskane z doświadczeń *in vitro* wykazały, że TBBPA nawet w niskim, mikromolowym zakresie stężeń, zaburza działanie układów endokrynnego, immunologicznego a także nerwowego. Hydrofobowość i wysoka lipofilność TBBPA ułatwia pokonywanie błon i barier biologicznych (bariera łożyskowa i krew-mózg) i wnikanie do narządów i komórek. Ekspozycja na TBBPA może następować drogą oddechową, przez kurz, oraz pokarmową, przez zanieczyszczoną wodę i żywność.

Wyniki dotychczasowych badań prowadzonych głównie na hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku szczura (CGC) eksponowanych na TBBPA, wskazują na zaburzenia homeostazy wapnia, stres oksydacyjny, deenergizację mitochondriów, a także na aktywację receptorów NMDA (NMDAR) o niejasnym mechanizmie, oraz na udział tych zjawisk w toksycznym działaniu TBBPA na neurony. Pozwala to na postawienie hipotezy mówiącej o kluczowej roli ekscytotoksyczności w toksycznym działaniu TBBPA, jednak wzajemne powiązania wspomnianych wyżej mechanizmów są niejasne. Celem tych badań, prowadzonych niemal wyłącznie na hodowlach CGC poddanych działaniu TBBPA, była weryfikacja tej hipotezy. Celami szczegółowymi było poznanie związków przyczynowo-skutkowych między wywołanym przez ekspozycję CGC na TBBPA wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia ($[Ca^{2+}]_i$), a stresem oksydacyjnym i deenergizacją mitochondriów oraz wyjaśnienie mechanizmu aktywacji NMDAR w tych warunkach, a także poznanie mechanizmów śmierci neuronów z ustaleniem roli nekrozy, apoptozy i autofagii.

Badania wykazały zależne od stężenia TBBPA zjawiska: wzrost $[Ca^{2+}]_i$, indukcję stresu oksydacyjnego, którego wskaźnikami były wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS), oraz spadek stężenia glutationu (GSH) i aktywności katalazy, a także depolaryzację mitochondriów w CGC. Zahamowanie wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ przez podanie kombinacji antagonistów NMDAR i receptorów rianodynowych (RyR) zapobiegło wywołanej przez 10 μ M TBBPA indukcji stresu oksydacyjnego i depolaryzacji mitochondriów, natomiast te efekty indukowane

przez 25 μM TBBPA były tylko częściowo hamowane. Te wyniki po raz pierwszy bezpośrednio udowodniły, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, zachodzący za pośrednictwem NMDAR i receptorów rianodynowych (RyR), odgrywa kluczową i pierwotną rolę w patogenezie indukowanego przez TBBPA stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów, pokazując też możliwość bezpośredniej indukcji stresu oksydacyjnego przez 25 μM TBBPA.

Wykazany w dalszych badaniach brak wpływu TBBPA na wiązanie znakowanych ligandów NMDAR do frakcji błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura pozwoliło na odrzucenie hipotezy roboczej, sugerującej bezpośrednie interakcje TBBPA z NMDAR. Natomiast dalsze eksperymenty po raz pierwszy ujawniły, że TBBPA obniża potencjał błonowy neuronów, co więcej, w tym zjawisku biorą udział zarówno jonotropowe receptory glutaminianu (NMDAR i AMPAR), jak i kanały sodowe bramkowane napięciem. Ta ostatnia informacja daje podstawy dla hipotezy, że depolaryzacja CGC eksponowanych na TBBPA, jeśli jest po części zjawiskiem pierwotnym, może sprzyjać aktywacji kanału NMDAR przez zniesienie bloku magnezowego. Testowana była także hipoteza, że aktywacja NMDAR w CGC eksponowanych na TBBPA może być wynikiem zahamowania pobierania zwrotnego glutaminianu, co prowadzi do wzrostu jego stężenia w środowisku zewnątrzkomórkowym. O jej słuszności świadczy potwierdzenie w obecnych badaniach hamującego wpływu TBBPA na pobieranie glutaminianu przez frakcję synaptosomów izolowanych z mózgu szczura. Ponadto, stosując układ enzymatyczny rozkładający glutaminian, po raz pierwszy wykazane zostało doświadczalnie powiązanie przyczynowo – skutkowe między retencją endogennego glutaminianu, a aktywacją NMDAR mierzoną wzrostem pobierania ^{45}Ca przez CGC eksponowane na TBBPA. Uzyskano też oryginalne wyniki ujawniające, że TBBPA może aktywować uwalnianie glutaminianu z zakończeń synaptycznych i sugerujące udział dysfunkcyjnych RyR w mechanizmie tego efektu.

Badania przeprowadzone 24 godz. po 30-min ekspozycji na TBBPA wykazały zależne od stężenia obniżenie przeżywalności CGC, któremu częściowo zapobiegało wspólne podanie antagonistów NMDAR i RyR hamujących wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lub zmiataczy wolnych rodników, a niemal całkowicie znosiła obecność kombinacji wszystkich tych substancji. Świadczy to o roli jonów wapnia oraz stresu oksydacyjnego w cytotoksyczności TBBPA. Przeprowadzone w takim samym układzie doświadczalnym badania zmian ekspresji genów odpowiadających za procesy śmierci komórkowej w drodze nekrozy, apoptozy i autofagii wykazały narastający w czasie, wzrost ekspresji genów autofagii oraz apoptozy, przy braku istotnych zmian ekspresji genów związanych z programowaną nekrozą. Ponadto, badania szlaków śmierci komórek przy użyciu specyficznych markerów fluorescencyjnych ujawniły, że śmierć około połowy neuronów można

przypisać nekrozie nieprogramowanej, ponad jednej trzeciej apoptozie, a tylko niewiele ponad 10% autofagii, przy czym udział apoptozy i autofagii narasta wraz z upływem czasu po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA.

Wyniki badań omówionych w niniejszej pracy, wskazują na decydujący udział ekscytotoksyczności w mechanizmach neurotoksycznego działania TBBPA na CGC w hodowli pierwotnej. Kluczową rolę w tych złożonych i wzajemnie na siebie działających mechanizmach komórkowych odgrywa wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w którym pośredniczą NMDAR i RyR, prowadzący do indukcji stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów. Elementem zewnątrzkomórkowym tego mechanizmu domykającym błędne koło ekscytotoksyczności jest wzrost stężenia endogenego glutaminianu, prowadzący do aktywacji NMDAR i AMPAR.

Abstract

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a brominated flame retardant commonly used in industry for the manufacture of electrical appliances, textiles, furniture, vehicle and aircraft equipment, as well as in construction materials. TBBPA is considered to be a potential environmental toxin which has been shown to be toxic in *in vivo* experiments in aquatic animals and mammals. Despite assurances that TBBPA is persistent and therefore safe, it has been shown to be present in the environment as well as in human and animal tissue and body fluids samples. Numerous data obtained from *in vitro* experiments have shown that TBBPA, even in the low, micromole concentration range, has properties that disrupt the endocrine, immune and nervous systems. Hydrophobic and high lipophilic properties of TBBPA makes it easier to cross membranes and biological barriers (placental and blood-brain barrier) and to penetrate organs and cells. Exposure to TBBPA may occur by inhalation, through dust or contaminated water and food.

The results of previous studies of our laboratory and other laboratories, conducted mainly on primary cultures of rat cerebellar granule cell (CGC) exposed to TBBPA, indicate calcium homeostasis disturbances, oxidative stress, mitochondrial deenergization, as well as activation of NMDA receptors (NMDAR) with unclear mechanism and the involvement of these phenomena in the toxic effects of TBBPA on neurons. This allows us to put forward a hypothesis about the key role of excitotoxicity in the toxic action of TBBPA, but the interrelationship of the above mentioned mechanisms is unclear. The aim of my research, conducted almost exclusively on CGC cultures treated with TBBPA, was to verify this hypothesis. The specific objectives were to learn the cause-effect relationships between the increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) induced by CGC exposure to TBBPA and oxidative stress and mitochondrial deenergization, to explain the mechanism of NMDAR activation, and to better understand the mechanisms of neuronal death with the role of necrosis, apoptosis and autophagy.

The study showed TBBPA-dependent phenomena: increase in $[Ca^{2+}]_i$, induction of oxidative stress, which was indicated by an increase in reactive oxygen species (ROS) production, decrease in GSH content and catalase activity, as well as depolarization of mitochondria in CGC. The inhibition of $[Ca^{2+}]_i$ growth by administering a combination of NMDAR and rianodine receptor (RyR) antagonists prevented induction of oxidative stress and mitochondrial depolarization induced by 10 μ M TBBPA, whereas these effects induced by 25 μ M TBBPA were only partially inhibited. These results have for the first time directly demonstrated that the increase in $[Ca^{2+}]_i$, mediated by NMDAR and RyR, plays a key and

primary role in the pathogenesis of TBBPA-induced oxidative stress and mitochondrial deenergization, showing also the possibility of direct induction of oxidative stress by 25 μ M TBBPA.

In further studies, the demonstration of no effect of TBBPA on the binding of labelled NMDAR ligands to the membrane fraction isolated from the rat brain cortex allowed to reject the working hypothesis suggesting direct interactions of TBBPA with NMDAR. However, subsequent experiments revealed for the first time that TBBPA depolarizes the neurons, moreover, both ionotropic glutamate receptors (NMDAR and AMPAR) and voltage-gated sodium channels are involved in this phenomenon. The latter information gives rise to the hypothesis that the depolarization of CGCs exposed to TBBPA, if it is partly a primary phenomenon, may promote the activation of the NMDAR channel by releasing magnesium block. The hypothesis that activation of NMDAR in CGCs exposed to TBBPA could be the result of inhibition of glutamate reuptake, which leads to an increase in its concentration in the extracellular environment, has also been tested. This has been confirmed by the results demonstrating the inhibitory effect of TBBPA on glutamate uptake by the synaptosomal fraction isolated from the rat brain. Moreover, using an enzymatic system decomposing glutamate, for the first time a cause-effect relationship between the retention of endogenous glutamate and NMDAR activation measured by the increase of ^{45}Ca uptake by CGCs exposed to TBBPA has been experimentally demonstrated. Original results showing that TBBPA can activate glutamate release from synaptic terminals and suggesting participation of dysfunctional RyR in the mechanism of this effect were also obtained.

Studies conducted 24 hours after 30-min. exposure to TBBPA showed concentration-dependent reduction of the number of live CGC, which was partially prevented by the joint administration of NMDAR and RyR antagonists which prevent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, or by free radical scavengers, and almost completely stopped in the presence of combinations of all these substances. This demonstrates the role of calcium ions and oxidative stress in TBBPA cytotoxicity. The same experimental system showed that the expression of genes responsible for cell death processes through necrosis, apoptosis and autophagy increased over time with no significant changes in the expression of genes associated with programmed necrosis. Moreover, studies of cell death trails using specific fluorescence markers revealed that the death of about half of the neurons can be attributed to unprogrammed necrosis, more than one third to apoptosis and only slightly more than 10% to autophagy, with the share of apoptosis and autophagy increasing over time after CGC culture exposure to TBBPA.

The results presented in this paper, analyzed collectively, indicate a pivotal contribution of excitotoxicity in the mechanisms of neurotoxic effects of TBBPA on CGC in primary culture. The key role in these complex and interacting cellular mechanisms is played by the increase in $[Ca^{2+}]_i$, mediated by NMDAR and RyR, leading to induction of oxidative stress and mitochondrial deenergization. The extracellular element of this mechanism closing the vicious circle of excitotoxicity is an increase in the concentration of endogenous glutamate, leading to activation of NMDAR and AMPAR.

Innowacyjność rozprawy

Niniejsza rozprawa zawiera ustalenia wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową:

- Uzyskano bezpośrednie dowody, że wzrost $[Ca^{2+}]_i$, zachodzący za pośrednictwem NMDAR i RyR, odgrywa kluczową i pierwotną rolę w mechanizmie indukowanego przez TBBPA stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów;
- Opisano depolaryzujące działanie TBBPA na neurony i wykazano udział w tym zjawisku zarówno jonotropowych receptorów glutaminianu (NMDAR i AMPAR), jak i kanałów sodowych bramkowanych napięciem;
- Wykazano powiązanie przyczynowo-skutkowe między retencją endogennego glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (stosując układ enzymatyczny rozkładający glutaminian) a aktywacją NMDAR mierzoną wzrostem pobierania ^{45}Ca przez CGC eksponowane na TBBPA;
- Odkryto indukowany przez TBBPA mechanizm uwalniania glutaminianu z zakończeń synaptycznych z udziałem endogennego wapnia i dysfunkcyjnych RyR;
- Opisano dynamikę zmian ekspresji genów biorących udział w szlakach śmierci komórkowej (nekroza, apoptoza, autofagia), a także udział tych rodzajów śmierci komórki w zaobserwowanej neurotoksyczności wywołanej ekspozycją neuronów na TBBPA.

Spis treści

1. Wstęp	16
1.1. Tetrabromobisfenol A.....	16
1.1.1. Informacje ogólne.....	16
1.1.2. Charakterystyka związku.....	17
1.1.3. Obecność w środowisku.....	18
1.1.4. Dotychczasowe badania <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	20
1.2. Rola jonów wapnia w komórkach nerwowych.....	22
1.2.1. Funkcje, regulacja, homeostaza.....	22
1.2.2. Zaburzenia homeostazy wapniowej indukowane przez TBBPA.....	27
1.3. Glutaminian – metabolizm, funkcje i transport.....	29
1.4. Receptory NMDA.....	32
1.5. Stres oksydacyjny.....	35
1.6. Ekscytotoksyczność.....	37
1.7. Śmierć neuronów.....	39
2. Założenia i cel pracy	44
2.1. Hipoteza o kluczowej roli wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ w indukcji stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów po ekspozycji na TBBPA.....	45
2.2. Proponowane hipotezy mechanizmu aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA.....	46
2.2.1. Hipoteza o bezpośredniej aktywacji NMDAR przez TBBPA.....	46
2.2.2. Hipoteza o potęgowaniu przez TBBPA aktywacji NMDAR drogą pośrednią, poprzez depolaryzację błony komórkowej neuronów.....	47
2.2.3. Hipoteza o roli dekompartamentacji endogenego glutaminianu w aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA.....	47
2.2.4. Hipotetyczne mechanizmy śmierci komórkowej indukowanej przez TBBPA	
2.3. Cel pracy.....	49
3. Materiał i metody	50
3.1. Odczynniki.....	50
3.2. Zwierzęta.....	51
3.3. Izolowanie błon komórkowych z kory mózgowej mózu szczura.....	51

3.3.1. Wiązanie [³ H]MK-801 do izolowanych błon komórkowych w obecności TBBPA.....	52
3.3.2. Wiązanie [³ H]kwasu glutaminowego i [³ H]glicyny do izolowanych błon komórkowych w obecności TBBPA.....	53
3.4. Izolowanie synaptosomów z kory mózgu szczura.....	53
3.4.1. Wiązanie [³ H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy w obecności TBBPA.....	54
3.5. Hodowla pierwotna neuronów ziarnistych mózdzku szczura.....	55
3.5.1. Badania kontrolne wpływu TBBPA na zastosowane markery zmian [Ca ²⁺] _i , produkcji ROS oraz ΔΨ _m w systemie bezkomórkowym.....	55
3.5.2. Badania wpływu TBBPA na stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego w hodowli komórkowej CGC.....	56
3.5.3. Badania wpływu TBBPA na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych w hodowlach CGC.....	57
3.5.4. Badania wpływu TBBPA na zawartość GSH oraz aktywność katalazy w hodowlach CGC.....	58
3.5.5. Badania wpływu TBBPA na potencjał błonowy mitochondriów w hodowlach CGC.....	59
3.5.6. Badania wpływu TBBPA na potencjał błony komórkowej w hodowlach CGC.....	59
3.5.7. Badania wpływu TBBPA na pobieranie ⁴⁵ Ca przez komórki ziarniste mózdzku: modulacja przez podanie enzymu rozkładającego glutaminian.....	61
3.5.8. Badanie przeżywalności komórek hodowli po ekspozycji na TBBPA.....	61
3.5.9. Badanie zmian ekspresji genów związanych z programowaną śmiercią komórki po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA.....	63
3.5.10. Badanie indukcji apoptozy oraz autofagii komórek ziarnistych mózdzku w wyniku ekspozycji na TBBPA.....	64
3.6. Analiza statystyczna.....	65
4. Wyniki.....	66
4.1. Indukowane przez TBBPA zaburzenia homeostazy wapnia w hodowli CGC mózdzku szczura i ich wpływ na poziom stresu oksydacyjnego i potencjał mitochondrialny.....	66
4.1.1. Wpływ TBBPA na sygnał sond fluorescencyjnych w systemie bezkomórkowym.....	74
4.2. Mechanizmy indukowanej przez TBBPA aktywacji receptorów NMDA.....	77
4.2.1. Bezpośrednia interakcja TBBPA z receptorami NMDA.....	77
4.2.2. Depolaryzacja neuronów wywołana przez TBBPA jako element mechanizmu aktywacji receptorów NMDA.....	80

4.2.3. Wpływ dekompartamentacji glutaminianu na aktywację receptorów NMDA po podaniu TBBPA.....	87
4.3. Cytotoksyczny wpływ TBBPA na CGC w hodowli pierwotnej - rola nekrozy, apoptozy, autofagii.....	92
4.3.1. Spadek przeżywalności komórek w hodowli CGC eksponowanej na TBBPA.....	92
4.3.2. Poziom ekspresji genów związanych z programowaną śmiercią komórki po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA.....	96
4.3.3. Dynamika zmian w markerach nekrozy, apoptozy i autofagii po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA.....	101
5. Dyskusja.....	103
5.1. Ocena strony metodycznej.....	103
5.2. Analiza wyników.....	111
5.2.1. Indukowane przez TBBPA zaburzenia homeostazy wapnia w hodowli CGC oraz ich wpływ na poziom stresu oksydacyjnego i potencjał mitochondrialny.....	111
5.2.2. Mechanizmy aktywacji receptorów NMDA a ekscytotoksyczność TBBPA.....	115
5.2.3. Ocena udziału procesów śmierci komórkowej w hodowli CGC eksponowanej na TBBPA.....	125
6. Podsumowanie i wnioski.....	132
I. Badanie powiązań przyczynowo – skutkowych między wywołanym przez TBBPA wzrostem $[Ca^{2+}]_i$ a stresem oksydacyjnym i depolaryzacją mitochondriów.....	132
II. Mechanizmy aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA.....	133
III. Mechanizmy śmierci komórkowej indukowanej przez ekspozycję hodowli neuronów na TBBPA.....	134
WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE.....	136
WNIOSEK OGÓLNY.....	137
7. Literatura.....	138

1. Wstęp

1.1. Tetrabromobisfenol A (TBBPA)

1.1.1. Informacje ogólne

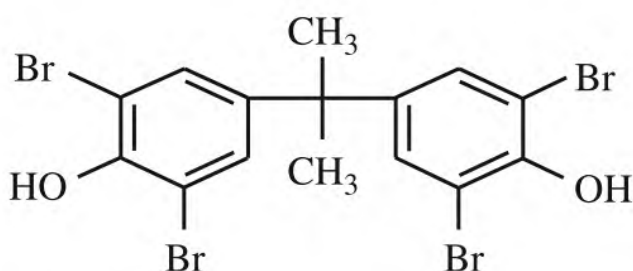
Grupa związków należących do bromowanych opóźniaczy spalania (ang. *brominated flame retardants* - BFR) to szereg substancji obniżających punkt zapłonu materiałów palnych, z którymi są połączone tj. polimerów, tworzyw sztucznych, drewna, papieru i tekstyliów. Grupę BFR tworzy zbiór ponad 80 różnych związków alifatycznych, cykloalifatycznych, aromatycznych czy polimerycznych, które klasyfikuje się pod względem reaktywności oraz chemicznego wiązania z produktem. Wyróżniamy więc BFR addytywne (*additive*), reaktywne (*reactive*) oraz polimerowane (*polymeric*) (Guerra i wsp. 2011). Klasę BFR addytywnych, w której najszerzej zbadaną grupą związków są polibromowane difenyloetery i heksabromocyklododekany, charakteryzuje brak mocnych wiązań chemicznych do składników polimerów co powoduje ich wypłukiwanie i uwalnianie do środowiska (Alaee i wsp., 2003). Drugą, wiodącą klasę na rynku BFR, na czele z TBBPA, charakteryzuje większa trwałość uzyskana poprzez silne wiązania kowalencyjne z substancjami mieszanymi, co czyni ją bardziej stabilną. W polimerycznych BFR, takich jak bromowany polistyren (BPS), atomy bromu są włączane do szkieletu polimeru, co prowadzi do bardziej stabilnej struktury chemicznej o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej – to z kolei powoduje mniejszą biodostępność i toksyczność (Covaci i wsp., 2009).

Przedstawione powyżej związki zmniejszające palność są rutynowo stosowane w przemyśle w celu zapobiegania pożarom i powodowanym przez nie ogromnym stratom. Produktów wytworzonych z udziałem BFR używa się już od dziesięcioleci, lecz dokładnych informacji na temat skali zagrożenia ich obecnością dla środowiska jak i dla ludzi jest stosunkowo mało i często są one sprzeczne (Birnbaum i Staskal, 2004). Obecnie największym zainteresowaniem cieszy się tetrabromobisfenol A (TBBPA), który produkowany jest w znacznie większej ilości (ok. 60% całej produkcji) niż pozostałe substancje opóźniające spalanie. Pomimo jego słabej reaktywności oraz stosunkowo niewielkich zanieczyszczeń znalezionych w różnych próbkach środowiska, wzrasta liczba informacji o rosnącym zagrożeniu (toksyczności TBBPA obserwowanej w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*) (Guerra i wsp., 2011). Istotne dla toksyczności właściwości, które posiadają bromowane opóźniacze spalania to hydrofobowość, która ułatwia bioakumulację w środowisku i łańcuchu troficznym, oraz lipofilność, która ułatwia pokonywanie błon

biologicznych i wnikanie do organizmów żywych, a dalej do tkanek czy komórek (Darnerud, 2003; Szychowski i Wójtowicz., 2013).

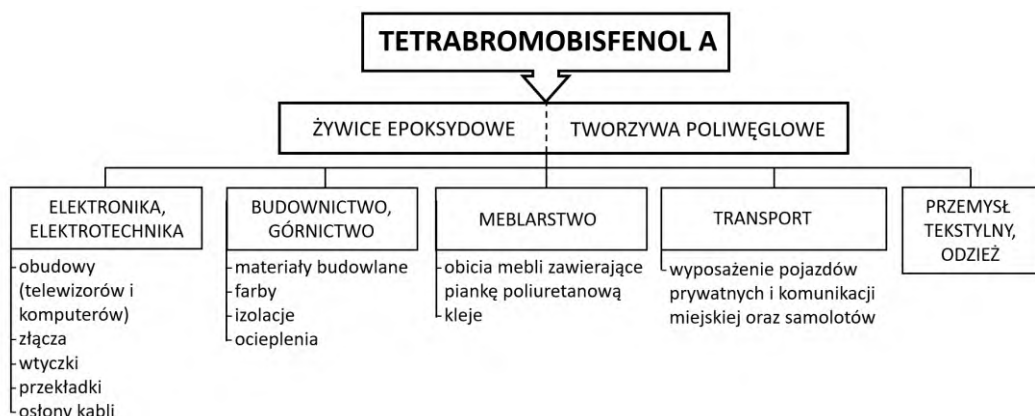
1.1.2. Charakterystyka związku

TBBPA to związek o wzorze $C_{15}H_{12}Br_4O_2$ (Ryc. 1), w jego strukturze wyróżnia się dwa pierścienie aromatyczne oraz 4 atomy bromu (Guerra i wsp., 2011). Jest on syntetyzowany w reakcji bromowania bisfenolu-A gdzie ilość utworzonych wiązań z bromem waha się od 1-4 i to od niej zależy skuteczność opóźniania spalania (Environment Agency, 2008). TBBPA charakteryzuje się niską rozpuszczalnością w wodzie, natomiast wysoką w metanolu, acetonie i dimetylosulfotlenku (DMSO).



Rycina 1. Wzór strukturalny tetrabromobisfenolu A

Ze względu na swoje właściwości, TBBPA jest powszechnie wykorzystywany do produkcji m. in. części elektronicznych, wyposażenia pojazdów, klejów budowlanych, żywic epoksydowych czy tworzyw poliwęglanowych. Jest on także składnikiem przedmiotów codziennego użytku takich jak: meble, obicia, tekstylia i przede wszystkim sprzęt elektroniczny (szczegóły na Ryc. 2).



Rycina 2. Zastosowanie tetrabromobisfenolu A (na podstawie rysunku z Jarosiewicz i Bukowska, 2017).

TBBPA produkowany jest głównie w Stanach Zjednoczonych, Izraelu, Chinach i Japonii, w ilościach sięgających nawet 170 tysięcy ton rocznie, co stanowi około 60% wszystkich związków opóźniających spalanie. Europejski panel do spraw przemysłu BRF wskazał kraje azjatyckie, jako te o największej konsumpcji TBBPA (do 89400 ton/rok) a zaraz za nimi Stany Zjednoczone (do 18000 ton/rok), natomiast kraje europejskie zużywają go w ilości do 11600 ton rocznie (dane z 2007). Mimo małej konsumpcji w Europie należy zwrócić uwagę, iż znacząca ilość produktów a zwłaszcza elektroniki, plastików, klejów i tekstyliów jest pochodzenia azjatyckiego. Bardzo dużym problemem jest brak ograniczeń oraz ścisłego monitorowania produkcji tego związku, co może w przyszłości doprowadzić do znacznego wzrostu stężeń TBBPA w zasobach środowiskowych, a także w łańcuchach troficznych. (Covaci i wsp., 2009; Jarosiewicz i Bukowska, 2017).

1.1.3. Obecność w środowisku

Ponieważ TBBPA należy do substancji trwale połączonych z polimerem, jest prawnie uważany za bezpieczny dla środowiska. Ponadto, zgodnie z Rozporządzeniem nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), tetrabromobisfenol A nie został przydzielony do grupy substancji określanych mianem PBT (*persistant, bioaccumulative, toxic*), czyli trwałych, toksycznych i zdolnych do bioakumulacji w środowisku. W rozporządzeniu WE 1272/2008 został on jednak sklasyfikowany jako H400/H410 (H – *hazard statement*), czyli związek bardzo toksyczny dla organizmów wodnych, potencjalnie powodujący długotrwałe zmiany w tym środowisku wodnym.

Pomimo zapewnień, że TBBPA jest związkiem trwale wiążącym się z produktem, wykazano jego obecność w różnych obszarach środowiska, a także w próbkach tkanek i płynach ustrojowych człowieka i zwierząt. Uważa się, że ekspozycja na TBBPA może następować nie tylko przez zanieczyszczoną wodę, kurz znajdujący się w pomieszczeniach, lecz głównie przez zanieczyszczoną żywność (dietę bogatą w owoce morza i ryby). Największe notowane stężenia TBBPA w środowisku dotyczą różnych obszarów Chin zarówno ze względu na dużą aktywność przemysłową, dietę jak i brak odpowiedniego recyklingu (spora ilość tzw. e-odpadów – z ang. *e-waste*). Wykazano, że zanieczyszczenie obecne w kurzu w pomieszczeniach biurowych sięga od około 30 ng/g do 140 µg/g kurzu, a w budynkach mieszkalnych nawet do 382 ng/g kurzu. W wodach powierzchniowych

stężenie TBBPA sięga od 0,9 µg do nawet 4,87 µg na litr (dane z 2012-2015), a średnia jego zawartość w tkankach ryb wynosiła 28,5–39,4 ng/g tkanki, przy czym najwyższą zawartość wykryto w nerkach tych zwierząt (72,2–126,4 ng/g) (Liu i wsp., 2016; Jarosiewicz i Bukowska, 2017).

Określono również stężenie TBBPA w powietrzu na różnych stanowiskach pracy, takich jak: sklep meblowy, fabryka obwodów elektronicznych, zakład demontażu elektroniki, pracownia komputerowa i pokoje socjalne. Dodatkowo w niektórych miejscach pracy określono narażenie na TBBPA pracowników w wyniku kontaktu tego związku ze skórą. W powietrzu TBBPA występował w stężeniu od poziomu poniżej wykrywalności do 14 600 ng/m³ powietrza. Najwyższe stężenia odnotowano w zakładzie demontażu elektroniki. Należy zaznaczyć, że wartość maksymalnego stężenia TBBPA w tym zakładzie była znacząco wyższa (ponad 300 tys. razy) od mierzonego w powietrzu atmosferycznym w Wielkiej Brytanii (0,7-0,9 pg/m³) czy Niemczech (0,04-0,85 pg/m³) (Abdallah i wsp., 2008; Mäkinen i wsp., 2009). Zhou i wsp. (2014) określili możliwość narażenia pracowników na TBBPA podczas produkcji płytek z obwodami drukowanymi. Autorzy zbadali 3 drogi narażenia na badany związek: pokarmową (w wyniku połknięcia pyłu), oddechową (inhalacja PM10 – cząsteczek o średnicy <10 µm, które mogą docierać do górnych dróg oddechowych i płuc) oraz przez kontakt ze skórą. W badanych próbkach wymienionych wyżej grup narażenia, stężenie TBBPA wynosiło odpowiednio: 70,3-1930 pg/kg; 15,7-431 pg/kg oraz 7,55-96,5 pg/kg masy ciała na dobę (Zhou i wsp., 2014).

TBBPA charakteryzuje się wysoką lipofilnością oraz hydrofobowością, dlatego może przenikać przez błony i bariery biologiczne (bariera łożyskowa, bariera krew-mózg) oraz wnikać do narządów a także komórek (Schauer i wsp., 2006; Szychowski i Wojtowicz, 2013; Jarosiewicz i Bukowska, 2017). Szacuje się, że w ciągu doby osoba dorosła, u której podstawą diety są ryby, przyjmuje TBBPA w ilości 2,6 ng/kg masy ciała. Ta wartość w odniesieniu do niemowląt waha się w zależności od objętości spożywanego mleka, i wynosi ok. 55,7 ng/kg masy ciała na dobę dla niemowląt spożywających mleko krowie. Ustalono również, że okres półtrwania TBBPA w organizmie człowieka wynosi ok. 2 doby. TBBPA jest metabolizowany głównie do postaci glukuronidu i siarczanu-TBBPA, a maksymalne stężenie tych metabolitów TBBPA obecne są po 4 godzinach od ekspozycji (Jarosiewicz i Bukowska, 2017).

1.1.4. Dotychczasowe badania *in vivo* i *in vitro*

Powszechne zastosowanie TBBPA spowodowało narażenie organizmów żywych w tym ludzi na potencjalnie szkodliwe działanie tego związku. Z tego powodu zagadnienia dotyczące toksyczności TBBPA powinny być badane z coraz większą uwagą oraz dokładnością, zwłaszcza w eksperymentach *in vivo*, których dostępne obecnie wyniki są kontrowersyjne i niejednoznaczne.

Choć część autorów wskazuje na niską lub znikomą toksyczność TBBPA u zwierząt i ludzi (m. in. Osimitz i wsp., 2016) istnieje również wiele dowodów wskazujących na jego toksyczne działanie. Ze względu na zbliżoną budowę strukturalną TBBPA do hormonów tarczycy pojawiają się obawy, że związek ten może zaburzać prawidłową gospodarkę hormonalną ludzi i zwierząt (Grasselli i wsp., 2014). Zaobserwowano również, że wywołuje on zaburzenia neurogenezy w obrębie hipokampa (Kim i wsp., 2017). Z kolei w innych badaniach odnotowano znaczny spadek stężenia tyroksyny w surowicy badanych zwierząt i znaczący wzrost masy wątroby a także indukcję cytochromu CYP2B1 u szczurów, którym podawano wysokie dawki TBBPA (500 mg/kg masy ciała) (Choi i wsp., 2011). Choi i wsp. (2011) wykazali, że TBBPA może przyczyniać się do indukcji reaktywnych form tlenu (ROS) w różnych narządach wewnętrznych jak wątroba, nerki. Najnowsze badania (Chen i wsp., 2018) wskazują na synergistyczne, toksyczne działanie TBBPA i kadmu (Cd), substancji występujących w glebie. Obecność TBBPA i Cd pobudziła produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), uruchomiła szlaki obrony antyoksydacyjnej oraz peroksydację lipidów u dwóch gatunków dżdżownic – *M. guillelmi* i *E. fetida*.

W literaturze przeważają opisy badania toksycznych efektów TBBPA *in vitro*. Jedne z nich wykazują zdolność TBBPA do indukcji procesu apoptozy w komórkach ludzkiej neuroblastoma linii SH-SY5Y oraz w hodowlach pierwotnych neuronów. Dowiodły one także, że TBBPA działa m. in. jak agonista receptorów GABA_A a także zaburza transmisję synaptyczną, hamuje działanie receptorów acetylocholinowych (AChR), hamuje aktywność kanałów wapniowych bramkowanych napięciem (VGCC), indukuje powstawanie i agregację β -amyloidu oraz generowanie ROS (Reistad i wsp., 2007; Al-Mousa i Michelangeli 2012, Hendriks i wsp., 2012; Szychowski i Wojtowicz, 2013). Eksperymenty przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że TBBPA w stężeniu 10 oraz 20 μ M nasilał uwalnianie czynników prozapalnych - interleukin 6 i 8 a także prostaglandyny E2 w ludzkiej linii komórek łożyska pierwszego trymestru HTR-8/SVneo, a hamował uwalnianie przeciwzapalnego czynnika TGF- β (Park i wsp., 2014). Te same badania ujawniły również

indukowaną przez TBBPA zwiększoną ekspresję genów białek zaangażowanych w szlaki zapalne. Jedne z nowszych badań prowadzonych na kapilarach mózgu szczura wskazują, że TBBPA w istotnych dla środowiska stężeniach 1-100 nM wpływa na zmiany w aktywności transportera ABC (odpowiadającego za transport ATP) oraz białka BCRP (ang. *breast cancer resistant protein*) występującego w barierze krew-mózg (BBB – *blood-brain barrier*). Co ważne, indukowane przez TBBPA zmiany w przepuszczalności BBB mogą prowadzić do zaburzeń funkcji mózgu oraz zwiększyć jego wrażliwość na szkodliwe substancje (Cannon i wsp., 2019). Inne eksperymenty wykazały, że ekspozycja szczurzych hepatocytów na TBBPA powodowała obniżenie zawartości ATP, nukleotydów adeninowych, glutationu i tioli białkowych, co prawdopodobnie było spowodowane dysfunkcją mitochondriów (Nakagawa i wsp., 2007). Choi i wsp. (2017) w badaniach na linii komórkowej osteoblastów MC3T3-E1 opisali nie tylko spadek poziomu ATP wywołany obecnością TBBPA, lecz także wzrost produkcji ROS, peroksydację kardiolipiny oraz uwalniania cytochromu c i cyklofiliny A i B, co może prowadzić do inicjacji procesów apoptozy lub nekrozy. Ponadto, w innych badaniach, po podaniu TBBPA zaobserwowano również zwiększenie aktywności kaspazy-3 i powstawanie ciałek apoptotycznych (Szychowski i Wojtowicz, 2016), a Wu i wsp. (2018) zaobserwowali indukcję tworzenia ROS i zwiększenie zawartości MDA (dialdehyd malonowy - marker peroksydacji lipidów) w ludzkich komórkach nabłonkowych dróg oddechowych (linia A549) co może świadczyć o uszkodzeniu mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej. W modelu badawczym wykorzystującym synaptosomy izolowane z mózgu szczura, zaobserwowano zahamowanie przez TBBPA pobierania glutaminianu, GABA i dopaminy (Mariussen i Fonnum 2003). W eksperymentach przeprowadzonych przez Ogunbayo i Michelangeli (2007) na frakcjach retikulum sarkoplazmatycznego pozyskanych z mięśni szkieletowych królika oraz na mikrosomach mózdzku świni, wykazano bezpośrednie hamowanie ATP-azy SERCA po ekspozycji na TBBPA. Innymi ważnymi w utrzymaniu komórkowej homeostazy wapnia kanałami, blokowanymi przez TBBPA są kanały wapniowe bramkowane napięciem – VGCC (Hendriks i wsp., 2012). Ponadto, w poprzednich badaniach grupy Ziemska i wsp. (2017b) przeprowadzonych na hodowlach CGC wykazano znaczny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów cynku (Zn^{2+}) po ekspozycji komórek na TBBPA. Zaobserwowano również zmniejszenie całkowitej zawartości Zn^{2+} komórkowego, związane z przemieszczeniem się tego jonu do środowiska zewnątrzkomórkowego, co sugeruje udział TBBPA w wyczerpywaniu zasobów Zn^{2+} w komórkach hodowli. W innych badaniach

wykazano również, że TBBPA zaburza integralność błon lipidowych (Ogunbayo i wsp., 2007) oraz zakłóca szlaki sygnalizacji z udziałem kinaz MAP w komórkach ziarnistych mózdzku (Strack i wsp., 2007). Badania naszej pracowni również potwierdziły wyniki pierwotnie opisane przez Mariussen i Fonnum (2003), Reistad i wsp. (2005, 2007), Ogunbayo i wsp. (2008) wskazujące, że TBBPA zaburza homeostazę wapnia i indukuje stres oksydacyjny. Efekty te są częściowo odwracane przez antagonistów receptora NMDA, co sugeruje rolę ekscytotoksyczności w mechanizmie toksycznego działania TBBPA.

Podsumowując, rozsiane w literaturze wyniki wcześniejszych badań na różnych modelach komórkowych wskazywały na udział w mechanizmie cytotoksycznego działania TBBPA zaburzeń homeostazy wapnia, stresu oksydacyjnego, obniżenia potencjału energetycznego komórek oraz upośledzenia pobierania zwrotnego glutaminianu (Mariussen i Fonnum 2003; Reistad i wsp. 2005, 2007; Ogunbayo i wsp. 2008). Wcześniejsze eksperymenty na hodowlach pierwotnych CGC pokazały że MK-801, który jest antagonistą receptorów NMDA, częściowo zapobiega cytotoksyczności TBBPA (Reistad i wsp. 2007). Dało to podstawę dla hipotezy, że w indukowanym przez TBBPA uszkodzeniu neuronów pełnią znaczącą rolę w mechanizmach toksyczności pobudzeniowej (ekscytotoksyczności), w których pośredniczą receptory NMDA, niekontrolowany wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki o złożonym mechanizmie, oraz stres oksydacyjny (Ziemińska i wsp. 2012, 2014, 2015, 2017), Poniżej, na tle literatury i w sposób bardziej szczegółowy zostaną przedstawione wyniki poprzednich badań Pracowni Farmakoneurochemii, będące punktem wyjścia dla moich eksperymentów opisanych w niniejszej rozprawie.

1.2. Rola jonów wapnia w komórkach nerwowych

1.2.1. Funkcje, regulacja, homeostaza

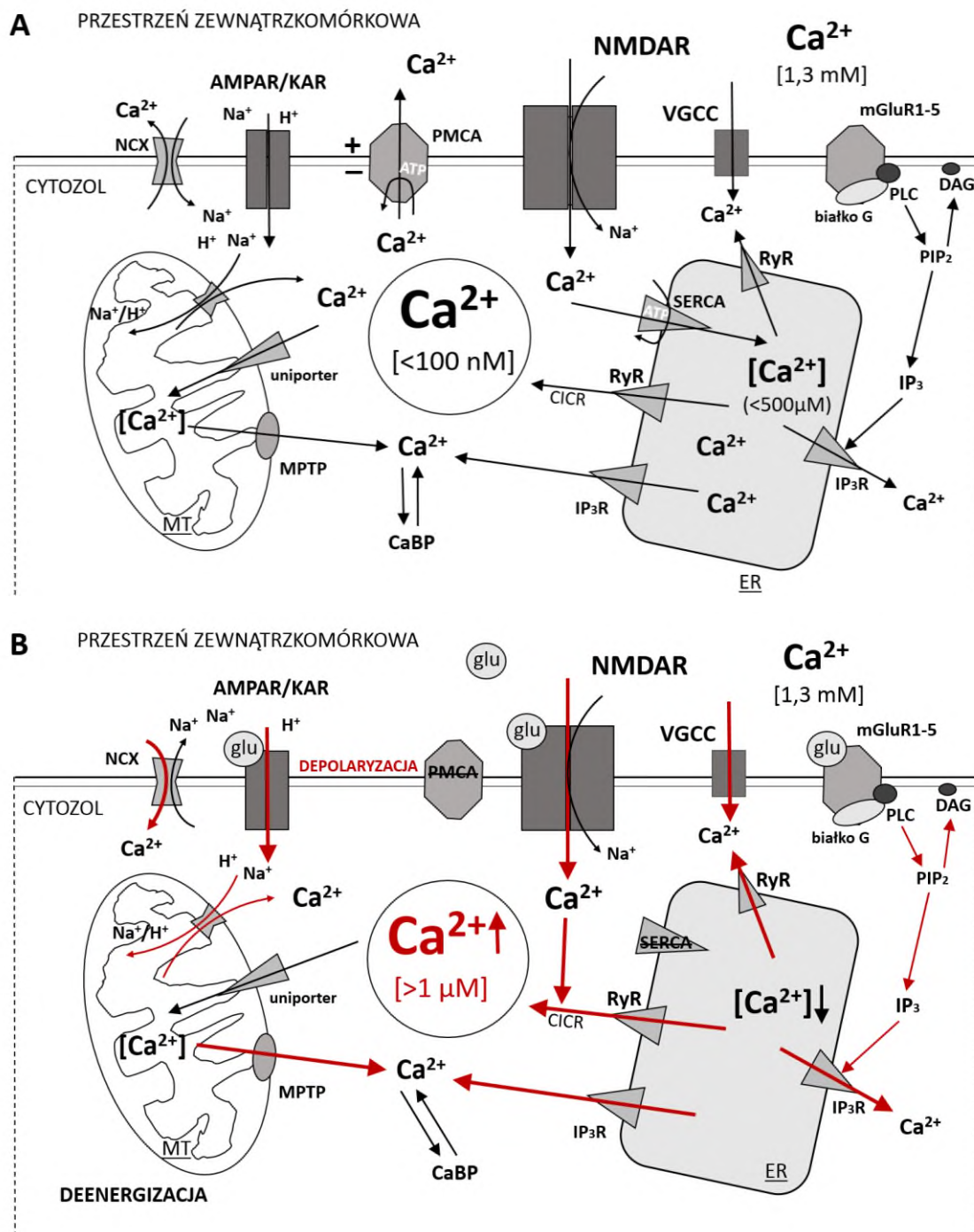
Utrzymanie homeostazy wapniowej w neuronach jest niezmiernie ważne dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Jony wapnia (Ca^{2+}) są przekaźnikami mającymi zdolność do regulowania wielu szlaków metabolicznych zarówno poprzez wiązanie się ze specyficznymi enzymami jak i białkami regulatorowymi, tym samym oddziałując na procesy fosforylacji i defosforylacji białek (Abdel-Latif, 1986).

Fizjologiczne stężenie Ca^{2+} w cytozolu komórki nerwowej w stanie spoczynkowym, nie przekracza 10^{-7} M, natomiast w środowisku zewnątrzkomórkowym (krew oraz płyny tkankowe) jest utrzymywane na poziomie 10^{-3} M (Salińska i Łazarewicz, 2012). W komórkach pobudliwych, jakimi są neurony, jony te pośredniczą w reakcji na otrzymane bodźce, a także uczestniczą w regulacji ich pobudliwości, przewodzeniu impulsów,

uwalnianiu neuroprzekazników i transdukcji sygnału w części postsynaptycznej synaps pobudzających. W układzie nerwowym jony Ca^{2+} są zaangażowane w neurotransmisję na wielu poziomach tego procesu, tak więc bardzo istotne jest utrzymanie prawidłowej homeostazy jonów wapnia, którą zaburza obecność TBBPA (Ogunbayo i wsp., 2008; Zieminska i wsp., 2017a).

Sygnał wapniowy, zapoczątkowany sygnałem zewnątrzkomórkowym odbieranym w postaci pobudzenia synaptycznego docierającego do komórek nerwowych, jest generowany w przebiegu neurotransmisji chemicznej lub elektrycznej (Berridge, 2012). W wyniku depolaryzacji błony plazmatycznej i/lub aktywacji receptorów, następuje napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki ze środowiska zewnątrzkomórkowego lub z wewnątrzkomórkowych zasobów jonów wapnia (retikulum endoplazmatyczne - ER), co prowadzi do wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie (Ryc. 3). Napływ Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego następuje głównie przez kanały wapniowe bramkowane napięciem VGCC oraz kanały receptorów jonotropowych dla kwasu glutaminowego; głównie NMDAR, a w mniejszym stopniu receptorów AMPA oraz kainianowych (KA) (Danysz i wsp., 2004; Nakamura i Lipton, 2010). Mobilizacja Ca^{2+} z siateczki endoplazmatycznej następuje za pośrednictwem wtórnego przekaznika IP_3 i specyficznych dla niego receptorów (IP_3R) znajdujących się na ER, co jest poprzedzone pobudzeniem receptorów metabotropowych sprzężonych za pośrednictwem białek G z fosfolipazą C (PLC). Należą do nich receptory metabotropowe glutaminianu (mGluR) grupy I (Carrasco i wsp., 2004).

Krótkotrwały wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu spowodowany napływem z zewnątrz może być wzmocniony i przedłużony w wyniku mechanizmu wtórnego uwalniania Ca^{2+} z ER, który następuje głównie za pośrednictwem receptorów rianodynowych (RyR) – jest to kaskada zwana CICR (z ang. *calcium-induced calcium release*) (Berridge, 2002). Nawet niewielki napływ Ca^{2+} do komórki przez zaktywowane receptory NMDA jest w stanie pobudzić i otworzyć receptory rianodynowe, uwalniając tym samym do cytozolu zmagazynowane jony wapnia, podwyższając $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Verkhatsky, 2002).



Rycina 3. Komórkowa homeostaza Ca^{2+} na przykładzie neuronów glutaminianergicznyc. (A) Warunki prawidłowe - ściśle kontrolowany napływ Ca^{2+} głównie przez VGCC i NMDAR, jest stale równoważony przez usuwanie jonów wapnia z neuronów za pomocą pompy PMCA i wymiennika NCX, wewnątrzkomórkowe buforowanie za pomocą białek wiążących wapń (CaBP) a także pobieranie do ER i mitochondriów. (B) Warunki niedoboru energetycznego - nadmierne pobudzenie VGCC i NMDAR prowadzi do napływu Ca^{2+} do komórki dodatkowo wspomaganego przez odwrócenie trybu pracy NCX i depolaryzację błony komórkowej. Następuje hamowanie ATPaz a wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu indukuje wyrzut wapnia z zasobów retikulum za pośrednictwem IP₃R i RyR (CICR). Przeładowanie mitochondriów Ca^{2+} prowadzi do ich deenergizacji, aktywacji MPTP i uwolnienia jonów wapnia z mitochondriów (schemat na podstawie pracy Salinska i Lazarewicz, 2012).

Samo wniknięcie Ca^{2+} do neuronu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej uruchamia jedynie sygnał o niewielkiej amplitudzie i o lokalnym charakterze, natomiast CICR sprawia, że sygnał wapniowy staje się rozleglejszy i utrzymuje się dłużej (Alkon i wsp., 1998). Tak więc znaczenie czynnościowe tej kaskady polega na wzmacnianiu i przedłużaniu sygnału wapniowego w neuronach (Verkhatsky i Toescu, 2003). RyR pośredniczą w uwalnianiu Ca^{2+} z zasobów wewnątrzkomórkowych w retikulum endoplazmatycznym, a ich nazwa wywodzi się od ich egzogenego liganda – rianodyny. Receptory te odgrywają istotną rolę w mechanizmie podwyższania wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, a ich dysfunkcja może prowadzić do zaburzenia czynności i śmierci komórki. Mechanizm działania RyR jest dosyć specyficzny, ponieważ są one w stanie uwolnić znaczne ilości jonów Ca^{2+} w zależności od aktualnego stężenia Ca^{2+} w cytozolu (Verkhatsky, 2002).

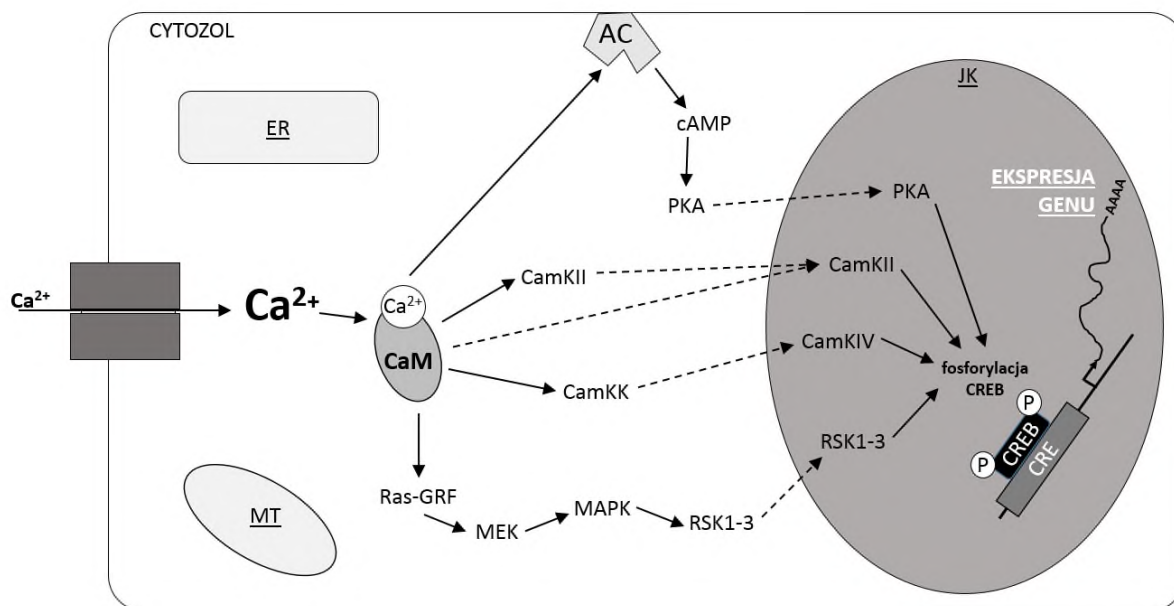
Receptory rianodynowe ekspresjonowane są jako trzy różne izoformy: RyR1 (mięśnie szkieletowe), RyR2 (mięsień sercowy i mózg) oraz RyR3 (mózg) (Santulli i Marks, 2015). Stan aktywacji RyR jest modulowany poprzez rodzinę białek wiążących FK-506 – immunofilinę FKBP12, która przyłączając się do receptora zarówno w neuronach jak i innych tkankach reguluje jego aktywność. Wiązanie i regulacja FKBP12 mogą być zahamowane poprzez wspomniane białko FK-506, które powoduje dysocjację FKBP12 od kompleksu receptora, tym samym zwiększa wypływ jonów wapnia z ER (Ozawa, 2008). Wiadomo, że także inne substancje farmakologiczne jak np. tapsigargina oraz bastadyny podane w wyższych stężeniach mikromolowych powodują dysocjację FKBP12 z kompleksu z białkiem RyR, co powoduje przekształcenie go w niewrażliwy na działanie hamujące rianodyny kanał przeciekowy (ang. *leak channel*). W konsekwencji dochodzi do opróżnienia zasobów wapniowych w ER (Pessah i wsp., 1997, 2010). Ci sami autorzy wykazali również, że bastadyny w znacznie niższych stężeniach mikromolowych zapobiegają uwalnianiu FKBP12 i przekształceniu RyR w kanał przeciekowy.

Wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu oraz uzupełnianie zapasów wapnia gromadzonego wewnątrzkomórkowo następuje także dzięki powszechnemu mechanizmowi zwanemu pojemnościowym napływem jonów wapnia do komórki (z ang. *Store-Operated Calcium Entry* – SOCE), pierwotnie zidentyfikowanemu w komórkach niepobudliwych elektrycznie. Jest to napływ jonów wapnia do wnętrza komórek w odpowiedzi na wyczerpanie wewnątrzkomórkowych magazynów Ca^{2+} , które znajdują się głównie w retikulum endoplazmatycznym (ER). Proces ten jest regulowany przez białka STIM1 i STIM2 pełniące rolę czujników reagujących na stopień opróżnienia magazynów

wapniowych w komórce, a także białka Orai1 znajdujące się na błonie komórkowej, które wraz ze zaktywowanymi białkami STIM tworzą kanał wapniowy. Prowadzi to do podtrzymywania sygnalizacji wapniowej w komórce oraz uzupełniania zapasów Ca^{2+} w ER (Węgierski i Kuźnicki, 2018).

Dla utrzymania i wyrównywania bilansu wapniowego w komórkach istnieją mechanizmy odpowiadające za usuwanie tych jonów na zewnątrz komórki – jednym z ważniejszych jest reakcja hydrolizy ATP przez PMCA (ATP-aza wapniowa błony plazmatycznej), gdzie wypływowi Ca^{2+} z cytoplazmy towarzyszy napływ protonów do światła komórki. PMCA cechuje się względnie niską wydajnością, lecz wysokim powinowactwem do jonów wapnia – w przeciwieństwie do białka transportowego NCX pełniącego rolę wymiennika wykorzystującego energię elektrochemicznego gradientu jonów sodu (Lytton, 2007). Działanie tego białka polega na wymianie 1Ca^{2+} na 3Na^+ lub 1Ca^{2+} i K^+ na 4Na^+ . Mechanizm jest odwracalny, a kierunek transportu jest regulowany przez gradienty stężeń tych jonów i potencjał błonowy. Sposobem na buforowanie stężenia jonów Ca^{2+} jest również pobieranie ich przez organelle komórkowe takie jak mitochondria i ER. Zewnętrzna błona mitochondrialna jest przepuszczalna dla substancji o niskiej masie cząsteczkowej a transport Ca^{2+} przez błonę wewnętrzną odbywa się na zasadzie uniportu napędzanego przez potencjał mitochondrialny i gradient elektrochemiczny jonów wapnia (Nicholls, 2009). Pobieranie Ca^{2+} przez mitochondria cechuje się względnie niskim powinowactwem, ale dużą pojemnością. W warunkach przeładowywania mitochondriów Ca^{2+} następuje jego uwalnianie dzięki megakanałom MPTP (z ang. *mitochondrial permeability transition pore*), co jest elementem mechanizmu obronnego rozładowującego potencjał mitochondrialny i ograniczającego produkcję wolnych rodników, a zarazem może być elementem dysfunkcyjnym prowadzącym do śmierci komórkowej o charakterze apoptotycznym (Pivovarova i Andrews, 2010). Głównym magazynem jonów wapnia w komórce jest ER. Zawiera ono szereg białek regulujących stężenie Ca^{2+} w cytozolu m. in. wapniową ATP-azę SERCA (ang. *sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase*) oraz receptory RyR i IP_3 odpowiedzialne za transport Ca^{2+} do/z ER (Guerrero-Hernandez i wsp., 2010). Ważnym elementem regulacji stężenia Ca^{2+} panującego w komórce są białka o wysokim powinowactwie do jonów wapnia (CaBP), których rolą jest wiązanie wolnych jonów wapnia. O ważnej roli CaBP świadczy fakt, że tylko 1% z puli Ca^{2+} występuje w postaci niezwiązanej (Sun i wsp., 2010). Wśród nich wyróżnia się bufory wapniowe: kalbindynę,

parwalbuminę i kalretinę oraz sensory wapnia: kalmodulinę, kalcyneurynę, troponinę i neuronalne sensory wapnia (Wojda i wsp., 2008).



Rycina 4. Rola Ca^{2+} w przekazywaniu sygnału uruchamiającego transkrypcję genów w neuronach. JK – jądro komórkowe; ER – retikulum endoplazmatyczne; MT – mitochondria. (rycina na podstawie pracy Salińska i Łazarewicz, 2012).

Wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu wywołuje w komórce szybkie odpowiedzi za pośrednictwem wyspecjalizowanych białek. Długotrwałe zmiany strukturalne i funkcjonalne komórki, będące odpowiedzią na sygnał wapniowy, zachodzą dzięki uruchomieniu szlaków specyficznych kinaz (Ryc. 4), które wpływają na zmianę poziomu ekspresji genów dzięki fosforylacji czynnika transkrypcyjnego – CREB (Salińska i Łazarewicz, 2012). Napływ jonów wapnia do wnętrza komórek nerwowych przez głównie NMDA i VGCC powoduje aktywację szlaków sygnałowych cykazy adenylanowej (AC) oraz kinazy aktywowanej kompleksem Ca^{2+} /kalmodulina (CaM) przez białko Ras. Każdy z tych szlaków prowadzi do przekazania sygnału do jądra poprzez przetransportowanie i aktywację kinaz PKA, CaMKII i RSK1-3 oraz aktywację kinaz jądrowych (CaMKII i IV), co w efekcie umożliwia fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB i rozpoczęcie transkrypcji danego genu (Salińska i Łazarewicz, 2012).

1.2.2. Zaburzenia homeostazy wapniowej indukowane przez TBBPA

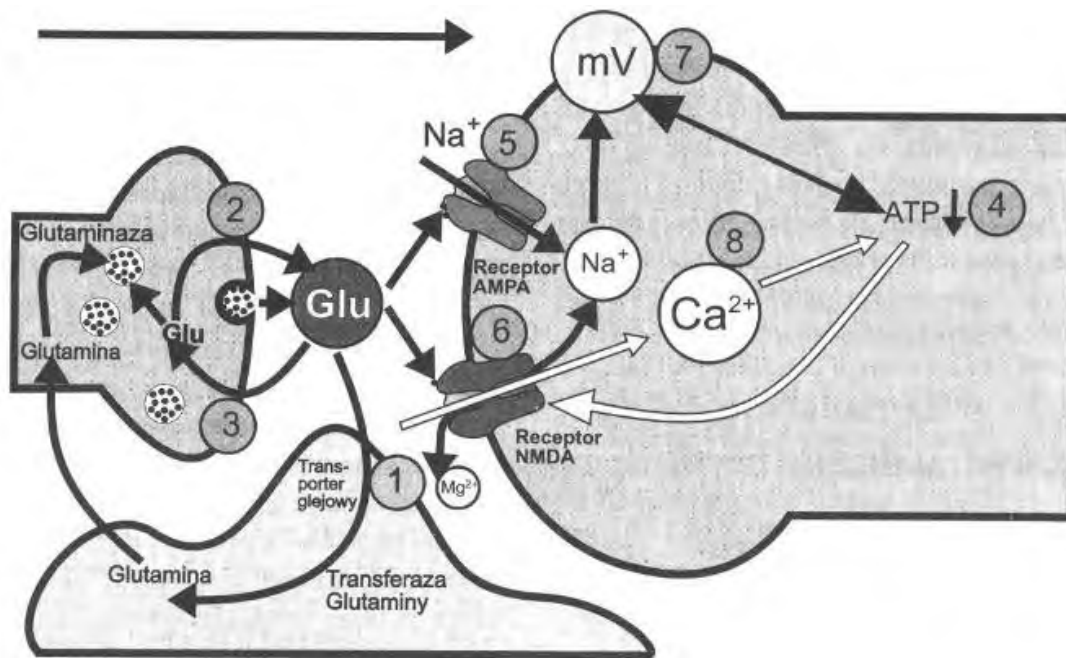
Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w hodowlach CGC ekspozowanych na TBBPA został po raz pierwszy opisany w pracy Reistad i wsp. (2007). Autorzy ci sugerowali, że może to być efekt aktywacji jonotropowych receptorów dla glutaminianu tj. NMDAR i AMPAR. Poprzednie

badania naszej pracowni potwierdziły to przypuszczenie i wykazały, że zależny od stężenia TBBPA wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w CGC jest częściowo hamowany przez antagonistę NMDAR – MK-801, co wskazuje na udział tych receptorów w mechanizmie omawianego efektu (Ziemińska i wsp. 2015). Jednakże mechanizm indukowanego przez TBBPA wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ w komórkach okazał się być bardziej złożony. Badania grupy Michelangeli prowadzone na modelu linii komórkowej TM4 wywodzącej się z komórek Sertoliego pokazały, że TBBPA silnie hamuje ATPazę wapniową SERCA i indukuje mobilizację Ca^{2+} z zasobów wewnątrzkomórkowych za pośrednictwem receptorów rianodynowych (RyR) (Ogunbayo i wsp. 2008). Badania prowadzone poprzednio w naszej pracowni pokazały, że także w hodowlach pierwotnych CGC wzrost $[Ca^{2+}]_i$ wywołany przez TBBPA można po części przypisać uwalnianiu wapnia wewnątrzkomórkowego, oraz że ten efekt ma charakterystykę farmakologiczną zbliżoną do modelowej substancji uwalniającej wapń wewnątrzkomórkowy – tapsigarginy (Ziemińska i wsp. 2014). W obu wypadkach wzrost $[Ca^{2+}]_i$ można było silnie zahamować podając kombinację ligandów RyR 200 μ M rianodynę i 2,5 μ M bastadynę, która jest bromowaną cykliczną pochodną tyrozyny, natomiast sama rianodyna miała bardzo słaby efekt hamujący. Istota interakcji TBBPA z RyR wydaje się więc być podobna do omówionego powyżej działania tapsigarginy, i polegać na przekształceniu tych receptorów w dysfunkcjonalne kanały ciekące (Ziemińska i wsp. 2014). Co więcej, dalsze badania pokazały, że jednoczesne zastosowanie inhibitora NMDAR - MK-801 oraz kombinacji ligandów RyR - bastadyny i rianodyny, całkowicie zapobiega indukowanemu przez TBBPA wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ w CGC (Ziemińska i wsp. 2015). To odkrycie dostarczyło narzędzi do dalszych badań nad zależnymi i niezależnymi od wapnia mechanizmami cytotoksyczności TBBPA.

Dla uzupełnienia informacji o wpływie TBBPA na homeostazę wapnia w neuronach należy przypomnieć, że ta substancja okazała się silnym inhibitorem napięciowo-zależnych kanałów wapniowych (Hendriks i wsp., 2012). Wyniki uzyskane w naszej pracowni pokazały, że TBBPA indukuje wzrost $[Zn^{2+}]_i$ w komórkach hodowli CGC, a także w środowisku zewnątrzkomórkowym, któremu można po części przypisać wpływ neuroprotektyny (Ziemińska i wsp., 2017b). Według mojej wiedzy brak jest w literaturze danych na temat wpływu TBBPA na homeostazę innych kationów w neuronach.

1.3. Glutaminian – metabolizm, funkcje i transport

Kwas glutaminowy jest aminokwasem będącym nie tylko składnikiem białek, lecz także biorącym udział w przekazie sygnału w układzie nerwowym. Glutaminian jest najczęściej występującym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w układzie nerwowym kręgowców (Meldrum, 2000), a jego stężenie w szczeliny synaptycznej podczas pobudzenia neuronów może wzrosnąć do 1 mM. Jednak w krótkim czasie po pobudzeniu komórek nerwowych stężenie glutaminianu spada do wartości podstawowych tj. około 1 – 2 μM (Sopala i Danysz, 2005).



Rycina 5. Schemat przedstawiający synapsę glutaminianergiczną z uwzględnieniem metabolizmu, uwalniania i wychwytu zwrotnego glutaminianu oraz występowania receptorów jonotropowych. Numerami oznaczono kluczowe zjawiska: (1) glejowy wychwyt zwrotny; (2) uwalnianie kwasu glutaminowego z neuronów presynaptycznych; (3) neuronalny wychwyt zwrotny; (4) stan zasobów energetycznych neuronu; (5) AMPAR; (6) NMDAR; (7) potencjał błonowy neuronu (8) stężenie i kompartmentalizacja jonów wapniowych. (według Sopala i Danysz, 2005)

Glutaminian może być syntetyzowany z kwasu α -ketoglutarowego pochodzącego z cyklu Krebsa w obecności NH_4 i NADPH lub na drodze deamidacji glutaminy dzięki aktywności enzymu – glutaminazy (Ryc. 5). Należy również wspomnieć, że glutaminian jest ważnym prekursorem w syntezie innego neurotransmitera – GABA – dzięki aktywności enzymu dekarboksylazy glutaminianowej (Erecinska i Silver, 1990; Danbolt, 2011). Nadmiar glutaminianu jest również w sposób ciągły przekształcany do postaci α -ketoglutaranu poprzez deaminację (przez GPT) lub przez transaminację (z udziałem transaminaz) i metabolizowany kolejno przez cykl kwasów trójkarboksylowych do bursztynianu, fumaranu i jabłczanu (Foran i

Trott, 2009). Uwolnienie glutaminianu z pęcherzyków synaptycznych do szczeliny synaptycznej następuje za sprawą depolaryzacji błony komórkowej zakończeń presynaptycznych neuronów glutaminianergicznym. Czynnikiem wyzwalającym uwalnianie neurotransmiterów, w tym glutaminianu z puli pęcherzykowej jest wzrost stężenia Ca^{2+} w zakońzeniach synaptycznych. Zwiększone stężenie glutaminianu pojawiającego się w szczeliny synaptycznej są w stanie pobudzić dwa rodzaje receptorów: jonotropowe oraz metabotropowe (Sopala i Danysz, 2005).

Receptory metabotropowe, sprzężone z białkiem G, tworzą 3 grupy: I (mGluR₁ i mGluR₅), II (mGluR₂ i mGluR₃) oraz III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ i mGluR₈) (Swanson i wsp., 2005). Pierwsza grupa receptorów stymuluje fosfolipazę C, która katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolu (PI) do IP₃ i diacyloglicerolu (DAG). Trifosforan inozytolu przenika do wnętrza komórki i może aktywować receptory obecne na ER indukując uwalnianie wapnia i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , natomiast DAG pełni rolę aktywatora dla kinazy białkowej C (PKC). Receptory grupy II oraz III mają właściwości hamujące uwalnianie neuroprzekaźników i obniżenie aktywności cyklazy adenylowej (AC) powodując tym samym spadek poziomu cAMP wewnątrz komórki, aczkolwiek grupy te różnią się preferencjami w stosunku do agonistów (Sopala i Danysz, 2005).

Odrębną klasą receptorów, są receptory jonotropowe typu NMDA, AMPA i KA. Mechanizmowi działania NMDAR został poświęcony osobny podrozdział (patrz 1.4), ponieważ jego wadliwe działanie prowadzące do niekontrolowanego wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ jest uważane za jedną z głównych przyczyn śmierci komórek w toksycznym działaniu TBBPA (Ziemska i wsp., 2015). Receptory AMPA, które mają mniejsze powinowactwo do glutaminianu niż NMDAR, mają podstawowe znaczenie w szybkim przekaźnictwie synaptycznym zachodzącym w układzie glutaminianergicznym. Ich kanał jonowy przepuszczalny jest dla jednowartościowych jonów sodu oraz potasu, a wyjątkowo także dla Ca^{2+} przy zmiennym składzie podjednostkowym (Rogawski, 2013). Receptory kainianowe (KA), mogą działać w dwojaki sposób – jako receptory jonotropowe oraz metabotropowe. Pośredniczą w depolaryzacji postsynaptycznej, mogą modulować presynaptyczne uwalnianie neuroprzekaźników takich jak GABA i glutaminian, które jest zależne od stężenia Ca^{2+} , odgrywają znaczącą rolę w powstawaniu obwodów nerwowych podczas rozwoju (Lerma i Marques, 2013).

Transport glutaminianu przez błonę komórkową i błony wewnątrzkomórkowe odbywa się przy udziale trzech klas transporterów: EAAT's (z ang. *excitatory amino acid transporter*),

VGLUT (z ang. *vesicular glutamate transporter*) i xCT (*cystine-glutamate antiporter*) (Danbolt, 2001). Pierwsza klasa transporterów działa na zasadzie gradientu elektrochemicznego jonów Na^+ i wyróżnić w niej można 5 białek: EAAT1 - EAAT5, przy czym około 90% transportu glutaminianu odbywa się dzięki aktywności EAAT2 w komórkach astrogleju (Holmseth i wsp., 2009). Prawidłowe działanie EAAT zależne jest też od gradientu błonowego jonów K^+ i H^+ . Na transport jednej cząsteczki glutaminianu przypada wymiana 3Na^+ i 1H^+ na 1K^+ (Danbolt, 2001; Kandel i wsp., 2013). Funkcja EAAT's polega na pobieraniu zwrotnym glutaminianu do neuronów i komórek glejowych. Pęcherzykowe transportery glutaminianu klasy VGLUT dzielą się na 3 podklasy: VGLUT1-3, ich aktywność zależy od gradientu protonów, a rola polega na nagromadzeniu glutaminianu wewnątrz pęcherzyków synaptycznych, z których następnie uwalniany jest on do synapsy (Shigeri i wsp., 2004). Trzecią klasą transporterów glutaminianu jest tzw. wymiennik cystyna-glutaminian (xCT). Transporter ten został po raz pierwszy opisany po zbadaniu ludzkich fibroblastów, jako elektroobojętny cystynowy wymiennik glutaminianu, który podczas pobrania jednej cząsteczki cystyny do komórki, uwalnia jedną cząsteczkę glutaminianu z wnętrza komórki (Bannai, 1986).

Glutaminian jest głównym mediatorem sygnałów pobudzających oraz plastyczności układu nerwowego. Dla zachowania prawidłowej funkcji neuronów, glutaminian powinien być obecny w odpowiednich stężeniach we właściwych miejscach i we właściwym czasie. Następnie, komórki powinny wykazywać odpowiednią wrażliwość na glutaminian i w razie niekontrolowanego wzrostu jego stężenia na zewnątrz komórek, uruchamiać sprawne mechanizmy jego usuwania z odpowiednią wydajnością i specyfiką lokalizacyjną. Zarówno nadmiar glutaminianu, jak i jego niedobór są szkodliwe. Nadmierna aktywacja receptorów glutaminianowych może pobudzać komórki nerwowe zbyt długo i intensywnie, co w efekcie może prowadzić do ich śmierci, w procesie określanym jako „ekscytotoksyczność” (Danbolt, 2011).

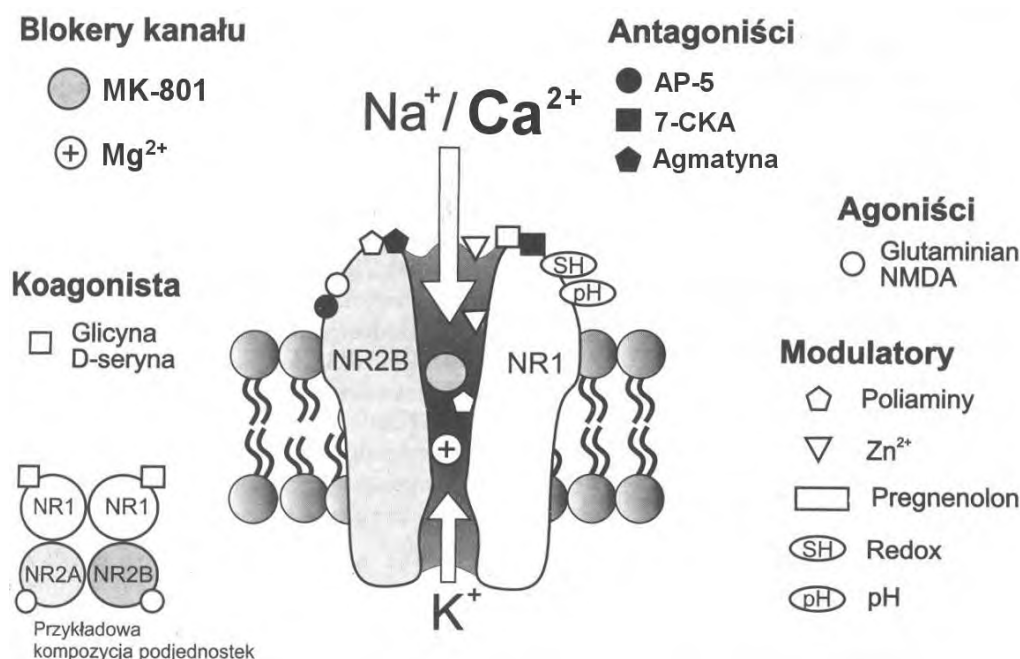
W literaturze dostępne są tylko nieliczne informacje o wpływie TBBPA na transport i kompartmentację glutaminianu w neuronach. Reistad i wsp. (2007) opisali powolne narastanie stężenia pobudzających aminokwasów – glutaminianu i asparaginianu w środowisku zewnątrzkomórkowym hodowli pierwotnych CGC eksponowanych na $10\ \mu\text{M}$ TBBPA. Mechanizm tego zjawiska autorzy powiązali z hamowaniem pobierania znakowanych izotopami neuroprzekaźników, w tym glutaminianu, przez frakcję synaptosomów izolowanych z kory mózgu szczura (Mariussen i Fonnum 2003), co sugeruje hamowanie przez TBBPA wychwytu zwrotnego tego neuroprzekaźnika. O udziale wzrostu zewnątrzkomórkowego

stężenia glutaminianu w neurotoksyczności TBBPA świadczy także obserwacja, że MK-801, antagonistą NMDAR, obniża jego działanie toksyczne (Reistad i wsp., 2007; Ziemińska i wsp., 2015).

1.4. Receptory NMDA

W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), receptory NMDA występują powszechnie, lecz ich największą gęstość opisano w korze mózgowej, hipokampie (rejon CA1), przegrodzie, jądrach podstawy i jądrze migdałowym. Występują one przede wszystkim postsynaptycznie (Sopala i Danysz, 2005). NMDAR to kanały kationowe bramkowane glutaminianem o wysokiej przepuszczalności dla jonów wapnia, odgrywając ważną rolę w funkcjonowaniu neuronów. Są one kluczowe dla rozwoju OUN, generowania rytmów oddechowych i ruchowych oraz procesów leżących u podstaw uczenia się, pamięci i neuroplastyczności. W konsekwencji, nieprawidłowe poziomy ekspresji i zmieniona funkcja NMDAR skutkują licznymi zaburzeniami neurologicznymi i stanami patologicznymi (m. in. padaczką, depresją, schizofrenią, chorobą Alzheimera oraz Parkinsona) (Blanke i VanDongen, 2009).

Receptory NMDA są heteromerycznymi kompleksami złożonymi z czterech podjednostek pochodzących z trzech spokrewnionych rodzin: podjednostek NR1, NR2 i NR3 (Mori i Mishina, 1995). Podjednostka NR1 zawiera miejsce wiązania glicyny, podczas gdy domena homologiczna na podjednostce NR2 zawiera miejsce wiązania glutaminianu. Dobrze funkcjonujący receptor reagujący na agonistów takich jak glutaminian i glicyna wymaga obecności zarówno podjednostek NR1, jak i NR2 (Ryc. 6). Badania wskazują, że pojedynczy kompleks NMDAR zawiera dwie podjednostki NR1 i dwie podjednostki NR2 (Ryc. 6) (Laube i wsp., 1998). Podjednostka NR3 może tworzyć kompleksy z podjednostkami NR1, tworząc receptor pobudzający, który reaguje na glicynę nie wymagając przy tym obecności L-glutaminianu (Chatterton i wsp., 2002). Dzięki alternatywnemu splicing'owi, występuje 8 różnych izoform podjednostki NR1: NR1-1a (najczęściej ekspresjonowana), NR1-1b, NR1-2a, NR1-2b, NR1-3a, NR1-3b, NR1-4a, NR1-4b (Stephenson, 2006). Podjednostkę NR2 mogą tworzyć 4 izoformy: NR2A, NR2B, NR2C i NR2D (Teng i wsp., 2010).



Rycina 6. Schemat receptora NMDA z uwzględnieniem głównych miejsc modulujących oraz tetramerycznego układu podjednostek tworzących receptor (schemat na podstawie pracy Sopala i Danysz, 2005).

Receptor NMDA, jako jedyny spośród receptorów jonotropowych, posiada zależną od potencjału blokadę kanału jonowego w której uczestniczą dwuwartościowe jony magnezu – Mg²⁺ (Danysz i wsp., 1995). Kanał ten jest kompletnie blokowany przy potencjale błonowym -70 mV, a wraz z depolaryzacją blokada ta maleje. Należy również zaznaczyć, że sam kanał jest ważnym miejscem wiązania różnych substancji – tzw. blokerów kanału receptora NMDA. Takimi substancjami są MK-801, memantyna, ketamina czy fencyklidyna (PCP), które uważane są za antagonistów niekompetytywnych (tj. niekonkurujących o miejsce wiązania z głównym agonistą ani nie działających na miejsca allosteryczne). Związki blokujące działanie kanału wymagają jego wstępnej aktywacji, co jest warunkiem wejścia do wnętrza komórek i kompletnego hamowania aktywności NMDAR (Sopala i Danysz, 2005). Szereg naturalnych i syntetycznych substancji, w tym poliaminy, Zn²⁺, sterydy, odczynniki redoks są modulatorami receptorów NMDA. Działają one na zewnątrzkomórkowe domeny receptora, zwiększając lub zmniejszając strumień jonów Ca²⁺ przepływający przez kanały NMDAR (Williams, 2009). Wiadomo, że obecność poliamin takich jak spermidyna czy spermina dodatkowo wzmacnia aktywność pobudzonego przez glutaminian i glicynę receptora NMDA (Ransom i Stec, 1988). Natomiast obecność jonów Zn²⁺ wpływa hamująco na receptor NMDA w dwojaki sposób – zależnie od jego stężenia. Niskie stężenia jonów cynku (1-10 μM) są w stanie zmniejszać prawdopodobieństwo otwierania się kanału NMDAR, natomiast wyższe stężenia (10-100 μM)

cynku przy ujemnych wartościach potencjału błony, dodatkowo wywołują efekt szybkiej blokady tego receptora (Christine i Choi, 1990).

W warunkach spoczynkowego potencjału błonowego, jony Mg^{2+} wnikają do kanałów NMDAR, ale w przeciwieństwie do przenikających jonów Ca^{2+} , wiążą się ściśle i zapobiegają dalszemu wnikaniu jonów do komórki (Mayer i wsp., 1984). Jony magnezu występują w milimolowych stężeniach w środowisku zewnątrzkomórkowym, podczas gdy jego wewnątrzkomórkowe stężenie jest w zakresie mikromolowym, co skutkuje skierowaną do wewnątrz siłą napędową dla Mg^{2+} przy ujemnych potencjałach błonowych. Do usunięcia tego bloku i wyparcia jonów magnezu z wnętrza kanałów wymagana jest depolaryzacja o wystarczającej amplitudzie i czasie trwania, tym samym umożliwiając przepływ dla jonów. W rezultacie receptor NMDA działa jak detektor koincydencji molekularnej: wydajna aktywacja NMDAR wymaga zarówno wystarczająco silnej depolaryzacji, jak i presynaptycznego uwalniania glutaminianu. To podwójne wymaganie wejściowe, wraz z ich powolną kinetyką aktywacji i dezaktywacji, umożliwia NMDAR integrację z przychodzącą aktywnością synaptyczną (Blanke i VanDongen, 2009). Ponadto pośród wielu kanałów jonowych bramkowanych ligandami, receptory NMDA są unikalne gdyż ich całkowita aktywacja wymaga związania dwóch agonistów: glutaminianu oraz glicyny (Johnson i Ascher, 1987). Podczas gdy glutaminian jest uwalniany z zakończeń presynaptycznych, uważa się, że niskie stężenia glicyny w środowisku zewnątrzkomórkowym otaczającym synapsę są wystarczające, aby umożliwić aktywację receptora. W pewnych obszarach mózgu D-seryna uwalniana przez astrocyty jest również endogennym agonistą miejsca glicyny umożliwiając komórkom glejowym aktywną kontrolę nad plastycznością synaptyczną (Panatier i wsp., 2006). Jony Ca^{2+} napływające do wnętrza komórki nerwowej przez aktywowany NMDAR są ważnym elementem regulacji wielu procesów zachodzących w cytozolu. Są one w stanie modulować transdukcję sygnału i szlaki metaboliczne dzięki lokalnym interakcjom z zależnymi od wapnia enzymami, przekaźnikami wtórnymi, kinazami białkowymi i fosfatazami czy białkami rusztowania (ang. *scaffold proteins*). Jony wapniowe obecne w cytozolu wpływają również na białka wiążące GTP i ich regulatory, cząsteczki adhezyjne (Husi i wsp., 2000), oraz zapoczątkowują kaskadę uwalniającą większe ich ilości z retikulum endoplazmatycznego. Szereg badań przeprowadzonych na modelu pierwotnych hodowli CGC pokazało, że TBBPA istotnie wpływa na funkcjonowanie receptora NMDA. Poza wspomnianymi powyżej pionierskimi badaniami Reistad i wsp., (2007), którzy przypisali endogennemu glutaminianowi nagromadżającemu się w przedziale zewnątrzkomórkowym rolę czynnika inicjującego

mechanizm neurotoksyczności TBBPA, badania dotyczące udziału NMDAR w toksyczności TBBPA były kontynuowane w naszej pracowni. Potwierdzono w nich, że MK-801, antagonist NMDAR, wpływa neuroprotekcynie na hodowle CGC inkubowane w obecności TBBPA (Ziemińska i wsp., 2012, 2015). Co więcej, w tych badaniach po raz pierwszy wykazano bezpośrednio, że TBBPA aktywuje pobieranie ^{45}Ca przez hodowle CGC, a MK-801 hamuje ten efekt, co pozwala na wnioskowanie, że w tym modelu doświadczalnym istotnie dochodzi do aktywacji NMDAR, i że te receptory pośredniczą zarówno we wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, jak i w neurotoksycznym działaniu TBBPA.

Choć w świetle omówionych powyżej wyników udział NMDAR w cytotoksycznym działaniu TBBPA na neurony nie ulegał wątpliwości, szczegółowy mechanizm aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA pozostawał jednak niejasny. W niniejszej pracy przetestowana została również możliwość bezpośredniej interakcji TBBPA z receptorem NMDA.

1.5. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest wynikiem gromadzenia się w komórkach i tkankach nadmiaru reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS), powszechnie definiowanych jako wolne rodniki tlenowe i azotowe. Wolne rodniki tlenowe są naturalnie występującym metabolitem zdrowych tkanek ssaków. Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a działaniem systemów obrony antyoksydacyjnej. Nadmiar (ok 1-3%) elektronów może wydostawać się z łańcucha oddechowego w mitochondriach i zamiast redukować tlen do wody generuje rodnik nadtlenkowy (O_2^{\cdot}), będący głównym przedstawicielem, a zarazem źródłem innych aktywnych form tlenu (Valko i wsp., 2007). Wolne rodniki tworzą się również w wyniku β -oksydacji kwasów tłuszczowych i w kompleksach mitochondrialnych. Dysmutaza nadtlenkowa typu 2 (SOD2) może neutralizować O_2^{\cdot} do nadtlenku wodoru (H_2O_2), który jako cząsteczka obojętna uwalniany jest z mitochondriów niezależnie od ich stanu energetycznego (Dikalov, 2011). H_2O_2 jest po części neutralizowany przez peroksydazę glutationową, a donorem elektronów jest glutation (GSH) – najważniejszy przeciwutleniacz komórkowy. Nadmiar uwolnionego H_2O_2 jest z kolei substratem dla powstającego w reakcji Fentona rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$), który ma zdolność do uszkodzania DNA i RNA, a także do peroksydacji lipidów błonowych i wewnątrzkomórkowych. Rodniki generowane są również przez indukowaną formę syntazy tlenku azotu (iNOS). Rodnik tlenku azotu (NO^{\cdot}), dalej dla uproszczenia definiowany jako tlenek azotu (NO) jest źródłem reaktywnych form azotu, a

zarazem ich najważniejszym przedstawicielem. W zależności od warunków środowiska tkankowego, NO ulega przemianie do kationu nitrozonowego (NO^+), bądź do anionu nitroksylogowego (NO^-). Rodniki są w stanie oddziaływać z białkami zmieniając ich aktywność i konformację (Dröge, 2002), a także przyczyniać się do otwarcia megakanałów mitochondrialnych (MPTP). W następstwie występuje stan niedoboru energetycznego, którego odległym wynikiem może być przemieszczanie glutaminianu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Nadmierne pobudzenie receptorów jonotropowych (głównie NMDA) prowadzi do ekscytotoksyczności (Bal-Price, 2001). Dodatkowym efektem gromadzenia się glutaminianu jest zahamowanie do-komórkowego transportu cystyny i spadek syntezy GSH (Sattler i Tymianski, 2001). Brak odpowiednio szybkich reakcji antyoksydacji neutralizujących rodniki tlenowe prowadzi do zaburzenia równowagi i nasilenia stresu oksydacyjnego prowadzącego do uszkodzeń komórek (Lennon i wsp., 1991).

Stres oksydacyjny jest ważnym elementem ekscytotoksyczności. Może być on wynikiem nadmiernej aktywacji receptorów dla glutaminianu, destabilizacji komórkowej homeostazy wapniowej w neuronach oraz dysfunkcji mitochondriów. Obecnie, w wielu pracach wskazuje się na istotny wpływ TBBPA na rozwój stresu oksydacyjnego. Wywołane przez TBBPA nagromadzenie ROS i produktów utleniania wolnych rodników wykryto *in vitro* zarówno w hodowlach komórek nerwowych jak i obwodowych (Suh i wsp., 2017), lecz w obu przypadkach dokładne mechanizmy tych zjawisk są niejasne (Zieminska i wsp., 2017a)

Reistad i wsp. (2005, 2007) zaobserwowali, że wzrost produkcji ROS jest zależny od stężenia TBBPA. Zauważono też, że rozwój stresu oksydacyjnego był hamowany w środowisku niezawierającym jonów Ca^{2+} . Sugerować to może rolę podwyższonego stężenia $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w indukcji stresu oksydacyjnego. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Pracowni Farmakoneurochemii IMDiK potwierdziły, że TBBPA posiada właściwości sprzyjające tworzeniu się ROS i powstawaniu stresu oksydacyjnego (Zieminska i wsp., 2012). Istnieją zatem podstawy do przypuszczenia, że powstawanie stresu oksydacyjnego w neuronach ekspozowanych na TBBPA może być efektem wtórnym w stosunku do zaburzeń homeostazy Ca^{2+} indukowanych przez TBBPA. Brak jest jednak bezpośrednich dowodów na zależność indukowanego przez TBBPA stresu oksydacyjnego od jonów wapnia i aktywacji receptorów NMDA. Z drugiej strony, wiadomo również, że podwyższone stężenie Ca^{2+} w cytozolu prowadzić może do przeładowania mitochondriów wapniem. Skutkować to może bezpośrednim rozpręgnięciem mitochondriów przez TBBPA, powodując zwiększenie niezależnej od Ca^{2+} produkcji ROS w neuronach (Zieminska i wsp., 2017a).

Badania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, katalazy i peroksydazy glutationowej) wykazały niewielki, lecz istotny spadek ich aktywności we frakcji erytrocytów izolowanych z krwi człowieka eksponowanej na TBBPA (Jarosiewicz i wsp., 2019). Wraz z obniżeniem aktywności tych enzymów zmniejszyła się również zawartość zredukowanego glutationu. Te dane sugerować mogą wpływ TBBPA na zaburzenia aktywności systemu obrony przeciwutleniaczy i w konsekwencji utraty równowagi redoks (Jarosiewicz i wsp., 2019).

1.6. Ekscytotoksyczność

Pierwsze hipotezy o tym patologicznym procesie występującym w tkance nerwowej pojawiły się w późnych latach 60-tych, kiedy to zespół Olney'a zaobserwował i opisał neurotoksyczny efekt wywołany nadmiernym pobudzeniem neuronów przez glutaminian (Olney i Ishimaru, 1999). Późniejsze badania wykazały, że nadmierne i długotrwałe pobudzenie receptorów glutaminianergicznych, prowadzi do niekontrolowanej depolaryzacji i uszkodzeń komórek nerwowych. W efekcie następują zaburzenia homeostazy nie tylko aminokwasów pobudzających (EAA), ale przede wszystkim jonów wapnia, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego (Salińska i wsp., 2005). Ważnym krokiem milowym w zrozumieniu mechanizmu ekscytotoksyczności było odkrycie, że w tym procesie, wiodącym do nieodwracalnego uszkodzenia i śmierci neuronów, pośredniczy specyficzna podklasa jonotropowych receptorów glutaminianowych, których selektywnym agonistą jest N-metylo-D-asparaginian (NMDA), i które są przepuszczalne dla jonów wapnia. Nadmierne pobudzenie oraz wzrost aktywności NMDAR może prowadzić do zaburzenia homeostazy i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (Choi i wsp., 1988). W warunkach prawidłowych, receptory NMDA pośredniczą w napływie do komórki jonów wapnia, które regulują procesy fizjologiczne takie jak plastyczność synaptyczna i pamięć. Zaburzenia w prawidłowym działaniu tych receptorów mogą powodować patologiczny wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego (Li i Wang, 2016). Poza wysoką przepuszczalnością NMDAR dla Ca^{2+} , receptor ten cechuje się powolną desensytyzacją, co może skutkować nadmiernym napływem Ca^{2+} do światła komórki (Salińska i wsp., 2005). Rolę w indukcji ekscytotoksyczności odgrywa również zaburzone funkcjonowanie transporterów glutaminianowych klasy EAAT (Foran i Trotti, 2009). Innym czynnikiem odgrywającym istotną rolę w całym mechanizmie ekscytotoksyczności jest stres oksydacyjny, który został scharakteryzowany w poprzednim podrozdziale. Zaburzenia w utrzymywaniu homeostazy [Ca^{2+}]; oraz prawidłowej gospodarki energetycznej neuronów mogą prowadzić do wyrzutu

glutaminianu z zakończeń presynaptycznych, a także zahamowania pobierania zwrotnego tego neuroprzekaźnika, co skutkuje nagromadzeniem się glutaminianu i w przestrzeni pozasynaptycznej (Salińska i wsp., 2005). Podwyższone i utrzymujące się stężenie glutaminianu lub wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia pośredniczą w promowaniu czynników transkrypcyjnych dla genów pro-apoptotycznych lub obniżeniu poziomu czynników transkrypcyjnych dla genów anty-apoptotycznych. Zatem efektem takiego działania jest prowadzenie komórki na szlaki śmierci komórkowej (Dong i wsp., 2009). Ekscytotoksyczność w zakresie wyżej omówionych procesów patologicznych może być początkiem wielu poważnych schorzeń neurologicznych takich jak stany zawałowe czy niedokrwienie mózgu (ischemia). Istnieją przesłanki, że mechanizmy ekscytotoksyczności uczestniczą w neurodegeneracji w takich przewlekłych chorobach jak choroba Parkinsona, Huntingtona, Alzheimerera, stwardnienie boczne rozsiane i jaskra. Jednak specyficzna etiologia i dokładna patogenezą zaburzeń neurodegeneracyjnych pozostaje nieznana (Salińska i wsp., 2005).

Wyniki eksperymentów grupy Mariussen i Fonnum (2003) wykazały hamujący wpływ TBBPA na pobieranie zwrotne glutaminianu do frakcji izolowanych synaptosomów, a także zmiany w ich potencjale błonowym. Takie warunki sprzyjają retencji glutaminianu w szczelinie synaptycznej oraz aktywowaniu receptorów dla glutaminianu tj. NMDAR i AMPAR (patrz podrozdział 1.3). Efekt nadmiernej aktywności receptora NMDA zaobserwowano w badaniach naszej pracowni testujących udział TBBPA w neurotoksyczności w pierwotnych hodowlach CGC (Zieminska i wsp., 2012). Badania te wykazały istotny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia zależny od zastosowanego stężenia TBBPA. Późniejsze badania wykazały także istotny wpływ receptorów rianodynowych działających synergistycznie wraz z receptorami NMDA w zaburzeniu homeostazy $[Ca^{2+}]_i$ wywołanej obecnością TBBPA (Zieminska i wsp., 2015) (patrz podrozdział 1.4). Wyniki wyżej wspomnianych badań ujawniły również kolejny ważny element sprzyjający rozwijaniu się ekscytotoksyczności, to jest stres oksydacyjny, który odnosi się do cytotoksyczności wywołanej przez wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), co dalej negatywnie wpływa na stan homeostazy wapniowej oraz pracę mitochondriów. Rodniki tlenowe są produktami ubocznymi zarówno prawidłowych, jak i nieprawidłowych procesów metabolicznych wykorzystujących tlen cząsteczkowy (patrz podrozdział 1.5).

Nieprawidłowości związane z wyżej omówionymi mechanizmami niewątpliwie prowadzą do spadku przeżywalności neuronów, a co zostało zaobserwowane przez wielu

autorów. Potencjał neurotoksyczny TBBPA zaobserwowano w badaniach grupy Reistad i wsp. (2007), w których wykazano znaczny spadek przeżywalności komórek hodowli CGC eksponowanych na TBBPA. Inni autorzy zauważyli również cytotoksyczne działanie TBBPA na linię komórkową TM4 wywodzącą się z komórek Sertoliego (Ogunbayo i wsp., 2007). Badania grupy Hendriks i wsp. (2012) prowadzone na komórkach linii B35 oraz PC12 również wykazały znaczący spadek ich przeżywalności po ekspozycji na wysokie stężenia TBBPA. Zauważono też, że TBBPA indukuje śmierć komórek słuchowych linii HEI-OC1 w hodowlach *in vitro* (Park i wsp., 2016). Badania prowadzone w naszej pracowni (Zieminska i wsp. 2012, 2015) także wykazały zależny od stężenia TBBPA spadek przeżywalności eksponowanych komórek hodowli CGC.

W związku z przedstawionymi wyżej wynikami badań różnych badaczy, mechanizm cytotoksycznego działania TBBPA na neurony można wstępnie zakwalifikować do ekscytotoksyczności. Jednak są niejasności dotyczące poszczególnych mechanizmów szczegółowych. Nie jest jasny mechanizm aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA, ani też jaka jest wzajemna zależność stresu oksydacyjnego i wzrostu $[Ca^{2+}]_i$, czy też jaki jest związek między wzrostem $[Ca^{2+}]_i$ a nagromadzeniem się glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Te zagadnienia zostaną omówione szczegółowo w rozdziale poświęconym hipotezom roboczym.

1.7. Śmierć neuronów

Obecnie uznaje się, że większość przypadków śmierci neuronów jest wynikiem aktywacji dobrze zorganizowanych procesów komórkowych prowadzących do dezintegracji komórki (Chi i wsp., 2018). Śmierć komórkowa jest nie tyle wysoce regulowanym, ale i kluczowym mechanizmem w utrzymaniu prawidłowych funkcji komórek jak i całych tkanek (Fricker i wsp., 2018). Zjawisko kontrolowanej śmierci komórkowej przyjęło nazwę programowanej śmierci komórkowej (PCD – z ang. *programmed cell death*). PCD jest procesem, w którym eliminowane są komórki zbędne i uszkodzone, co pozwala na utrzymanie fizjologicznej homeostazy układów organizmu. Proces ten zachodzi również w trakcie neurogenezy, a także w adaptacji do warunków środowiska oraz w reakcji na abiotyczny i biotyczny stres środowiskowy (Godlewski i Kobylińska, 2016).

Obecnie przyjmuje się, że około połowa neuronów wytwarzanych w nadmiarze podczas neurogenezy umiera przed zakończeniem dojrzewania centralnego i obwodowego układu nerwowego. PCD odgrywa również główną rolę w procesie starzenia się fizjologicznego, a

także w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych (Lossi i wsp., 2015). Śmierć neuronów nie jest jedynie "autonomicznym zdarzeniem komórkowym", ale często jest wspomagana lub wyzwalana poprzez interakcje z sąsiednimi komórkami nerwowymi i glejowymi (Fricker i wsp., 2018). Wyróżnia się wiele rodzajów śmierci komórkowej (Tabela 1), lecz poprzez molekularną specyficzność każdego z nich, rozróżnienie to nie zawsze jest łatwe i jasne.

Uważa się, że dwoma głównymi drogami śmierci neuronów są apoptoza i nekroza, a różnice między tymi rodzajami śmierci komórkowej można dostrzec badając morfologię komórek oraz integralność błony komórkowej (Chi i wsp., 2018). Należy także uwzględnić autofagię, która jest procesem nie tylko regulującym prawidłowe funkcjonowanie neuronów, lecz także może być ważnym elementem neurodegeneracji (Nikoletopoulou i Tavernarakis, 2018).

Apoptoza, charakteryzuje się kurczeniem się komórki i rozpadem cytoszkieletu, kondensacją chromosomów, a w późnej fazie tego mechanizmu - fragmentacją DNA (Toné i wsp., 2007). Podczas tego procesu tworzą się ciała apoptotyczne, a zawartość komórek nie przedostaje się na zewnątrz komórki, co nie wywołuje reakcji immunologicznych. Proces apoptozy może być aktywowany przez kilka szlaków sygnalizacyjnych, jednak niezależnie od rodzaju szlaku, w cytoplazmie aktywowane są kaspazy. Ważną cechą tych enzymów jest zdolność do samoaktywowania, tak więc aktywacja jednej z kaspaz powoduje reakcje łańcuchową aktywacji kaspaz zwaną również kaskadą kaspaz (Paduch i wsp., 2015). Z punktu widzenia niniejszej rozprawy, wymagającym wyróżnienia wydaje się być szlak wewnętrzny (mitochondrialny), którego głównym mechanizmem inicjującym przekazanie sygnału do rozpoczęcia apoptozy są nie tylko wzrost stężenia ROS oraz nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów, lecz także zaburzenia homeostazy Ca^{2+} .

Zaburzenia te wraz z obecnością nieprawidłowo sfałdowanych białek mogą także aktywować szlak siateczkowy, który z jednej strony zależny jest od aktywacji Bax, a z drugiej zostaje inicjowany jeszcze przed uwolnieniem cytochromu c do cytoplazmy. Należy jednak wspomnieć, że oprócz pro-apoptotycznych czynników, mających za zadanie aktywować apoptozę (np. Bak, Bax, Bcl-X_s, mitochondrialne białka szoku termicznego) obecne są również czynniki anty-apoptotyczne, które zapobiegają jej aktywacji (np. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, cytoplazmatyczne białka szoku cieplnego). O przeżyciu komórki lub jej śmierci drogą apoptozy decyduje jednak stosunek zawartości białek o aktywności pro-apoptotycznej do białek anty-apoptotycznych (Paduch i wsp., 2015; Godlewski i Kobylńska, 2016).

Tabela 1. Porównanie cech występujących podczas różnych procesów programowanej śmierci komórkowej (według Cao i Dixon, 2016).

Rodzaj śmierci komórkowej	Bodziec wywołujący	Procesy inicjacji	Cechy szczególne
<u>Apoptoza:</u>			
Zewnętrzna	- przyłączenie się ligandu śmierci do rodziny receptorów czynnika nekrozy nowotworów (TNF) tj. FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, Apo2L/DR5	- aktywacja receptorów śmierci TNF - rekrutacja białek adaptorowych cytoplazmy (tj. FADD, TRADD)	- aktywacja kaspaz - uwolnienie cytochromu c - tworzenie pęcherzów na błonie komórkowej - fragmentacja jądra kom. - kondensacja chromatyny - transport fosfatydyloseryny (PS) na zewnątrz błony komórkowej
Wewnętrzna	- uszkodzenie DNA - wycofanie czynnika wzrostu - hipoksja - infekcja wirusowa - toksyny - hipertermia	- utrata potencjału międzybłonowego w mitochondriach - permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrialnej (MOMP) - uwolnienie pro-apoptotycznych białek do cytozolu (tj. cytochrom c)	
<u>Nekroptoza</u>	- przyłączenie się ligandu śmierci (np. Fas, TNF α , TRAIL) do receptorów TNF neuronów z zahamowanym działaniem kaspazy	- aktywacja TRNF1 - rekrutacja białek RIPK1 i TRADD	- permeabilizacja błony komórkowej - kurczenie się organelli komórkowych (np. mitochondriów)
<u>Ferroptoza</u>	- zatrzymanie importu cystyny (np. przez erastynę, SAS, glutaminian) - wyczerpanie zasobów glutationu (np. przez BSO) - inaktywacja GPX4 (np. przez RSL3) - wyczerpanie zasobów aminokwasów w obecności surowicy i glukozy	- zahamowanie systemu x_c^- - zahamowane GCL - zahamowanie GPX4	- peroksydacja lipidów - zależność od obecności żelaza
<u>Toksyczność oksydacyjna wywołana glutaminianem</u>	- wysokie stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu	- zahamowanie systemu x_c^- powodująca wyczerpanie zasobów glutationu	- produkcja ROS przez mitochondria - napływ Ca ²⁺ - stres oksydacyjny
<u>Autofagia</u>	- nadekspresja białek anty-apoptotycznych Bcl-2 lub Bcl-x _L - podanie etopozylu, taspigarginy, staurosporyny	- zwiększenie ekspresji genu związanego z autofagią (Atg5 i Atg6)	- sekwestracja zawartości cytoplazmatycznej w autofagosome i autolizosomie na dużą skalę

Nekroza do niedawna uważana była wyłącznie za prosty, pasywny i prozapalny mechanizm śmierci komórkowej wywoływanej przez przypadkowe czynniki zewnętrzne prowadzące do wyczerpania zasobów ATP, zwiększenia przepuszczalności błony i uwolnienia zawartości wewnątrzkomórkowej poza błonę komórkową. Jednakże, nekroza okazuje się być równie skomplikowanym i regulowanym mechanizmem w podobnym stopniu jak apoptoza (Feoktistova i Leverkus, 2015). Jako rodzaj śmierci nekrotycznej regulowanej, wyodrębniono nekroptozę, która została opisana jako powszechna, nieapoptotyczna ścieżka śmierci komórki, wywołana szeregiem bodźców pozakomórkowych, np. przez czynnik martwicy nowotworu (z ang. *tumor necrosis factor* - TNF). Nekroptoza była obserwowana przede wszystkim wtedy, gdy wewnątrzkomórkowa sygnalizacja apoptotyczna była hamowana. Pierwotnie definiowano ją, jako śmierć komórki charakteryzującą się nekrotyczną morfologią śmierci komórki, jednoczesną aktywacją autofagii i jej zależnością od funkcji kinazy RIPK1 (Degterev, 2005). Następnie mechanizm nekroptozy zdefiniowano bardziej szczegółowo, kiedy okazało się, że kinazy RIPK mają zdolność do fosforylacji i aktywacji kinazy MLKL (z ang. *mixed lineage kinase domain-like*) powodując jej oligomeryzację, prowadząc do zmian w przepuszczalności błony plazmatycznej oraz organelli (Vandenabeele, 2010). Nekroptoza nie jest jednak jedyną formą kontrolowanej nekrozy. Poznany został mechanizm nekrozy mitochondrialnej sprzężonej z MPTP, która charakteryzuje się szybkim wzrostem przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej i zależnym od cyklofiliny D (CypD) powstawaniem MPTP (Linkermann i Green, 2014). Powstawanie MPTP uważa się za inicjację apoptozy wewnętrznej poprzez uwalnianie białek pro-apoptotycznych do cytoplazmy, jednak istnieją przesłanki, że może również wywoływać nekrozę (Galluzzi i wsp., 2014). Inną formą regulowanej nekrozy jest ferroptoza, która charakteryzuje się zależnym od żelaza kurczeniem mitochondriów i akumulacją reaktywnych form tlenu (ROS) (Dixon i wsp., 2012). Ferroptoza inicjowana jest przez nieprawidłowe działanie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej zależnej od glutationu, co prowadzi do niekontrolowanej peroksydacji lipidów i dalej śmierci komórki. Następuje także zahamowanie syntezy glutationu i zależnego od niego enzymu – peroksydazy glutationowej 4 (GPX4) (Cao i Dixon, 2016). Choć ferroptoza różni się od apoptozy zarówno pod względem morfologii, jak i sygnalizacji biochemicznej, niektórzy autorzy uważają ją za specyficzną formę nekrozy regulowanej (Vanden Berghe i wsp., 2014).

Innym, bardzo ciekawym i specyficznym mechanizmem zaliczanym do programowanej śmierci komórkowej jest autofagia. Autofagia jest niezbędnym mechanizmem komórkowym, który odgrywa rolę "sprzątacza" w normalnych procesach fizjologicznych, w tym usuwania

agregatów i źle pofałdowanych białek, usuwania uszkodzonych organelli komórkowych, regulacji wzrostu i starzenia się komórek. Autofagia jest również zaangażowana w funkcje biologiczne, takie jak rozwój, zróżnicowanie komórkowe, obrona przed patogenami, toksynami i brakiem składników odżywczych (Ravanan i wsp., 2017). Proces autofagii, mimo że w warunkach fizjologicznych występuje w ograniczonym zakresie, jest niezwykle istotny dla utrzymania żywotności i przeżywalności komórek w warunkach stresu (Paduch i wsp., 2015). Główny mechanizm autofagii opiera się na działaniu rodziny białek związanych z autofagią (Atg), które w specyficzny sposób uczestniczą na różnych etapach procesu autofagicznego, jakimi są indukcja, rozpoznawanie i selekcja ładunku, tworzenie pęcherzyków, synteza wakuoli autofagosomalnych, rozkład ładunku, a następnie uwalnianie produktów degradacji z powrotem do cytosolu (Lossi i wsp., 2015).

Pomimo tak zróżnicowanych mechanizmów, wskazuje się również na funkcjonalne interakcje między autofagią a innymi rodzajami śmierci komórek. W odpowiedzi na stres metaboliczny autofagia może opóźniać apoptozę, z drugiej jednak strony może też stanowić szlak alternatywny dla komórek, które nie są w stanie zaktywować apoptozy. Z kolei inaktywacja ochronnej funkcji autofagii silnie promuje nekrotyczną śmierć komórek (Paduch i wsp., 2015). Spekuluje się, że zarówno nadmierna jak i zbyt niska aktywność autofagii może wpływać na przeżycie neuronów i sprzyjać powstawaniu chorób neurodegeneracyjnych (Kesidou i wsp., 2013). Wykazano, że warunkowy *knock-out* genów *atg5* i *atg7*, biorących udział w autofagii, przyczynił się do powstania agregatów białkowych w mózgu myszy i neurodegeneracji (Komatsu i wsp., 2006). Z kolei inna grupa badaczy wykazała, że glutaminian lub GABA, mogą wpływać na proces autofagii neuronów za pomocą mechanizmów, które mogą obejmować szlak mTOR (Nikoletopoulou i Tavernarakis, 2018). Shehata i wsp. (2012) zaobserwowali, że w neuronach może wystąpić autofagia zależna od NMDAR poprzez hamowanie szlaku PI3K-Akt-mTOR. Ten mechanizm może prowadzić do degradacji AMPAR, sugerując tym samym, że autofagia może być czynnikiem przyczyniającym się do plastyczności synaptycznej zależnej od NMDAR.

Na poziomie badań podstawowych dotyczących udziału śmierci komórkowej w procesach zachodzących w tkance nerwowej, trudno wyodrębnić poszczególne mechanizmy odpowiadające wyłącznie za dany proces śmierci komórki, a wzajemne oddziaływanie (tzw. *cross-talk*) między apoptozą, nekrozą i autofagią zostały już zauważone i opisane przez Nikoletopoulou i wsp. (2013). Rozwój stanów patologicznych oraz chorób neurodegeneracyjnych często wiąże się z takimi zjawiskami cytotoksycznymi, jak zaburzenia

homeostazy jonowej, wzrost tworzenia reaktywnych form tlenu, ekscytotoksyczność, dysfunkcja synaptyczna, produkcja niefunkcjonalnych białek, tworzenie się agregatów białkowych, a także upośledzenie układów degradacji białek i funkcjonowania retikulum endoplazmatycznego, powstawanie uszkodzeń w DNA, dysfunkcja mitochondriów, zaburzenia cyklu komórkowego (Seward i wsp., 2013).

Badanie mechanizmów śmierci neuronów w hodowlach *in vitro* po ekspozycji na TBBPA zostało zainicjowane przez Reistad i wsp., (2007), którzy wykazali, że TBBPA może zaburzać integralność błony komórkowej wskazując na nekrotyczny charakter śmierci komórek, a jednocześnie zaobserwowali zmiany przypominające apoptozę bez aktywacji kaspaz. Jednak dalsze badania wykazały obecność klasycznej aktywności apoptotycznej w hodowlach neuronów eksponowanych na TBBPA (Al-Mousa i Michelangeli, 2012; Szychowski i Wojtowicz, 2016; Suh i wsp., 2017), tym nie mniej rola kaspaz w procesie apoptozy indukowanej TBBPA w hodowlach CGC wymaga dokładniejszych badań. Brak jest natomiast informacji dotyczących udziału autofagii w cytotoksycznym działaniu TBBPA na neurony.

2. Założenia i cel pracy

Omówione w podrozdziale 1.6 niejasności dotyczące szczegółów mechanizmu ostrej cytotoksyczności TBBPA, którą można wstępnie zakwalifikować, jako toksyczność pobudzeniowa (ekscytotoksyczność), skłoniły mnie do podjęcia badań mających na celu wyjaśnienie tych zagadnień. Choć wiadomo, że skutkami działania TBBPA na neurony są wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$), stres oksydacyjny oraz deenergizacja mitochondriów, istnieją kontrowersje dotyczące zależności przyczynowo-skutkowych między tymi zjawiskami. Podejmując się próby ich wyjaśnienia wysunąłem hipotezę, że indukowane przez TBBPA zaburzenia homeostazy wapnia są mechanizmem inicjującym zarówno stres oksydacyjny jak i depolaryzację błon mitochondrialnych. Następnie, rozpatrując potencjalne mechanizmy znanego efektu aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na działanie TBBPA, uwzględniłem trzy hipotezy mogące wyjaśnić to zagadnienie i podjąłem się ich zbadania. Niejasnym zagadnieniem, także wyselekcjonowanym do zbadania w tej rozprawie, było ustalenie roli destabilizacji homeostazy wapnia oraz stresu oksydacyjnego w indukcji śmierci neuronów po ekspozycji na TBBPA, oraz określenie udziału w tym procesie nekrozy, apoptozy i autofagii. W dalszej części rozdziału zostaną szczegółowo wymienione założenia uzasadniające podjęcie tych badań.

2.1. Hipoteza o kluczowej roli wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ w indukcji stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów po ekspozycji na TBBPA

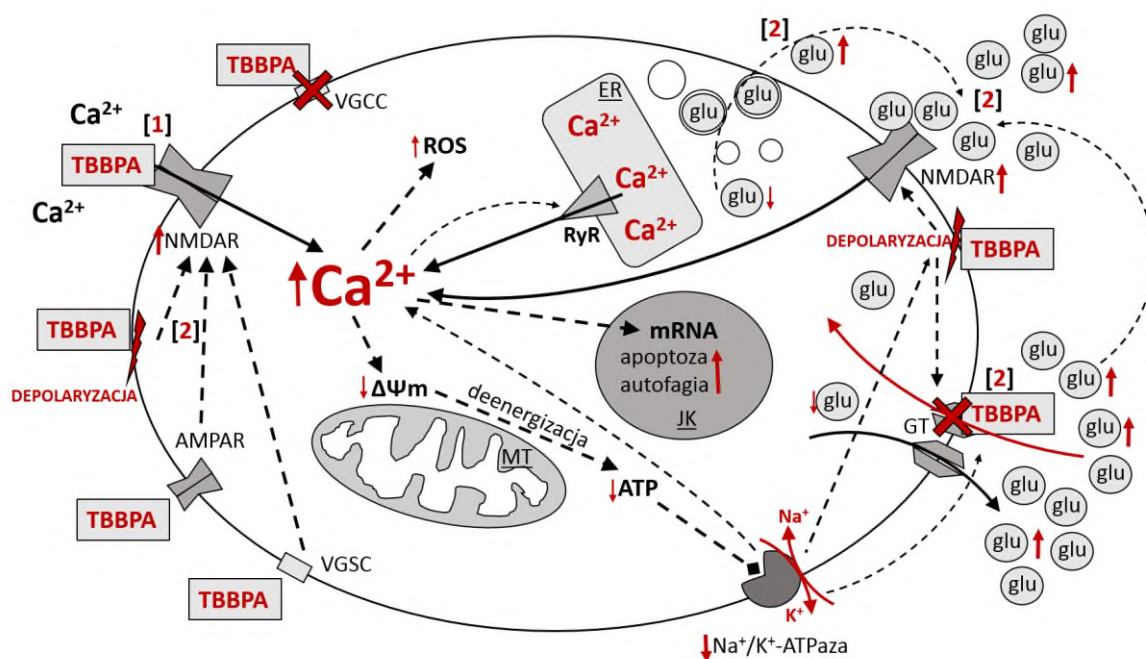
Toksyczne działanie TBBPA na neurony zostało po raz pierwszy wykazane w pracy Reistad i wsp. (2007), którzy podawali TBBPA do hodowli pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku (CGC) szczura. Ci sami autorzy wykazali też wywołane przez TBBPA zaburzenia transdukcji sygnału, wzrost $[Ca^{2+}]_i$ oraz indukcję stresu oksydacyjnego, przy czym MK-801, niekompetycyjny antagonist i bloker kanału receptora NMDA, częściowo obniżał cytotoksyczne działanie TBBPA, ale nie miał wpływu na wskaźniki stresu oksydacyjnego. W tych badaniach stres oksydacyjny był jednak hamowany podczas hodowania neuronów w środowisku bezwapniowym. Wcześniejsze badania naszej pracowni (Zieminska i wsp., 2012, 2014a, 2015) wykazały rolę NMDAR we wzroście $[Ca^{2+}]_i$ oraz potwierdziły indukcję stresu oksydacyjnego w CGC eksponowanych na TBBPA, brak było jednak w tych pracach dowodów na wzajemne powiązania mechanizmów tych efektów. Są doniesienia wskazujące na to, że TBBPA ma właściwości podobne do wolnego rodnika (Szychowski i wsp., 2016), i w związku z tym jest możliwość bezpośredniej indukcji przez TBBPA stresu oksydacyjnego w komórkach. Indukowany przez TBBPA stres oksydacyjny, poprzez zaburzenie funkcji białek uczestniczących w transporcie wapnia w komórkach mógłby się przyczynić do wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ (Ogunbayo i wsp., 2008). Wiadomo jednak od dawna, że długotrwały i niekontrolowany wzrost $[Ca^{2+}]_i$ może indukować stres oksydacyjny (Choi, 1985; Salinska i wsp. 2005; Szydłowska i Tymianski, 2010; Salinska i Lazarewicz, 2012). To skłoniło mnie do testowania hipotezy roboczej, w myśl której wzrost $[Ca^{2+}]_i$ jest wcześniejszym niż stres oksydacyjny elementem łańcucha przyczynowo-skutkowego cytotoksyczności TBBPA w neuronach. Sądzić również można, że indukowany przez TBBPA wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w CGC może być czynnikiem pierwotnym wobec depolaryzacji, i co za tym idzie deenergizacji mitochondriów. Jest to zgodne z powszechnie znanym zjawiskiem buforowania przez mitochondria jonów wapnia z cytosolu, oraz szkodliwości przeładowania tych organelli jonami Ca^{2+} (Salinska i wsp. 2005; Szydłowska i Tymianski, 2010; Salinska i Lazarewicz, 2012). Jednak poza przeciążeniem mitochondriów wapniem, które może prowadzić do stresu oksydacyjnego, w oparciu o wyniki badań na hepatocytach szczura postulowano także możliwość bezpośredniego działania TBBPA na mitochondria i ich rozpręgnięcia, co mogłoby skutkować zwiększoną i niezależną od $[Ca^{2+}]_i$ produkcją ROS w neuronach (Nakagawa et al., 2007). Za właściwe narzędzie do planowanej weryfikacji roli wapnia w indukcji stresu oksydacyjnego i deenergizacji mitochondriów w CGC eksponowanych na TBBPA uznałem jednoczesne stosowanie antagonistów NMDAR

(MK-801) i ligandów RyR (rianodyny i bastadyny). Jak wykazały poprzednie badania naszej pracowni, takie postępowanie całkowicie zapobiega indukowanemu przez TBBPA wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ (Ziemska i wsp. 2014). Zaplanowałem także użycie zmiataczy wolnych rodników do zahamowania stresu oksydacyjnego oraz cyklosporyny A do zahamowania formowania się megakanalów mitochondrialnych (MPTP).

2.2. Proponowane hipotezy mechanizmu aktywacji NMDAR w neuronach ekspozowanych na TBBPA

2.2.1. Hipoteza o bezpośredniej aktywacji NMDAR przez TBBPA

Została postawiona hipoteza robocza, która postuluje możliwość bezpośredniej modulacji allosterycznej kompleksu receptora NMDA przez TBBPA lub wpływu TBBPA na miejsca specyficznego wiązania glutaminianu lub/i glicyny (Ryc. 7). Postanowiłem testować tę hipotezę przy wykorzystaniu frakcji błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura, poprzez badanie wpływu TBBPA na wiązanie specyficzne znakowanych ligandów NMDAR, $[^3H]$ glutaminianu i $[^3H]$ glicyny, a stopień aktywacji kanału NMDAR oceniać przez badanie specyficznego wiązania do błon $[^3H]$ MK-801, niekompetycyjnego antagonisty NMDAR wiążącego się do otwartego kanału tego receptora.



Rycina 7. Hipotetyczne mechanizmy neurotoksycznego działania TBBPA. [1] Bezpośrednia interakcja z kompleksem receptora NMDA, oraz [2] pośrednia aktywacja NMDAR poprzez depolaryzację błony komórkowej.

2.2.2. Hipoteza o potęgowaniu przez TBBPA aktywacji NMDAR drogą pośrednią, poprzez depolaryzację błony komórkowej neuronów

Wysunęliśmy hipotezę postulującą, że TBBPA wpływając bezpośrednio na białka regulujące potencjał błonowy, lub też pośrednio, poprzez deenergizację komórek, może sprzyjać depolaryzacji neuronów, co by potęgowało aktywację kanałów NMDAR, prowadząc do zaburzeń homeostazy wapniowej i dalej śmierci komórkowej (Ryc. 7). Dla weryfikacji tej hipotezy i wyjaśnienia czy są podstawy do postulowania wpływu TBBPA na aktywność NMDAR poprzez depolaryzację neuronów, zaplanowałem przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem hodowli pierwotnych CGC, na których zbadano wpływ TBBPA na potencjał błonowy. W CGC eksponowanych na TBBPA można oczekiwać depolaryzacji, w której pośredniczą NMDAR, natomiast eksperymenty zmierzały do ujawnienia indukowanej przez TBBPA depolaryzacji, niezwiązanej z aktywacją jonotropowych receptorów dla glutaminianu, a zwłaszcza NMDAR. W badaniach, jako wskaźnika zmian potencjału postanowiłem wykorzystać wrażliwą na potencjał sondę fluorescencyjną oxonol VI. Zaplanowałem zastosowanie antagonistów receptorów mogących uczestniczyć w depolaryzacji błony komórkowej: MK-801 dla wyłączenia kanału receptora NMDA, CNQX dla zablokowania AMPAR oraz TTX dla zahamowania bramkowanych napięciem kanałów sodowych (VGSC).

2.2.3. Hipoteza o roli dekompartmentacji endogenego glutaminianu w aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA

Dla testowania hipotezy o kluczowej roli wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu w mechanizmie aktywacji NMDAR w CGC eksponowanych na TBBPA, zaplanowałem serię badań z użyciem zarówno hodowli pierwotnych CGC, jak i frakcji izolowanych zakończeń synaptycznych, w celu badania wskaźników aktywności NMDAR i hipotetycznej dekompartmentacji glutaminianu. Bezpośredniemu potwierdzeniu testowanej hipotezy miały służyć eksperymenty, w których miarą aktywacji NMDAR w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA był wzrost pobierania ^{45}Ca , który jak wiadomo jest wrażliwy na hamowanie przez MK-801 (Ziemińska i wsp., 2015). Dowodem na rolę glutaminianu byłoby zahamowanie tego zjawiska gdy środowisko inkubacyjne zostało wzbogacone w układ enzymatyczny rozkładający glutaminian, opisany w badaniach innych autorów przeprowadzonych na tym samym modelu doświadczalnym (Pearce i wsp., 1987; Didier i wsp., 1993).

Rozpatrując hipotetyczne mechanizmy wzrostu stężenia glutaminianu w środowisku inkubacyjnym, mogącego doprowadzić do aktywacji NMDAR w CGC eksponowanych na TBBPA, nie można pominąć możliwości jego zależnego od Ca^{2+} uwalniania z puli neuroprzebieżnikowej, zlokalizowanej w pęcherzykach zakończeń synaptycznych. Do testowania tej hipotezy, w eksperymentach prowadzonych na CGC, jako narzędzi farmakologicznych postanowiłem zastosować kombinację blokerów mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego rianodynę i bastadynę, i mierzyć indukowaną przez TBBPA depolaryzację neuronów, jako wskaźnika aktywacji jonotropowych receptorów dla glutaminianu. Jako alternatywne wytłumaczenie mechanizmu nagromadzenia się endogennego glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej należy uwzględnić hipotezę opartą na danych z pracy Mariussen and Fonnum (2003), w której autorzy wskazują na hamowanie przez TBBPA transportu zwrotnego glutaminianu w synaptosomach. Można spekulować, że może to być wynikiem pokazanej w tej samej publikacji depolaryzacji synaptosomów, a pierwotnym punktem uchwytu może być deenergizacja mitochondriów (Zieminska i wsp., 2017a) prowadząca do zaburzenia energetyki komórki, ubytku ATP i zahamowania Na^+/K^+ -ATPazy. To mogłoby prowadzić do odwrócenia kierunku migracji glutaminianu przez transportery i przemieszczania glutaminianu komórkowego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Nicholls, 2004).

Do zalegania glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej może przyczynić się zahamowanie pobierania zwrotnego tego neuroprzebieżnika (Mariussen i Fonnum 2003), dla weryfikacji tej hipotezy postanowiłem porównać działanie TBBPA na pobieranie glutaminianu przez synaptosomy z efektem uznanego inhibitora transportera glutaminianu, L-PDC.

Konsekwencją nałożenia się na siebie dwu omówionych powyżej hipotetycznych mechanizmów prowadzących do retencji glutaminianu w przestrzeni synaptycznej, może być przelewanie się nadmiaru tego neuroprzebieżnika do okolic pozasynaptycznych i aktywacji zlokalizowanych tam NMDAR o odmiennym niż klasyczne receptory synaptyczne składzie podjednostkowym i właściwościach farmakologicznych. Istnieją doniesienia, że memantyna, jako bezkompetycyjny antagonist NMDAR, preferencyjnie hamuje receptory NMDA zlokalizowane pozasynaptycznie. Dla pełniejszego scharakteryzowania hipotetycznych, zależnych od endogennego glutaminianu mechanizmów aktywacji NMDAR w CGC eksponowanych na TBBPA, postanowiłem

porównać hamujący wpływ memantyny i antagonistów RyR, kombinacji rianodyny z bastadyną na wywołaną przez TBBPA depolaryzację CGC.

2.2.4. Hipotetyczne mechanizmy śmierci komórkowej indukowanej przez TBBPA

Naturalną konsekwencją omówionej powyżej hipotezy (rozdział 2.1), przypisującej wywołanemu przez TBBPA wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ rolę pierwotnego czynnika indukującego dalsze zaburzenia, takie jak stres oksydacyjny i deenergizacja mitochondriów, może być jej rozwinięcie i twierdzenie, że w tych warunkach wzrost $[Ca^{2+}]_i$ jest mechanizmem uruchamiającym łańcuch przyczynowo-skutkowy wiodący ku śmierci neuronów eksponowanych na TBBPA. Nie można jednak zapominać o sugestiach wskazujących na właściwości tej substancji przypominające wolny rodnik, i możliwość bezpośredniego indukowania przez TBBPA stresu oksydacyjnego w komórkach (Szychowski i wsp., 2016). Dlatego, przechodząc do badania mechanizmów śmierci neuronów CGC w hodowli pierwotnej eksponowanych na TBBPA, postanowiłem porównać spodziewane cytoprotekcyjne działanie zahamowania wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ oraz podania zmiataczy wolnych rodników, a także ocenić efekt zastosowania ich kombinacji.

W badaniach na stosowanym przez nas modelu doświadczalnym nie została dotąd dokonana systematyczna ocena dynamiki zmian nekrotycznych i apoptotycznych po 30-min ekspozycji hodowli CGC na TBBPA. Brak jest także informacji o wpływie ekspozycji hodowli neuronów na TBBPA na proces autofagii. Wiadomo, że w warunkach normalnych autofagia promuje przetrwanie komórek, jednak w przypadkach poważnego ich uszkodzenia, silna stymulacja autofagii wspomaga, a nawet uczestniczy w śmierci komórki (Duprez i wsp., 2009). W związku z tym są podstawy dla hipotezy roboczej, że zarówno zahamowanie jak i nadmierna aktywacja autofagii mogłaby przyczynić się do indukowanej przez TBBPA śmierci neuronów.

2.3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było potwierdzenie wiodącej roli ekscytotoksyczności w ostrym toksycznym działaniu TBBPA na neurony poprzez zbadanie wybranych komórkowych, receptorowych i molekularnych mechanizmów cyto(neuro)toksyczności TBBPA *in vitro*.

Celami szczegółowymi tych badań, prowadzonych na hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku szczura oraz frakcjach subkomórkowych izolowanych z kory mózgu szczura, było:

- I. Wykrycie powiązań przyczynowo - skutkowych między wywołanym przez TBBPA i zachodzącym przy współdziałaniu receptorów NMDAR i RyR wzrostem $[Ca^{2+}]_i$, a stresem oksydacyjnym i dysfunkcją mitochondriów.
- II. Wyjaśnienie mechanizmów aktywacji receptorów NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA:
 - a) bezpośredniego działania TBBPA na NMDAR,
 - b) depolaryzacji neuronów i pośredniego potęgowania przez TBBPA aktywności receptorów NMDAR,
 - c) wpływu endogennego glutaminianu, uwalnianego z zakończeń synaptycznych w wyniku wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ i gromadzącego się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej na skutek zahamowania jego pobierania zwrotnego.
- III. Dokładniejsze poznanie mechanizmów śmierci komórek indukowanej przez ekspozycję hodowli neuronów na TBBPA poprzez:
 - a) ustalenie roli w tych mechanizmach wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ i stresu oksydacyjnego,
 - b) ocenę zmian poziomu mRNA genów związanych z programowaną śmiercią komórek,
 - c) zbadanie dynamiki zmian fluorescencji markerów nekrozy, apoptozy i autofagii.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki

TBBPA (o czystości 99,8%) był komercyjnie zsyntetyzowany przez Zakład Analityczny Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie, Polska. Maleinian (5S)-10,11-dihydro-5-metylo-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-iminy (MK-801) pochodził z Tocris (Abingdon, UK). Dimetylosulfotlenek (DMSO), kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA), kwas L-glutaminowy, glicyna, kwas DL-2-amino-5-fosfonowalerianowy (AP5), kwas 7-chlorokynureninowy (7-CKA), ketamina, butylohydroksyanizol (BHA), zredukowany glutation (GSH), cyklosporyna A (CsA), transaminaza glutaminianowo-pirogronianowa (GPT), kwas pirogronowy (pyr), kwas L-trans-Pirolidyno-2,4-Dikarboksylowy (L-PDC), oxonol VI surowica oraz inne materiały potrzebne do hodowli komórkowych zostały zakupione w Merck Sigma-Aldrich sp. z.o.o. (Poznań, Polska). Rianodyna była zakupiona w Enzo Life-Sciences (Warszawa, Polska). 2,3-diketon 6-cyjano-7-nitrochinoksaliny (CNQX) pochodził z HelloBio (Bristol, UK) a tetrodotoksyna (TTX) z Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Bastadyna 12

zsyntetyzowana w Laboratory of Natural Products Synthesis and Bioorganic Chemistry, Institute of Bioorganic Chemistry NCRS “Demokritos” (Ateny, Grecja), została użyczona do testów przez dr Emmanuela N. Pitsinosa. Sondy fluorescencyjne: fluo3/AM, rodamina123 (R123) i dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA) zakupiono w Molecular Probes Inc. (Paisley, UK). Komercyjne zestawy do oznaczania apoptozy oraz autofagii - w Abcam (Cambridge, UK). Odczynniki znakowane izotopami radioaktywnymi: $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 mCi, aktywność specyficzna 14,98 mCi/mg, [^3H]kwas glutaminowy (250 μCi , radioaktywność 51,1 Ci/mmol) oraz [^3H]glicyna (1 mCi, radioaktywność 47,0 Ci/mmol) kupiono w Perkin-Elmer (Waltham, USA). [^3H]MK-801 (250 μCi , aktywność specyficzna 26,4 Ci/mmol) - w American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, USA). Wszystkie odczynniki niezbędne do sporządzania buforów były o czystości analitycznej.

3.2. Zwierzęta

W doświadczeniach użyto siedmiodniowych szczurów szczepu Wistar, obu płci, o średniej masie ± 15 g (16 sztuk do sporządzenia jednej hodowli) oraz dorosłe samce szczepu Wistar, o masie ± 250 g (4 sztuki do izolowania błon lub synaptosomów z mózgu). Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni IMDIK, były trzymane w standardowych warunkach (cykl 12-12 godz. noc-dzień), przebywały w temperaturze pokojowej oraz stałej wilgotności – ok. 60% i miały dostęp do standardowego pożywienia i wody.

Wszystkie procedury prowadzone na zwierzętach były zgodne z Dyrektywą Unii Europejskiej 2010/63/EU, dotyczącej zwierząt eksperymentalnych, z późniejszymi modyfikacjami, a także zgodne z krajowym prawem wewnętrznym.

3.3. Izolowanie błon komórkowych z kory mózgowej i hipokampa szczura

Fracja błon była izolowana z kory mózgu i hipokampa dorosłych szczurów, metodą opisaną przez Reynolds (2000). Tkanka oczyszczona z błon i naczyń była rozdrabniana w buforze izolacyjnym zawierającym 0,32 M sacharozy, 20 mM HEPES oraz 1 mM EDTA (pH 7,4) z wykorzystaniem homogenizatora mechanicznego (Polytron). Homogenizacja trwała 10-15 sekund, aż do osiągnięcia jednolitej zawiesiny. Następnie, zawiesina błon była wirowana przy przyspieszeniu $40\,000 \times g$ przez 10 minut w 4°C , przy użyciu ultrawirówki Beckman Coulter Optima XNP-100 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Nadsącz zlewano, a osad zawieszano w 18 ml buforu izolacyjnego a następnie ponownie homogenizowano. Ta procedura homogenizacji i wirowania powtórzona była dwukrotnie. Próbkę w tym stanie mogły być przechowywane w -20°C przez maksymalnie miesiąc od czasu izolacji. Do otrzymania

frakcji błon nadających się do eksperymentów, wstępnie przygotowany materiał był rozmrażany i inkubowany w 37°C przez 30 minut. Następnie, wyizolowane błony czterokrotnie poddano 10 minutowemu wirowaniu w ultrawirówce przy przyspieszeniu $40\,000 \times g$ oraz płukaniu i homogenizacji ręcznej (szkło-Teflon), po czym nadsącz zlewano a osad zawieszano w buforze zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,4) bez dodatku 1 mM EDTA. Po otrzymaniu frakcji błon komórkowych, stężenie białka było oznaczone metodą Bradforda. Zawiesina błon była rozdzielona w odpowiednich stężeniach do probówek zawierających bufor 20 mM HEPES (pH 7,4). Uzyskany materiał, gotowy do eksperymentów był przechowywany zgodnie z procedurą, w temperaturze -70°C przez maksymalnie 3 miesiące (Reynolds, 2000).

3.3.1. Wiązanie [³H]MK-801 do izolowanych błon komórkowych w obecności TBBPA

Frakcje błon komórkowych, izolowane wg. metody opisanej wyżej były rozmrażane w temperaturze pokojowej (RT), a procedura eksperymentu wykonywana była jak opisano w publikacji Salińska i wsp. (2008) z drobnymi modyfikacjami. Na jedną próbkę o całkowitej objętości 0,5 ml zużywano 200 µg białka wyizolowanych frakcji błon. Jakość materiału wyizolowanego z mózgow szczerów zbadano kontrolnie używając odpowiednich narzędzi farmakologicznych w postaci agonistów: 100 µM NMDA i 30 µM glicynę oraz antagonistę – 100 µM ketaminę. Badanie specyficznego wiązania kontrolnego [³H]MK-801 do błon komórkowych przeprowadzono z użyciem 2 nM [³H]MK-801, natomiast do oznaczenia wiązania niespecyficznego zastosowano 10 µM MK-801. Kolejność dodawania poszczególnych substancji do buforu inkubacyjnego (20 mM HEPES, pH 7,4) próby była następująca: agoniści/antagoniści, radioligand, frakcja błon komórkowych. Zawiesinę błon komórkowych w buforze wraz z odpowiednimi substancjami farmakologicznymi inkubowano przez 30 min w RT na wytrząsarce przy prędkości 240 obrotów/min. Po tym czasie inkubację przerywano przez filtrację w aparacie Brandel MPR-24 Cell Harvester (USA), używając bibuły filtracyjnej Whatman GF/B. Zawiesinę błon płukano 3-krotnie zimnym buforem inkubacyjnym, krążki z bibuły umieszczano w probówkach scyntylicyjnych i zalewano 4 ml roztworu Bray'a o składzie: 180 g naftalenu, 0,6 g POPOP (1,4-di(5-fenyloksazolo-2-yl)benzen), 12 g PPO (2-difenylookszazol), 300 ml metanolu, 60 ml glikolu etylenowego, 2,64 l dioksanu. Radioaktywność frakcji pozostałej na bibule była mierzona przy użyciu licznika scyntylicyjnego Wallac 1409 (Wallac Oy, Turku, Finlandia) po 24-godzinnym wygaszaniu autofluorescencji. Dla obliczenia specyficznego wiązania

radioligandu do receptora, od wiązania całkowitego w danej próbie odejmowano wiązanie niespecyficzne (w obecności 10 μ M MK-801).

Do frakcji błon komórkowych izolowanych z mózgu szczura, TBBPA podawano w stężeniach 10, 25 lub 40 μ M w eksperymentach mających na celu sprawdzenie ich wpływu na aktywność kanału receptora NMDA. Jako kontrolę rozpuszczalnikową stosowano 0,5% DMSO a wpływ TBBPA na aktywność receptora badano w obecności (lub braku) agonisty (100 μ M NMDA) i ko-agonisty (30 μ M glicyny).

3.3.2. Wiązanie [³H]kwasu glutaminowego i [³H]glicyny do izolowanych błon komórkowych w obecności TBBPA

Do pomiaru interakcji 10, 25 i 40 μ M TBBPA ze specyficznymi miejscami wiązania agonisty i ko-agonisty na receptorze NMDA użyto znakowanego trytem agonisty – 2 nM [³H]kwasu glutaminowego (51,1 Ci/mmol) – oraz ko-agonisty – 5 nM [³H]glicyny (47,0 Ci/mmol). Do pomiaru niespecyficznego wiązania użyto glutamianu lub glicyny w stężeniu 1 mM. W obydwóch eksperymentach dodatkowo badano wpływ specyficznych antagonistów NMDAR oddziałujących w miejscu wiązania ligandu do receptora. Tymi narzędziami farmakologicznymi były AP5 (100 i 200 μ M) przy badaniu wiązania [³H]kwasu glutaminowego oraz 7-CKA (100 μ M) przy badaniu wiązania [³H]glicyny. W tych ostatnich eksperymentach badany był również wpływ 100 μ M CNQX (antagonista receptora AMPA/KA), ponieważ zaobserwowano jego hamujący wpływ na wiązanie glicyny do receptora NMDA (Birch i wsp., 1988; Harris i Miller, 1989; Lester i wsp., 1989). Procedura przygotowania próbek do badania wiązania specyficznego oraz niespecyficznego, w tym warunki filtracji próbek, były jak opisano powyżej (podrozdział 3.3.1).

3.4. Izolowanie synaptosomów z kory mózgu szczura

Fracja synaptosomów wyizolowana była z przodomózgowia dorosłego szczura, według procedury opisanej przez Booth i Clark (1978) z drobnymi modyfikacjami. Po wyizolowaniu przodomózgowia, oczyszczona z błon i naczyń tkanka była przemywana buforem izolacyjnym, zawierającym 0,32 M sacharozę, 1 mM EDTA-Na, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 i następnie rozdrabniana przy użyciu ręcznego homogenizatora szklanego typu Dounce. Homogenat rozcieńczano buforem izolacyjnym i całość wirowano przez 3 min w 4°C przy 1000 \times g. Następnie nadsącz był zbierany i wirowany przy przyspieszeniu 17 000 \times g przez 10 minut w 4°C. Otrzymany osad zawieszany był w 1,5 ml buforu izolacyjnego i rozcieńczany do 9 ml roztworem zawierającym 12% (w/w) ficoll w 0,32 M sacharozie, 50 μ M EDTA-Na (pH 7,4), a

następnie łagodnie homogenizowany kilkoma przesunięciami tłoka. Tak otrzymaną zawiesinę przenoszono do probówek wirówkowych, następnie na powierzchnię ostrożnie nakładano warstwę 4,5 ml roztworu 7,5% (w/w) Ficoll w 0,32 M sacharozy, 50 μ M EDTA-Na (pH 7.4), a następnie 4,5 ml buforu izolacyjnego bez Ficollu i wirowano przy $46\,000 \times g$ przez 30 minut w 4°C. Po odwirowaniu ostrożnie usuwano warstwę mieliny z górnej interfazy zawiesiny, a następnie zbierano warstwę synaptosomów z niższej interfazy. Pozyskaną frakcję synaptosomów zawieszono w buforze izolacyjnym i wirowano przy $17\,000 \times g$ przez 10 minut w 4°C. Tak uzyskaną frakcję synaptosomów zawieszano w 2 ml buforu izolacyjnego i po przeprowadzeniu pomiaru stężenia białka, przygotowywano frakcję do eksperymentów.

3.4.1. Wiązanie [³H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy w obecności TBBPA

Eksperymenty mające na celu ujawnienie dynamiki pobierania [³H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy opierały się na metodach opisanych w pracach Divac i wsp. (1977) oraz Sulkowski i wsp. (2014). Otrzymana frakcja synaptosomów zawieszana była w buforze izolacyjnym, a następnie oznaczano stężenie białka. Ilość białka użytego na jedną próbkę o końcowej objętości 500 μ l wynosiła 200 μ g. W celu rozpuszczenia odczynników oraz inkubacji synaptosomów użyto buforu inkubacyjnego, który zawierał: 122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 0,4 mM KH₂PO₄; 10 mM glukozę, 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM CaCl₂; 4 mM HEPES (pH 7,4). Dla zbadania dynamiki pobierania przez frakcję synaptosomów stosowana była mieszanina o składzie: 16 μ l [³H]kwasu glutaminowego (51.0 Ci/mmol) i 3,679 mg glutaminianu rozpuszczonego w 5 ml buforu inkubacyjnego, którą użyto w ilości 50 μ l na próbę. Końcowe stężenie [³H]kwasu glutaminowego oraz glutaminianu w próbce wynosiło kolejno 5 μ M i 0,5 mM. TBBPA podawano w stężeniach 5, 10 i 25 μ M, jako kontrolę rozpuszczalnikową stosowano 0,5% DMSO a kontrolą pozytywną był inhibitor transporterów glutaminianu, 100 μ M kwas L-PDC. Pobieranie [³H] kwasu glutaminowego było inicjowane dodaniem frakcji synaptosomalnej. Po 0, 2, 4, 6 i 8 minutach inkubacji próbki były filtrowane przez sączki z bibuły Whatman GF/B przy użyciu kolektora podciśnieniowego do zbierania prób firmy Millipore (nr. XX2702550; Bradford, Massachusetts, US) i płukane zimnym buforem zawierającym: 140 mM NaCl i 20 mM Tris-HCl, pH 7.4. Następnie sączki były przenoszone do fiolek do pomiaru scyntylicacji, zalewane 10% roztworem Triton-X100, a po 15 minutach płynem scyntylicacyjnym Bray'a. Radioaktywność synaptosomów pozostałych na bibule, była

mierzona po 24 godzinach metodą scyntylicyjną przy użyciu licznika Wallac 1409 (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

3.5. Hodowla pierwotna neuronów ziarnistych mózdzku szczura

Do badań wykorzystano 7-dniowe hodowle komórek ziarnistych mózdzku szczura preparowane z 7-dniowych szczurów, wg standardowej metody opisanej przez Schousboe (1992) z drobnymi modyfikacjami (Zieminska, 2003). Zwierzęta dekapitowano, a następnie izolowano z nich mózdzki, które po oczyszczeniu z błon i naczyń krwionośnych, krojono na siekaczu McIlwain na skrawki $400 \times 400 \mu\text{m}$, a tak rozdrobnioną tkankę umieszczano w buforze HIB (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 9,1 mM glukoza, pH 7,4) z dodatkiem 0,025% trypsyny i 0,05% DNA-zy i wytrząsano w łaźni wodnej przez 15 min w temp. 37°C . Po tym czasie dodawano 0,5 ml roztworu zawierający inhibitor trypsyny, zawiesinę komórek wirowano przez 2 minuty przy przyspieszeniu $1000 \times g$, a osad zawieszano w ciepłym środowisku wzrostowym BME (Basal Medium Eagle) z dodatkiem soli Earla uzupełnionym 10% cielęcą surowicą płodową, 25 mM KCl, 2 mM glutaminą i 0,5% (v/v) roztworem penicyliny/streptomycyny i rozdrabniano przez triturację za pomocą strzykawki z grubą igłą. Całość powtórnie wirowano i rozdrabniano aż do uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Przed wysianiem na płytki komórki zabarwione 2% roztworem błękitu trypanu liczone w komorze Bürkera. Gęstość komórek wysiewanych na płytkę 24 dołkową (NUNC) pokrytą polilizyną, wynosiła 1×10^6 komórek na dołek, a na płytkę 6 dołkową – 4×10^6 . Hodowlę prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach w 37°C i w obecności 5% zawartości CO_2 w powietrzu o 95% wilgotności. Trzydzieści sześć godz. po założeniu hodowli, dodawano do komórek $7,5 \mu\text{M}$ arabinozydu cytozyny, aby zapobiec mnożeniu się komórek glejowych i fibroblastów. Tak przygotowane hodowle komórkowe po 7 dniach były gotowe do eksperymentów.

3.5.1. Badania kontrolne wpływu TBBPA na zastosowane markery zmian $[\text{Ca}^{2+}]_i$, produkcji ROS oraz $\Delta\Psi_m$ w systemie bezkomórkowym

Jedną z powszechnie wykorzystywanych metod oceny produkcji wolnych rodników w komórkach jest zastosowanie fluorescencyjnej sondy DCFH-DA. Związek ten w komórce ulega rozpadowi do DCFH i w obecności ROS utleniany do fluorescencyjnego produktu – DCF (Wang i wsp., 1999). W literaturze pojawiły się jednak doniesienia ostrzegające przed stosowaniem testu DCF do oceny pobudzenia wytwarzania ROS przez TBBPA w hodowlach komórkowych (Tetz i wsp., 2013; Szychowski i wsp., 2016a, 2016b). Skłoniło

mnie to do wykonania szeregu eksperymentów kontrolnych, których głównym celem była ocena udziału sugerowanej przez innych bezpośredniej interakcji TBBPA z DCFH-DA we wzroście fluorescencji DCF obserwowanym w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA. Eksperymenty objęły również zbadanie wpływu innych kluczowych substancji farmakologicznych na fluorescencję badanych sond fluorescencyjnych, wykorzystanych w badaniach efektów ekspozycji na TBBPA.

W eksperymentach kontrolnych oceniliśmy działanie TBBPA, a także antagonisty NMDAR - MK-801 i antagonistów RyR: bastadyny i rianodyny, na fluorescencję DCFH-DA, DCF, fluo-3 AM, fluo-3 i rodaminy 123. We wszystkich testach stosowano TBBPA w stężeniach 10 i 25 μM , stężenia te były również stosowane w głównych badaniach przedstawionych w rozprawie. Wszystkie sondy fluorescencyjne użyte były w stężeniu 1 μM prawdopodobnie odpowiadając stężeniu wewnątrz komórek. DCFH-DA i DCF dodatkowo użyto jeszcze w stężeniu 100 μM , które było stosowane w fazie preinkubacji w badaniach opisanych w podrozdziale 4.1. W eksperymentach prowadzonych w środowisku bezkomórkowym, DCFH-DA, DCF, fluo-3AM i fluo-3, jak również rodaminę 123 rozpuszczono w buforze Locke 5. Pomiarów prowadzono na płytce 96-dołkowej, a po określeniu fluorescencji wyjściowej, dodawany był TBBPA lub inne badane substancje. Fluorescencję mierzono po 1 i 30 minutach za pomocą czytnika mikropłytek FLUOstar Omega przy długość fali wzbudzenia 485 nm i emisji 538 nm dla DCFH-DA, fluo3-AM i rodaminy 123. Wyniki pomiarów po 30 minutach, zapisane w jednostkach arbitralnych, znormalizowano i wyrażono w procentach fluorescencji próbki kontrolnej.

3.5.2. Badanie wpływu TBBPA na stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego w hodowli komórkowej CGC

Zmiany w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) były badane przy użyciu sondy fluorescencyjnej wrażliwej na obecność jonów wapnia – fluo3-AM. Związek ten penetruje błonę komórkową, a obecna wewnątrz komórki esteraza rozkłada związek do fluo-3, który fluoryzuje po związaniu się z jonami wapnia (Schousboe i wsp., 1992). Do eksperymentu użyto 7-dniowe hodowle komórkowe wysiane na płytkach 24 dołkowych. Komórki inkubowano przez 30 min. w warunkach standardowych z 16 μM fluo-3AM w buforze Locke 5 zawierającym: 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,3 mM CaCl_2 , 4 mM NaHCO_3 , 5 mM glukozę oraz 5 mM HEPES (pH 7,4). Dla usunięcia nadmiaru barwnika hodowle 2-krotnie płukano powyższym roztworem i przystępowano do pomiarów stosując się do zasad

opisanych przez Wahl i wsp. (1989) i Berman i wsp., (2000) (warunki nieznacznie zmodyfikowano).

W tym doświadczeniu badano wpływ 10 i 25 μM TBBPA na zmiany fluorescencji fluo-3. Testowano także modyfikację efektów TBBPA przez podanie zmiataczy wolnych rodników – 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA), 1 mM zredukowany glutation (GSH) i 1 mM witaminę C (Vit C); dodając antagonistę receptora NMDA – 0,5 μM MK-801 (MK); antagonistę receptora rianodynowego – 200 μM rianodynę (ryan) i/lub modulatora RyR – 2,5 μM bastadynę (bast). Jako kontrole rozpuszczalniki stosowano bufor Locke 5, 0,5% DMSO i 0,1% etanol.

Zmiany fluorescencji fluo-3, odpowiadające zmianom w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rejestrowano za pomocą czytnika płytek FLUOstar OMEGA (Ortenberg, Niemcy) oraz za pomocą mikroskopu konfokalnego LSM 510 wyposażonego w laser argonowy (488 nm). Do pomiaru fluorescencji w czytniku płytek zastosowano filtry: dla światła wzbudzającego 485 nm i dla światła emitowanego 538 nm, dane pomiaru próbek zbierane były co 60 sekund przez 30 minut. W czasie 0-5 min rejestrowano poziom bazowy fluorescencji fluo-3. Modulatory i TBBPA podawano do komórek po 5 min eksperymentu, a pomiary prowadzono przez dalsze 25 min.

W przypadku pomiarów z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, dane były zbierane przy długości fali 530 nm, co 30 sekund przez 10 minut. W czasie 0-2 min rejestrowano poziom bazowy fluorescencji fluo-3. TBBPA i modulatory podawano do komórek po 2 min eksperymentu, a pomiary prowadzono przez dalsze 8 minut.

3.5.3. Badanie wpływu TBBPA na poziom produkcji wolnych rodników tlenowych w hodowlach CGC

Produkcję ROS indukowaną przez TBBPA oceniono z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej DCFH-DA. Eksperymenty przeprowadzono za pomocą zarówno czytnika fluorymetrycznego, oraz mikroskopu konfokalnego.

Komórki ziarniste mózdzku, wysiane w ilości 1 mln na dołek 24 dołkowej płytki, po 7 dniach hodowli *in vitro*, preinkubowano przez 30 min. w środowisku wzrostowym w warunkach standardowych z 100 μM DCFH-DA. Aby pozbyć się nadmiaru barwnika fluorescencyjnego dołki płukano dwukrotnie buforem Locke 5. Eksperyment przeprowadzono w medium jonowym Locke 5.

Badano wpływ 10 i 25 μM TBBPA na zmiany fluorescencji DCF, a substancjami modyfikującymi zmiany poziomu wolnych rodników tlenowych w cytozolu były: zmiatacze wolnych rodników – 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) oraz 1 mM zredukowany glutation (GSH), inhibitor megakanałów mitochondrialnych – 5 μM cyklosporyna A (CsA), antagonist receptoru NMDA – 0,5 μM MK-801 (MK), antagonist receptoru rianodynowego - 200 μM rianodyna (ryan) i modulator RyR. - 2,5 μM bastadyna (bast). Jako kontrole rozpuszczalniki stosowano komórki inkubowane w samym buforze Locke 5 z 0,5% DMSO i 0,1% etanolem. W okresie 0-5 min rejestrowano poziom wyjściowy fluorescencji DCF.

Zmiany w poziomie fluorescencji DCF, odpowiadające zmianom stężenia wolnych rodników tlenowych, rejestrowano za pomocą czytnika płytek FLUOstar OMEGA przy długościach fal ekscytacji/emisji 485/538 nm oraz mikroskopu konfokalnego LSM 510 wyposażonego w laser argonowy (488 nm). Szczegóły pomiaru - jak opisano w podrozdziale 3.5.2.

3.5.4. Badanie wpływu TBBPA na zawartość GSH oraz aktywność katalazy w hodowlach CGC

Zawartość zredukowanego glutationu (GSH) oznaczano stosując fluorymetryczny zestaw do oznaczania glutationu: ‘Glutathione Assay Kit’ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Pomiar opiera się na zdolności monochlorobimanu (MCB) do wiązania zredukowanego glutationu, tworząc fluorescencyjny addukt, który pozwala na oszacowanie poziomu GSH w komórkach hodowli. Aktywność katalazy oznaczano stosując kolorymetryczny zestaw do oznaczania katalazy ‘Catalase Assay Kit’ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Test opiera się na reakcji uwolnionej z komórek katalazy z metanolem w obecności H_2O_2 i pomiarze wytworzonego formaldehydu za pomocą chromogenu Purpald.

Przygotowane pierwotne hodowle CGC inkubowano przez 30 minut w 37°C w buforze Locke 5 w obecności badanych substancji, a następnie hodowle w dołkach dwukrotnie przemywano buforem PBS. Kolejno przeprowadzano testy z wykorzystaniem komercyjnych zestawów zgodnie z instrukcją zamieszczoną przez producenta.

W tych eksperymentach badany był wpływ 7,5, 10 i 25 μM TBBPA na zmiany fluorescencji MCB odzwierciedlającej zawartość GSH w komórkach hodowli CGC oraz zmiany kolorymetryczne chromogenu, który odwzorowuje poziom wytworzonego

formaldehydu, tym samym aktywności katalazy. Substancjami modyfikującymi wywołane przez TBBPA zmiany poziomu GSH w cytozolu lub aktywność katalazy były: zmiatacze wolnych rodników – 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) oraz 1 mM zredukowany glutation (GSH), antagonist receptoru NMDA – 0,5 μM MK-801 (MK), antagonist receptoru rianodynowego – 200 μM rianodyna (ryan) i modulator RyR – 2,5 μM bastadyna (bast). Jako kontrole rozpuszczalnikowe stosowano 0,5% DMSO i 0,1% etanol. Fluorescencję MCB mierzono za pomocą czytnika płytek FLUOstar OMEGA przy długościach fal 360 nm dla wzbudzenia i 485 nm dla emisji. Absorbancję chromogenu Purpald mierzono przy długości fali 550 nm za pomocą FLUOstar OMEGA.

3.5.5. Badanie wpływu TBBPA na potencjał błonowy mitochondriów w hodowlach CGC

Zmiany w potencjale błonowym mitochondriów ($\Delta\Psi\text{m}$) w hodowli CGC poddanej działaniu 10 i 25 μM TBBPA były mierzone za pomocą sondy fluorescencyjnej rodamin 123 (R123). Błony mitochondrialne mają zdolność do wiązania rodamin 123 w zależności od potencjału błonowego. W warunkach polaryzacji błony, R123 wiąże się do błon, co wygasza fluorescencję, natomiast podczas depolaryzacji błony – R123 uwalniana jest do cytozolu, powodując wzrost fluorescencji.

Substancjami modyfikującymi zmiany potencjału mitochondrialnego w neuronach były: zmiatacze wolnych rodników - 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) oraz 1 mM zredukowany glutation (GSH), antagonist receptoru NMDA - 0,5 μM MK-801 (MK), antagonist receptoru rianodynowego - 200 μM rianodyna (ryan) i jego modulator - 2,5 μM bastadyna (bast) oraz inhibitor megakanałów mitochondrialnych – 5 μM cyklosporyna A (CsA). Jako kontrole rozpuszczalnikowe stosowano 0,5% DMSO i 0,1% etanol. W czasie 0-5 min rejestrowano poziom wyjściowy fluorescencji R123. Wzrost fluorescencji R123 rejestrowano za pomocą czytnika płytek FLUOstar OMEGA, a do pomiaru zastosowano filtry: dla światła wzbudzającego 485 nm i dla światła emitowanego 538 nm. Dane zbierane były co 60 sekund przez 30 minut. Modulatory i TBBPA podawano do komórek po 5 min eksperymentu, a pomiary prowadzono przez dalsze 25 min.

3.5.6. Badania wpływu TBBPA na potencjał błony komórkowej w hodowlach CGC

Zmiany potencjału błonowego komórek ziarnistych mózdzku badane były za pomocą sondy fluorescencyjnej oxonol VI (Apell i Bersh, 1987; Smith, 1990). Fluorescencja tej sondy ulega wygaszeniu podczas hiperpolaryzacji, a wzrasta, gdy następuje obniżenie potencjału transbłonowego. Oxonol VI jest negatywnie naładowanym związkiem i

przemieszcza się do wnętrza zdepolaryzowanych komórek na zasadzie równowagi Nernst'a, co ujawnia się w postaci wzmocnionej fluorescencji (Apell i Bersh, 1987). W naszych badaniach nie przeprowadzono kalibracji zmian fluorescencji oksonolu VI w odniesieniu do jednostek napięcia. Aby jednak zweryfikować wyniki pomiarów potencjału błonowego przy użyciu oksonolu VI, przeprowadzono eksperymenty kontrolne – dwie kontrole pozytywne z 100 mM KCl i 100 μ M glutaminianem. W eksperymentach użyto 10 μ M oksonolu VI na 1 ml buforu Locke 5, w którym inkubowane były neurony przez 30 minut w 37°C. Po inkubacji, eksperymenty były prowadzone bez zmiany środowiska hodowlanego. Po inkubacji prowadzono eksperymenty w tym samym środowisku zawierającym oksonol.

W tym eksperymencie badany był wpływ 5, 7,5, 10 i 25 μ M TBBPA na zmiany fluorescencji oksonolu VI, a efekty podania 25 μ M TBBPA były dodatkowo modulowane substancjami farmakologicznymi. Jako przeciwutleniacze wykorzystano 10 μ M butylowany hydroksyanizol (BHA) oraz 1 mM zredukowany glutation (GSH). Stosowano też 10 μ M CNQX – antagonistę receptora AMPA oraz 1 μ M tetrodotoksynę (TTX) – inhibitora kanałów sodowych, 0,5 μ M MK-801 lub 5 μ M memantynę (mem) – antagonistów NMDAR oraz kombinację ligandów RyR: 200 μ M rianodynę (ryan) i 2,5 μ M bastadynę (bast). Ponadto, dla zbadania natury początkowego obniżenia fluorescencji oksonolu VI po podaniu TBBPA i weryfikacji udziału w tym zjawisku hipotetycznej hiperpolaryzacji błon komórkowych poprzez aktywację kanałów potasowych o dużym przewodnictwie regulowanych jonami wapniowymi (BKCa), co mogło by nastąpić w wyniku wzrostu $[Ca^{2+}]_i$, wykorzystano blokera BKCa, 200 μ M iberiotoksynę (IBTX). Dla zbadania udziału w tym zjawisku receptorów GABA podawano antagonistów receptora GABA_A - 10 μ M pikrotoksynę (PTX), 20 μ M bikukulinę (BCC), 20 μ M metylobromek bikukuliny (BCMB) lub 1 mM furosemid (FUR). Wymienione substancje były stosowane pojedynczo lub jako kombinacja różnych antagonistów. Próbkami kontrolnymi były pomiary fluorescencji oksonolu VI w hodowli komórek w obecności rozpuszczalników: 0,5% DMSO lub 0,1% etanolu.

Zmiany we fluorescencji oksonolu VI w neuronach mierzono z użyciem mikroskopu konfokalnego LSM 510 stosując laser argonowy przy długości fali światła wzbudzającego – 540 nm i światła emitowanego - 630 nm. Zmiany we fluorescencji rejestrowano co 30 sekund przez 15 minut. Pierwsze trzy skany wyznaczały poziom fluorescencji wyjściowej. Następnie podawano wymienione wyżej substancje farmakologiczne i również rejestrowano

zmiany fluorescencji po ich podaniu, a w dalszej kolejności prowadzono pomiary zmian po podaniu TBBPA.

3.5.7. Badanie wpływu TBBPA na pobieranie ^{45}Ca przez komórki ziarniste mózdzku: modulacja przez podanie enzymu rozkładającego glutaminian.

Pobieranie wapnia przez komórki ziarniste mózdzku badano z użyciem znakowanego chlorku wapnia (II) – $^{45}\text{CaCl}_2$ – zgodnie z metodami wcześniej stosowanymi w Pracowni Farmakoneurochemii IMDiK PAN (Ziemińska i wsp., 2006; 2012; 2015; 2017). Komórki ziarniste mózdzku wysiewane były w ilości 4 mln na dołek 6 dołkowej płytki. Po 7 dniach hodowli *in vitro*, środowisko hodowlane było zastępowane buforem inkubacyjnym (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,6 mM NaHCO_3 ; 1,3 mM CaCl_2 ; 5,6 mM glukozy; 10 mM HEPES; pH 7.4) w ilości 2 ml/dołek, a komórki preinkubowano przez 10 min. w 37°C. W eksperymencie stosowano dwa środowiska inkubacyjne. Grupę kontrolną stanowiły hodowle CGC inkubowane przez 5 minut w podanym wyżej buforze inkubacyjnym, natomiast grupą doświadczalną były hodowle CGC inkubowane w buforze z dodatkiem 10 μl GPT (2U/dołek) i 10 μl pirogronianu (pyr) w końcowym stężeniu 2 mM. Następnie do obydwu środowisk hodowli CGC dodawano $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 $\mu\text{Ci/ml}$), TBBPA (5, 10, 25 μM) i MK-801 (1 μM). Jako kontrolę pozytywną użyto 100 μM glutaminianu, a kontrolą rozpuszczalnikową był 0,5% DMSO. Następnie płytki inkubowano przez kolejne 10 min. w temperaturze 37°C. Po tym czasie reakcję zatrzymywano przez odessanie medium eksperymentalnego i 3-krotne przepłukanie komórek zimnym buforem zawierającym: 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,6 mM NaHCO_3 ; 10 mM HEPES; 2 mM EGTA; pH 7.4. W dalszej kolejności komórki poddawano lizie przez dodanie 0,5 M roztworu NaOH i inkubacji przez 30 minut w temperaturze 4°C. Po tym czasie zawartość dołków przeniesiono do fiolek i uzupełniono płynem scyntylicyjnym, a po 24 godzinach mierzono radioaktywność próbek przy użyciu licznika Wallac 1409 (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

3.5.8. Badanie przeżywalności komórek hodowli po ekspozycji na TBBPA

Toksyczne działanie TBBPA na hodowle komórek ziarnistych mózdzku oceniano badając przeżywalność neuronów przy użyciu barwnika fluorescencyjnego jodku propidyny (PI) oraz kalceiny/homodimeru etydydy (CA/ET). PI nie przenika przez błony jądrowe żywych komórek, dlatego przed wybarwieniem komórki wymagają utrwalenia 80 % metanolem dla uprzepuszczalnienia błony. W ten sposób PI może związać się z DNA barwiąc jądra komórkowe. Metodą tą znakujemy komórki, które w momencie utrwalenia

były zarówno martwe jak i żywe. PI uwidacznia morfologię jąder komórkowych, co może być wykorzystane do oceny udziału apoptozy w śmierci neuronów. „Martwe i żywe” komórki zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym i szacowano ich procentowy udział w każdym z dołków (Ankarcrona i wsp., 1995). Innym testem również użytym do oceny przeżywalności komórek był test CA/ET. Kalceina w postaci niefluoryzującego estru acetoksymetylowego, którą dodaje się do hodowli komórkowych, przenika przez błony komórkowe. Dopiero po wnikięciu do żywych komórek posiadających nienaruszone błony komórkowe jest ona przekształcana przez esterazy w fluoryzującą w kolorze zielonym kalceinę. Homodimer-1 etydyne (ET) jest słabo fluoryzującym związkiem, który przenika tylko do martwych lub umierających komórek z uszkodzonymi błonami komórkowymi i wiąże się z wysokim powinowactwem do DNA (fluorescencja w kolorze czerwonym). Ten test można analizować z wykorzystaniem fluorescencyjnego czytnika płytek.

Podczas eksperymentów badających przeżywalność i śmierć neuronów, środowisko hodowlane wymieniane było na bufor Locke 25 zawierający 134 mM NaCl, 25 mM KCl, 2,3 mM CaCl₂, 4 mM NaHCO₃, 5 mM glukozę, 5 mM HEPES (pH 7,4). Efekty podania 10 lub/i 25 μM TBBPA były dodatkowo modulowane różnymi substancjami farmakologicznymi. Podawano antyoksydanty, 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) i 1 mM zredukowany glutation (GSH), antagonistę receptora NMDA, 0,5 μM MK-801 (MK), antagonistę receptora rianodynowego – 200 μM rianodynę (ryan) i modulatora RyR – 2,5 μM bastadynę (bast). Te substancje były stosowane pojedynczo lub jako kombinacje różnych antagonistów. Jako kontrole rozpuszczalnikowe stosowano 0,5% DMSO i 0,1% etanol. Po 30-minutowej inkubacji hodowli komórkowych przy 37°C dołki były dwukrotnie przemywane buforem Locke 25, a następnie zostało przywrócone środowisko hodowlane, a komórki pozostawały w hodowli przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie usuwano środowisko hodowlane, a komórki utrwalano w 80% roztworze metanolu przez 30 min w temp. -20°C. Po utrwaleniu i odpłukaniu metanolu komórki barwiono 0,5 μg/ml PI w roztworze PBS przez 5 min w RT.

Przeżywalność komórek w eksperymentach z zastosowaniem PI była analizowana przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiovert (Carl Zeiss AG, Niemcy) przy długości fali wzbudzenia 546 nm i emisji 617 nm. Zmiany fluorescencji przy zastosowaniu testu CA/ET mierzono za pomocą czytnika płytek (FLUOstar Omega, Niemcy) przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 520 nm dla CA oraz przy długości fali wzbudzenia 530 nm i emisji 620 nm dla ET. Przeżywalność komórek hodowli CGC określono, w przypadku

barwienia PI jako procent żywych komórek w odniesieniu do wszystkich komórek obecnych w danej grupie, a w przypadku CA/ET jako procentowy spadek przeżywalności w stosunku do kontroli.

3.5.9. Badanie zmian ekspresji genów związanych z programowaną śmiercią neuronów w hodowli CGC

Całkowite RNA ekstrahowane było z 30 mln komórek hodowli CGC w 3, 6 i 24 godzinie po 30-minutowej ekspozycji komórek na 25 μ M TBBPA lub rozpuszczalnik (0.5% DMSO) przy użyciu zestawu 'miRNeasy1 Minik Kit' (Qiagen, Hilden, Germany) według instrukcji przewidzianej przez producenta. Po oczyszczeniu RNA przeprowadzone zostało trawienie DNAzą na kolumnie używając zestawu 'RNase-Free DNase Set' (Qiagen, Hilden, Germany). Stężenie RNA było oszacowane spektrofotometrycznie przy długości fal 260 nm przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Czystość próbki RNA oznaczono poprzez określenie stosunku absorbancji przy pomiarach o długości fal 260 i 280 nm. Kontrolę jakości próbki wykonano metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym. Do konwersji RNA do cDNA stosowany był zestaw 'RT2 First Strand Kit' (Qiagen, Hilden, Germany), a eksperymenty PCR w czasie rzeczywistym (qPCR - Quantitative PCR) przeprowadzane były zgodnie z instrukcją zestawu 'RT2 Profiler PCR array' na termocyklerze LightCycler1 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Za pomocą zestawu 'The Rat Cell Death Pathway Finder (PARN-212ZF) RT2 Profiler PCR Array' (SA Biosciences, Frederick, USA) wykonany został profil ekspresji 84 genów odpowiadających za śmierć komórkową (Tabela 6). Warunki eksperymentów PCR były następujące: 1 cykl w 95°C na 10 min; 45 cykli w 95°C na 15 sek oraz w 60°C na 1 min; 1 cykl w 95°C na 10 sek i w 60°C na 15 sek oraz w 95°C na 15 sek. Badanie względnej ekspresji genów wykonane było metodą DDCT (Livak i Schmittgen, 2001). Ekspresja genów była normalizowana do średniej z pięciu użytych w eksperymentach genów referencyjnych: *Actb* (β -aktyna), *B2m* (β 2-mikroglobulina), *Hprt1* (fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa 1), *Ldha* (dehydrogenaza mleczanowa A) oraz *Rplp1* (duża podjednostka rybosomalna, P1).

Wyniki z wartościami Ct były analizowane przy pomocy bazy do analiz PCR: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

3.5.10. Badanie indukcji apoptozy oraz autofagii komórek ziarnistych mózdzku w wyniku ekspozycji na TBBPA

Eksperymenty dotyczące ujawnienia rodzaju śmierci komórkowej indukowanej przez ekspozycję hodowli CGC na TBBPA, przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów: „Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection Kit” oraz „Autophagy/Cytotoxicity Dual Staining Kit”. Test do wykrycia apoptozy opiera się na oznaczeniu fosfatydyloseryny (PS), która we wczesnej fazie apoptozy przemieszcza się z wewnętrznej powierzchni błony komórkowej na powierzchnię komórki. Koniugat aneksyny V z FITC posiada wysokie powinowactwo do PS emitując zieloną fluorescencję (Crowley i wsp., 2016). Test do monitorowania autofagii wykorzystujący monodansylkadawerynę (MDC), która jest związkiem lizosomotropicznym, i wykazuje powinowactwo do błon lipidowych oraz przedziałów ze środowiskiem o obniżonym pH. Te cechy pozwalają na łączenie się oraz wnikanie do ciałek wielopęcherzykowych jak lizosomy, późne endosomy oraz wakuole autofagiczne, tym samym zwiększając intensywność fluorescencji (Niemann i wsp., 2001).

Analiza obrazów pod mikroskopem konfokalnym odbywała się przy najmniejszej intensywności światła przechodzącego (1% mocy), w celu upewnienia się, że zlokalizowana fluorescencja pochodzi od morfologicznie prawidłowej i funkcjonującej komórki ziarnistej mózdzku, a nie artefaktu. Liczenie komórek odbywało się na zasadzie oznaczania 100 dowolnie wybranych, lecz morfologicznie prawidłowych komórek. Następnie wykrywano – za pomocą lasera argonowego ustawionego na długość fali odpowiadającej danemu markerowi śmierci komórkowej i zliczano stosunek komórek wykazujących fluorescencję do komórek oznaczonych, lecz nieświecących. Taką zasadę przyjęto dla wszystkich powtórzeń i użytych markerów w tym badaniu.

Przygotowane hodowle otrzymane jak opisano powyżej, poddano 30-minutowej ekspozycji na 25 μ M TBBPA w 37°C. Po tym czasie dołki hodowli komórkowych były dwukrotnie przemywane buforem Locke 25 a następnie napełniano je medium hodowlanym, a komórki pozostawały w hodowli do czasu badania. Barwienie z wykorzystaniem danego zestawu, przygotowane zgodnie z protokołem załączonym przez producenta, następowało po 3, 6 oraz 24 godzinach od ekspozycji hodowli na TBBPA.

Analizę badanej hodowli przeprowadzano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 z laserem argonowym i systemem Cell Observer SD przy ustawieniach 488 nm długości fali wzbudzenia oraz 530 nm emisji w przypadku eksperymentów z

użyciem komercyjnej aneksyny V-FITC. Pomiary fluorescencji MDC przeprowadzono przy długości fali 335 nm wzbudzenia oraz 512 nm emisji, natomiast fluorescencji PI przy długości fali 546 nm wzbudzenia oraz 617 nm emisji. Pozyskanie oraz sortowanie danych odbywało się przy użyciu programu mikroskopu konfokalnego ZEN w wersji 3.2 (Carl Zeiss AG, Jena Germany). Liczenie komórek żywych oraz martwych odbyło się przy użyciu programu ZEN Blue dedykowanego dla użytego mikroskopu konfokalnego. Przeżywalność komórek hodowli CGC określono, jako procent żywych komórek w odniesieniu do wszystkich komórek obecnych w danej próbce.

3.6. Analiza statystyczna

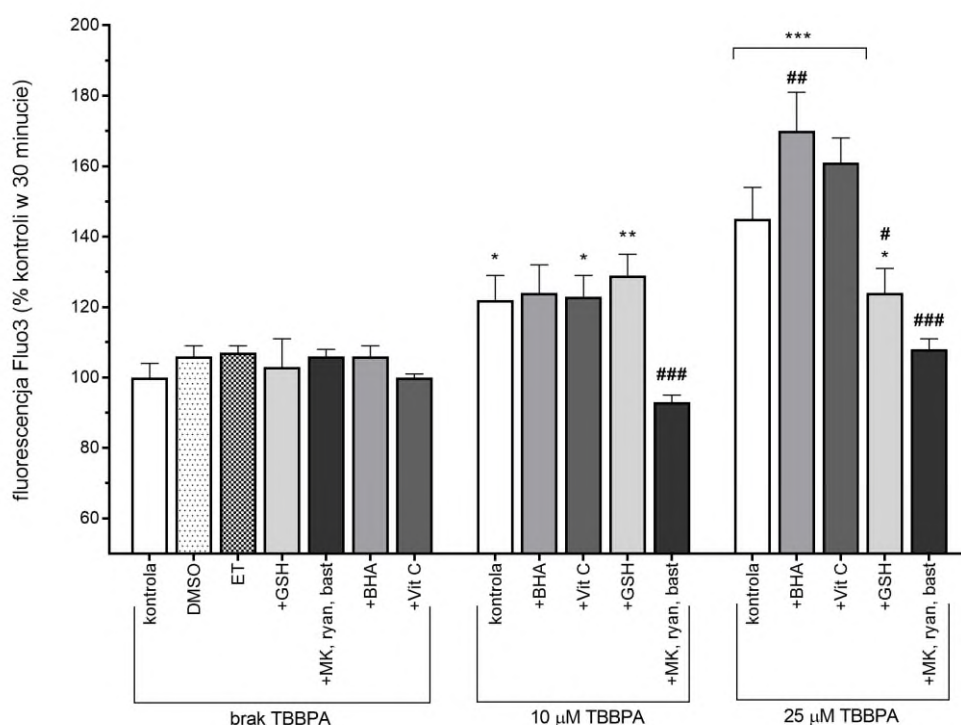
Wszystkie eksperymenty wiązania radioligandów do frakcji błon synaptycznych były powtarzane czterokrotnie z użyciem różnych preparatów błon izolowanych z różnych dorosłych szczurów. Zbiór danych prezentowany jest jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). Badania z użyciem hodowli CGC były powtarzane trzykrotnie, a w każdym eksperymencie hodowle komórkowe były preparowane z osesków szczurzych pochodzących z różnych miotów. Ponieważ różnice między tymi eksperymentami były nieistotne statystycznie ($p > 0.05$), uzyskane w ten sposób dane zostały uznane za jeden zbiór i wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD.

Do oceny znamienności statystycznej różnic między próbkami kontrolnymi a badanymi stosowano test *one-way* lub *two-way* ANOVA wraz z testem wielokrotnych porównań Dunnett'a lub Bonferroni'ego. Zmiany uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

4. Wyniki

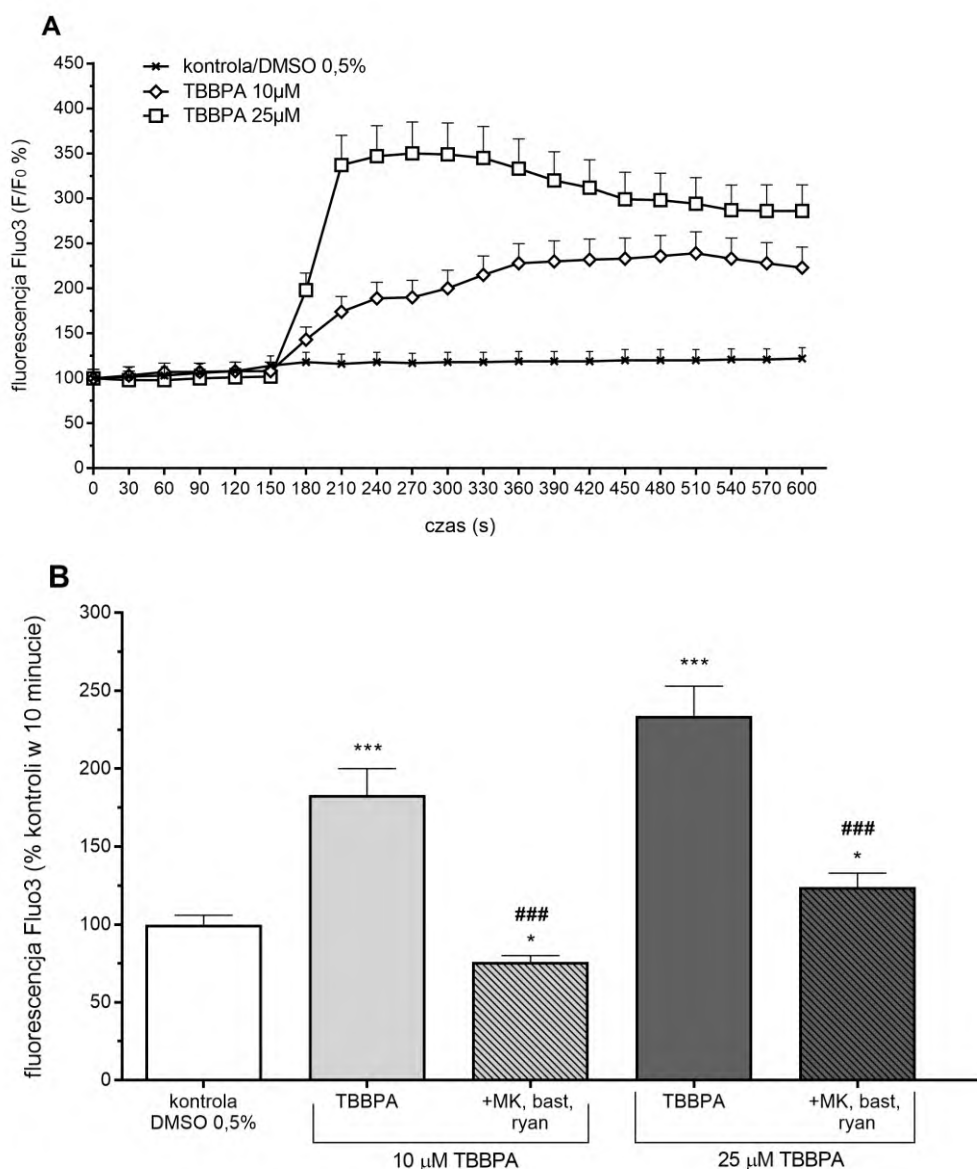
4.1. Indukowane przez TBBPA zaburzenia homeostazy wapnia w hodowli CGC mózdzku szczura i ich wpływ na poziom stresu oksydacyjnego i potencjał mitochondrialny

Wyniki przedstawione na Ryc. 8 pokazują wzrost fluorescencji fluo-3, która odzwierciedla wzrost $[Ca^{2+}]_i$, wynikający z podania TBBPA do hodowli pierwotnych CGC. Utrzymujący się podwyższony poziom wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} podczas 30-minutowej inkubacji był zależny od stężenia TBBPA (Ryc. 8, 9). Jednoczesne podanie 200 μ M rianodiny w kombinacji z 2,5 μ M bastadyną i 0,5 μ M MK-801 – antagonistów odpowiednio RyR i NMDAR – całkowicie zapobiegło wzrostom $[Ca^{2+}]_i$ indukowanym przez 10 μ M TBBPA, i niemal całkowicie zmniejszyło efekt podania 25 μ M TBBPA (Ryc. 8). Wyniki te są zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi z mikroskopii konfokalnej w czasie rzeczywistym (Ziemska i wsp., 2015), a także z pomiarami w mikroskopii konfokalnej, które wykonaliśmy na potrzeby obecnych badań (Ryc. 9).



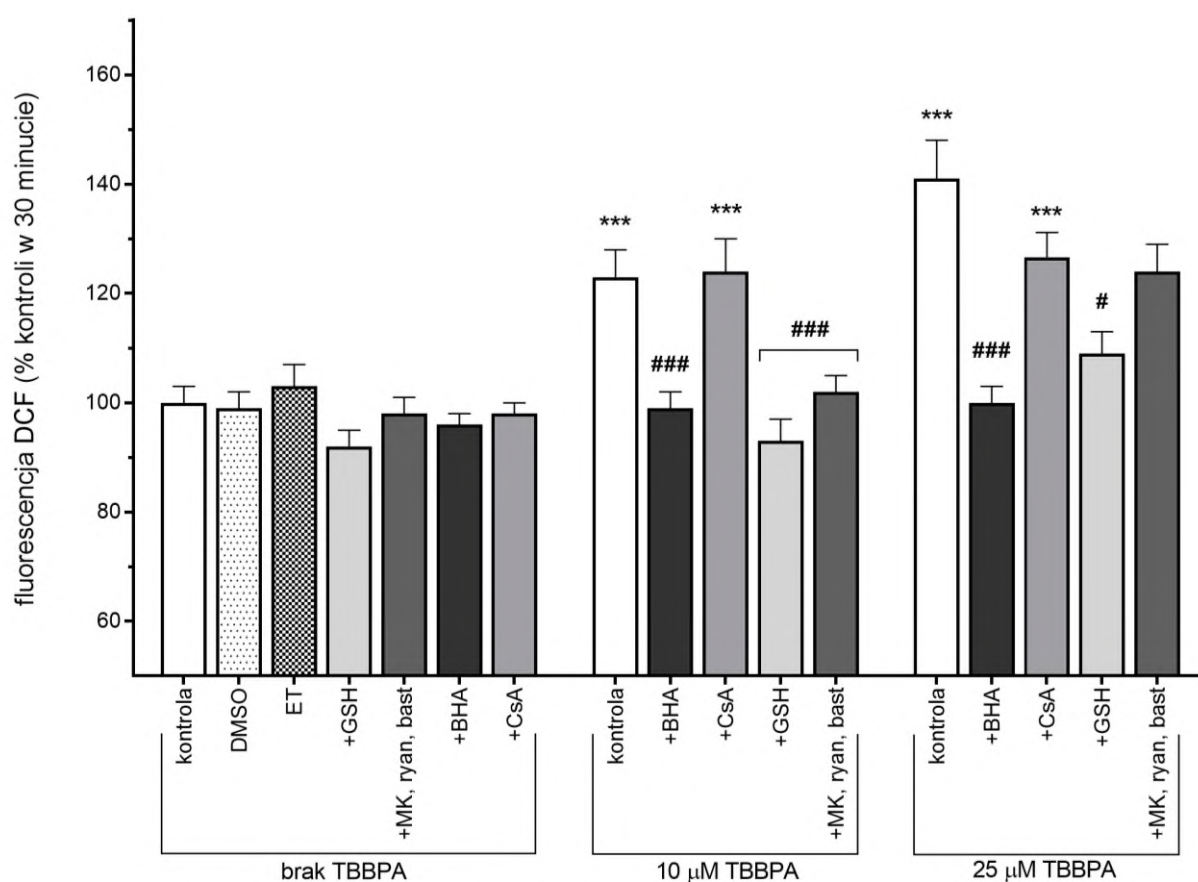
Rycina 8. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} indukowany w obecności TBBPA w pierwotnych hodowlach CGC. Modulacja efektów 10 i 25 μ M TBBPA przez zmiatacze wolnych rodników: 10 μ M butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET), 1 mM zredukowany glutation (GSH), 1 mM kwas askorbinowy (Vit C) i połączenie antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μ M bastadyny (bast), 200 μ M rianodiny (ryan) i 0,5 μ M MK-801 (MK). Fluorescencja fluo-3 jest wyrażona jako procent kontroli w 30 min. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD (n = 15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (brak TBBPA): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ oraz kontrolą wewnątrz grupy eksponowanej na 10 i 25 μ M TBBPA z modulatorami: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ indukowany przez 25 μM TBBPA był znacząco nasilony w obecności zmiataczy wolnych rodników tj. 10 μM butylowanego hydroksyanizolu (BHA) (wzrost o 55,5%) lub 1 mM witaminy C (wzrost o 35,5%). Podanie 1 mM GSH obniżyło fluorescencję wywołaną podaniem 25 μM TBBPA o 46,7%. Użyte zmiatacze wolnych rodników nie miały wpływu na stężenie $[Ca^{2+}]_i$ w próbie kontrolnej hodowli CGC nie ekspozowanej na TBBPA oraz na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} wywołany przez 10 μM TBBPA (Ryc. 8).



Rycina 9. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} indukowany w obecności TBBPA w pierwotnych hodowlach CGC. (A) Zależny od stężenia wpływ 10 i 25 μM TBBPA w porównaniu do kontroli rozpuszczalnika (0,5% DMSO) na fluorescencję fluo-3. (B) Hamowanie działania 10 i 25 μM TBBPA przez kombinację antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadyny (bast), 200 μM rianodyny (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Fluorescencja fluo-3 jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego ($F/F_0\%$) (A) lub procent kontroli w 10 minucie (B). Wyniki z jednego przykładowego eksperymentu (wartości średnie \pm SD z 4 powtórzeń). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ oraz kontrolą wewnątrz grupy ekspozowanej na TBBPA: ### $p < 0,001$

Wyniki przedstawione na Ryc. 9A pokazują znaczący wzrost fluorescencji fluo-3 indukowany przez 10 μM i 25 μM TBBPA w hodowlach CGC. Wzrost fluorescencji odzwierciedla zależne od stężenia TBBPA zwiększenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ponadto, na Ryc. 9B wykazano, że zastosowanie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR (0,5 μM MK-801 i 200 μM rianodyny z 2,5 μM bastadyną) całkowicie zmniejszyło wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wywołany przez 10 μM TBBPA, zmierzony po 10 minutach (spadek z 183% do 76% poziomu kontroli), a wpływ 25 μM TBBPA został obniżony z 234% do 124%. Obecność tych antagonistów w kontroli i/lub hodowli CGC traktowanej DMSO nieznacznie obniżała fluorescencję fluo-3 (wyników nie pokazano).

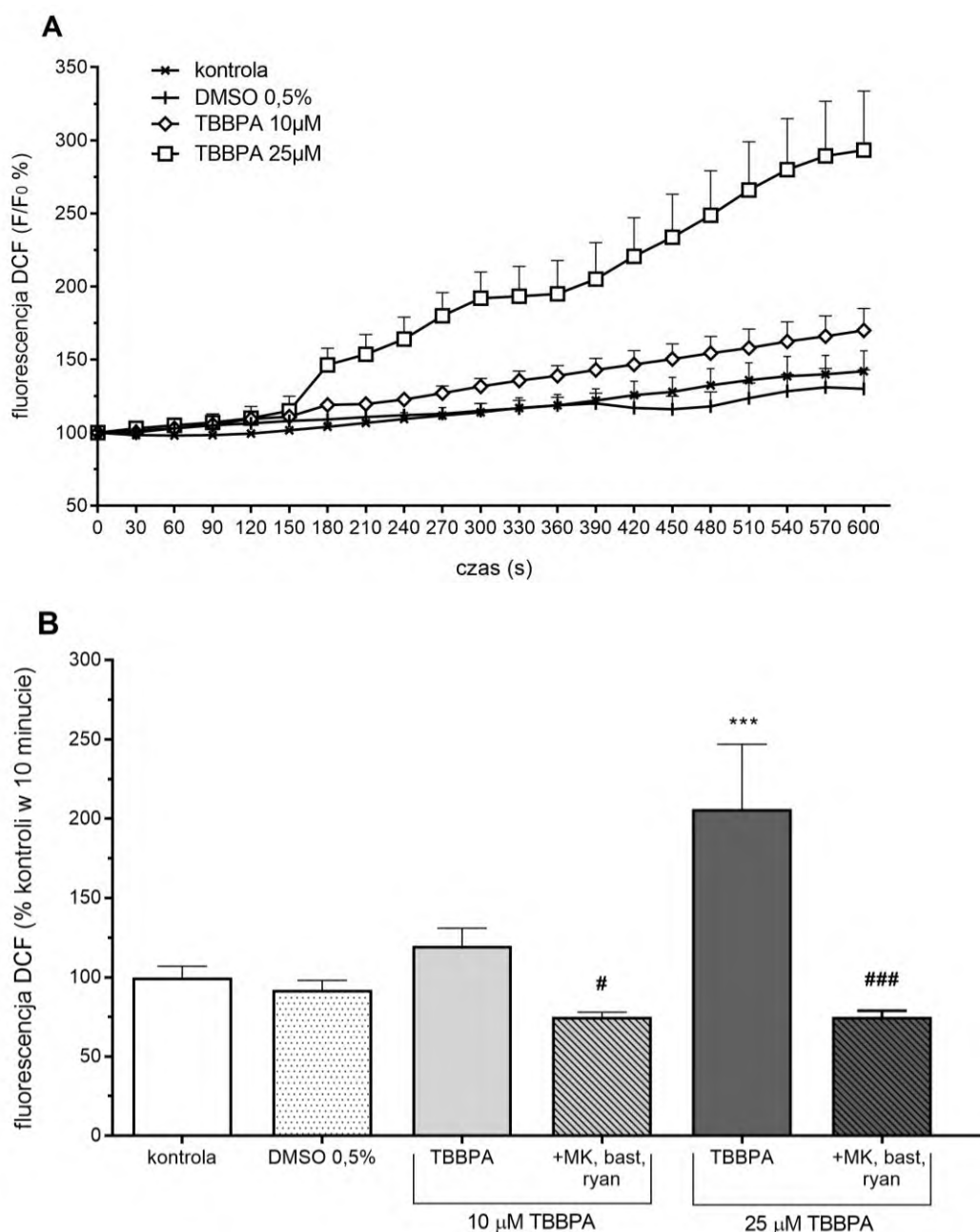


Rycina 10. Wzrost produkcji reaktywnych form tlenu w pierwotnych hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA. Modulacja działania 10 i 25 μM TBBPA przez zmiatacze wolnych rodników: 1 mM zredukowany glutation (GSH), 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET), inhibitor MPTP 5 μM cyklosporyne A (CsA) i kombinację antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadyna (bast), 200 μM rianodyna (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Fluorescencja DCF jest wyrażona jako procent kontroli w 30 min. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD ($n = 15$). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): *** $p < 0,001$ oraz kontrolą wewnątrz grupy eksponowanej na TBBPA: # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$

Stres oksydacyjny w hodowlach CGC wywołany przez TBBPA oceniono przez pomiar fluorescencji DCF; jego wzrost odzwierciedla produkcję ROS. Wyniki przedstawione na Ryc. 10 pokazują zależną od stężenia TBBPA produkcję ROS po ekspozycji komórek hodowli CGC na badany związek. Wyniki wykazały też, że produkcja ROS w hodowli CGC wywołana przez 10 lub 25 μM TBBPA była inaczej modulowana przez zastosowanych antagonistów NMDAR i RyR. Zabieg ten, który całkowicie zapobiegał wzrostowi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indukowanemu przez 10 μM TBBPA (Ryc. 8), również całkowicie hamował wzrost produkcji ROS. Jednak w przypadku 25 μM TBBPA niemal pełnemu zahamowaniu wzrostu poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ryc. 8) towarzyszyła zaledwie nieznamienna statystycznie tendencja do zmniejszania produkcji ROS (Ryc. 10).

Wyniki prezentowane na Ryc. 10 pokazują, że zmiatacze wolnych rodników BHA i GSH całkowicie zapobiegały wytwarzaniu ROS wywołanemu przez 10 μM TBBPA, podczas gdy w próbie z 25 μM TBBPA, wytwarzanie ROS było całkowicie zahamowane w obecności GSH, ale mniej skuteczne hamowanie (tylko o 78%) stwierdzono po zastosowaniu BHA. Inhibitor powstawania MPTP – cyklosporyna A (5 μM) – nie miała znaczącego wpływu na wytwarzanie ROS w hodowlach CGC eksponowanych na 10 i 25 μM TBBPA (Ryc. 10).

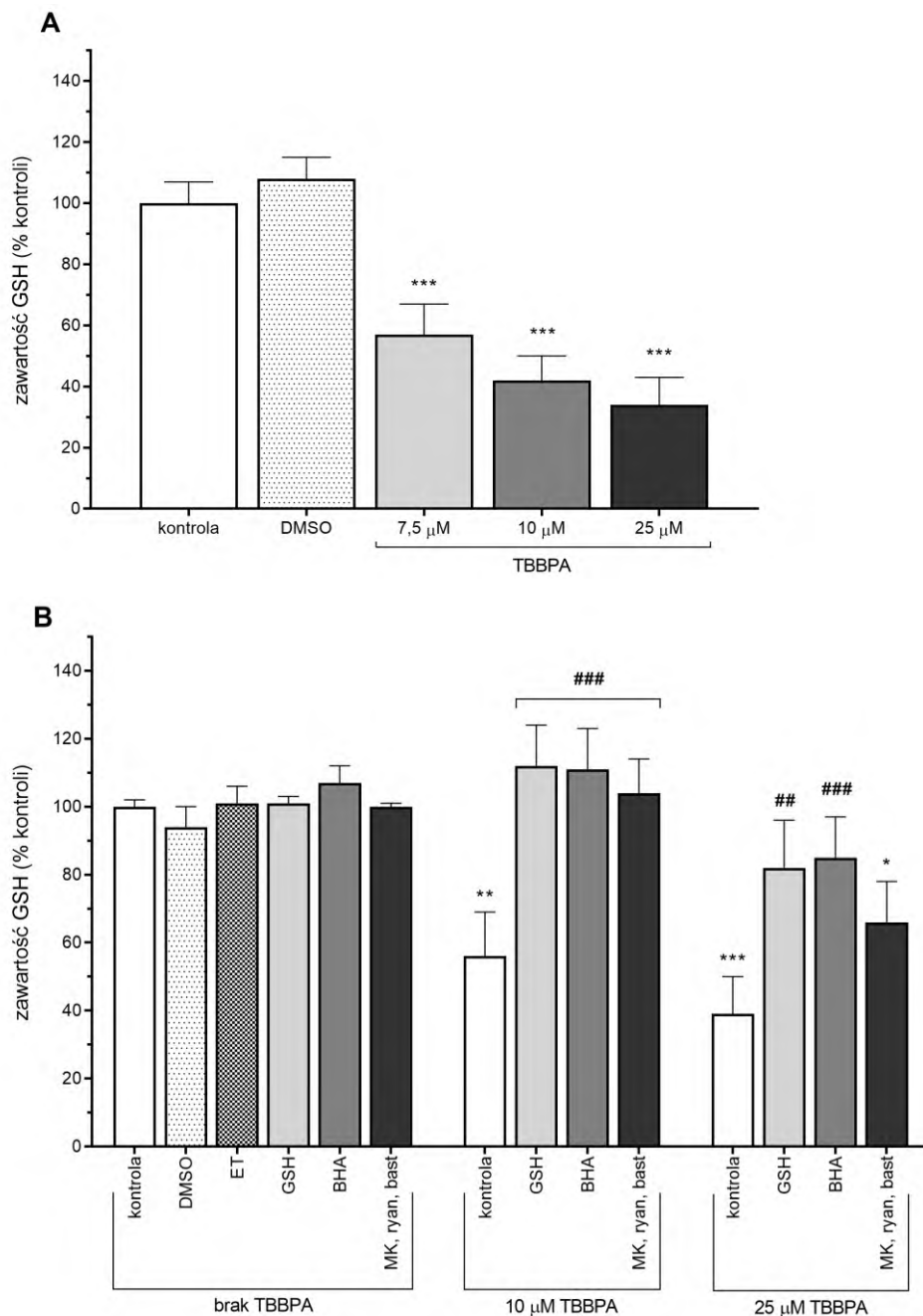
Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują, że wzrost fluorescencji fluo-3 i DCF w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA jest zależny od jego stężenia oraz jest hamowany przez antagonistów NMDAR i RyR. Podobne tendencje uzyskano przy pomocy mikroskopu konfokalnego (Ryc. 8, 10) i przy użyciu fluorescencyjnego czytnika płytek (Ryc. 9, 11). Ponadto, przedstawione tu wyniki dotyczące wpływu TBBPA na fluorescencję fluo-3 i modulację tych efektów przez antagonistów NMDAR i RyR są zgodne z naszymi poprzednio opublikowanymi danymi, również uzyskanymi przy użyciu konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej (Zieminska i wsp., 2015). Opisane wyżej wyniki sugerują, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w hodowlach CGC, indukowany przez 10 μM TBBPA jest pierwotną przyczyną wzrostu tworzenia ROS i w rezultacie stresu oksydacyjnego.



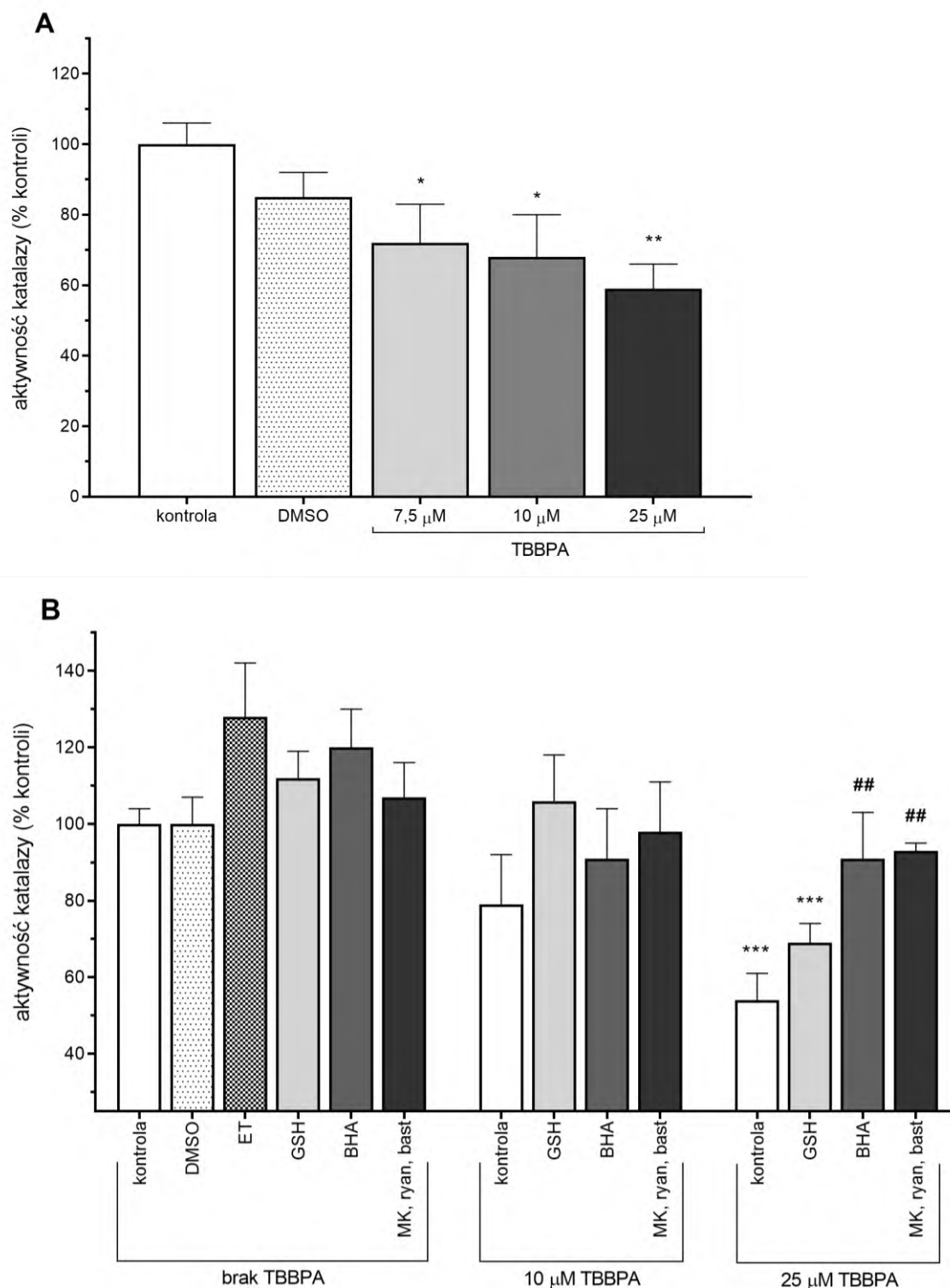
Rycina 11. Wzrost produkcji ROS w pierwotnych hodowlach CGC indukowany w obecności TBBPA. (A) Zależne od stężenia działanie 10 i 25 μM TBBPA w stosunku do kontroli rozpuszczalnika (0,5% DMSO) na fluorescencję DCF. (B) Modulacja wpływu 10 i 25 μM TBBPA przez połączenie antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadyny (bast), 200 μM rianodyny (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Fluorescencja DCF jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) (A) lub procent kontroli w 10 min (B). Wyniki z jednego przykładu eksperymentu (wartości średnie ± SD z 4 powtórzeń). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): ***p<0,001 oraz kontrolą wewnątrz grupy ekspozowanej na TBBPA: #p<0,05; ###p<0,001

Dla oceny endogennego potencjału antyoksydacyjnego hodowli CGC ekspozowanych na TBBPA, oznaczono zawartość GSH oraz aktywność katalazy. Jak przedstawiono na Ryc. 12, inkubacja hodowli CGC z TBBPA powoduje zależne od jego stężenia obniżenie zawartości GSH. Temu zjawisku wywołanemu przez podanie 10 μM TBBPA całkowicie zapobiegała

obecność antagonistów NMDAR i RyR, a także obecność BHA (Ryc. 12). Spadek zawartości GSH w hodowlach neuronów spowodowany przez obecność 25 μM TBBPA był zmniejszony tylko częściowo (o 44,3%) przez kombinację bastadyny z rianodyną i MK-801, a bardziej efektywnie – o 75,5%, w obecności BHA.

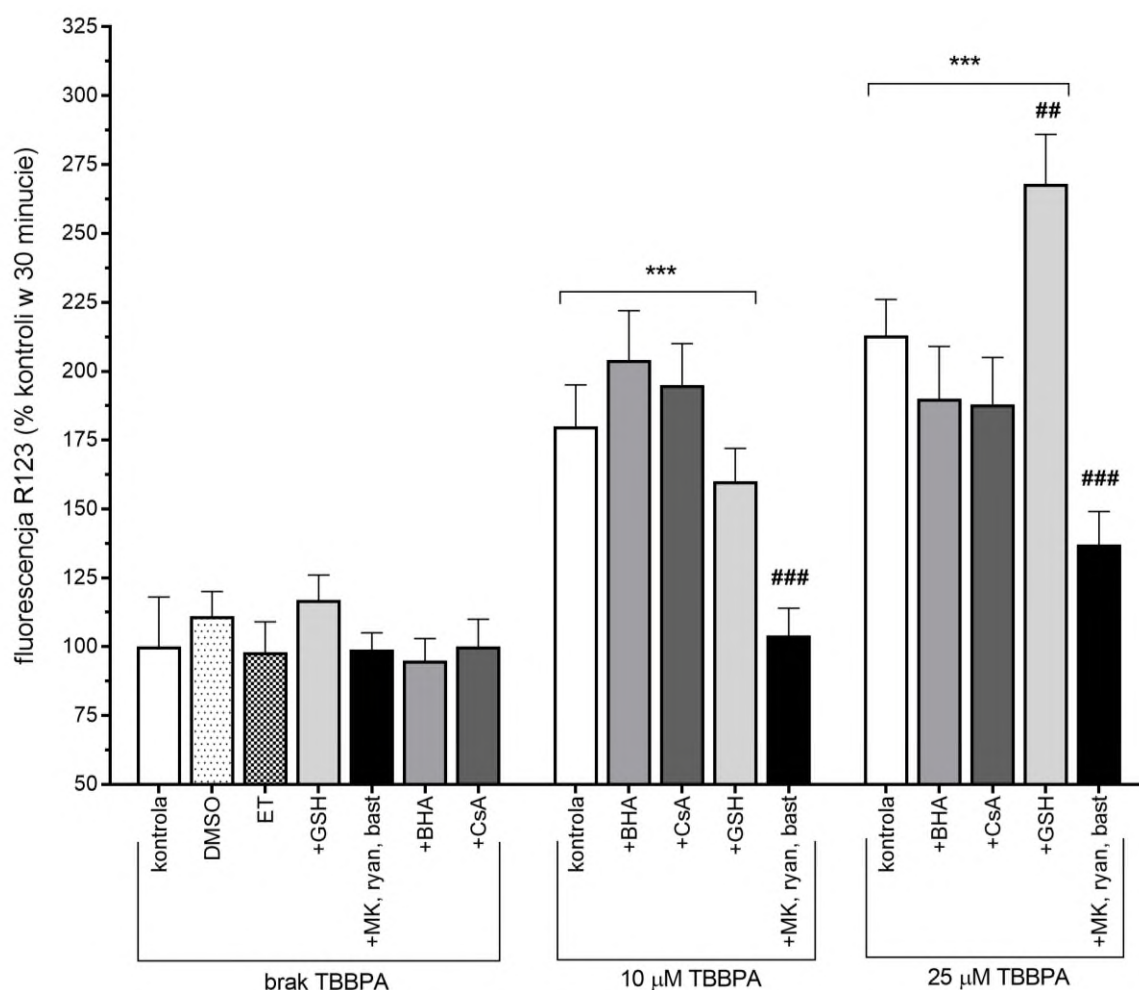


Rycina 12. Zmiany zawartości GSH w pierwotnych hodowlach CGC eksponowanych przez 30 min na TBBPA. (A) Wpływ różnych stężeń TBBPA i rozpuszczalnika (0,5% DMSO). (B) Modułacja wpływu 10 i 25 μM TBBPA przez zmiataczy wolnych rodników: 1 mM zredukowany glutation (GSH) i 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET) i przez mieszaninę antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadynę (bast), 200 μM rianodynę (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Zawartość GSH w CGC jest przedstawiona jako procent kontroli (bez TBBPA). Wyniki są wartościami średnimi \pm SD ($n = 15$). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ oraz kontrolną grupy eksponowanej na TBBPA: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$



Rycina 13. Obniżenie aktywności katalazy po 30-minutowej inkubacji hodowli CGC z TBBPA. (A) Wpływ różnych stężeń TBBPA i rozpuszczalnika (0,5% DMSO) na aktywność katalazy. (B) Modulacja wpływu 10 i 25 μM TBBPA przez zmiatacze wolnych rodników: 1 mM zredukowany glutation (GSH) i 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET) i przez mieszaninę antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadynę (bast), 200 μM rianodynę (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Aktywność katalazy w CGC jest przedstawiona jako procent kontroli (bez TBBPA). Wyniki są wartościami średnimi ± SD (n = 15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): ***p<0,001; oraz kontrolą grupy eksponowanej na TBBPA: ##p<0,01

Inkubacja CGC przez 30 minut z TBBPA (7,5; 10 i 25 μM) zmniejszyła aktywność katalazy w sposób zależny od stężenia, odpowiednio o 28, 32 i 41% (Ryc. 13). Spadkowi aktywności wywołanemu przez 10 μM TBBPA, całkowicie zapobiegało podanie GSH. Spadek aktywności katalazy indukowany przez 25 μM TBBPA był znacznie zmniejszony przez GSH, BHA i kombinację antagonistów RyR i NMDAR (Ryc. 13). Na Ryc. 13A pokazano również, że wystąpił 20% wzrost aktywności katalazy w komórkach kontrolnych (brak TBBPA) po 30 minutach inkubacji w obecności BHA. Jest to prawdopodobnie spowodowane wpływem etanolu (0,1%) stosowanego jako rozpuszczalnik dla BHA – ponieważ sam etanol zwiększył aktywność katalazy o 28%.



Rycina 14. Depolaryzacja błony mitochondriów w pierwotnych hodowlach CGC inkubowanych z TBBPA. Modulacja działania 10 i 25 μM TBBPA przez zmiataczy wolnych rodników: 1 mM zredukowany glutation (GSH), 10 μM butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET), inhibitor MPTP 5 μM cyklosporyne A (CsA) i kombinację antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μM bastadynę (bast), 200 μM rianodynę (ryan) i 0,5 μM MK-801 (MK). Fluorescencja R123 jest wyrażona jako procent kontroli w 30 min.. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD (n = 15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (brak TBBPA): ***p<0,001; oraz kontrolą grupy eksponowanej na TBBPA: ##p<0,01; ###p<0,001

Zmiany w potencjale błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA oceniono przy użyciu sondy fluorescencyjnej rodamininy 123 (R123). Jak pokazano na Ryc. 14, zastosowanie TBBPA spowodowało zależny od stężenia wzrost fluorescencji R123 (175-215%), co jest wskaźnikiem obniżenia $\Delta\Psi_m$. Mieszanina antagonistów RyR i NMDAR całkowicie zapobiegła temu efektowi w grupie, w której podawano 10 μM TBBPA, podczas gdy w grupie, w której podawano 25 μM TBBPA, depolaryzacja mitochondriów zmniejszyła się o 67,3% w stosunku do kontroli tego stężenia (Ryc. 14). Zmiatacze wolnych rodników GSH i BHA nie miały statystycznie istotnego wpływu na depolaryzację mitochondriów w hodowlach CGC inkubowanych z 10 μM TBBPA. W przypadku ekspozycji na 25 μM TBBPA, spadek $\Delta\Psi_m$ był nawet znacząco pogłębiony w obecności GSH, podczas gdy BHA nie miało istotnego wpływu. Dodanie 5 μM cyklosporyny A – o której wiadomo, że hamuje tworzenie porów (megakanałów) mitochondrialnych (MPTP) – nie zapobiegło w istotny sposób obniżeniu $\Delta\Psi_m$ indukowanemu przez podanie 10 i 25 μM TBBPA (Ryc. 14).

Przedstawione wyniki wskazują na to, że centralnym elementem mechanizmu ostrej cytotoksyczności indukowanej przez TBBPA w hodowlach CGC jest niekontrolowany wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, głównie pierwotny wobec stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów. Z poprzednich badań pracowni wiadomo, że za to zjawisko odpowiada aktywacja zarówno receptorów NMDA jak i rianodynowych (Zieminska i wsp., 2015). Ponadto, poprzednie badania pracowni (Zieminska i wsp., 2014) rzuciły światło na mechanizm aktywacji RyR będącej wynikiem ekspozycji CGC na TBBPA, natomiast mechanizm aktywacji w tych warunkach NMDAR jest hipotetyczny i wymaga zbadania.

4.1.1. Wpływ TBBPA na sygnał sond fluorescencyjnych w systemie bezkomórkowym

Przeprowadzone eksperymenty mające na celu uzasadnienie przydatności użytych sond fluorescencyjnych tj. fluo3AM, rodamininy 123, a przede wszystkim DCFH-DA. Wyniki (tabela 2) pokazują, że 0,5% DMSO nie miał wpływu na fluorescencję 100 μM roztworu DCFH-DA, podczas gdy zastosowanie TBBPA w obu stężeniach powodowało jednakowy i bardzo nieznaczny wzrost fluorescencji do 110%. W tych warunkach podanie TBBPA również nie miało istotnego wpływu na fluorescencję 100 μM DCF (wyniki nieprzedstawione). Dane z Tabeli 2 pokazują również brak istotnego wpływu kombinacji antagonistów NMDAR i RyR na fluorescencję roztworów DCFH-DA i DCF w środowisku bezkomórkowym.

Tabela 2. Wpływ TBBPA i antagonistów NMDAR/RyR na fluorescencję 100 μM roztworu DCFH-DA w środowisku bezkomórkowym

Próba	Fluorescencja w 30 minucie (% kontroli)	
	DCFH-DA	DCF
Kontrola	100 \pm 2	100 \pm 1
DMSO 0,5%	98 \pm 1	104 \pm 2
TBBPA 10 μM	110 \pm 3	108 \pm 2
TBBPA 25 μM	110 \pm 4	108 \pm 3
MK-801, rianodyna, bastadyna	103 \pm 2	104 \pm 1

Fluorescencję mierzono w środowisku bezkomórkowym (bufor Locke 5) zawierającym 100 μM DCFH-DA pod nieobecność (kontrola, DMSO) lub w obecności 10 lub 25 μM TBBPA lub kombinacji 0,5 μM MK-801, 200 μM rianodiny i 2,5 μM bastadyny.

Wyniki z jednego eksperymentu, dane przedstawione jako średnia z 3 powtórzeń na próbę.

Tabela 3. Wpływ TBBPA i antagonistów NMDAR/RyR na fluorescencję 1 μM roztworu DCFH-DA w środowisku bezkomórkowym

Próba	Fluorescencja w 30 minucie (% kontroli)	
	DCFH-DA	DCF
Kontrola	100 \pm 2	100 \pm 1
DMSO 0,5%	97 \pm 2	104 \pm 2
TBBPA 10 μM	132 \pm 3	108 \pm 2
TBBPA 25 μM	134 \pm 2	108 \pm 3
MK-801	94 \pm 2	104 \pm 1
rianodyna	98 \pm 2	104 \pm 2
bastadyna	140 \pm 3	114 \pm 2

Fluorescencję mierzono w środowisku bezkomórkowym (bufor Locke 5) zawierającym 1 μM DCFH-DA i DCF pod nieobecność (kontrola, DMSO) lub w obecności 10 lub 25 μM TBBPA, 0,5 μM MK-801, 200 μM rianodiny lub 2,5 μM bastadyny.

Wyniki z jednego eksperymentu, dane przedstawione jako średnia z 3 powtórzeń na próbę.

Tabela 4. Wpływ TBBPA i antagonistów NMDAR/RyR na fluorescencję 1 μM roztworu fluo-3AM i fluo-3 w środowisku bezkomórkowym

Próba	Fluorescencja w 30 minucie (% kontroli)	
	fluo-3AM	fluo-3
Kontrola	100 \pm 1	100 \pm 1
DMSO 0,5%	98 \pm 1	97 \pm 2
TBBPA 10 μM	107 \pm 3	106 \pm 2
TBBPA 25 μM	106 \pm 2	103 \pm 1
MK-801	100 \pm 1	98 \pm 1
rianodyna	98 \pm 2	95 \pm 1
bastadyna	105 \pm 1	111 \pm 2

Fluorescencję mierzono w środowisku bezkomórkowym (bufor Locke 5) zawierającym 1 μM fluo-3AM i fluo-3 pod nieobecność (kontrola, DMSO) lub w obecności 10 lub 25 μM TBBPA, 0,5 μM MK-801, 200 μM rianodiny lub 2,5 μM bastadyny.

Wyniki z jednego eksperymentu, dane przedstawione jako średnia z 3 powtórzeń na próbę.

Kolejny eksperyment, w którym użyto DCFH-DA i DCF w środowisku bezkomórkowym, w stukrotnie niższym stężeniu (1 μM) wykazał wzrost fluorescencji tych roztworów pod wpływem obu stężeń TBBPA i bastadyny o 32-40% (DCFH-DA) oraz 8–14% (DCF) w stosunku do kontroli (Tabela 3). Zarówno rozpuszczalnik – 0,5% DMSO – jak i pozostałe badane substancje nie wpływały istotnie na fluorescencję DCFH-DA i DCF.

W następnym doświadczeniu (Tabela 4) mierzono wpływ tych samych substancji na fluorescencję 1 μM fluo-3 AM i fluo-3 w środowisku bezkomórkowym. Dane z tabeli 4 pokazują, że TBBPA tylko nieznacznie (o 3-7%) zwiększyło fluorescencję sond wrażliwych na Ca^{2+} – fluo-3AM i fluo-3, podczas gdy bastadyna zwiększyła fluorescencję fluo-3 o 11%.

Tabela 5 przedstawia wpływ badanych substancji na fluorescencję 1 μM rodaminy 123 w środowisku bezkomórkowym. TBBPA (10 i 25 μM) zależnie od stężenia zmniejszyła fluorescencję tej sondy odpowiednio o 23 i 31%. Inna bromowana substancja jaką jest bastadyna, zmniejszyła fluorescencję tylko nieznacznie – o 9% w stosunku do kontroli.

Tabela 5. Wpływ TBBPA i antagonistów NMDAR/RyR na fluorescencję 1 μM roztworu rodaminy 123 w środowisku bezkomórkowym

Próba	Fluorescencja w 30 minucie (% kontroli)
Kontrola	100 \pm 1
DMSO 0,5%	98 \pm 2
TBBPA 10 μM	77 \pm 2
TBBPA 25 μM	69 \pm 3
MK-801	98 \pm 1
rianodyna	99 \pm 2
bastadyna	91 \pm 2

Fluorescencję mierzono w środowisku bezkomórkowym (bufor Locke 5) zawierającym 1 μM rodaminy 123 pod nieobecność (kontrola, DMSO) lub w obecności 10 lub 25 μM TBBPA, 0,5 μM MK-801, 200 μM rianodiny lub 2,5 μM bastadyny.

Wyniki z jednego eksperymentu, dane przedstawione jako średnia z 3 powtórzeń na próbę.

Dane te potwierdzają wyniki innych autorów (Tetz i wsp., 2013; Szychowski i wsp., 2016a, 2016b), że TBBPA zwiększa fluorescencję roztworów DCFH-DA w systemach bezkomórkowych. Ponadto, nasze eksperymenty kontrolne pokazały wywołany przez TBBPA wzrost fluorescencji roztworu DCF, który był jednak niższy niż w przypadku DCFH-DA. Inny bromowany związek – bastadyna, także nasilał fluorescencję roztworu DCFH-DA. Co ważne, TBBPA i bastadyna, nieznacznie wzmocniły fluorescencję fluo-3AM i fluo-3, a zmniejszyły fluorescencję rodaminy 123. Należy więc odpowiedzieć na pytanie, czy te wyniki uzyskane w systemie bezkomórkowym wiarygodnie pokazują, że

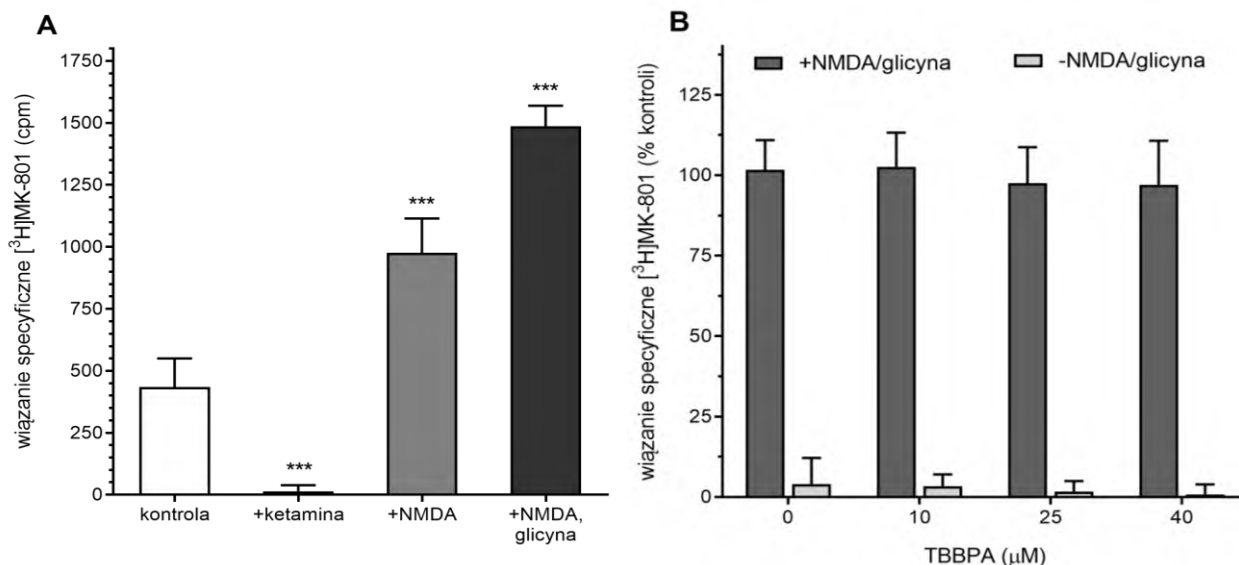
dane uzyskane w modelu hodowli CGC przy użyciu testu DCF są artefaktami. Innymi słowy, czy słuszne są poglądy autorów, którzy ostrzegają, że wzmożonej fluorescencji DCF, obserwowanej po podaniu TBBPA do hodowli komórek nie należy przypisywać wzrostowi produkcji ROS w komórkach (Tetz i wsp., 2013), a test DCF nie nadaje się do oceny indukowanego przez TBBPA stresu oksydacyjnego w neuronach (Szychowski i wsp., 2016b). Szersza analiza wyników znajduje się w podrozdziale 5.1. dyskusji.

4.2. Mechanizmy indukowanej przez TBBPA aktywacji receptorów NMDA

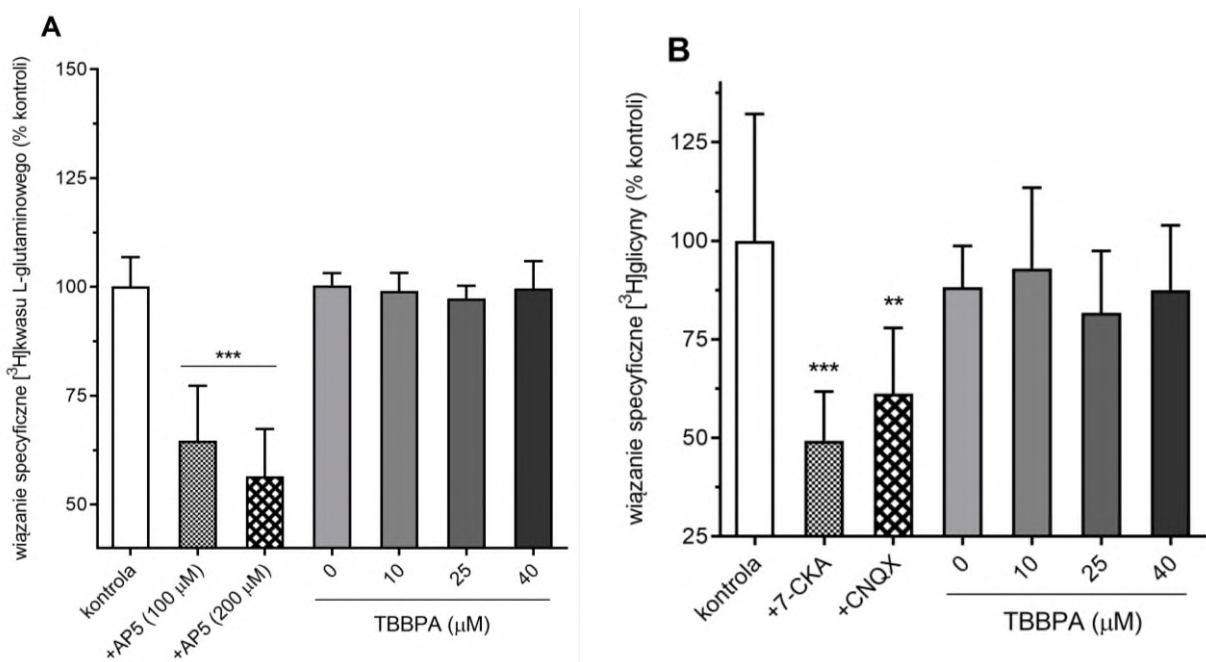
4.2.1. Bezpośrednie interakcje TBBPA z receptorami NMDA

Do zbadania bezpośrednich interakcji TBBPA z receptorami NMDA znajdującymi się w błonach komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura zastosowano [³H]MK-801, specyficznego antagonistę NMDAR wiążącego się do wnętrza aktywnego kanału. Wyniki pomiarów kontrolnych (Ryc. 15A) wykazały, że wiązanie [³H]MK-801 do frakcji błon komórkowych, będące wskaźnikiem aktywności receptorów NMDA, zostało niemal całkowicie zniesione po podaniu 100 μM ketaminy, niekompetycyjnego blokera NMDAR. Podanie agonistów NMDAR - 100 μM NMDA oraz 100 μM NMDA wraz z 30 μM glicyną spowodowało odpowiednio - dwukrotny lub czterokrotny wzrost specyficznego wiązania [³H]MK-801, co świadczy o aktywacji tych receptorów. Taka obserwacja pozwala sądzić, że otrzymane błony wyizolowane z kory mózgu szczurzych zawierają natywne NMDAR i nadają się do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów z użyciem TBBPA.

Następnie zostały przeprowadzone eksperymenty testujące wpływ trzech stężeń TBBPA (10, 25 oraz 40 μM) na wiązanie [³H]MK-801 do frakcji błon (Ryc. 15B). Próba kontrolna nie zawierała badanej substancji, jedynie jej rozpuszczalnik – 0,5% DMSO. Podanie TBBPA w obecności agonistów (100 μM NMDA i 30 μM glicyny) oraz w przypadku ich braku nie spowodowało istotnych zmian nie tylko w porównaniu z próbą kontrolną, ale również między badanymi grupami o różnych stężeniach tego związku. Przedstawione wyniki sugerują, że obecność TBBPA we wszystkich badanych stężeniach nie spowodowała bezpośrednich zmian w aktywności receptora NMDA nie tylko podczas pobudzenia agonistami, lecz także pod nieobecność egzogennych modulatorów aktywności kanału tego receptora.

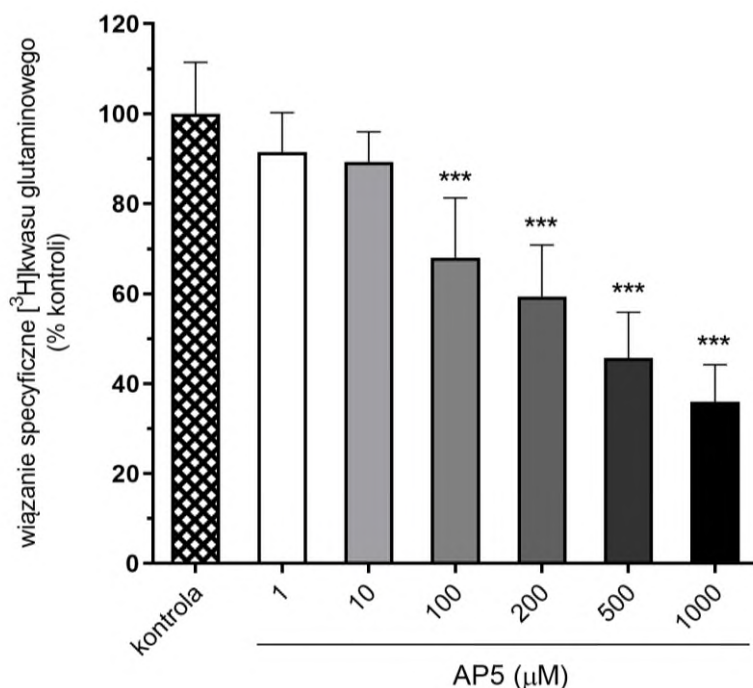


Rycina 15. Specyficzne wiązanie [³H]MK-801 do błon kory mózgu szczura. (A) Modułacja za pomocą antagonisty NMDAR – ketaminy (100 μM) i agonisty NMDA (100 μM) samego lub podanego z glicyną (30 μM). Dane wyrażono jako zliczenia impulsów radioaktywności na minutę (cpm). (B) Wpływ 10, 25 lub 40 μM TBBPA w obecności lub pod nieobecność agonistów NMDAR. Dane wyrażono jako procent kontroli rozpuszczalnika (0,5% DMSO) w obecności agonistów NMDAR. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD (n=9-11). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: ***p<0,001



Rycina 16. Modułacja specyficznego wiązania znakowanych agonistów NMDAR do błon kory mózgu szczura. (A) Specyficzne wiązanie [³H]kwasu glutaminowego. Błony inkubowano bez żadnych dodatków (kontrola), z konkurencyjnym antagonistą miejsca wiązania glutaminianu - AP5 (100 i 200 μM) lub w obecności 0,5% DMSO (0 mM TBBPA) czy 10, 25 i 40 μM TBBPA. (B) Specyficzne wiązanie [³H]glicyny do błon. Błony inkubowano bez żadnych dodatków (kontrola), z selektywnymi i nieselektywnymi antagonistami miejsca wiązania glicyny – 7-CKA (100 mM) lub CNQX (100 μM) lub w obecności 0,5% DMSO (0 μM TBBPA) czy z 10, 25 i 40 μM TBBPA. Dane wyrażono jako procent kontroli nośnika (DMSO), a wyniki przedstawiono jako średnią ± SD (n=8-10). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: **p<0,01; ***p<0,001

Tych samych stężeń TBBPA i tych samych frakcji błon komórkowych użyto do określenia poziomów wiązania [³H]kwasu glutaminowego i [³H]glicyny do ich specyficznych miejsc wiązania do NMDAR. Przedstawione na Ryc. 16A wyniki badań kontrolnych pokazują, że wiązanie [³H]kwasu glutaminowego było hamowane zależnie od stężenia użytego kompetycyjnego antagonisty AP5 (100 i 200 μM). Ponadto, zastosowanie kompetycyjnych antagonistów miejsca glicynowego, 7-CKA (100 μM) i CNQX (100 μM), spowodowało zahamowanie wiązania [³H]glicyny odpowiednio o 51% i 40% (Ryc. 16B).



Rycina 17. Zahamowanie swoistego wiązania [³H]kwasu glutaminowego z frakcją błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczurów przez kompetycyjnego antagonistę DL-AP5. Stężenie radioligandu wynosiło 2 nM. Dane wyrażane są jako procent zahamowania, a wyniki przedstawiane są jako średnia ± SD (n=10). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: ***p<0,001

W celu uzupełnienia wyników zawartych w na Ryc. 16A, dotyczących zastosowanego stężenia antagonisty AP5, zbadano oraz przedstawiono (Ryc. 17) pełniejszy zakres zależności między wiązaniem [³H]kwasu glutaminowego do frakcji błon komórkowych a różnymi stężeniami AP5 (1 μM do 1 mM). Jak przedstawiono na Ryc. 17, AP5 hamował wiązanie specyficzne [³H]kwasu glutaminowego do frakcji błon komórkowych w sposób zależny od stężenia. Zastosowanie AP5 w stężeniu 100 μM i 200 μM hamowało wiązanie o 23% i 34%, natomiast 1 mM AP5 hamowało wiązanie [³H]kwasu glutaminowego o 63%.

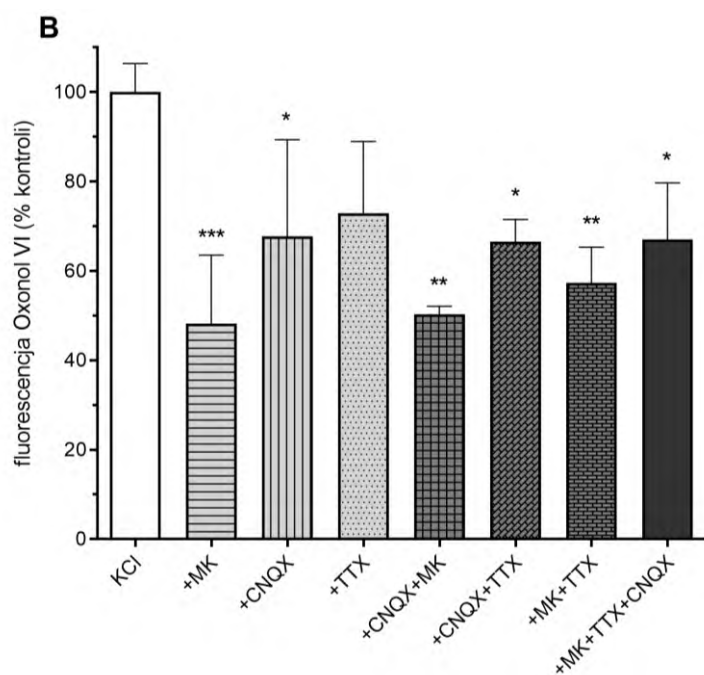
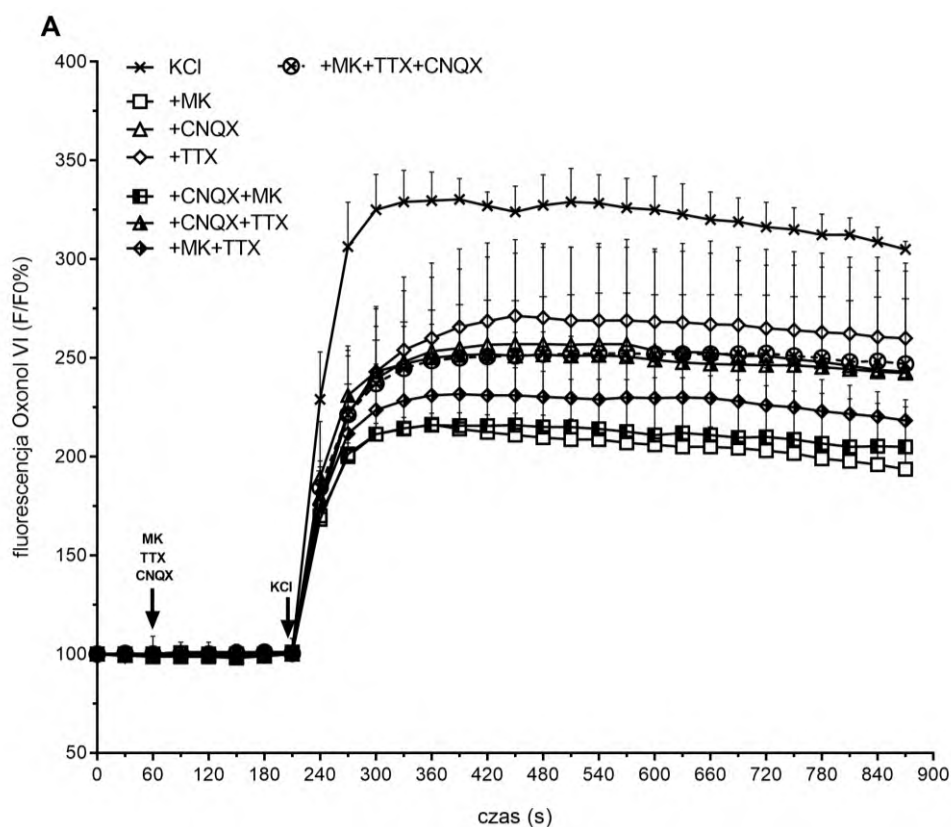
Zastosowanie 10, 20 i 40 μM TBBPA nie wpłynęło znacząco na wiązanie [³H]kwasu glutaminowego i [³H]glicyny (Ryc. 16). Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na frakcji

błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura wskazują, że TBBPA nie wpływa na aktywność kanałów NMDAR ani poprzez interakcje allosteryczne, ani też przez oddziaływanie na miejsca wiązania dla agonisty i ko-agonisty znajdujące się na podjednostkach NMDAR.

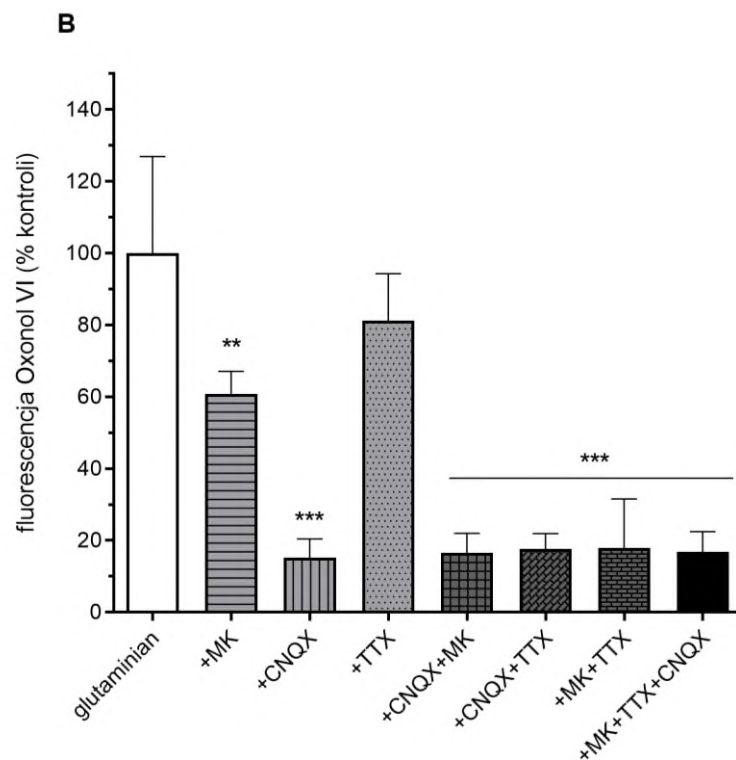
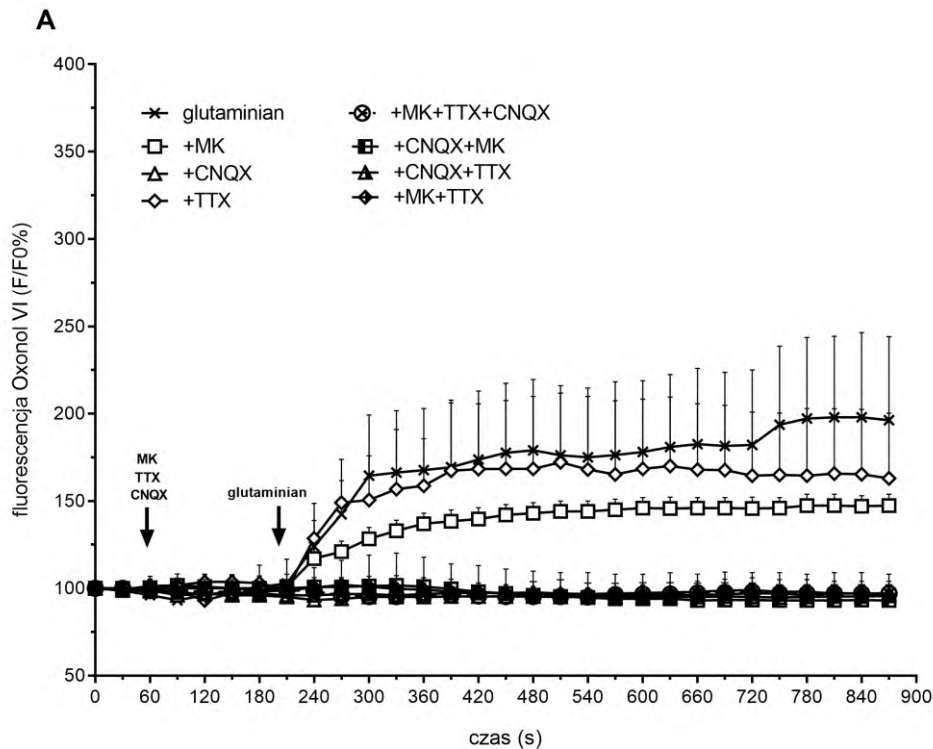
4.2.2. Depolaryzacja neuronów wywołana przez TBBPA jako element mechanizmu aktywacji receptorów NMDA

Aktywacja kanału jonowego NMDAR jest częściowo zależna od depolaryzacji błony, co prowadzi do zwolnienia zależnego od potencjału bloku magnezowego. Leży to u podstaw alternatywnej hipotezy, zakładającej, że aktywacja NMDAR w hodowlach CGC inkubowanych w obecności TBBPA może być efektem pośrednim, związanym z indukowaną przez TBBPA depolaryzacją neuronów. Dla jej weryfikacji wykorzystano wrażliwy na zmiany potencjału błonowego wskaźnik fluorescencyjny oksonol VI. Aby zweryfikować wiarygodność wyników pomiarów potencjału błonowego przy użyciu oksonolu VI, przeprowadzono eksperymenty kontrolne z zastosowaniem: 100 mM KCl i 100 μ M glutaminianu.

Jako pierwszą kontrolę pozytywną użyto KCl w wysokim stężeniu. Zaobserwowano szybki wzrost fluorescencji oksonolu VI wskazujący na depolaryzację, spowodowaną narzuconymi warunkami doświadczalnymi zaburzeniami równowagi jonowej. Na tle tego pierwotnego efektu, którego nie można było zmodyfikować farmakologicznie, zaobserwowaliśmy fazę wtórnej depolaryzacji, która była hamowana przez MK-801, CNQX i TTX (Ryc. 18A). Podanie samego antagonisty AMPAR - CNQX (20 μ M), obniżało depolaryzację wywołaną przez KCl o 32%. TTX (1 μ M) - która jest selektywnym i silnym blokerem kanałów sodowych bramkowanych napięciem - hamowała depolaryzację o 27%. Jednakże, gdy antagonistę NMDAR - MK-801 (0,5 μ M) podawano samodzielnie lub w połączeniu z CNQX, efekt depolaryzacji zmniejszył się o około 50%. (Ryc. 18B). Inne kombinacje połączenia antagonistów zmniejszały efekt depolaryzacji błon komórkowych indukowany przez KCl o 34–50% (Ryc. 18B).



Rycina 18. Wpływ KCl na fluorescencję oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC: modulacja receptorów jonotropowych dla glutaminianu i kanałów sodowych bramkowanych napięciem przy użyciu blokerów i antagonistów. (A) Dynamika zmian fluorescencji oksonolu VI po podaniu 100 mM KCl pod nieobecność lub w obecności: 0,5 μ M MK-801, 20 μ M CNQX i 1 μ M TTX. (B) Modulacja wpływu 100 mM KCl przez MK-801, CNQX i TTX. Fluorescencja oksonolu VI jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) w czasie (A) lub jako interpolacja zmiany fluorescencji we wszystkich punktach pomiaru po zastosowaniu KCl (B). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (n=15). Istotnie statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (KCl): *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001



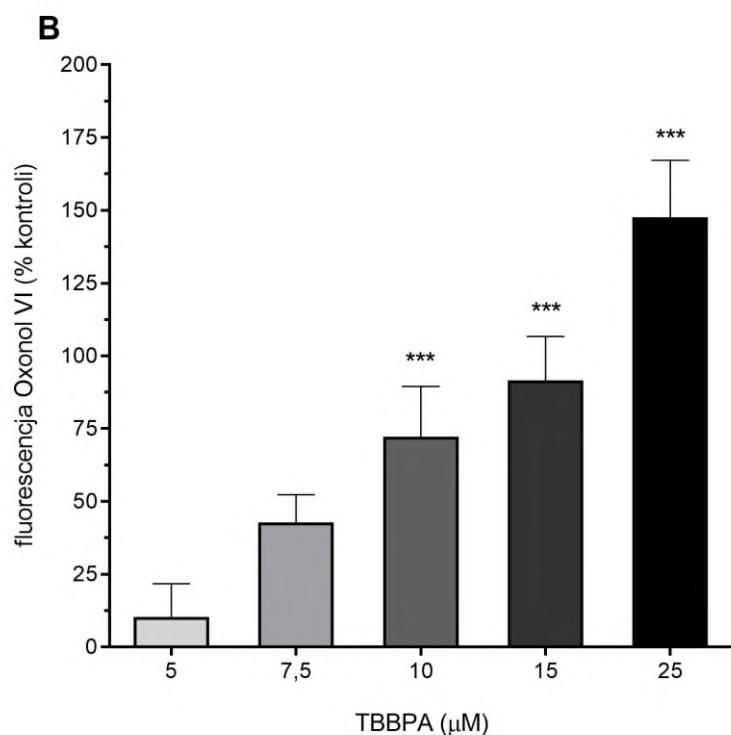
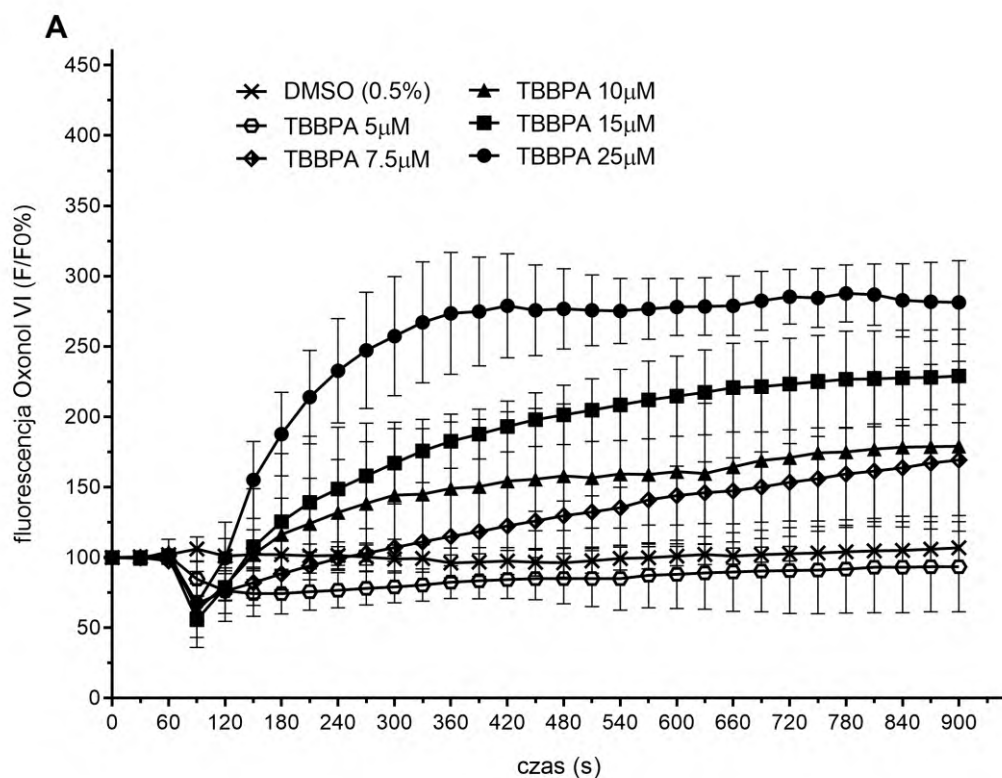
Rycina 19. Wpływ glutaminianu (glu) na fluorescencję oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC: modulacja receptorów jonotropowych dla glutaminianu i kanałów sodowych bramkowanych napięciem przy użyciu blokerów i antagonistów. (A) Dynamika zmian fluorescencji oksonolu VI po podaniu 100 μ M glu w nieobecności lub obecności: 0,5 μ M MK-801, 20 μ M CNQX i 1 μ M TTX. (B) Modulacja wpływu 100 μ M glu przez MK-801, CNQX i TTX. Fluorescencja oksonolu VI jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) w czasie (A) lub jako interpolacja zmiany fluorescencji we wszystkich punktach pomiaru po podaniu glu (B). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (n=15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (glu): **p<0,01; ***p<0,001

Inna substancja kontrolna, glutaminian, również zwiększyła poziom fluorescencji oksonolu VI (Ryc. 19), lecz wzrost ten był wolniejszy i niższy niż ten obserwowany po podaniu KCl. Efekt podania glutaminianu był hamowany o 40% w obecności MK-801, natomiast całkowite zahamowanie indukowanej glutaminianem depolaryzacji hodowli CGC obserwowano przy użyciu samego CNQX lub w połączeniu z innymi antagonistami (Ryc. 19B). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w tak wywołanej depolaryzacji po podaniu samego TTX (Ryc. 19B).

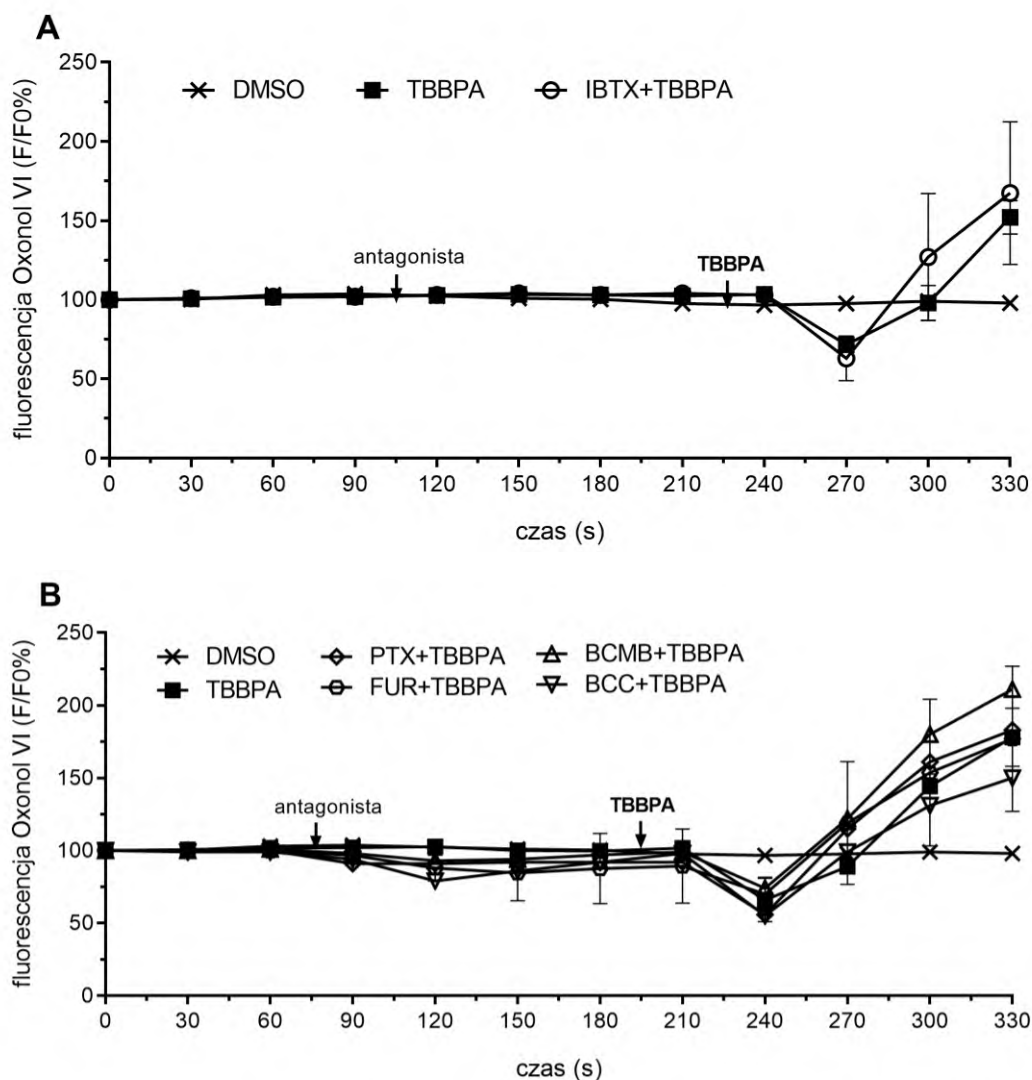
Wyniki te są zgodne z interpretacją, że w depolaryzacji pierwotnych hodowli CGC indukowanej przez egzogeny glutaminian pośredniczą jonotropowe receptory dla glutaminianu. Warunkiem koniecznym jest aktywacja AMPAR, w następstwie dochodzi do aktywacji NMDAR i kanałów sodowych wrażliwych na TTX. Jednak udział receptorów AMPA dominuje w takim stopniu, że przesłania inne, wtórne mechanizmy. Do ujawnienia roli kanałów sodowych bramkowanych napięciem w depolaryzacji indukowanej glutaminianem okazało się być konieczne zastosowanie MK-801, co zmniejszyło udział receptorów glutaminianergicznych w depolaryzacji.

Kolejne eksperymenty przeprowadzone na pierwotnych hodowlach CGC wykazały, że zastosowanie 5, 7,5, 10, 15 i 25 μM TBBPA miało dwufazowy wpływ na fluorescencję oksonolu VI (Ryc. 20). Początkowa i przejściowa faza zmian fluorescencji oksonolu VI po podaniu TBBPA polegała na jej obniżeniu o 25-40%. Następnie zaobserwowaliśmy stopniowy, i zależny od stężenia ($\geq 7,5 \mu\text{M}$ TBBPA), wzrost fluorescencji oksonolu VI, który interpretujemy jako depolaryzację neuronów (Ryc. 20B).

Przedmiotem dodatkowych badań była natura początkowego obniżenia fluorescencji oksonolu VI po podaniu TBBPA. Testowana była hipoteza, że ten efekt może być odbiciem hiperpolaryzacji w wyniku aktywacji BKCa lub receptorów GABA_A. Jak pokazano w naszych doświadczeniach (Ryc. 21), zaobserwowany spadek fluorescencji spowodowany obecnością TBBPA (Ryc. 20) nie był hamowany ani przez blokera BKCa - iberiotoksynę, ani przez antagonistów GABA_A: pikrotoksynę, bikukulinę, metylobromek bikukuliny i furosemid. Tak więc, indukowany przez TBBPA spadek fluorescencji oksonolu VI nie wydaje się być związany z mechanizmami hiperpolaryzacji, w których pośredniczą wyżej wspomniane kanały/receptory. Ponadto początkowy spadek fluorescencji nie był zależny od stężenia TBBPA (Ryc. 20A).

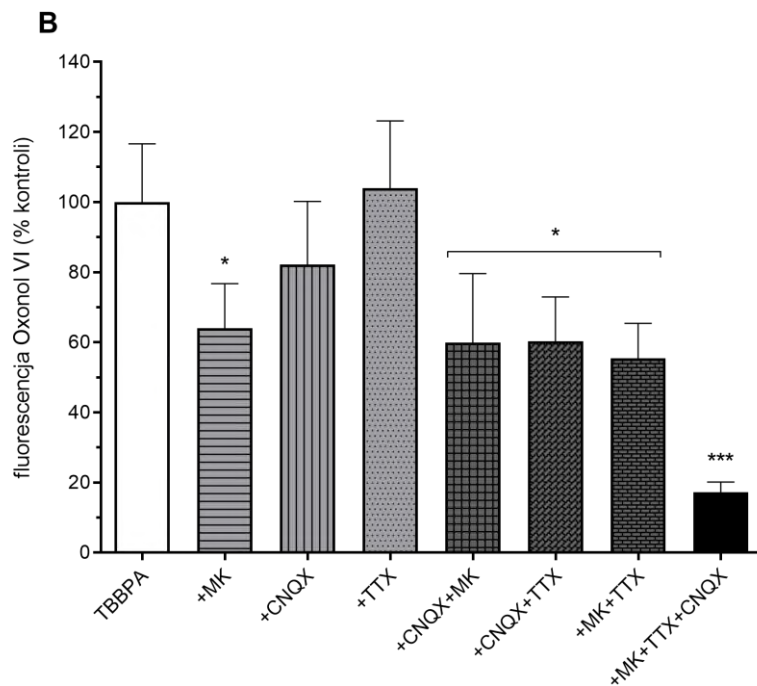
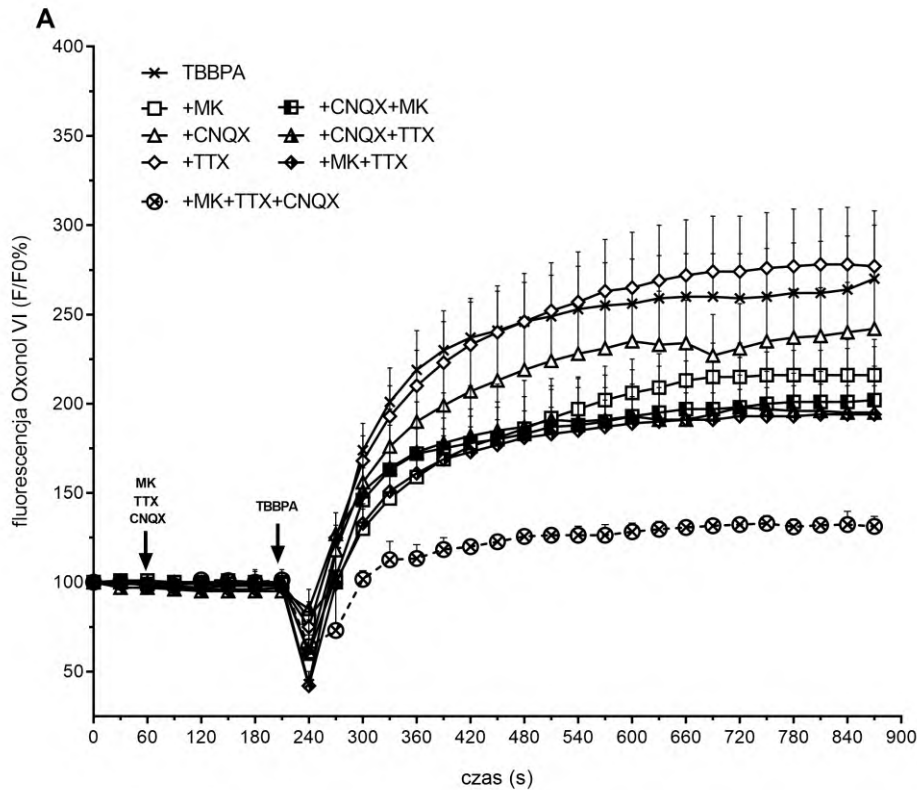


Rycina 20. Wpływ TBBPA na fluorescencję oksonolu VI w hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku (CGC). (A) Zmiany fluorescencji oksonolu VI w czasie, wyrażone jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%), indukowane przez TBBPA lub kontrolę (0,5% DMSO). (B) Zależność zmian fluorescencji oksonolu VI, wyrażona jako interpolacja zmiany fluorescencji we wszystkich punktach pomiarów po zastosowaniu 5, 7,5, 10, 15 i 25 μM TBBPA. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD (n=15). Istotnie statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: ***p<0,001



Rycina 21. Wpływ blokerów BKCa i antagonistów GABA_A na zmiany fluorescencji oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC indukowanych przez TBBPA. Wykres pokazuje początkowy spadek fluorescencji oksonolu VI w czasie, indukowany przez 25 μM TBBPA w nieobecności lub obecności 200 μM blokera BKCa - iberiotoksyny (IBTX) (A) lub antagonistów GABA_AR: 10 μM pikrotoksyny (PTX), 20 μM bikukuliny (BCC), 20 μM metylobromku bikukuliny (BCMB) lub 1 mM furosemidu (FUR) (B). Fluorescencja oksonolu VI jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) w czasie. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD (n=15). Dalsze wyjaśnienia w tekście rozprawy.

Zaobserwowane zmniejszenie fluorescencji oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA można przypisać artefaktom. Natomiast wzrost fluorescencji oksonolu VI po podaniu TBBPA można uznać za odbicie depolaryzacji neuronów, ponieważ zaostała wykazana modulacja tego efektu przy użyciu substancji farmakologicznych.



Rycina 22. Wpływ TBBPA na fluorescencję oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC: modulacja receptorów jonotropowych dla glutaminianu i kanałów sodowych bramkowanych napięciem przy użyciu blokerów i antagonistów. [A] Zmiany fluorescencji oksonolu VI w czasie, po podaniu 25 μ M TBBPA w nieobecności lub obecności: 0,5 μ M MK-801, 20 μ M CNQX i 1 μ M TTX. [B] Modulacja wpływu 25 μ M TBBPA przez MK-801, CNQX i TTX. Fluorescencja oksonolu VI jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) w czasie (A) lub jako interpolacja zmiany fluorescencji we wszystkich punktach pomiaru po zastosowaniu TBBPA (B). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (n=15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z próbą kontrolną (TBBPA): *p<0,05; ***p<0,001

Dalsze badania dotyczyły roli jonotropowych receptorów dla glutaminianu (AMPA i NMDAR) oraz kanałów sodowych bramkowanych napięciem, w depolaryzacji błon komórkowych hodowli CGC eksponowanej na 25 μM TBBPA (Ryc. 22). Efekt depolaryzacji w wyniku podania TBBPA został niemal całkowicie zniesiony przez antagonistów receptorów jonotropowych dla glutaminianu: MK-801 (0,5 μM), CNQX (20 μM) w kombinacji z TTX (1 μM). Zastosowanie tylko CNQX lub TTX nie miało istotnego wpływu na wywołany przez TBBPA spadek potencjału błony komórkowej. Depolaryzujące działanie TBBPA było znacząco obniżone (o 36-45% w stosunku do kontroli) w obecności MK-801, gdy ten antagonistą był stosowany zarówno osobno, jak i w połączeniu z TTX lub CNQX, oraz gdy CNQX był stosowany w połączeniu z TTX (Ryc. 22B).

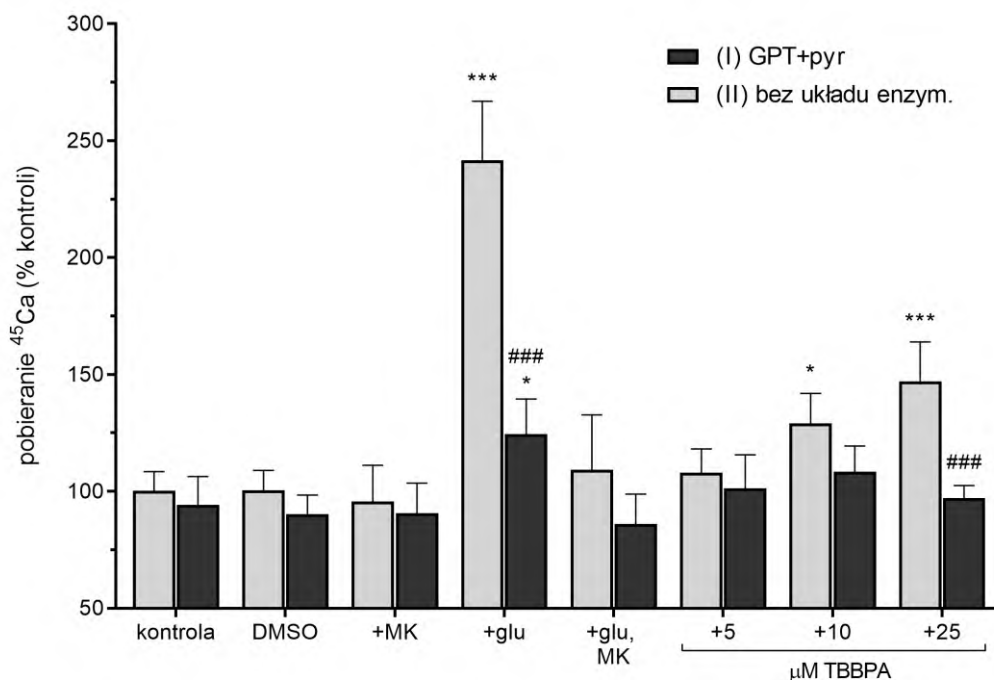
Wyniki te wskazują, że ekspozycja hodowli CGC na TBBPA prowadzi do depolaryzacji neuronów i w tym efekcie biorą udział zarówno jonotropowe receptory glutaminianu (NMDAR i AMPAR), jak i wrażliwe na TTX kanały sodowe bramkowane napięciem.

4.2.3. Wpływ dekompartamentacji glutaminianu na aktywację receptorów NMDA po podaniu TBBPA

Używając chlorku wapnia znakowanego radioaktywnym izotopem [^{45}Ca] została przetestowana ta część hipotezy, która zakłada udział endogenego glutaminianu w wywołanym przez TBBPA nagromadzeniu się jonów Ca^{2+} wewnątrz komórek pierwotnych hodowli CGC, w którym pośredniczą NMDAR. Dla weryfikacji naszych założeń przeprowadzono eksperyment w dwóch różnych środowiskach inkubacyjnych: w warunkach kontrolnych oraz w buforze inkubacyjnym wzbogaconym w układ enzymatyczny rozkładający kwas glutaminowy tj. mieszaninę transaminazy glutaminianowo-pirogronianowej (GPT) w ilości 4U/dolek i 2 mM pirogronianu (pyr).

Jak przedstawiono na Ryc. 23, podanie 100 μM glutaminianu indukuje wzrost pobierania ^{45}Ca przez CGC (o 142%) w porównaniu do próby kontrolnej. Ten efekt był silnie hamowany w obecności 1 μM MK-801 w obydwu środowiskach inkubacyjnych, co świadczy o roli NMDAR w tym zjawisku. Zastosowanie 10 i 25 μM TBBPA spowodowało także istotny wzrost pobierania ^{45}Ca (o 50%) w środowisku nie zawierającym enzymów rozkładających glutaminian, a efekt ten był całkowicie zahamowany w obecności GPT i pirogronianu. Podobny efekt zaobserwowano w grupie, w której zastosowano sam

glutaminian, gdzie obecność układu enzymatycznego w środowisku inkubacyjnym istotnie zahamowała wzrost pobierania ^{45}Ca z 242% do 124% kontroli.

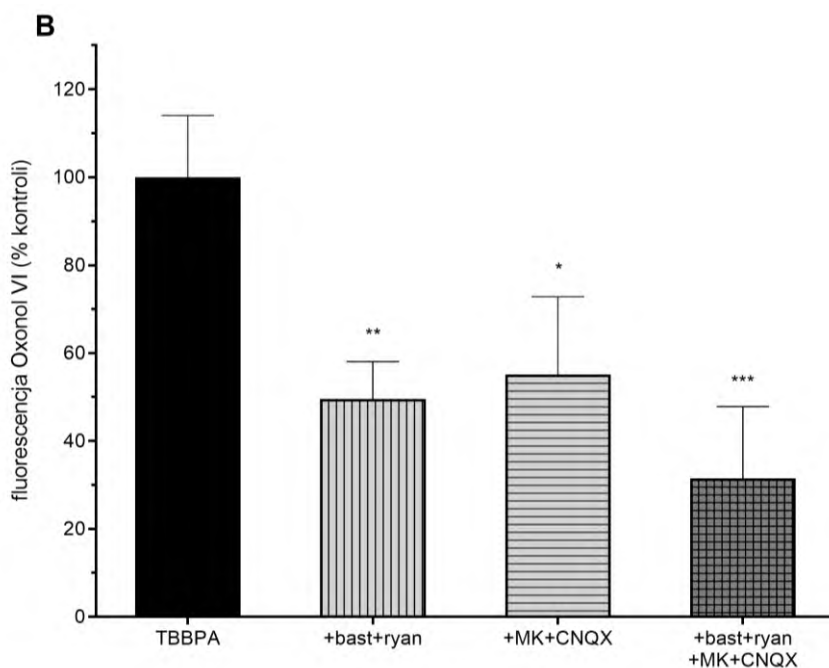
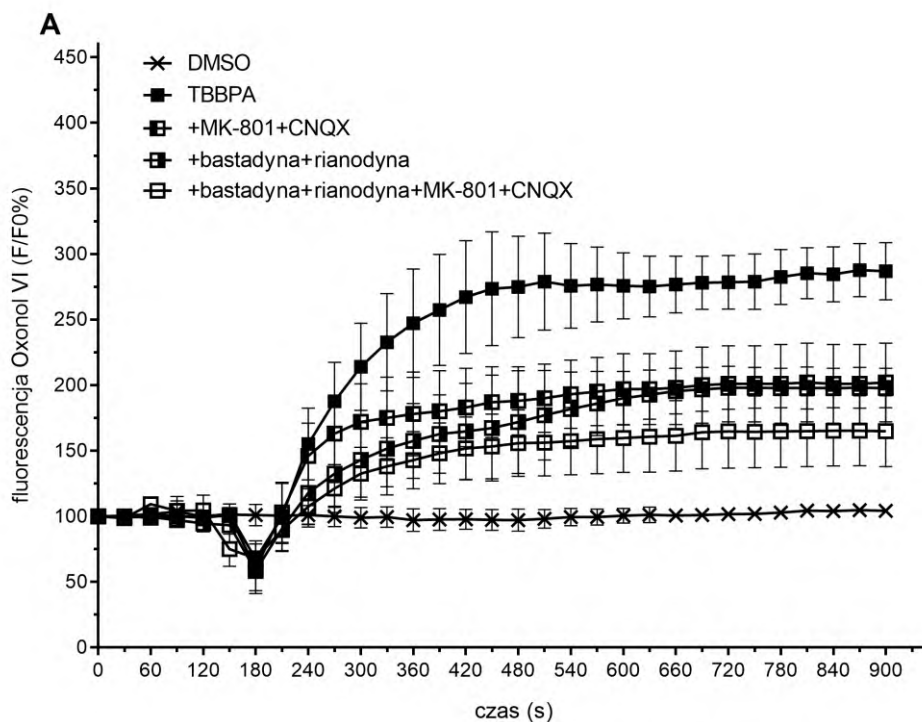


Rycina 23. Pobieranie ^{45}Ca przez komórki pierwotnej hodowli CGC w obecności 5, 10 i 25 μM TBBPA w warunkach kontrolnych oraz w obecności transaminazy glutaminianowo-pirogronianowej (GPT) (4U/próbie) i 2 mM pirogronianu (pyr). Modułacja efektu przy użyciu 100 μM glutaminianu (glu) lub/i 1 μM MK-801 (MK). Wartości wyrażone jako procent kontroli, wyniki przedstawione jako średnia \pm SD (n=6). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: *p<0,05; ***p<0,001; oraz między dwoma środowiskami inkubacyjnymi (I) a (II): ###p<0,001.

Ten eksperyment wskazuje, że usuwanie glutaminianu ze środowiska zewnątrzkomórkowego znosi aktywację NMDAR w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA, co jest zgodne z hipotezą, że endogenne glutaminiany pośredniczą w tym mechanizmie. To odkrycie sprowokowało postawienie pytania o mechanizm pojawienia się w środowisku zewnątrzkomórkowym hodowli CGC eksponowanych na TBBPA podwyższonego stężenia glutaminianu aktywującego NMDAR. W następnych badaniach zostały uwzględnione następujące możliwości: zwiększone uwalnianie glutaminianu z puli wewnątrzkomórkowej, zwłaszcza z puli neuroprzekaznikowej, wywołane przez wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w zakończeniach synaptycznych w związku z dysfunkcją RyR, zahamowanie pobierania zwrotnego glutaminianu lub nawet nałożenie się na siebie obu tych zjawisk.

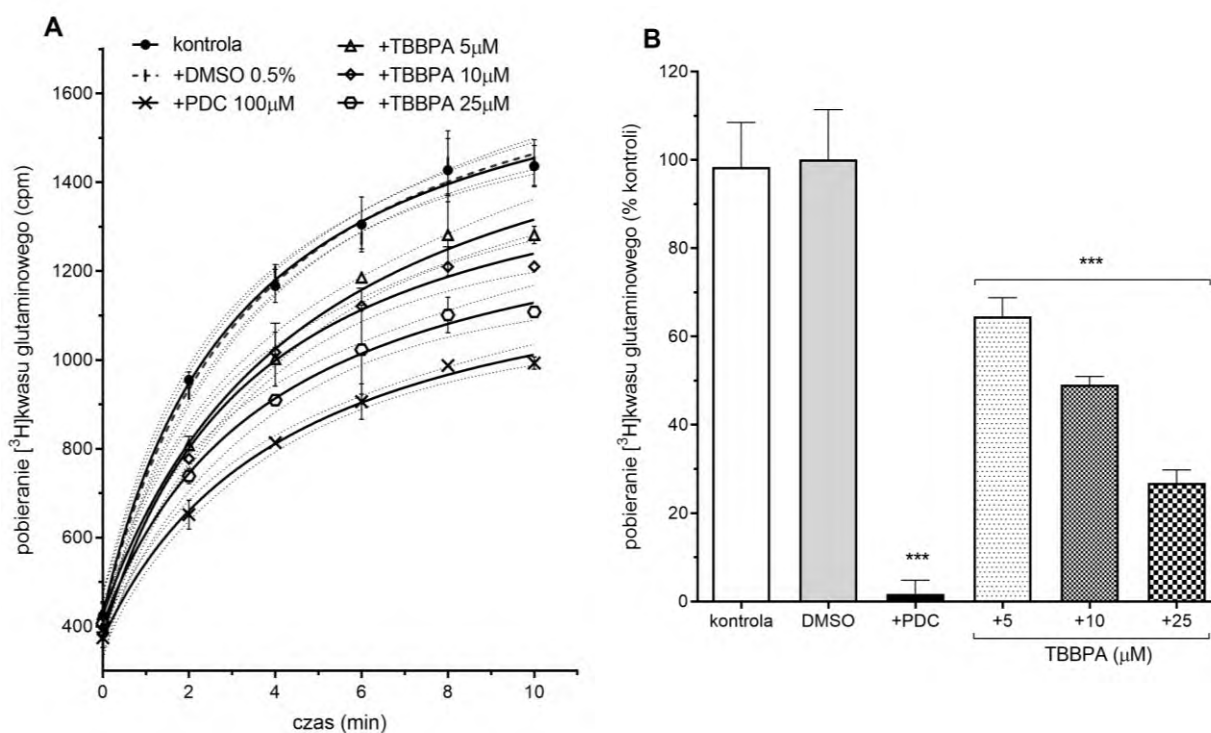
Aby testować pierwszą z tych możliwości przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem antagonistów RyR, NMDAR oraz AMPAR, a także blokera kanałów sodowych bramkowanego napięciem, w których za pomocą sondy fluorescencyjnej oksonol VI badano indukowaną przez TBBPA depolaryzację neuronów w hodowli CGC. Ryc. 24

przedstawia wpływ podawania kombinacji rianodyny (200 μM) z bastadyną (2,5 μM) na depolaryzację hodowli CGC wywołanej przez 25 μM TBBPA.



Rycina 24. Wpływ TBBPA na fluorescencję oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC: modulacja przez antagonistów RyR i jonotropowych receptorów dla glutaminianu. Zmiany fluorescencji oksonolu VI w czasie, indukowane przez 25 mM TBBPA pod nieobecność lub w obecności: 200 μM rianodyny i 2,5 μM bastadyny (bast), 0,5 μM MK-801 i 20 μM CNQX lub wszystkich czterech antagonistów. Fluorescencja oksonolu VI jest wyrażona jako procent poziomu podstawowego (F/F₀%) w czasie (A) lub jako interpolacja zmian fluorescencji we wszystkich punktach pomiaru po zastosowaniu TBBPA (B). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD (n=15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (TBBPA) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

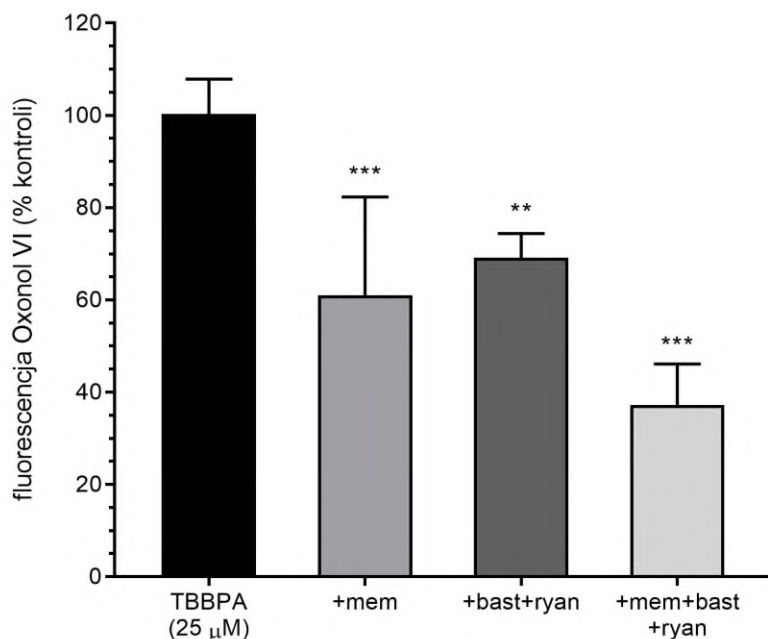
Kombinacja wyżej wymienionych antagonistów została użyta dla oceny roli mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w depolaryzacji wywołanej podaniem TBBPA. Jak wykazano wcześniej, mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego przez TBBPA była całkowicie hamowana w hodowlach CGC z zastosowaniem kombinacji wspomnianych antagonistów receptora rianodynowego (Ziemska i wsp., 2014). Jak pokazano na Ryc. 24B, depolaryzacja komórek hodowli CGC wywołana przez TBBPA została obniżona o około 50% przy podaniu kombinacji rianodyny i bastadyny, a skala tego hamowania była porównywalna do obserwowanej przy użyciu mieszaniny antagonistów NMDAR i AMPAR – MK-801 i CNQX (Ryc. 24B). Depolaryzacja wywołana podaniem TBBPA była zmniejszona o około 70%, w przypadku użycia kombinacji wszystkich wymienionych wyżej antagonistów. Przedstawione wyniki sugerują że do wzrostu stężenia glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w tych warunkach doświadczalnych może przyczyniać się stymulowany przez wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wyrzut glutaminianu presynaptycznego, prowadzący do depolaryzacji neuronów postsynaptycznych.



Rycina 25. Wpływ 5, 10 lub 25 μM TBBPA na dynamikę pobierania $[\text{^3H}]$ kwasu glutaminowego przez synaptosomy w 0, 2, 4, 6, 8 oraz 10 minucie od inicjacji reakcji. Efekt modulowany przez podanie inhibitora transporterów glutaminianu – L-PDC (100 μM). DMSO (0,5%) zastosowano jako kontrolę rozpuszczalnikową. Dane wyrażone jako odczyt radioaktywności na minutę (cpm) (A) lub jako procent kontroli w 10 minucie eksperymentu (B). Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD ($n=8$). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z kontrolą: $p<0,05$ (A); $***p<0,001$ (B)

Badania przeprowadzone na frakcjach synaptosomów izolowanych z mózgu szczura miały na celu zweryfikowanie następczej hipotezy, która przypisuje TBBPA hamowanie pobierania glutaminianu. W tym eksperymencie przetestowany został wpływ TBBPA na poziom pobierania egzogenego glutaminianu przez frakcję synaptosomów izolowanych z kory mózgu szczura. Testowano wpływ trzech stężeń TBBPA: 5, 10 oraz 25 μM , a także inhibitora transporterów glutaminianowych (EAAT) - 100 μM L-PDC. Zastosowanie inhibitora w takim stężeniu traktowano jako kontrolę pozytywną, co pozwoliło oszacować skalę zmian w pobieraniu [^3H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy. Ryc. 25A pokazuje zależne od stężenia zahamowanie przez TBBPA pobierania [^3H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy. Dane przedstawione na Ryc. 25B wykazały, że podanie 5 μM TBBPA spowodowało zahamowanie pobierania glutaminianu do 65% wartości kontroli. Natomiast obecność 10 i 25 μM TBBPA spowodowała spadek pobierania glu odpowiednio do 49 i 27%. Przedstawione wyniki potwierdzają więc, że TBBPA hamuje pobieranie [^3H]kwasu glutaminowego przez frakcję synaptosomalną i sugeruje, że wywołane obecnością TBBPA zaburzenia jego transportu zwrotnego może być jedną ze składowych mechanizmów ekscytotoksycznego działania tej substancji.

Na podstawie przedstawionych wyżej wyników można postulować, że indukowany przez TBBPA wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu ma złożony mechanizm i wynika zarówno ze zwiększonego uwalniania jak też zahamowania jego pobierania zwrotnego. Może to powodować znaczny wzrost stężenia glutaminianu w przestrzeni synaptycznej, a w następstwie wydostanie się go poza przestrzeń synaptyczną. Może to prowadzić do aktywacji nie tylko synaptycznych, ale i również pozasynaptycznych receptorów NMDA. Dla testowania tej hipotezy użyto memantynę (mem), niekompetycyjnego antagonistę NMDAR o wysokim powinowactwie do pozasynaptycznych receptorów NMDA. Zastosowanie memantyny spowodowało zahamowanie wzrostu fluorescencji oxonolu VI o 40% wywołanego ekspozycją hodowli CGC na 25 μM TBBPA (Ryc. 26). Podobny poziom hamowania (o 30%) uzyskano po podaniu antagonistów RyR – 200 μM rianodyny i 2,5 μM bastadyny (ryan, bast). Natomiast podanie kombinacji wszystkich tych antagonistów spowodowało silne obniżenie (o 65%) wzrostu fluorescencji oxonolu VI wywołanego przez ekspozycję hodowli CGC na 25 μM TBBPA.



Rycina 26. Wpływ antagonistów receptora NMDA i RyR na indukowany przez 25 μM TBBPA wzrost fluorescencji oksonolu VI w pierwotnych hodowlach CGC: modulacja efektu przy użyciu: 5 μM memantyny (mem), 2,5 μM bastadyny (bast) z 200 μM rianodyną (ryan) lub kombinacją wszystkich trzech antagonistów. Fluorescencja Oxonol VI jest wyrażona jako interpolacja zmiany fluorescencji we wszystkich punktach pomiaru po zastosowaniu TBBPA. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD (n=15). Istotnie statystycznie różnice w porównaniu z próbą z TBBPA: **p<0,01; ***p<0,001

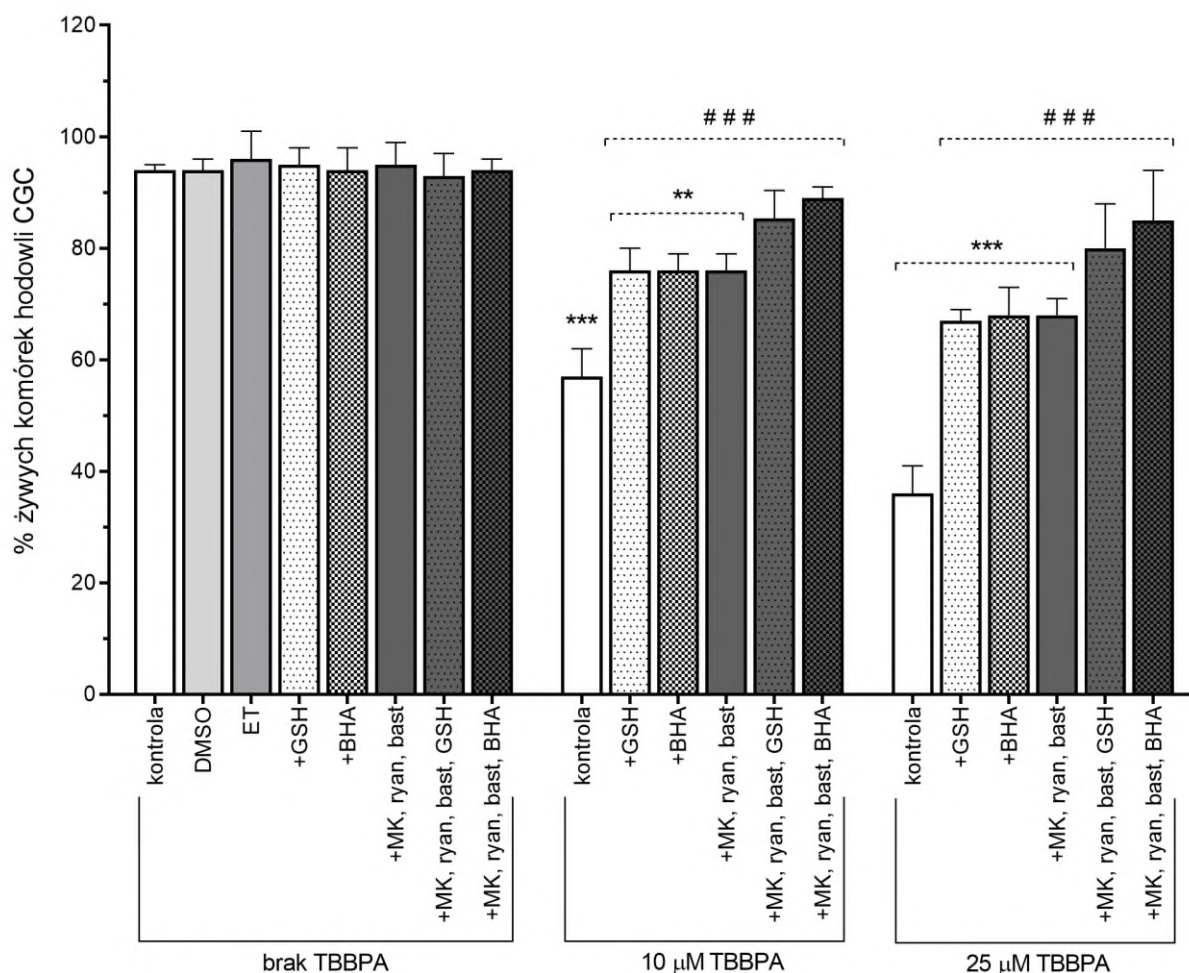
Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że endogenne glutaminian pośredniczy w aktywacji receptorów NMDA oraz w depolaryzacji neuronów CGC w hodowlach pierwotnych eksponowanych na TBBPA. Wyniki są zgodne z hipotezą, że glutaminian głównie pochodzi z presynaptycznych zakończeń nerwowych i jest uwalniany w wyniku indukowanej przez TBBPA mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia. Te dane potwierdzają również, że TBBPA silnie hamuje wychwytywanie glutaminianu ze środowiska zewnątrzkomórkowego, przyczyniając się do jego retencji.

4.3. Cytotoksyczny wpływ TBBPA na CGC w hodowli pierwotnej - rola nekrozy, apoptozy, autofagii

4.3.1. Spadek przeżywalności komórek w hodowli CGC eksponowanej na TBBPA

W tej pracy badany był cytotoksyczny wpływ 30 minutowej ekspozycji komórek hodowli CGC na 10 i 25 μM TBBPA. Po upływie 24 godzin od podania TBBPA zaobserwowano zależne od stężenia zmniejszenie liczby żywych neuronów (Ryc. 27). Antagoniści RyR i NMDAR, których zastosowanie w kombinacji zapobiega wywołaniu przez TBBPA wzrostu $[Ca^{2+}]_i$, częściowo (o 44,2 i 48,4%) obniżyły spadek żywotności

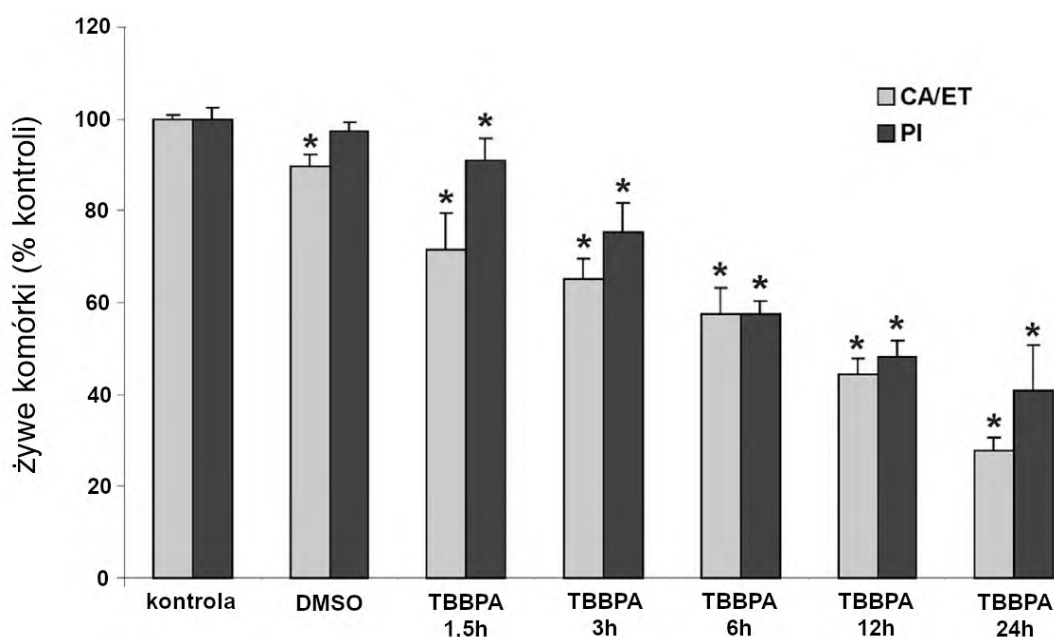
neuronów wywołany przez TBBPA. Podobny poziom neuroprotekcji obserwowano w obecności zmiataczy wolnych rodników GSH lub BHA. Jednoczesne stosowanie antagonistów RyR i NMDAR z GSH lub BHA jeszcze bardziej zwiększało żywotność hodowli CGC eksponowanej na obydwa stężenia TBBPA, aczkolwiek nie osiągnięto całkowitej neuroprotekcji (Ryc. 27).



Rycina 27. Wpływ TBBPA na przeżywalność hodowli CGC 24 godziny po 30-minutowej ekspozycji na 10 i 25 μ M TBBPA. Efekt TBBPA był modulowany przez użycie zmiataczy wolnych rodników: 10 μ M butylowany hydroksyanizol (BHA) rozpuszczony w 0,1% etanolu (ET), 1 mM zredukowany glutation (GSH) i kombinację antagonistów RyR i NMDAR: 2,5 μ M bastadynę (bast), 200 μ M rianodynę (ryan) i 0,5 μ M MK-801 (MK). Żywotność hodowli CGC wyrażona jako procent komórek przeżywających. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD (n=15). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną (bez TBBPA): **p<0,01; ***p<0,001 oraz kontrolą wewnątrz grupy eksponowanej na TBBPA: ###p<0,001

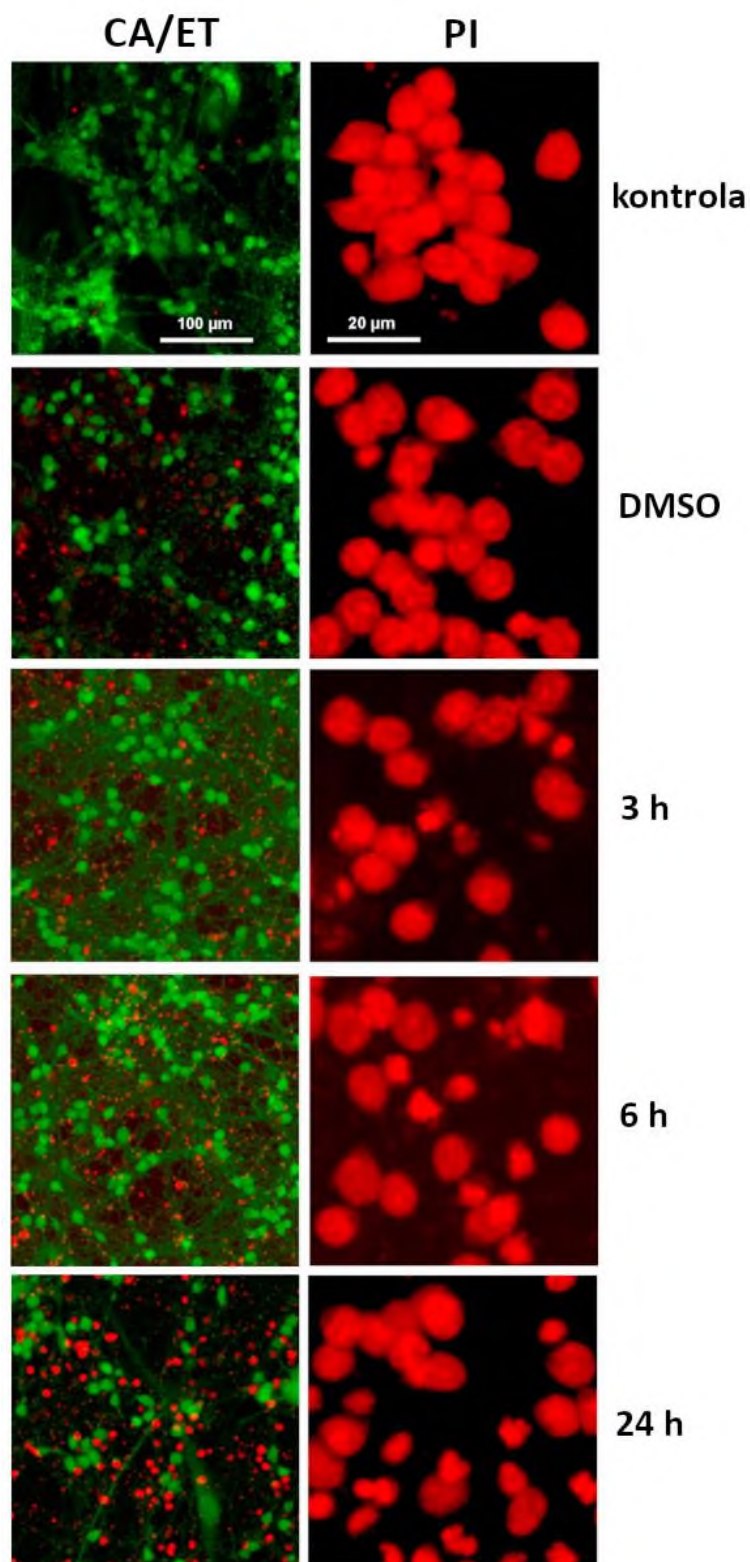
Następnie, za pomocą dwóch metod (PI oraz CA/ET) zbadano dynamikę ubytku liczby żywych neuronów po ekspozycji hodowli CGC na 25 μ M TBBPA. Jak przedstawiono na rycinach 28 i 29, 30-minutowa ekspozycja komórek hodowli CGC na 25 μ M TBBPA, spowodowała stopniowe, zależne od upływu czasu obniżenie liczby żywych neuronów. Wyniki nieznacznie różniły się w zależności od użytej metody barwienia. W

teście wykorzystującym PI, procent żywych komórek hodowli w badaniu po 3, 6 i 24 godz. po ekspozycji na TBBPA wynosił odpowiednio 75%, 58% i 41%. Natomiast test CA/ET, w tych samych punktach czasowych, wykazał spadek żywotności komórek odpowiednio do 65%, 58% i 28%. Trudno stwierdzić, czy różnice te mogą wynikać z niedoszacowania śmierci neuronów przez metodę barwienia PI, zwłaszcza w punktach czasowych 1,5 oraz 24 godz. po ekspozycji na TBBPA.



Rycina 28. Żywotność hodowli CGC w różnych czasach po 30-minutowej ekspozycji na 25 μ M TBBPA lub 0,5% DMSO. Przeżywalność neuronów badano we wskazanych czasach, stosując barwienie PI oraz CA/ET. DMSO użyto jako kontrola rozpuszczalnika. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD (n=6). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: *p<0,05.

Mikrofotografie wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Ryc. 29) przedstawiają komórki hodowli CGC po 3, 6 i 24 godzinach od ekspozycji na TBBPA. Barwienie CA/ET (Ryc. 29, lewy panel) wykazało, że w kontroli prawie wszystkie komórki były zabarwione kolorem zielonym (CA), co wskazywało, że były żywe. Wraz z upływem czasu po ekspozycji na TBBPA, liczba zabarwionych na czerwono (ET) martwych komórek wzrosła, lecz nawet po 24 godzinach żywe komórki były nadal obecne. Natomiast obserwacja jąder komórkowych neuronów wybarwionych PI, w tych samych punktach czasowych (Ryc. 29, prawy panel) wykazała wzrost liczby komórek z nieregularną, kurczącą się strukturą jąder komórkowych w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wszystkie komórki były żywe w czasie utrwalania i posiadały morfologicznie prawidłowe jądra komórkowe.



Rycina 29. Mikrofotografie pierwotnych hodowli CGC w różnych czasach po 30-minutowej ekspozycji na 25 μ M TBBPA lub 0,5% DMSO. Lewy panel - barwienie CA/ET - obrazuje zmiany proporcji żywych (zielonych) do martwych (czerwonych) komórek 3, 6 i 24 godziny po ekspozycji. Prawy panel – barwienie PI - przedstawia zmiany w morfologii jąder komórek hodowli CGC. DMSO użyto jako kontroli rozpuszczalnika. Wyniki są wartościami średnimi \pm SD (n=6). Istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: *p<0,05.

4.3.2. Poziom ekspresji genów związanych z programowaną śmiercią komórek po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA

Aby pogłębić wiedzę na temat mechanizmu śmierci komórek hodowli po ekspozycji na TBBPA, przeprowadzono badania z wykorzystaniem technik PCR – profilowania genowego. Ryc. 30 przedstawia przegląd wykresów rozproszenia dla ekspresji 84 genów (Tabela 6) związanych z procesami śmierci komórkowej, która zbadana była na modelu pierwotnych hodowli CGC. Dane do analizy zebrane były 3, 6 lub 24 godziny po 30-minutowej ekspozycji na 10 lub 25 μ M TBBPA, w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej.

Tabela 6. Lista testowanych genów powiązanych ze szlakami śmierci komórkowej

Symbol	Opis
1 <i>Abl1</i>	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
2 <i>Akt1</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
3 <i>Apaf1</i>	Apoptotic peptidase activating factor 1
4 <i>App</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein
5 <i>Atg12</i>	ATG12 autophagy related 12 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
6 <i>Atg16l1</i>	ATG16 autophagy related 16-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
7 <i>Atg3</i>	ATG3 autophagy related 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
8 <i>Atg5</i>	ATG5 autophagy related 5 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
9 <i>Atg7</i>	ATG7 autophagy related 7 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
10 <i>Atp6v1g2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit G2
11 <i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein
12 <i>Bcl2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
13 <i>Bcl2a1</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d
14 <i>Bcl2l1</i>	Bcl2-like 1
15 <i>Bcl2l11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
16 <i>Becn1</i>	Beclin 1, autophagy related
17 <i>Birc2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 2
18 <i>Birc3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3
19 <i>Bmf</i>	Bcl2 modifying factor
20 <i>Casp1</i>	Caspase 1
21 <i>Casp2</i>	Caspase 2
22 <i>Casp3</i>	Caspase 3
23 <i>Casp6</i>	Caspase 6
24 <i>Casp7</i>	Caspase 7

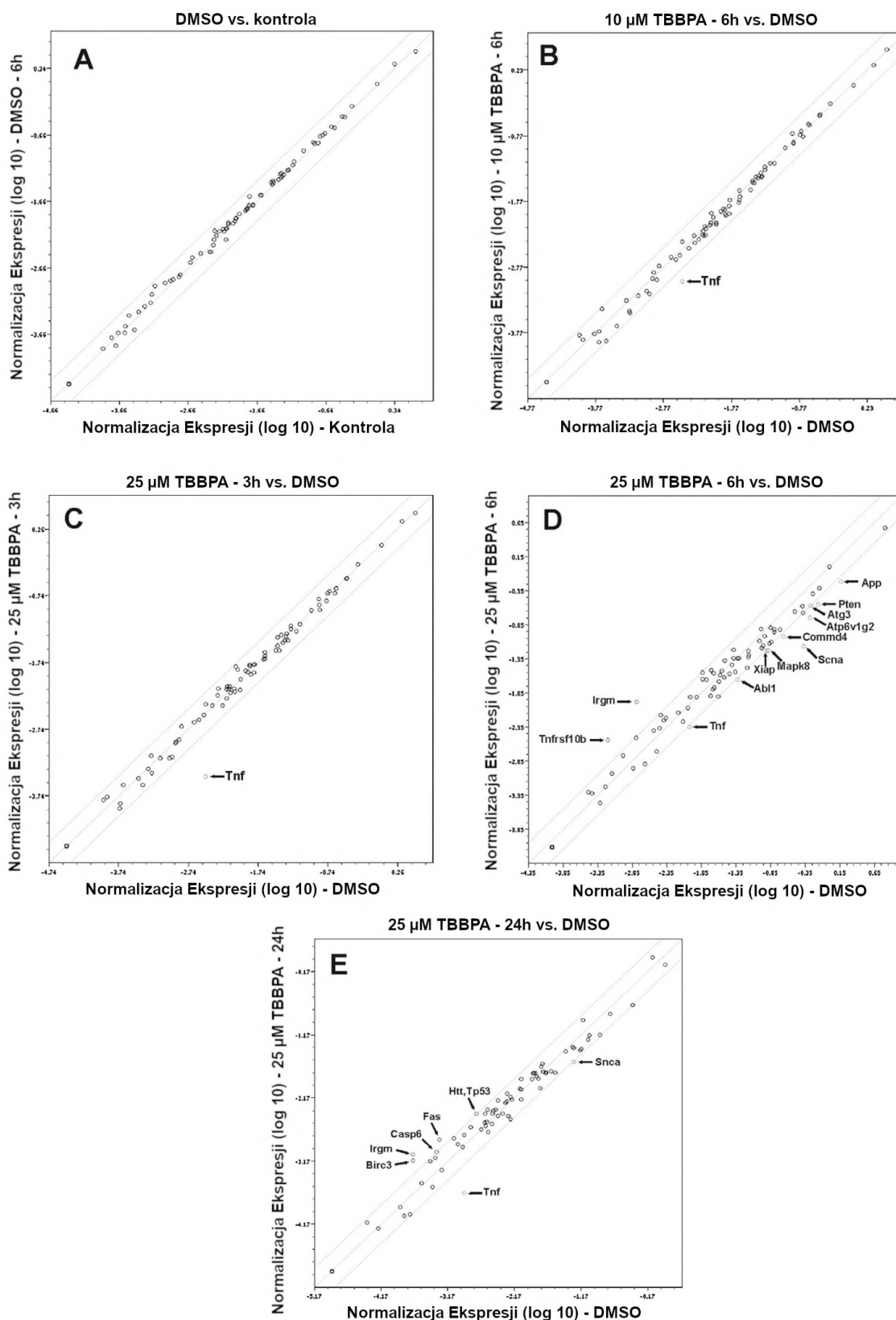
Tabela 6 (c.d.). Lista testowanych genów powiązanych ze szlakami śmierci komórkowej

25	<i>Casp9</i>	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
26	<i>Cd40</i>	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
27	<i>Cd40lg</i>	CD40 ligand
28	<i>Cflar</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
29	<i>Commd4</i>	COMM domain containing 4
30	<i>Ctsb</i>	Cathepsin B
31	<i>Ctss</i>	Cathepsin S
32	<i>Cybb</i>	Cytochrome b-245, beta polypeptide
33	<i>Cyld</i>	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
34	<i>Defb1</i>	Defensin beta 1
35	<i>Dffa</i>	DNA fragmentation factor, alpha subunit
36	<i>Dpysl4</i>	Dihydropyrimidinase-like 4
37	<i>Esr1</i>	Estrogen receptor 1
38	<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
39	<i>Faslg</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
40	<i>Foxi1</i>	Forkhead box I1
41	<i>Gaa</i>	Glucosidase, alpha, acid
42	<i>Gadd45a</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
43	<i>Galnt5</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)
44	<i>Grb2</i>	Growth factor receptor bound protein 2
45	<i>Hspbap1</i>	Hspb associated protein 1
46	<i>Htt</i>	Huntingtin
47	<i>Ifng</i>	Interferon gamma
48	<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1
49	<i>Igf1r</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor
50	<i>Ins2</i>	Insulin 2
51	<i>Irgm</i>	Immunity-related GTPase family, M
52	<i>Kcnip1</i>	Kv channel-interacting protein 1
53	<i>Mag</i>	Myelin-associated glycoprotein
54	<i>Map1lc3a</i>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
55	<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8
56	<i>Mcl1</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1
57	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
58	<i>Nol3</i>	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
59	<i>Olr1583</i>	Olfactory receptor 1583

Tabela 6 (c.d.). Lista testowanych genów powiązanych ze szlakami śmierci komórkowej

60	<i>Parp1</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
61	<i>Parp2</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase 2
62	<i>Pik3c3</i>	Phosphoinositide-3-kinase, class 3
63	<i>Pten</i>	Phosphatase and tensin homolog
64	<i>Pvr</i>	Poliovirus receptor
65	<i>Rab25</i>	RAB25, member RAS oncogene family
66	<i>RGD1311517</i>	Similar to RIKEN cDNA 9430015G10
67	<i>Dennd4a</i>	DENN/MADD domain containing 4A
68	<i>Rps6kb1</i>	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1
69	<i>Snca</i>	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
70	<i>Spata2</i>	Spermatogenesis associated 2
71	<i>Sqstm1</i>	Sequestosome 1
72	<i>Sycp2</i>	Synaptonemal complex protein 2
73	<i>Tmem57</i>	Transmembrane protein 57
74	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
75	<i>Tnfrsf10b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
76	<i>Tnfrsf11b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
77	<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
78	<i>Tnfrsf4</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
79	<i>Tnfrsf8</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
80	<i>Tp53</i>	Tumor protein p53
81	<i>Traf2</i>	Tnf receptor-associated factor 2
82	<i>Txnl4b</i>	Thioredoxin-like 4B
83	<i>Ulk1</i>	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)
84	<i>Xiap</i>	X-linked inhibitor of apoptosis

Geny związane ze śmiercią komórek – przedstawione w tabeli 6 – analizowano przy użyciu RT2 ProfilerTM PCR Array. Wyniki pokazują brak wpływu rozpuszczalnika dla TBBPA - 0,5% DMSO (Ryc. 30A), jednak wpływ TBBPA na ekspresję genów porównywany był do kontroli rozpuszczalnika. Po 6 godzinach od ekspozycji komórek hodowli na 10 μ M TBBPA, nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genów z wyjątkiem jednego genu – *Tnf*, którego ekspresja uległa obniżeniu (Ryc. 30B). Tak więc w dalszych eksperymentach skupiliśmy się jedynie na zbadaniu wpływu 25 μ M TBBPA.



Rycina 30. Przegląd wykresów rozproszenia ekspresji 84 genów związanych z procesem śmierci komórkowej w pierwotnych hodowlach CGC traktowanych 10 lub 25 μ M TBBPA. Pomiary przeprowadzono w okresach 3, 6 lub 24 godziny po ekspozycji hodowli na TBBPA. Wykresy rozproszenia dla każdej z grup ekspozycji wygenerowano przez normalizację względem kontroli zgodnie z analizą danych online Qiagen dla macierzy PCR z profilem RT2.

Po 3 godzinach od ekspozycji hodowli CGC na 25 mM TBBPA również obserwowano obniżenie ekspresji tylko jednego genu – *Tnf* (Ryc. 30C). Bardziej wyraźne były zmiany wywołane po 6 godzinach, gdzie zmianom ekspresji uległo 12 z badanych genów. Stwierdzono zwiększanie ekspresji 2 genów oraz obniżenie 10 genów (Ryc. 30D). Przedłużona inkubacja komórek po ekspozycji na 25 μ M TBBPA do 24 godzin spowodowała nadekspresję pięciu genów, a dwa z badanych genów ulegały obniżeniu ekspresji (Ryc. 30E).

Tabela 7. Ekspresja mRNA genów zaangażowanych w procesy śmierci komórkowej po ekspozycji na TBBPA

3h po ekspozycji CGC na 25 μ M TBBPA			6h po ekspozycji CGC na 25 μ M TBBPA			24h po ekspozycji CGC na 25 μ M TBBPA		
Podwyższona ekspresja genów			Podwyższona ekspresja genów			Podwyższona ekspresja genów		
symbol genu	krotność zmiany	funkcja	symbol genu	krotność zmiany	funkcja	symbol genu	krotność zmiany	funkcja
			<i>Irgm</i>	6,4	autofagia	<i>Birc3</i>	3,4	anty-apoptoza
			<i>Tnfrsf10b</i>	4,6	pro-apoptoza	<i>Casp6</i>	2,0	pro-apoptoza
						<i>Fas</i>	2,9	pro-apoptoza, autofagia
						<i>Htt</i>	2,1	autofagia
						<i>Irgm</i>	4,2	autofagia
						<i>Tp53</i>	2,1	pro-apoptoza, autofagia
Obniżona ekspresja genów			Obniżona ekspresja genów			Obniżona ekspresja genów		
symbol genu	krotność zmiany	funkcja	symbol genu	krotność zmiany	funkcja	symbol genu	krotność zmiany	funkcja
<i>Tnf</i>	-9,0	autofagia, pro-apoptoza	<i>Abl1</i>	-2,1	pro-apoptoza	<i>Snca</i>	-2,1	autofagia
			<i>App</i>	-2,5	autofagia	<i>Tnf</i>	-5,7	autofagia, pro-apoptoza
			<i>Atg3</i>	-2,0	autofagia			
			<i>Atp6v1g2</i>	-2,9	pro-apoptoza, nekroza			
			<i>Commd4</i>	-2,3	nekroza			
			<i>Mapk8</i>	-2,2	autofagia			
			<i>Pten</i>	-2,5	autofagia			
			<i>Snca</i>	-6,1	autofagia			
			<i>Tnf</i>	-2,1	autofagia, pro-apoptoza			
			<i>Xiap</i>	-2,1	anty-apoptoza			

Bardziej szczegółowe dane dotyczące zaobserwowanych zmian w ekspresji genów pokazane są w Tabeli 7, gdzie wskazano szacunkowe zmiany w poziomie mRNA. Wartości większe niż jeden (oznaczone jako krotność zmiany) wskazują na nadekspresję danego genu, natomiast wartości mniejsze niż jeden wskazują na obniżenie ekspresji. Po 3 godz. od ekspozycji hodowli CGC na 25 μ M TBBPA nie stwierdzono zmian w ekspresji genów zaangażowanych w procesy programowanej śmierci komórki z wyjątkiem autofagicznego i pro-apoptotycznego genu *Tnf*, który był hamowany 9-krotnie. W hodowli neuronów analizowanych 6 godz. po ekspozycji na TBBPA, tylko dwa geny związane ze śmiercią komórki, *Irgm* (autofagia) i *Tnfrsf10b* (pro-apoptotyczny) uległy nadekspresji. Ponadto, w tym czasie obniżeniu ekspresji uległo aż dziesięć genów, a większość z nich (5 genów) bierze udział w procesie autofagii.

Wystąpiło również zahamowanie genów o aktywności anty-apoptotycznej; *Xiap* i *Commd4*, które są zaangażowane w procesy nekrozy, a także dwa geny (*Atp6v1g2* i *Tnf*) regulujące odpowiednio apoptozę i nekrozę lub apoptozę i autofagię. W hodowlach CGC badanych po 24 godz. od ekspozycji na TBBPA, ekspresja dwóch genów tj. *Snca* (autofagia) i *Tnf* (autofagia, apoptoza) została obniżona, natomiast takiej regulacji nie uległ żaden z genów biorących udział w apoptozie lub nekrozie (Tabela 7). Z drugiej strony, zwiększeniu ekspresji uległy następujące geny: *Casp6*, który koduje białka biorące udział tylko w procesie apoptozy, dwa geny odpowiedzialne za procesy autofagii (*Htt* i *Irgm*), dwa geny biorące udział w obu tych procesach (*Fas* i *Tp53*) oraz tylko jeden gen anty-apoptotyczny (*Birc3*).

4.3.3. Dynamika zmian w markerach nekrozy, apoptozy i autofagii po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA

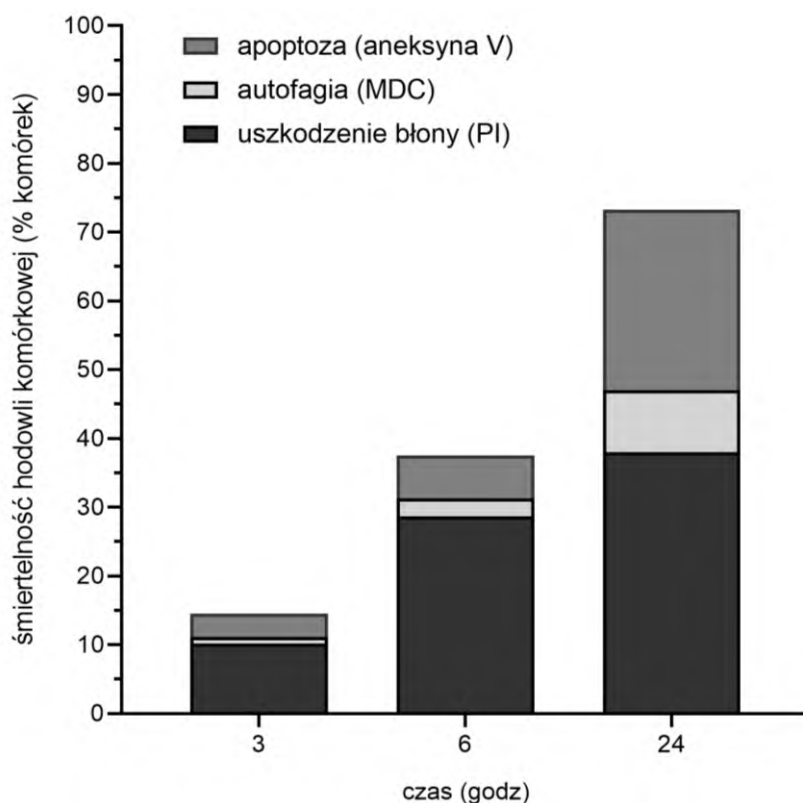
Zbadany również został udział szlaków śmierci komórkowej w neurotoksycznym działaniu TBBPA. W tym celu wykorzystano specyficzne markery: aneksyny V-FITC (ANX) do oznaczenia apoptozy, monodansylkadaweryny (MDC) do oznaczenia autofagii oraz jodku propidyny (PI) do oznaczenia zmian w integralności błony komórkowej świadczącej o nekrozie nieregulowanej. Podobnie jak w przypadku wcześniej omówionych wyników dotyczących przeżywalności neuronów po ekspozycji na 25 μ M TBBPA, w tym eksperymencie również odnotowano wysoki ubytek żywych komórek hodowli CGC (o 73,3%) w 24 godziny od podania TBBPA (Ryc. 31).

Kontrolą rozpuszczalnikową tego eksperymentu było zastosowanie 0,5% DMSO we wszystkich punktach czasowych (0, 3, 6 i 24 godz.), gdzie nie zaobserwowano istotnych różnic w nawiązaniu do próby kontrolnej zawierającej jedynie hodowle CGC (Tabela 8).

Tabela 8. Procent przyżywalności hodowli CGC w warunkach kontrolnych.

		CGC							
		Kontrola				0,5% DMSO			
Czas analizy (h):		0	3	6	24	0	3	6	24
Marker	ANX	99,7	99,5	99,5	99,5	99,7	99,5	99,0	99,5
	MDC	99,5	99,5	99,5	99,0	99,5	98,7	99,0	98,7
	PI	98,4	96,7	97,0	96,5	97,4	95,8	95,8	96,0

Kontrolą czasową było zastosowanie punktu pomiaru (godzina 0) zaraz po podaniu TBBPA (lub DMSO) do środowiska inkubacyjnego, której nie uwzględniono na Ryc. 31 oraz w Tabeli 9 ze względu na wysoką przeżywalność i znikomy procent udziału śmierci komórkowej w tym punkcie czasowym.



Rycina 31. Ocena udziału różnych procesów śmierci komórkowej indukowanej w pierwotnych hodowlach CGC przez 25 μ M TBBPA. W eksperymencie wykorzystano markery: aneksynę V-FITC (do oznaczenia apoptozy); monodansylkadawerynę (MDC) (do oznaczenia wakuol autofagosomalnych) oraz PI (do oznaczania spadku integralności błony komórkowej i nieprogramowanej nekrozy). Śmiertelność hodowli CGC wyrażona jako procent komórek martwych po 3, 6 i 24 godzinach od 30-minutowej ekspozycji na TBBPA. Wyniki są wartościami średnimi (n=6). Istotnie statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną: *p<0,05.

Jak wykazano w Tabeli 9 oraz Ryc. 31, największa ilość komórek hodowli CGC eksponowanej na 25 μ M TBBPA była barwiona przez PI, niezależnie od czasu przeprowadzonej analizy.

O ile stosunek liczby komórek hodowli barwionych ANX i MDC po 3 i 6 godzinach od czasu ekspozycji neuronów na TBBPA utrzymywał się na podobnym poziomie (Ryc. 31), to w przypadku analizy hodowli CGC po 24 godzinach zaobserwowany był znaczny wzrost liczby neuronów zabarwionych ANX (z 23,5-16,5% do 35,9%) oraz MDC (z 5,9-7,1% do 12,3%) (Tabela 9). Tym samym, procentowy udział PI w barwieniu komórek hodowli zmalał z 70,6-76,5% do 51,8%).

Tabela 9. Procentowy udział markerów szlaków śmierci komórkowej po barwieniu komórek hodowli CGC eksponowanej na 25 μ M TBBPA.

		Czas analizy po ekspozycji neuronów		
		3 godziny	6 godziny	24 godziny
Marker	ANX	23,5	16,5	35,9
	MDC	5,9	7,1	12,3
	PI	70,6	76,5	51,8

Powyższe wyniki badań mechanizmu neurotoksyczności indukowanej TBBPA pozwalają wnioskować, że w procesie śmierci komórkowej neuronów eksponowanych na 25 μ M TBBPA biorą udział wszystkie badane procesy śmierci komórkowej z wyraźną przewagą nieregulowanej nekrozy, o czym świadczy dominacja barwienia PI. Z upływem czasu wzrasta rola apoptozy, a zwłaszcza autofagii. Dane uzyskane w tym eksperymencie za pomocą mikroskopii konfokalnej są zgodne z opisanymi wyżej wynikami badań zmian ekspresji genów szlaków programowanej śmierci komórek, przeprowadzonymi technikami PCR.

5. Dyskusja

5.1. Ocena strony metodycznej

Pierwotne hodowle komórek ziarnistych mózdzku szczura są popularnym modelem neuronów glutaminianergicznych w badaniach *in vitro*, które stosowane są w wielu eksperymentach neurobiologicznych oraz neurotoksykologicznych (Schousboe i wsp., 1985; Contestabile, 2002). Biologia oraz warunki hodowli tych komórek są dobrze poznane oraz opisane, dlatego nadają się do badania komórkowych i molekularnych mechanizmów neurodegeneracji, a także neuroprotekcji. Wyniki uzyskane w naszej pracowni pokazały, że ten

model jest szczególnie przydatny w badaniach mechanistycznych dotyczących natury przepływu jonów Ca^{2+} w neuronach oraz mechanizmów cytotoksyczności różnych związków i substancji farmakologicznych (Zieminska i wsp., 2006, 2006–2007, 2010, 2012, 2014a i b, 2015). Co ważne, hodowle CGC wykorzystano już wcześniej w badaniach grupy Reistad i wsp. (2007), która po raz pierwszy opisała przejściowe zmiany w homeostazie jonów Ca^{2+} w neuronach poddanych działaniu TBBPA w mikromolowych stężeniach. Inne badania, w których wykorzystano linie komórkowe nie posiadające funkcjonalnych receptorów NMDA, wykazały istotny wpływ TBBPA na uwalnianie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} za pośrednictwem RyR (Ogunbayo i wsp., 2008; Al-Mousa i Michelangeli, 2012, 2014; Hendriks i wsp., 2014). Te dane wskazują, że hodowle CGC są dobrym modelem w badaniach mechanizmów neurotoksyczności, a zwłaszcza ekscytotoksyczności wywołanej przez TBBPA.

Podstawowym narzędziem farmakologicznym do weryfikacji roli NMDAR w przeprowadzonych eksperymentach był ich niekompetycyjny antagonist - MK-801, omówiony poprzednio w podrozdziale 1.4.1. Ten bloker kanału NMDAR został celowo użyty w stosunkowo niskim stężeniu $0,5 \mu\text{M}$. W tym stężeniu MK-801 skutecznie hamuje kanały NMDAR, przy uniknięciu efektów ubocznych tj. hamowania receptora acetylocholiny, które zachodzi przy IC_{50} równym $3 \mu\text{M}$ (Amador i Dani, 1991). MK-801 jest blokerem kanałów NMDAR o wysokim powinowactwie. Badania efektów cytoprotekcyjnych dla enancjomerów MK-801: (+)MK-801 i (-)MK-801, w hodowlach CGC eksponowanych na $100 \mu\text{M}$ glutaminian wykazały, że ich EC_{50} wynosi odpowiednio 30 nM i 150 nM (Lysko i wsp., 1992). Dodatkowo, przedstawione wyżej dane (Ryc. 23) pokazują, że $0,5 \mu\text{M}$ MK-801 niemal kompletnie hamuje indukowany przez glutaminian wzrost napływu Ca^{2+} do komórek hodowli CGC. MK-801 w postaci radioligandu wykorzystany został również w eksperymentach prowadzonych na frakcji błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura, gdzie dzięki jego specyficznemu powinowactwu do miejsc wiązania wewnątrz otwartego kanału NMDAR, możliwa była ocena poziomu aktywności tego receptora i wpływu podania agonistów oraz TBBPA.

Użyte w tej pracy zmiatacze wolnych rodników, takie jak zredukowany glutation (GSH) i butylowany hydroksyanizol (BHA), były poprzednio stosowane w tych samych stężeniach w badaniach mechanistycznych prowadzonych na hodowlach CGC (Sagara i wsp., 2006; Zieminska i wsp., 2010). W trakcie badań zrodziło się pytanie, czy formowanie się MPTP odgrywa rolę w indukowanym przez TBBPA wzroście produkcji ROS. W poprzednio prowadzonych badaniach *in vitro* stosowano różne stężenia cyklosporyny A (CsA) w celu

zahamowania powstawania MPTP (Zieminska i wsp., 2006; Bambrick i wsp., 2006). Przy tym skuteczność tego działania CsA na mitochondria neuronów jest kontrowersyjna (Brustovetsky i Dubinsky, 2000; Elrod i Molkenin, 2013). Wykazano, że 2 μM CsA skutecznie zapobiega indukcji MPTP w mitochondriach astrocytów, lecz nie w pierwotnych hodowlach CGC (Bambrick i wsp., 2006). Przeprowadziłem eksperymenty kontrolne w których sprawdzony był wpływ 0,5, 5 i 10 μM CsA na przeżywalność hodowli CGC eksponowanej na 10 i 25 μM TBBPA (Zieminska i wsp., 2017a). Uzyskane dane wykazały, że jedynie 5 i 10 μM CsA wpłynęła cytoprotekcyjnie na hodowlę CGC eksponowaną na 10 μM TBBPA, lecz nie zaobserwowano istotnych zmian w przeżywalności neuronów eksponowanych na 25 μM TBBPA (Zieminska i wsp., 2017a). W badaniach przedstawionych w tej rozprawie dotyczących wywołanej przez TBBPA depolaryzacji mitochondriów zastosowano więc CsA w stężeniu 5 μM .

Użyte wskaźniki fluorescencyjne tj. fluo-3, DCF i R123, których fluorescencja mierzona była za pomocą czytnika płytek, służyły do oceny odpowiednio, dynamiki zmian poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_i$, produkcji ROS i $\Delta\Psi_m$ w hodowlach CGC. Literatura zawiera raporty krytykujące niską rozdzielczość czasową i czułość tych czytników, przy pomiarach z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych bardzo dynamicznych i krótkotrwałych procesów, jak wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i produkcja ROS (Heusinkveld i wsp., 2011; Meijer i wsp., 2014). Zostały one wzięte pod uwagę, i dlatego przeprowadzono również eksperymenty przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym, aby zmierzyć w hodowlach CGC wpływ TBBPA na fluorescencję fluo-3 i DCF. Zastosowanie obu platform pomiarowych przyniosło bardzo podobne wyniki (do porównania Ryc. 8 z 9 oraz 10 z 11). Ponadto w naszej pracowni uzyskaliśmy wcześniej porównywalne wyniki z czytnika płytek i mikroskopii konfokalnej w czasie rzeczywistym, gdy charakteryzowano wywołany przez TBBPA wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w hodowlach CGC, w tym zależność stężenia do efektu oraz jego modulację farmakologiczną (Zieminska i wsp., 2012, 2014a, 2015).

Jednak w badaniach innych autorów wykazano, że TBBPA indukuje fluorescencję roztworów DCFH-DA w systemach bezkomórkowych, i na tej podstawie stwierdzono, że test DCF nie może być stosowany do oceny komórkowego wytwarzania ROS w badaniach TBBPA (Tetz i wsp., 2013; Szychowski i wsp., 2016a, 2016b). Autorzy ci podkreślają, że ze względu na obecność atomów bromu w strukturze TBBPA, substancja ta działa podobnie do wolnego rodnika i jest podatna na redukcję poprzez debrominację (Szychowski i wsp., 2016b). W tej

sytuacji nie można było wykluczyć interakcji TBBPA z innymi sondami fluorescencyjnymi. W naszych badaniach uwzględniliśmy też fakt, że bastadyna, jedno z narzędzi farmakologicznych stosowanych w naszych eksperymentach, która moduluje aktywność RyR, jest bromowaną pochodną tyrozyny, która może również reagować z sondami fluorescencyjnymi.

W eksperymencie kontrolnym w systemie bezkomórkowym (tabela 2) DCFH-DA i DCF użyto w stężeniu 100 μM , które także było zastosowane w fazie preinkubacji w badaniach opisanych w podrozdziale 4.1 (Ryc. 10, 11). W kolejnych eksperymentach (Tabele 3-5) wszystkie sondy fluorescencyjne użyte były w stężeniu 1 μM mogącym odpowiadać stężeniu wewnątrz komórek. Według mojej interpretacji wyników przedstawionych w podrozdziale 4.1.1., interakcje TBBPA z sondami fluorescencyjnymi zachodzą w systemach bezkomórkowych, jednak mają słabe odniesienie do zjawisk zachodzących w żywych komórkach. Uważam, że eksperymenty ujawniające wzrost produkcji ROS w komórkach poddanych działaniu TBBPA przy użyciu testu DCF mogą dostarczyć przydatnych wyników, pod warunkiem, że są one traktowane z ostrożnością. Ponadto, te wyniki eksperymentów biologicznych należy dodatkowo potwierdzić za pomocą innych metod.

Odrzucenie przez nas krytycznych opinii na temat wykorzystania testu DCF do oceny stresu oksydacyjnego wywołanego przez TBBPA w komórkach w hodowli mają następującą podstawę:

- (1) Proste eksperymenty kontrolne z zastosowaniem roztworów DCFH-DA lub DCF w środowisku bezkomórkowym nie dostarczyły informacji o stopniu, w jakim wyniki eksperymentów na komórkach mogą być zniekształcone. Do stwierdzenia danych z systemu bezkomórkowego, że bezpośrednio interakcje TBBPA–DCFH-DA mogą wpływać na wyniki testów DCF w modelach komórkowych, trzeba stosować stężenia roztworów DCFH-DA lub DCF, które odpowiadają stężeniu wewnątrzkomórkowemu dla tego wskaźnika. Względne wzrosty fluorescencji (w procentach kontroli) roztworów DCFH-DA indukowanych przez TBBPA okazały się odwrotnie proporcjonalne do stężenia wskaźnika (Tetz i wsp., 2013; Szychowski i wsp., 2016b). Jednak rzeczywiste stężenie DCFH-DA wewnątrz komórek po naładowaniu nim komórek hodowli CGC jest nieznane. W naszych doświadczeniach kontrolnych przeprowadzonych w środowisku bezkomórkowym z zastosowaniem 100 i 1 μM stężenia DCFH-DA, obserwowaliśmy odpowiednio 10% lub 32-34% wzrosty fluorescencji w obecności TBBPA. Jednakże, wyniki te nie mogą być związane z sytuacją, jaka może mieć miejsce w hodowlach komórkowych, ponieważ jak wspomniano powyżej, rzeczywiste stężenie DCFH-DA/DCF w komórkach nie jest znane.

- (2) Wyniki naszych eksperymentów opisanych w głównej części pracy (podrozdział 4.1) oraz powyżej, ujawniły istotne niezgodności niektórych wyników testów DCF i rodaminy 123 w systemie bezkomórkowym z danymi otrzymanymi z eksperymentów z użyciem hodowli CGC. Po pierwsze, antagoniści NMDAR i RyR (o nieznanym potencjale antyoksydacyjnym), którzy w hodowlach CGC hamują wzrost $[Ca^{2+}]_i$ indukowany przez 10 μ M TBBPA, zapobiegali również wywołanym przez TBBPA wzrostom fluorescencji DCF w komórkach (podrozdział 4.1 – Ryc. 10, 11). Należy również wziąć pod uwagę, że połączenie tych antagonistów - zawierających bastadynę - nie zakłóca fluorescencji DCF w kontroli hodowli CGC, nietraktowanej TBBPA (Ryc. 10). Z kolei w środowisku bezkomórkowym dwoje z tych antagonistów - MK-801 i rianodyna - również nie miały wpływu na fluorescencję 1 μ M DCFH-DA, aczkolwiek bastadyna istotnie zwiększyła tę fluorescencję. Inny przykład niespójności wyników dotyczy wpływu TBBPA na fluorescencję rodaminy 123. W środowisku wolnym od komórek fluorescencja rodaminy 123 zmniejszyła się o 23-31% w obecności TBBPA (Tabela 5), podczas gdy w eksperymentach prowadzonych na hodowlach CGC, TBBPA wzmocnił fluorescencję tej sondy, wskazując na depolaryzację mitochondriów (podrozdział 4.1 – Ryc. 14). Tak więc, wyniki eksperymentów biologicznych przeprowadzonych na hodowlach CGC, szczególnie tych wykorzystujących różne narzędzia farmakologiczne, nie są zgodne z danymi otrzymanymi z testów przeprowadzonych w środowisku bezkomórkowym. Nie potwierdza to obaw wynikających z eksperymentów kontrolnych w środowisku bezkomórkowym. Proponuję więc następującą interpretację przyczyn tych rozbieżności. W przypadku TBBPA (a także bastadyny), wyniki uzyskane z eksperymentów na roztworach wodnych w środowisku bezkomórkowym nie mają zastosowania do sytuacji panującej w komórkach. TBBPA i bastadyna są wysoce lipofilowe i w komórkach wiążą się z błonami, podczas gdy produkty deacylowania DCFH-DA rozpuszczają się w cytozolu. W komórkach substancje te znajdują się w różnych przedziałach komórkowych i istnieje małe prawdopodobieństwo ich bezpośredniej interakcji. Zatem wyniki uzyskane w eksperymentach wyłącznie na roztworach bezkomórkowych nie wyjaśniają, czy i w jakim stopniu bezpośrednia interakcja TBBPA–DCFH-DA może zakłócać wyniki testu DCF w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA.
- (3) Prezentacja zwiększonej produkcji ROS wyłącznie w oparciu o wynik testu DCF, bez wsparcia innych wskaźników, byłaby niekompletnym dowodem na indukowany przez TBBPA stres oksydacyjny w hodowlach CGC. Jednak nasze wyniki testu DCF w hodowli

CGC eksponowanej na TBBPA są zgodne z wynikami badań z wykorzystaniem alternatywnych metod oceny stresu oksydacyjnego (podrozdział 4.1 - Ryc. 12, 13). Pokazują one, że oprócz zwiększenia fluorescencji DCF, TBBPA indukuje zależny od stężenia spadek poziomu GSH i aktywności katalazy w hodowlach CGC oraz, że efekty podania 10 μM TBBPA są zniesione przez antagonistów NMDAR i RyR. Na podstawie danych literaturowych i wyników własnych uważam, że spadek poziomu GSH i zmniejszona aktywność katalazy są wtórne, są efektem zwiększonej produkcji ROS. Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost fluorescencji DCF w hodowlach CGC eksponowanych na 10 μM TBBPA nie jest artefaktem, lecz odzwierciedla zwiększoną produkcję ROS, która jest elementem indukowanego przez TBBPA stresu oksydacyjnego w neuronach w którym pośredniczy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Testowanie hipotezy o depolaryzacji CGC eksponowanych na TBBPA zostało przeprowadzone za pomocą dwóch kompatybilnych metod. Na wstępie wykazano indukowane przez TBBPA obniżenie potencjału błony całych komórek ziarnistych (ang. *wholecell current-clamp*) *in situ* w skrawkach mózdzku szczura (Ryc. 32). Badania elektrofizjologiczne zostały wykonane w ramach współpracy w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. Ich wynik uwiarygodnił szczegółowe badania przeprowadzone w naszej pracowni metodą alternatywną z użyciem sondy oksonol VI, który jest wrażliwą na zmiany potencjału sondą optyczną o powolnej odpowiedzi (Apell i Bersch, 1987; Smith, 1990). Związki z rodziny oksonoli są przydatne, ponieważ emitują stabilny sygnał fluorescencyjny z bardzo niskim poziomem wybielenia, co więcej, sygnały pochodzące z mitochondriów nie zakłócają fluorescencji oksonolu (Chifflet i Hernandez, 2007). Jest to bardzo ważna zaleta, ponieważ wiadomo, że TBBPA wywołuje depolaryzację błon mitochondrialnych w hodowlach CGC (Zieminska i wsp., 2015).

W celu zidentyfikowania mechanizmów odpowiedzialnych za depolaryzację hodowli CGC wywołaną przez TBBPA, zastosowano wybrane narzędzia farmakologiczne. Aby zaobserwować udział jonotropowych receptorów glutaminianu w powstawaniu depolaryzacji użyto selektywnego niekompetycyjnego antagonistę NMDAR (0,5 μM MK-801) oraz antagonistę AMPAR (20 μM CNQX) (Foster i wsp., 1988; Blake i wsp., 1989). Do potwierdzenia/wykluczenia udziału kanałów sodowych bramkowanych napięciem w mechanizmie depolaryzacji wywołanej przez TBBPA, zastosowano TTX jako blokera tych kanałów (Sah, 1995). Natomiast do sprawdzenia czy wywołana podaniem TBBPA mobilizacja

Ca²⁺ z magazynów ER w części presynaptycznej zakończeń nerwowych może prowadzić do uwalniania puli pęcherzykowej glutaminianu, zastosowano kombinację antagonistów RyR - 200 μM rianodyny z 2,5 μM bastadyną. Wykazano już wcześniej, że te ligandy RyR stosowane w kombinacji, zapobiegają mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ wywołanej zarówno przez TBBPA, jak i tapsigarginę (Zieminska i wsp., 2014).

Kolejnym modelem badawczym wykorzystanym w niniejszej pracy były frakcje błon komórkowych izolowanych z kory mózgu szczura z użyciem metody polegającej na homogenizacji, zamrażaniu-rozmrażaniu i przemywaniu homogenatu (Reynolds, 2001). W konsekwencji błony można uważać za całkowicie oczyszczone z endogennego glutaminianu zawartego w strukturach pęcherzykowych, takich jak synaptosomy, synaptoneurosome lub gliosomy. Specyficzne wiązanie znakowanych ligandów NMDAR do izolowanych błon kory mózgu szczura wykorzystano do weryfikacji hipotezy roboczej, że istnieje bezpośrednia interakcja TBBPA z NMDAR. Wiązanie [³H]MK-801 jest szczególnie ważnym markerem, ponieważ odzwierciedla poziom otwarcia kanału NMDAR (Foster i Wong, 1987; Ransom i Stec, 1988; Reynolds and Miller, 1988). Wiadomo, że MK-801 wiąże się wyłącznie do aktywnych (otwartych) kanałów NMDAR w błonach mózgu (Foster i Wong, 1987) i hamuje te receptory w sposób zależny od ich aktywności (Capek i Esplin, 1997). Ponadto, ewentualne zmiany w wiązaniu znakowanych agonistów NMDAR tj. glutaminianu i glicyny, mogłyby być pomocne w ocenie mechanizmu interakcji między TBBPA a receptorem NMDA.

Następnym modelem badawczym były frakcje synaptosomów izolowanych z przodomózgowia szczurów z użyciem metody opierającej się na homogenizacji, wirowaniu różnicowym i rozdziale frakcji na nieciągłym gradiencie, przy użyciu 7 i 12% roztworów Ficollu. Dzięki tej metodzie uzyskano frakcję synaptosomów, które są aktywne metabolicznie i minimalnie zanieczyszczone wolnymi mitochondriami (ok. 3,8% według Bootch i Clark, 1985). Ponieważ ta metoda była wielokrotnie stosowana z powodzeniem - również w Zakładzie Neurochemii (Sulkowski i wsp., 2009, 2014) – zastosowanie jej w eksperymentach opisanych w niniejszej pracy nie budziło wątpliwości. Jako kontroli pozytywnej dla efektu wywołanego przez TBBPA posłużyłem się inhibitorem transporterów glutaminianu (EAAT) – kwasem L-trans-pirolidyno-2,4-dikarboksylowym (PDC), który w stężeniu 100 μM skutecznie hamuje pobieranie glutaminianu do wnętrza komórek (Cebers i wsp., 2008). W przeprowadzonych eksperymentach, hamowanie pobierania [³H]kwasu glutaminowego przez synaptosomy wywołane podaniem PDC wahało się na poziomie 50-55% (Ryc. 18A). Tę wartość przyjęto za

maksymalną wartość hamowania transportu. Analogiczny wynik uzyskano w badaniach przeprowadzonych na frakcjach błon astroglejowych oraz synaptosomach izolowanych z kory mózgu myszy, gdzie maksymalne hamowanie transportu glutaminianu przez PDC (25 μ M) wynosiło 30-50% (Rauen i wsp. 1992). Niewielkie różnice tych danych mogą wynikać z metody izolacji frakcji synaptosomalnej, badanego materiału, stężenia użytego PDC oraz użytego radioligandu. W eksperymentach, których wyniki przedstawiono na Ryc. 18B, uzyskany poziom hamowania przyjęliśmy za maksymalny (100% hamowania pobierania [3 H]kwasu glutaminowego), a pobieranie [3 H]kwasu glutaminowego w warunkach kontrolnych za maksymalną aktywność transportu (100% pobierania).

Należy podkreślić, że stężenia 10 i 25 μ M TBBPA stosowane w tych eksperymentach – wybrane na podstawie poprzednich publikacji naszej pracowni (Zieminska i wsp., 2012, 2015) – są o kilka rzędów wielkości wyższe niż te występujące w płynach ustrojowych człowieka (Hendriks i wsp., 2012). Stosowanie stężeń mikromolowych TBBPA jest niezbędne dla ujawnienia bardzo dynamicznych mechanizmów ostrej toksyczności TBBPA. Uważamy, że mogą one uczestniczyć także w procesach indukowanych przewlekłą ekspozycją neuronów na niższe stężenia TBBPA. Sugeruje się, że substancje, które często wspólnie zanieczyszczają środowisko, mogą działać synergistycznie (Reistad i wsp., 2007; Fonnum i Mariussen, 2009; Zieminska i wsp., 2012) i razem stanowią realne zagrożenie. Jak dotychczas, wykazano to dla robaków ziemnych i zwierząt wodnych (He i wsp., 2015; Chen i wsp., 2018). Ponadto istnieją poglądy, że skumulowany efekt toksyczny TBBPA i neurotoksyn środowiskowych o podobnym mechanizmie działania i często wspólnie występujących w środowisku, takich jak polichlorowane bifenyle i organiczne związki rtęci, mogą być znacznie silniejsze niż efekty toksyn badanych indywidualnie (Fonnum i Mariussen, 2009). Tak więc, wyniki tej pracy dotyczące wyłącznie ostrego cytotoksycznego działania TBBPA, traktowane indywidualnie, nie odnoszą się bezpośrednio do oceny ryzyka dla ludzi. Wyniki innych badań neurotoksyczności TBBPA, przedstawionych w niniejszej pracy wskazują, że podanie do hodowli CGC 25 μ M TBBPA prowadzi do stopniowego zmniejszania się odsetka żywych komórek po 3, 6 i 24 godzinach od 30-min. ekspozycji hodowli na TBBPA. Zdajemy sobie sprawę z tego, że ostra neurotoksyczność TBBPA, która była badana *in vitro* z wykorzystaniem modelu pierwotnych hodowli CGC, nie odzwierciedla rzeczywistego zagrożenia toksykologicznego dla populacji ludzkich. Wiadomo, że żaden przypadek ostrego zatrucia TBBPA u ludzi nigdy nie został opisany. Natomiast pojawiają się ostrzeżenia o

niebezpieczeństwie chronicznego narażenia ludzi na niskie dawki TBBPA (Yu i wsp., 2020). Autorzy tej pracy zauważyli, że po 90 dniach ekspozycji szczurów na TBBPA (54,6 mg/m³) drogą inhalacji, największą jego zakumulowaną ilość zanotowano w wątrobie oraz osoczu - ok. 1,6 ±0,5 mg/g tłuszczu. Narażenie dotyczy również noworodków, ponieważ substancję tę – łatwo przechodzącą przez łożysko – wykryto w mleku matki (Cariou i wsp., 2008; Shi i wsp., 2013). Użyty w moich badaniach model eksperymentalny okazał się bardzo przydatny do ujawnienia mechanizmów cytotoksyczności TBBPA, a zwłaszcza w połączeniu z wynikami ukazującymi zaburzenia homeostazy wapniowej i indukcję stresu oksydacyjnego (Zieminska i wsp., 2015, 2017). Jednak aby oszacować realne zagrożenie oraz narażenie środowiskowe dla ludzi potrzebna jest kontynuacja oraz rozszerzenie badań mechanizmów toksyczności TBBPA.

5.2. Analiza wyników

5.2.1. Indukowane przez TBBPA zaburzenia homeostazy wapnia w hodowli CGC oraz ich wpływ na poziom stresu oksydacyjnego i potencjał mitochondrialny

Przedstawione wyżej wyniki pokazują, że ekspozycja hodowli CGC na TBBPA, zależnie od stężenia, indukuje wzrost poziomu $[Ca^{2+}]_i$, powstawanie stresu oksydacyjnego oraz depolaryzuje błonę mitochondriów. Wszystkie te efekty są całkowicie (przy 10 μ M TBBPA) lub bardzo silnie (przy 25 μ M TBBPA) hamowane przez kombinację antagonistów NMDAR i RyR. Substancje te zapewniają również znaczącą, lecz niepełną ochronę przed cytotoksycznością TBBPA. Obecność zmiataczy wolnych rodników nie niweluje skutków ekspozycji na TBBPA tj. zaburzeń homeostazy wapnia i depolaryzacji mitochondriów, natomiast zmniejsza stres oksydacyjny i zapewnia znaczącą neuroprotekcję zwiększając przeżywalność komórek w hodowli. Jednoczesne podawanie zmiataczy wolnych rodników z antagonistami NMDAR i RyR prawie całkowicie zapobiega cytotoksyczności TBBPA. Inhibitor tworzenia megakanałów mitochondrialnych (MPTP), cyklosporyna A (5 μ M), nie wykazała znaczącego wpływu na wzmożoną produkcję ROS oraz spadek $\Delta\Psi_m$ wywołany podaniem TBBPA, aczkolwiek zmniejszyła efekt cytotoksyczny po ekspozycji hodowli na 10 μ M TBBPA (Zieminska i wsp., 2017a). Wyniki te pokazują, że zarówno naruszenie homeostazy i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, jak i stres oksydacyjny są zaangażowane w mechanizm(y) cytotoksyczności TBBPA w hodowlach CGC. W badaniach z wykorzystaniem 10 μ M TBBPA pierwotnym mechanizmem wydaje się być wyłącznie wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, który pobudza produkcję ROS oraz depolaryzację mitochondriów, co prowadzi do cytotoksyczności. Dodatkowe mechanizmy

niezależne od zaburzeń homeostazy wapnia obserwujemy dopiero przy podaniu 25 μM TBBPA.

Opisane tu obserwacje pokazujące zależny od stężenia TBBPA wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w hodowlach CGC, któremu można całkowicie zapobiec przez jednoczesne zastosowanie antagonistów NMDAR (0,5 μM MK-801) i RyR (200 μM rianodyny i 2,5 μM bastadyny) (Ryc. 8), są potwierdzeniem wcześniej opublikowanych wyników (Zieminska i wsp., 2015). Wyniki te są zgodne z hipotezą, że w hodowlach CGC, mechanizm indukowanego przez TBBPA wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ma dwie składowe: uwalnianie Ca^{2+} z zasobów zmagazynowanych w ER poprzez ciekące kanały RyR, a także napływ Ca^{2+} do komórek poprzez NMDAR. Zbiorcza analiza wyników pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_i$ za pomocą mikroskopu konfokalnego i czytnika fluorescencji płytek pozwala bez wątplenia stwierdzić, że receptory NMDA są zaangażowane w indukowany przez TBBPA napływ Ca^{2+} do komórek prowadzący do wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Rozbieżności wyników uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego oraz czytnika płytek, zaobserwowane w postaci odczytu różnych poziomów wzrostu fluorescencji fluo3 i DCF przy zastosowaniu tych samych dawek substancji, przypisujemy różnicom w rozdzielczości pomiarów fluorescencji fluo-3 podczas użycia dwóch różnych platform pomiarowych. Podczas gdy pomiary z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego skupiały się na ciałach komórek nerwowych, które są bogate w retikulum endoplazmatyczne zawierające RyR, lecz o małej gęstości występowania NMDAR, czytnik płytek fluorescencyjnych mierzy średnią zmian wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w całej populacji hodowli CGC (Berman i Murray, 2000), w tym regiony bogate w dendryty z dużą gęstością NMDAR. Uzyskane wyniki uzasadniają późniejsze zastosowanie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR jako narzędzia w celu zbadania związków przyczynowych między wzrostem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a produkcją ROS w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA. Ponadto, prezentowane w tej pracy wyniki pokazują, że dodanie egzogennych zmiataaczy wolnych rodników nie hamuje indukowanego przez TBBPA wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ryc. 8), co świadczy o tym, że wywołany przez TBBPA stres oksydacyjny nie jest pierwotną przyczyną zaburzeń homeostazy wapnia w hodowlach CGC traktowanych TBBPA.

Już wcześniej wykazano, że stres oksydacyjny rozwija się w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA (Reistad i wsp., 2007; Zieminska i wsp., 2012). W eksperymentach prezentowanych w tej pracy, wykazano zależny od stężenia TBBPA wzrost produkcji ROS (Ryc. 10, 11) oraz zmniejszenie się zawartości GSH i aktywności katalazy w hodowlach CGC (Ryc. 12, 13). Zarówno GSH, jak i katalaza reprezentują system obrony

antyoksydacyjnej komórki, który obejmuje przeciwutleniacze nieenzymatyczne i enzymatyczne (Birben i wsp., 2012). Spadek zawartości GSH w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA można interpretować jako efekt nadmiernej produkcji ROS i następnie zużycia GSH w reakcji redukcji nadtlenu wodoru do H₂O. GSH służy także jako kofaktor kilku detoksyfikujących enzymów (Birben i wsp., 2012), a w równowadze z GSSH we wszystkich komórkach tworzy główny system rozpuszczalnych antyoksydantów. Wiadomo, że brak równowagi redoks może służyć jako biomarker chorób neurologicznych (Ruszkiewicz i Albrecht, 2015).

Wywołany przez TBBPA spadek zawartości GSH lub wzrost GSSH zaobserwowano w badaniach na wątrobie szczura i hodowlach hepatocytów (Nakagawa i wsp., 2007) oraz w dżdżownicach i gatunkach zwierząt wodnych eksponowanych na TBBPA (He i wsp., 2015). Katalaza wraz z dysmutazą ponadtlenkową (SOD) i peroksydazą glutationową (GSH-Px) są enzymatycznymi przeciwutleniaczami. SOD katalizuje dysmutację rodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) w H₂O₂, podczas gdy katalaza i GSH-Px są odpowiedzialne za przekształcenie tego potencjalnie toksycznego produktu w wodę (Armogida i wsp., 2012). Dokładny mechanizm obniżenia aktywności katalazy w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA jest nieznany, to wiadomo, że efektem wtórnym jest zwiększenie wytwarzania ROS, ponieważ efekt ten został odwrócony przez podanie egzogennych zmiataczy wolnych rodników (Ryc. 13). Ponieważ zarówno zmniejszenie zawartości GSH, jak i zmniejszona aktywność katalazy są mechanizmami wtórnymi w stosunku do zwiększonej produkcji ROS, zjawiska te pośrednio potwierdzają hipotezę, że TBBPA powoduje zwiększenie dynamiki produkcji ROS w hodowlach CGC.

Kluczową kwestią w tej grupie eksperymentów jest rola jonów Ca²⁺ w powstawaniu stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem TBBPA. Wykazano, że TBBPA podwyższa [Ca²⁺]_i, a inkubacja komórek w pożywce wolnej od jonów Ca²⁺ zmniejsza poziom wytwarzania ROS, co sugerować może rolę wapnia w wywoływaniu stresu oksydacyjnego. Z drugiej jednak strony w badaniach tych autorów podanie MK-801 nie zdołało znacząco zahamować produkcji ROS w hodowlach CGC eksponowanych na 10 μM TBBPA (Reistad i wsp., 2007). Wyniki eksperymentów przedstawionych w niniejszej pracy ujawniły, że jednoczesne podanie kombinacji antagonistów RyR i NMDAR, które zapobiegało wzrostowi [Ca²⁺]_i w hodowlach CGC eksponowanych na 10 μM TBBPA (Ryc. 8, 9), również zapobiega wzrostom wskaźników stresu oksydacyjnego (Ryc. 10, 11). Jest to zgodne z hipotezą o podstawowej roli wzrostu [Ca²⁺]_i w wywoływaniu przez TBBPA stresu

oksydacyjnego w hodowlach CGC. W tych samych warunkach, podanie zmiataczy wolnych rodników GSH i BHA zapobiegało nagromadzeniu się ROS i spadkowi potencjału antyrodnikowego komórek. Natomiast po zastosowaniu 25 μM TBBPA, pomimo niemal całkowitego zahamowania wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ przez podanie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR, obserwuje się tylko częściowe odwrócenie wzrostu produkcji ROS i spadku poziomu GSH (Ryc. 10, 12). Także działanie zmiataczy wolnych rodników hamujące rozwój stresu oksydacyjnego wywołanego przez 25 μM TBBPA było ograniczone i niekompletne. Wyniki te sugerują, że po podaniu 25 μM TBBPA oprócz procesów zależnych od jonów Ca^{2+} , uruchamiany jest niezależny od wapnia mechanizm indukcji stresu oksydacyjnego. Możliwe jest, że część niezależnego od jonów Ca^{2+} wzrostu fluorescencji DCF wywołanej przez 25 μM TBBPA można przypisać bezpośrednim oddziaływaniom chemicznym TBBPA z komórkami, zapewne z błonami, gdyż stwierdzono, że TBBPA wykazuje właściwości podobne do wolnego rodnika (Szychowski i wsp., 2016).

Wiadomo, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w komórkach może prowadzić do nagromadzenia się jonów Ca^{2+} w mitochondriach, prowadząc do przeładowania mitochondriów wapniem, co z kolei może skutkować obniżeniem $\Delta\Psi_m$, aktywacją MPTP i zwiększeniem produkcji ROS w mitochondriach (Adam-Vizi i wsp., 2010; Gleichmann i Mattson, 2011). Ponadto wysokie stężenia TBBPA mogą rozsprzęgać oksydacyjną fosforylację w mitochondriach i indukować peroksydację lipidów, jak zasugerowano w odniesieniu do hepatocytów (Nakagawa i wsp., 2007). Wyniki tej rozprawy pokazują, że TBBPA depolaryzuje mitochondria w sposób zależny od stężenia (Ryc. 14), i że przy 10 μM stężeniu TBBPA depolaryzacja ta może być zahamowana przez podanie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR, których zastosowanie również zapobiega wzrostowi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wywołanemu przez TBBPA. Wyniki te wskazują więc, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest czynnikiem odpowiedzialnym za depolaryzację mitochondriów w CGC. Współistnienie wywołanych przez TBBPA wzrostów $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i produkcji ROS, wraz z depolaryzacją mitochondriów i uwalnianiem cytochromu c, wykazano już przy użyciu ludzkiej linii neuroblastoma - SH-SY5Y (Al-Mousa i Michelangeli, 2012). Jednakże, według naszej wiedzy, badanie przedstawione w niniejszej pracy jest pierwszym, które pokazuje bezpośredni związek przyczynowy między wzrostem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a depolaryzacją mitochondriów w neuronach eksponowanych na niskie stężeniami TBBPA. Ponadto nasze wyniki pokazują, że spadek $\Delta\Psi_m$ wywołany przez 25 μM TBBPA może być tylko częściowo hamowany przez antagonistów NMDAR i RyR, co sugeruje dodatkowy udział mechanizmów niezwiązanych z jonami Ca^{2+} . Zastosowanie 25 μM TBBPA

prawdopodobnie w sposób bezpośredni pogłębia depolaryzację błony mitochondrialnej (Al-Mousa i Michelangeli, 2012). Zobserwowano, że TBBPA w mikromolowym zakresie stężeń zmienia właściwości błon fosfolipidowych (Ogunbayo i Michelangeli, 2007), a Mariussen i Fonnum (2003) donoszą o depolaryzującym efekcie wywołanym przez TBBPA we frakcjach synaptosomalnych błon plazmatycznych. Badania opisane w niniejszej pracy wykazały, że zastosowanie zmiataczy wolnych rodników (GSH i BHA), które hamują poziom produkcji ROS w hodowli CGC eksponowanej na TBBPA, nie ma wpływu na wywołany przez TBBPA spadek $\Delta\Psi_m$ (Ryc. 14). Jest to spójne z wyjaśnieniem, że przeciążenie mitochondriów jonami Ca^{2+} , a nie stres oksydacyjny, powoduje spadek $\Delta\Psi_m$ w hodowlach CGC poddanych działaniu TBBPA. Również cyklosporyna A stosowana w stężeniu 5 μM uważanym za neuroprotektynę (Ryc. 14) nie miała wpływu na indukowaną TBBPA depolaryzację mitochondrialną i tworzenie ROS (Ryc. 10), co nie wspiera twierdzenia o roli MPTP w wywołanych przez TBBPA zaburzeniach funkcji mitochondriów i indukcji stresu oksydacyjnego w hodowlach CGC. Jednak skuteczność cyklosporyny A jako inhibitora powstawania MPTP w mitochondriach neuronów była kwestionowana (Elrod i Molkenin, 2013; Brustovetsky i Dubinsky, 2000). Z drugiej jednak strony, wcześniejsze wyniki naszej pracowni pokazały, że 0,5 μM cyklosporyna A obniża obrzęk mitochondriów oraz wykazuje działanie neuroprotektynę w hodowlach CGC eksponowanych na glutaminian (Ziemińska i wsp., 2006). Wydaje się więc, że sprawa powstawania i roli MPTP w wywołanej przez TBBPA produkcji ROS w hodowlach CGC, pozostaje niejasna i wymaga dalszych badań.

5.2.2. Mechanizmy aktywacji receptorów NMDA a ekscytotoksyczność TBBPA

Omówione powyżej wyniki pokazały, że w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA aktywacja NMDAR jest czynnikiem współodpowiedzialnym za wzrost $[Ca^{2+}]_i$ a co za tym idzie za indukcję stresu oksydacyjnego oraz deenergizację mitochondriów. W chwili podejmowania przeze mnie badań mechanizm aktywacji NMDAR w tych warunkach nie był znany i pozostawał w sferze hipotez.

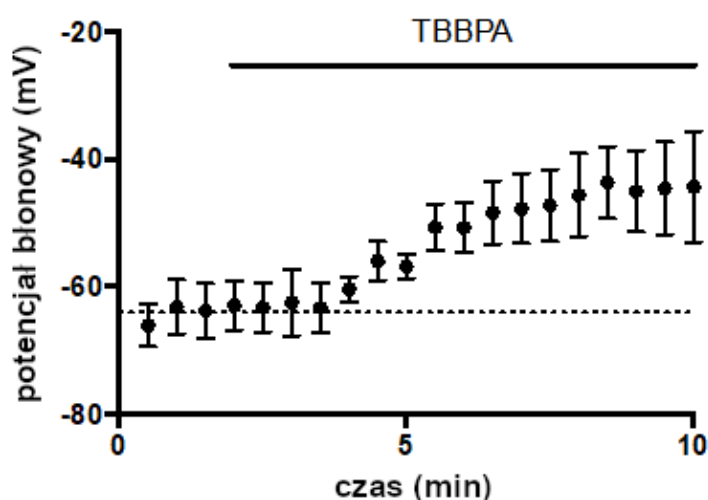
W tej rozprawie sprawdzana była hipoteza sugerująca, że NMDAR w neuronach mogą być aktywowane przez TBBPA w sposób bezpośredni. Wiadomo, że TBBPA wpływa na aktywność wielu receptorów i innych białek błonowych (Ogunbayo i Michelangeli, 2007; Ogunbayo i wsp., 2008; Hendriks i wsp., 2012). W szczególności, TBBPA ma wysokie powinowactwo do hydrofobowych przedziałów błonowych (Ogunbayo i wsp., 2007) i w ten

sposób może modyfikować biologiczne właściwości błon na różne sposoby, w tym oddziałując allosterycznie. Jednak wyniki przedstawionych badań z użyciem radioligandów receptora NMDA wykazały, że TBBPA nie ingeruje w wiązanie żadnego z badanych ligandów NMDAR do izolowanych frakcji błon kory mózgu szczurów, w tym [³H]MK-801 (Ryc. 15 i 16). Uważamy, że te negatywne wyniki są wiarygodne i wskazują na brak bezpośredniego oddziaływania TBBPA z receptorami NMDA. Twierdzenie to opieramy na kilku przesłankach. Po pierwsze jednorodność i czystość tej frakcji błonowej jest przypuszczalnie wysoka. Ponadto eksperymenty kontrolne wykazują, że wiązanie [³H]MK-801 z tymi błonami ulegało przewidywalnej modulacji przez agonistów i antagonistów NMDAR, co bezpośrednio potwierdza natywność błon i receptorów (Ryc. 15A).

Kwas DL-2-amino-5-fosfopentanowy (AP5), który jest kompetycyjnym antagonistą glutaminianu w miejscu wiązania agonisty do receptora NMDA, był wykorzystany w doświadczeniach prezentowanych w głównej części pracy (Ryc. 16), jako kontrola pozytywna w badaniach wpływu TBBPA na aktywność NMDAR. Ponieważ w tym zakresie stężeń nie osiągnięto maksymalnego zahamowania, trudno było określić wartość IC₅₀. Z wykresu uzupełniającego wpływ AP5 na wiązanie [³H]kwasu glutaminowego do frakcji błon (Ryc. 17) wynika jednak, że zahamowanie wiązania jest niepełne. Jednak efekt ten jest zgodny z danymi wykazującymi, że tylko ligandy pobudzających receptorów aminokwasowych o szerokim spektrum, takie jak L- i D-glutaminian lub cis-2,3-PDA, powodują całkowite zahamowanie wiązania specyficznego [³H]kwasu glutaminowego do frakcji izolowanych błon komórkowych, podczas gdy stosowanie selektywnych ligandów NMDAR (zarówno agonistów jak i antagonistów), prowadzi do maksymalnego zahamowania rzędu 65-90% (Grimwood i wsp., 1991; Fukunaga i wsp., 1991). Dane z literatury dotyczące procentu zahamowania swoistego wiązania [³H]kwasu glutaminowego przez 100 μM AP5 są różne; Grimwood i wsp. (1991) przy użyciu D-AP5 i frakcji zagęszczeń postsynaptycznych izolowanej z mózgu szczura otrzymali 75% zahamowanie, podczas gdy Fukunaga i wsp. (1991) wykazali 50% zahamowanie dla D,L-AP5 i frakcji błon komórkowych izolowanych z ludzkiej kory mózgu. Jest to zgodne z interpretacją, że specyficzne wiązanie [³H]kwasu glutaminowego reprezentuje poziom wiązania agonistów ze wszystkimi klasami receptorów glutaminianergicznych, podczas gdy udział receptorów NMDA może się różnić w różnych preparatach błon mózgowych. Wyniki badań z użyciem radioligandów NMDAR okazały się też spójne z danymi pochodzącymi z pomiarów elektrofizjologicznych (Grimwood i wsp., 1991).

Za szczególnie istotny uważam wynik pokazujący, że TBBPA nie miał żadnego wpływu na wiązanie [³H]MK-801 (Ryc. 15B). Ten negatywny wynik odzwierciedla brak zmian w aktywności kanału NMDA i pośrednio wskazuje na brak jakichkolwiek potencjalnych interakcji z tym receptorem, w tym efektów allosterycznych. Również wyniki wskazujące, że TBBPA nie wpływa na specyficzne wiązanie agonistów NMDAR [³H]kwasu glutaminowego i [³H]glicyny (Ryc. 16) sugerują brak bezpośredniego oddziaływania TBBPA z ortosterycznymi miejscami wiązania. Ogółem, wyniki przeprowadzonych badań wiązania radioligandów do frakcji błon nie potwierdzają hipotezy o bezpośredniej aktywacji lub modulacji receptorów NMDAR przez TBBPA.

Ze względu na brak dowodów przemawiających za hipotezą o bezpośrednim oddziaływaniu TBBPA na NMDAR, rozważono alternatywną hipotezę o mechanizmie pośrednim działania TBBPA na NMDAR polegającym na depolaryzacji błony, co by zwiększało prawdopodobieństwo aktywacji kanału NMDAR.



Rycina 32. Zmiany potencjału błony komórkowej mierzonego w komórkach ziarnistych po podaniu 25 μ M TBBPA. Kropkowana linia wskazuje średni potencjał kontrolny błony. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM; $p < 0,05$. (Diamandakis i wsp., 2019)

Rejestrowanie prądu błonowego w całych komórkach ziarnistych *in situ*, prowadzone na skrawkach mózdzku szczura wykazało, że podanie TBBPA depolaryzuje neurony (Ryc. 32), przy czym depolaryzacja rozwija się względnie powoli. Ten sam efekt wykazano również przez pomiar wzrostu fluorescencji oksonolu VI (Ryc. 20, 22, 24). Istnieje wiele powodów, dla których depolaryzację rejestrowaną metodą optyczną można uznać za efekt biologiczny. Indukowana przez TBBPA zwiększona fluorescencja oksonolu VI odpowiadała danym uzyskanym w eksperymentach elektrofizjologicznych, ponadto była ona zależna od stężenia TBBPA (Ryc. 20), a zakres efektu wywołanego przez 25 μ M

TBBPA był porównywalny z depolaryzacją indukowaną przez referencyjne substancje depolaryzujące tj. KCl i glutaminian (Ryc. 18, 19). Co ważne, zwiększona fluorescencja oksonolu VI w hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA była modulowana w przewidywalny sposób przez środki farmakologiczne (Ryc. 22).

Wywołany przez TBBPA wzrost fluorescencji oksonolu VI był poprzedzony przejściowym obniżeniem fluorescencji (Ryc. 20, 22, 24). Analizując naturę tego zjawiska, należy zdecydować, czy można je uznać za odzwierciedlenie hiperpolaryzacji. To zjawisko wydaje się przypominać od dawna znaną hiperpolaryzację neuronów korowych, obserwowaną w początkowej fazie zmian potencjału błonowego neuronów indukowanych przez anoksję, poprzedzającą depolaryzację, a wywołaną aktywacją kanałów potasowych i przepływem jonów K^+ z neuronów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Hansen i wsp., 1982; Erdemli i wsp., 1998; Müller i Somjen, 2000). Zostały więc rozważone potencjalne mechanizmy, które mogłyby pośredniczyć w hipotetycznym efekcie hiperpolaryzacyjnym wywołanym przez TBBPA. Wiadomo, że TBBPA indukuje uwalnianie Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego, co powoduje wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w hodowlach CGC (Zieminska i wsp., 2014). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ może aktywować hiperpolaryzujące kanały BKCa, których ekspresję w komórkach hodowli CGC dawno wykazano (Olesen i wsp., 1994). Z drugiej strony, istnieją również informacje, że TBBPA może działać jako agonista receptora $GABA_A$ (Hendriks i wsp., 2012), lecz doniesienia dotyczące obecności funkcjonalnych receptorów $GABA_A$ w pierwotnych hodowlach CGC są sprzeczne. Wczesne badania wykazały, że ekspresja hamujących receptorów $GABA_A$ o niskim powinowactwie wymaga obecności agonisty tego receptora w pożywce hodowlanej dla CGC (Schousboe i wsp., 1985), co nie było stosowane w moich badaniach. Z kolei w innych badaniach zaobserwowano funkcjonalne receptory $GABA_A$ na komórkach hodowli CGC (Kardos i Maderspach, 1987; Babot i wsp., 2005). Wyniki mojej pracy (Ryc. 21) pokazały jednak brak wpływu antagonistów BKCa i receptorów $GABA_A$ na wywołany przez TBBPA początkowy spadek fluorescencji oksonolu VI, co nie wsparło tych hipotetycznych interpretacji. Ponadto efekt hiperpolaryzacji nie był obserwowany po podaniu KCl lub glutaminianu (Ryc. 18, 19) oraz nie był zależny od stężenia TBBPA (Ryc. 20), a eksperymenty elektrofizjologiczne przeprowadzone na skrawkach mózdzku szczura nie wykazały początkowej hiperpolaryzacji komórek ziarnistych po podaniu TBBPA (Ryc. 32). Wydaje się więc, że tego spadku nie można przypisać hiperpolaryzacji, lecz jest to artefakt. Wiadomo, że TBBPA jest substancją lipofilową i ma wysokie powinowactwo do błon komórkowych (Ogunbayo i wsp., 2007) co

w konsekwencji, zaraz po zastosowaniu TBBPA, może prowadzić do krótkotrwałych zmian właściwości hydrofobowych domen błony plazmatycznej. Takie zmiany mogłyby powodować zmniejszenie wiązania oksonolu VI przez wewnętrzną błonę plazmatyczną, powodując zmniejszenie jego fluorescencji niezwiązane z hiperpolaryzacją.

Eksperymenty wykonane w tej pracy wykazały, że mechanizm wywołanej przez TBBPA depolaryzacji komórek hodowli CGC jest złożony. Aktywacja NMDAR odgrywa znaczącą rolę w tym procesie, o czym świadczy częściowe obniżenie depolaryzacji neuronów indukowanej przez TBBPA w obecności MK-801. Choć ten efekt przypomina hamowanie przez MK-801 depolaryzacji indukowanej glutaminianem (Ryc. 19), są istotne różnice między obydwoma zjawiskami. Przede wszystkim, antagonisty receptorów AMPA - CNQX, niemal kompletnie zahamował depolaryzację wywołaną przez glutaminian (Ryc. 19), natomiast podany indywidualnie nie hamował depolaryzacji wywołanej TBBPA (Ryc. 22). Silne, lecz niepełne zahamowanie wywołanej przez TBBPA depolaryzacji komórek CGC nastąpiło po podaniu kombinacji obu antagonistów jonotropowych receptorów glutaminianu, co wskazuje na znaczący udział w tym zjawisku mechanizmów zależnych od glutaminianu, oraz na istnienie innych dodatkowych mechanizmów.

W poszukiwaniu tych mechanizmów wykorzystałem TTX do zbadania udziału kanałów sodowych bramkowanych napięciem w wywołanej przez TBBPA depolaryzacji neuronów hodowli CGC. TTX był już poprzednio używany jako narzędzie farmakologiczne w celu zahamowania zależnego od potencjału czynnościowego uwalniania glutaminianu z zakończeń presynaptycznych w hodowlach CGC (Lysko i wsp., 1994; Varming i wsp., 1997). W naszych eksperymentach TTX podawany samodzielnie nie miał istotnego wpływu na depolaryzację CGC wywołaną przez TBBPA (Ryc. 22), natomiast była ona praktycznie całkowicie zahamowana po podaniu kombinacji CNQX i MK-801 z TTX. Te wyniki wskazują, że w mechanizmie indukowanej przez TBBPA depolaryzacji CGC biorą udział niezależne efekty depolaryzujące, w których pośredniczą jonotropowe receptory dla glutaminianu, a także kanały sodowe bramkowane napięciem - wrażliwe na hamowanie przez TTX.

Mechanizm aktywacji jonotropowych receptorów dla glutaminianu, biorącej udział w wywołanej przez TBBPA depolaryzacji neuronów w hodowlach pierwotnych CGC, będzie dyskutowany w dalszej części tej sekcji. Natomiast tu wymaga omówienia zjawisko aktywacji wrażliwych na hamowanie przez TTX kanałów sodowych bramkowanych napięciem. Nasuwa się tu pytanie, dlaczego TTX podany samodzielnie nie miał wpływu na

depolaryzację hodowli CGC eksponowanej na TBBPA. Wyniki przedstawione w tej rozprawie pokazały, że w pierwotnych hodowlach CGC zarówno depolaryzacja wywołana przez TBBPA, jak i glutaminian (Ryc. 19), w której pośredniczą głównie jonotropowe receptory glutaminianowe, znacznie przewyższa wszelkie inne potencjalne mechanizmy depolaryzacji. Dlatego też w obu przypadkach zastosowanie MK-801 w celu częściowego zahamowania jonotropowych receptorów dla glutaminianu jest niezbędne do ujawnienia udziału wrażliwych na TTX bramkowanych napięciem kanałów sodowych w procesie depolaryzacji.

Pierwotny mechanizm aktywacji wrażliwych na TTX kanałów sodowych bramkowanych napięciem w neuronach eksponowanych na TBBPA jest obecnie nieznany. Należy jednak zwrócić uwagę na interesującą analogię pomiędzy obserwowanym w tej pracy wpływem antagonistów jonotropowych receptorów dla glutaminianu oraz bramkowanych napięciem kanałów sodowych na depolaryzację neuronów indukowaną przez TBBPA i wynikami innych autorów badających depolaryzujący efekt anoksji. Müller i Somjen (2000) pokazali, że rozwój wywołanej przez anoksję depolaryzacji neuronów w skrawkach kory mózgu szczura zauważalnie opóźniało podanie kombinacji antagonistów NMDAR i AMPAR, jednak niemal całkowite zahamowanie wczesnej fazy depolaryzacji obserwowano po dołączeniu TTX do kombinacji tych antagonistów. To podobieństwo farmakologicznych właściwości depolaryzacji indukowanej przez TBBPA i anoksję może sugerować wspólny mechanizm, to jest zaburzenia energetyczne, prowadzące do niedoboru ATP. Hipotetyczne wyjaśnienie, że głównym miejscem aktywności neurotoksycznej TBBPA mogą być mitochondria - gdzie następuje depolaryzacja i deenergizacja, która prowadzi do niedoboru ATP i ostatecznie do depolaryzacji błony komórkowej neuronów, ma jednak słaby punkt. W tej rozprawie wykazano, że wywołana przez TBBPA depolaryzacja mitochondriów w pierwotnych hodowlach CGC jest późnym zjawiskiem w łańcuchu przyczynowo-skutkowym i jest wtórna w stosunku do przeładowania neuronów, a następnie mitochondriów jonami wapnia (Ryc. 14). Wracając do braku wpływu TTX podanego samodzielnie na depolaryzację CGC indukowaną przez TBBPA, jedną z przyczyn mogło być zahamowanie przez TBBPA napięciowo zależnych kanałów wapniowych (Hendriks i wsp., 2012), które pośredniczą w napływie wapnia do presynaptycznych zakończeń nerwowych odpowiedzialnych za uwalnianie glutaminianu zawartego w pęcherzykach synaptycznych (Wang i Sihra, 2004). Takie zahamowanie zapobiega zależnemu od potencjału czynnościowego i wrażliwego na TTX presynaptycznego

uwalnianiu glutaminianu. Z drugiej strony, nie ma powodu, aby przypuszczać, że uwalnianie glutaminianu spowodowane wywołaną przez TBBPA mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego może być wrażliwe na inhibicję przy użyciu TTX.

Należy także rozważyć możliwość bezpośredniego wpływu TBBPA na błony plazmatyczne skutkujące zwiększaniem ich przepuszczalności dla kationów i depolaryzację. Chociaż TBBPA ma wysokie powinowactwo do błon fosfolipidowych, pokazano jednak, że jego związanie ze sztucznymi błonami fosfolipidowymi nie tylko nie zwiększa, ale nawet zmniejsza ich przepuszczalność dla kationów (Ogunbayo i wsp., 2007). Oznacza to, że TBBPA nie posiada prostych właściwości jonoforu, które mogłyby wyjaśnić pierwotny proces depolaryzacji. Nie ma również danych w literaturze na temat możliwych bezpośrednich oddziaływań TBBPA z kanałami sodowymi. Kwestia ta wymaga dalszych badań.

Na zakończenie nasuwa się pytanie o rolę wykazanej tu depolaryzacji neuronów eksponowanych na TBBPA w cytotoksyczności tej substancji. W niniejszej pracy nie badano odwracalności depolaryzacji hodowli CGC wywołanej ekspozycją na TBBPA. Wiadomo, że długotrwała, nieodwracalna depolaryzacja jest ważnym elementem mechanizmu ekscytotoksyczności prowadzącej do dysfunkcji neuronów, ich uszkodzenia i śmierci (Coulter i wsp., 1992). Hydrofobowy TBBPA wykazuje silne powinowactwo do lipidów błonowych (Ogunbayo i in., 2007), co może prowadzić do ich trwałego związania z błonami i nieodwracalnych skutków cytotoksycznych. Z drugiej jednak strony, wyniki badań nad interakcją TBBPA z wyizolowaną frakcją ATP-azy SERCA zdają się wskazywać, że jego wiązanie z określonymi regionami białek enzymatycznych może być odwracalne (Ogunbayo i Michelangeli, 2007). Odwracalność efektów TBBPA może być ważnym celem dalszych badań mechanizmów neurotoksyczności TBBPA. Wyniki moich badań, uzyskane na pierwotnych hodowlach CGC, wskazują na depolaryzujące działanie TBBPA podawanego w stężeniach $\geq 7,5 \mu\text{M}$. Warto zauważyć, że TBBPA w podobnym zakresie stężeń ma toksyczny wpływ na pierwotne hodowle CGC, a w tym działaniu częściowo pośredniczą NMDAR (Ziemska i wsp., 2015, 2017). Depolaryzacja jest (oprócz związania glutaminianu z miejscem wiązania agonisty na NMDAR) niezależnym czynnikiem warunkującym aktywację kanału jonowego tego receptora (Seeburg i wsp., 1995). Dlatego hipotetyczna, niezależna od glutaminianu frakcja depolaryzacji indukowanej przez TBBPA, zachodząca za pośrednictwem wrażliwych na TTX kanałów sodowych, może dodatkowo potęgować neurotoksyczność, w której pośredniczą NMDAR. Brak jednak

dowodów na rolę tego zjawiska jako pierwotnego mechanizmu aktywacji NMDAR w CGC eksponowanych na TBBPA.

Przedstawione wyniki, które pokazują kluczową rolę jonotropowych receptorów dla glutaminianu, a zwłaszcza NMDAR, w wywołanym przez TBBPA mechanizmie depolaryzacji hodowli CGC, prowokują pytanie o udział endogennego glutaminianu w mechanizmie ich aktywacji. Hipotetyczna rola uwalniającego się endogennego glutaminianu w aktywacji jonotropowych receptorów glutaminianu w hodowlach CGC narażonych na TBBPA może być postulowana z wielu powodów. Wiadomo, że pierwotne hodowle CGC w 7 dniu hodowli nie tylko ekspresjonują funkcjonalne NMDAR oraz AMPAR ale też, że zachodzi w nich pobudzająca neurotransmisja i są ogólnie akceptowane jako model do badań tego zjawiska (Schousboe i wsp., 1985, 1992; Contestabile, 2002). Ponadto, Reistad i wsp. (2007) zademonstrowali stopniowy - ale powolny i trwający kilka godzin – wzrost stężenia glutaminianu w środowisku wzrostowym po podaniu TBBPA do pierwotnych hodowli CGC. Dla zweryfikowania hipotezy w myśl, której w aktywacji NMDAR, a co za tym idzie depolaryzacji neuronów eksponowanych na TBBPA, pośredniczy endogenny glutaminian, przeprowadzono eksperymenty wykorzystujące układ enzymatyczny rozkładający glutaminian tj. transaminazę glutaminianowo-pirogronianową (GPT) wraz z substratem – pirogronianem. Wskaźnikiem aktywacji NMDAR było tu pobieranie ^{45}Ca . Stosując podobny układ doświadczalny Matthews i wsp. (2003) wykazali, że endogenny glutaminian pośredniczy w neurotoksycznym wpływie PDC na komórki skrawków hipokampa (zależnie od podanego stężenia), który był hamowany w środowisku zawierającym rozkładający glutaminian układ enzymatyczny (GPT/pyr). Wyniki eksperymentów kontrolnych pokazują, że wywołany podaniem 100 μM glutaminianu do środowiska inkubacyjnego wzrost pobierania ^{45}Ca przez komórki hodowli CGC (Ryc. 25) był silnie hamowany przez podanie układu enzymatycznego rozkładającego glutaminian, w stopniu porównywalnym do działania antagonisty NMDA – MK-801. Potwierdza to udział NMDAR we wzroście pobierania ^{45}Ca w obecności nadmiaru glutaminianu oraz skuteczność metody jego eliminacji. Zaobserwowano również wzrost pobierania radioaktywnego wapnia po ekspozycji komórek hodowli CGC na TBBPA, który był zależny od stężenia. Jest to zgodne z poprzednimi wynikami naszej pracowni, które pokazały hamowanie tego efektu przez MK-801 (Ziemińska i wsp., 2015). Co najważniejsze, w hodowlach CGC zawierających wspomniany układ enzymatyczny rozkładający glutaminian obserwowano kompletne zahamowanie wzrostu pobierania ^{45}Ca indukowanego przez

TBBPA. Te wyniki wskazują, że TBBPA indukuje wzrost stężenia glutaminianu w środowisku zewnątrzkomórkowym, co prowadzi do aktywacji NMDAR i depolaryzacji. Ten efekt może być spowodowany uwalnianiem endogennego glutaminianu lub zahamowaniem jego pobierania zwrotnego. Niewykluczony jest również jednoczesny udział obydwu tych mechanizmów.

Po wykazaniu roli endogennego glutaminianu w aktywacji NMDAR w hodowlach pierwotnych CGC eksponowanych na TBBPA, co wynika ze wzrostu jego stężenia w środowisku zewnątrzkomórkowym, badałem mechanizm tego zjawiska. Zgodnie z sugestią Reistad i wsp. (2007), może ona być przypisane hamowaniu transporterów glutaminianu, co wykazano wcześniej w badaniach na synaptosomach mózgu szczura (Mariussen i Fonnum, 2003). Oprócz tej hipotezy, w mojej pracy był też badany udział mechanizmu presynaptycznego uwalniania glutaminianu aktywowanego przez TBBPA. Na pozór hipoteza przypisująca TBBPA pobudzenie uwalniania presynaptycznego glutaminianu, wydaje się mało prawdopodobna, ponieważ TBBPA w niskich stężeniach mikromolowych ma zdolność do hamowania kanałów wapniowych bramkowanych napięciem, pośredniczących w napływie Ca^{2+} do synaptoplazmy, co prowadzi do uwolnienia glutaminianu z pęcherzyków synaptycznych do przestrzeni synaptycznej (Hendriks i wsp., 2012). Z drugiej jednak strony wykazano, że TBBPA działa jako czynnik mobilizujący wapń wewnątrzkomórkowy (Ogunbayo i wsp., 2008), co zostało dobrze udokumentowane we wcześniejszych badaniach naszej pracowni przeprowadzonych na hodowlach CGC (Zieminska i wsp., 2014a, 2015, 2017). W innych modelach doświadczalnych wykazano, że mobilizacja Ca^{2+} z zasobów wewnątrz zakończeń synaptycznych może zwiększyć uwalnianie neuroprzebieżników (Nizami i wsp., 2010). Tak więc wywołana przez TBBPA mobilizacja wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} może być mechanizmem inicjującym uwalnianie glutaminianu z zakończeń presynaptycznych, prowadzące do aktywacji jego jonotropowych receptorów i depolaryzacji komórek. Przedstawione wyniki (Ryc. 24) pokazują, że depolaryzacja neuronów hodowli CGC przez TBBPA jest silnie hamowana przez podanie kombinacji bastadyny z rianodyną, co jak wiadomo, zapobiega wywołanej przez TBBPA mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (Zieminska i wsp., 2014). Efekt ten można interpretować jako odzwierciedlenie zahamowania łańcucha zdarzeń rozpoczynającego się od wywołanej przez TBBPA wewnątrzkomórkowej mobilizacji wapnia, która prowadzi do uwalniania glutaminianu z zakończeń presynaptycznych, co skutkuje aktywacją

postsynaptycznych jonotropowych receptorów glutaminianu, głównie odpowiedzialnych za depolaryzację komórek.

Testowana była także wspomniana powyżej hipoteza, sugerowana przez Reistad i wsp. (2007), o hamowaniu przez TBBPA zwrotnego pobierania glutaminianu. Badano wpływ 25 μM TBBPA na pobieranie znakowanego trytem kwasu glutaminowego przez frakcję synaptosomów izolowanych z przodomózgowia szczurów. Podanie TBBPA do frakcji synaptosomalnej powodowało zależne od stężenia obniżenie pobierania glutaminianu przez synaptosomy. Podobny efekt obserwowano po podaniu inhibitora transporterów glutaminianu – PDC. Istnieją dane z literatury ujawniające, że podanie 100 μM PDC do hodowli CGC skutkuje wzrostem stężenia glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zależnie od czasu ekspozycji hodowli na PDC (Cebers i wsp., 2008). Z kolei inna grupa autorów wykazała, że zahamowanie pobierania glutaminianu wywołuje neurodegenerację zwłaszcza, gdy osłabiony jest metabolizm energetyczny komórek (Del Rayo Sánchez-Carbente i Massieu, 1999). Należy przypomnieć, że efekt obniżenia potencjału mitochondrialnego, a więc deenergizacji mitochondriów i całej komórki, zaobserwowano po ekspozycji komórek hodowli CGC na TBBPA (Ryc. 14). Himi i wsp. (2003) wykazali, że zablokowanie pobierania glutaminianu przez 200 μM PDC w hodowlach komórek hipokampa szczurów wywiera wpływ neurotoksyczny na neurony, a mechanizm śmierci komórek obejmuje retencję zewnątrzkomórkowego glutaminianu i nadmierną aktywność receptora NMDA, a także znaczący spadek stężenia GSH oraz wzrost produkcji ROS. Wyniki eksperymentów Himi i wsp. (2003) z wykorzystaniem blokera transporterów EAAT, jakim jest PDC, wydają się więc analogiczne do wyników moich eksperymentów pokazujących, że TBBPA również obniża zawartość GSH i wywołują zwiększoną produkcję ROS. Te informacje przemawiają za tym, że w toksycznym działaniu TBBPA kluczową rolę odgrywa mechanizm ekscytotoksyczności. Można więc przypuszczać, że TBBPA powoduje wzrost stężenia glutaminianu w przestrzeni synaptycznej nie tylko przez indukcję jego uwalniania z zakończeń synaptycznych, ale też przez hamowanie transporterów glutaminianowych (EAAT).

Interesującym wynikiem, który zaobserwowaliśmy podczas badań do tej rozprawy było hamowanie wzrostu fluorescencji oxonolu VI indukowanego przez TBBPA po zastosowaniu 5 μM memantyny w hodowli CGC. Obserwacja tak silnego działania memantyny sugeruje, że hamuje ona pobudzone przez glutaminian pozasynaptyczne NMDAR. Możliwe, że odbywa się to na skutek przelewania się nadmiaru glutaminianu ze

szczeliny synaptycznej do przedziałów pozasynaptycznych. Sprzyjać może temu dodatkowo brak prawidłowego funkcjonowania pobierania zwrotnego glutaminianu przez komórki nerwowe.

Na podstawie wniosków z eksperymentów zaprezentowanych w niniejszej pracy oraz wyników pochodzących z prac innych autorów można sądzić, że głównymi mechanizmami aktywowanymi w obecności TBBPA są zahamowanie pobierania endogennego glutaminianu przy jednoczesnym wzroście jego uwalniania z zakończeń nerwowych, co może prowadzić do nagromadzenia glutaminianu w szczeliny synaptycznej. Te procesy wydają się być podstawą mechanizmu ekscytotoksyczności indukowanej przez TBBPA.

5.2.3. Ocena udziału procesów śmierci komórkowej w hodowli CGC eksponowanej na TBBPA

Zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi (Reistad i wsp., 2007; Wojtowicz i wsp., 2014; Hendriks i wsp., 2014; Ziemska i wsp., 2015) wykazano, że cytotoksyczność TBBPA jest zależna od stężenia i znacznie, lecz niekompletnie hamowana przez użycie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR (Ryc. 27) hamujących wzrost $[Ca^{2+}]_i$. Wyniki poprzednich badań naszej pracowni pokazały, że oprócz cytotoksyczności, w której pośredniczy wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w hodowli CGC traktowanej TBBPA, uruchamiane są również dodatkowe mechanizmy, prawdopodobnie związane ze stresem oksydacyjnym (Ziemska i wsp., 2015). Wyniki tej rozprawy przedstawione w podrozdziale 4.3 potwierdziły i uzupełniły te informacje oraz pokazują, że zmiatacze wolnych rodników tj. GSH i BHA mają silny potencjał neuroprotekcyny. Poprzednio, Reistad i wsp. (2007) wykazali, że również witamina E zapewnia częściową ochronę przed cytotoksycznością TBBPA w hodowlach CGC. Ponadto okazało się, że zmiatacze wolnych rodników stosowane razem z kombinacją antagonistów NMDAR i RyR zapewniają prawie całkowitą neuroprotekcję (Ryc. 27), co jest bardzo ważnym, nowym doniesieniem. Dane te wskazują, że mechanizmy zależne oraz niezależne od wapnia mogą wywołać stres oksydacyjny i że oba te szlaki są zaangażowane w cytotoksyczność TBBPA.

Rozpatrując mechanizmy wywołanej przez TBBPA śmierci komórek w hodowli CGC należy z jednej strony rozważyć wyniki dotyczące zmian przeżywalności komórek wraz z danymi z literatury, a z drugiej strony wyniki eksperymentów badających zmiany w ekspresji genów po ekspozycji na TBBPA. W przeprowadzonych eksperymentach

zastosowano także specyficzne, fluorescencyjne markery śmierci komórek, które stanowią istotne uzupełnienie wyników uzyskanych w badaniach udziału poszczególnych mechanizmów śmierci komórki w zaobserwowanej cytotoksyczności.

Aby dokładniej omówić wyniki badań zmian ekspresji „genów śmierci” komórek po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA, trzeba zwrócić uwagę na bardzo zróżnicowany wzorzec zmian w ekspresji genów zaangażowanych w trzy główne drogi śmierci komórek nerwowych po podaniu TBBPA. Sześć godzin po ekspozycji, ekspresja tylko dwóch genów, *Irgm* (autofagia) i *Tnfrs10b* (pro-apoptoza), uległa zmianie. *Tnfrs10b* (ang. *Tumor necrosis factor receptor superfamily 10b*) może nie tylko brać udział w przekazie sygnału apoptozy, ale także uczestniczyć w procesach zapalnych, proliferacji, przeżyciu i różnicowaniu komórki. Jak pokazano w tabeli 6, ekspresja 10 genów uległa obniżeniu - większość z nich, w tym *App*, *Atg3*, *Mapk8*, *Pten* i *Snca* uczestniczy w procesie autofagii, jeden (*Commd4*) uczestniczy w procesie nekrozy, jeden (*Abl1*) w procesie apoptozy (pro-apoptotyczny), dwa (*Atp6v1g2* i *Tnf*) są zaangażowane w autofagię, apoptozę i nekrozę, i tylko jednemu (*Xiap*) przypisuje się efekt anty-apoptotyczny. Enzym podobny do ubikwityny - *Atg3*, oprócz udziału w autofagii, odgrywa również rolę w homeostazie mitochondrialnej (Liu i wsp., 2016), a *Mapk8* (aktywowana mitogenem kinaza białkowa 8) wykazuje jeszcze szersze spektrum aktywności. *Mapk8*, podobna jest do innych białek tej rodziny, działa jako punkt integracji wielu sygnałów biochemicznych i jest zaangażowana w różnorodne procesy komórkowe, takie jak proliferacja, różnicowanie, migracja, transformacja i śmierć komórek (Chen i wsp., 2014).

Podobną heterogenność i złożoność można zaobserwować analizując listę genów ze zmianami ekspresji 24 godziny po ekspozycji na TBBPA. Spośród wszystkich tych genów tylko *Casp6* koduje białko zaangażowane wyłącznie w kaskadę aktywacji kaspaz odpowiedzialnych za rozpoczęcie procesu apoptozy. Inne białka mają szerokie spektrum aktywności. Fas nie tylko uczestniczy w tworzeniu kompleksu sygnałowego wywołującego śmierć komórki (DISC) i w aktywacji proteolitycznej kaspazy 8, ale także uczestniczy w przekazie sygnału generowanego przez czynnik nekrozy nowotworów. Chociaż dokładna funkcja huntingtyny (*Htt*) nie jest znana, wydaje się ona odgrywać ważną rolę w procesie autofagii i apoptozy (Rigamonti i wsp., 2000). Białko to reguluje ekspresję BDNF (Czynnika Neurotroficznego Pochodzenia Mózgowego – ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*) i jest związane z pęcherzykami i mikrotubulami. Prawdopodobnie odgrywa ono

również rolę w zakotwiczeniu cytoszkieletu i transporcie mitochondriów (Velier i wsp., 1998). Oprócz regulacji procesu autofagii, Irgm (ang. *Immunity-related GTPase family M protein*) może regulować produkcję prozapalnych cytokin i odgrywać rolę w adhezji i motoryce makrofagów (Ge i wsp., 2014). Wydaje się, że w proapoptotycznym działaniu Tp53 (komórkowego antygenu nowotworowego p53) pośredniczy albo w pobudzeniu ekspresji BAX i antygenu FAS, albo w obniżeniu ekspresji Bcl-2. Tp53 działa również jako czynnik hamujący rozwój nowotworów w wielu typach nowotworów i jest zaangażowany w regulację cyklu komórkowego jako *trans*-aktywator, który negatywnie reguluje podział komórek poprzez kontrolowanie zestawu genów wymaganych w tym procesie. Jednym z genów aktywowanych przez gen *Tp53* jest inhibitor kinaz zależnych od cykliny (Shaw, 1996). Wielofunkcyjny Birc3 (ang. *baculoviral IAP repeat-containing protein 3*) nie tylko reguluje kaspazę i proces apoptozy, ale także moduluje sygnalizację stanu zapalnego i odporność, sygnalizację kinaz aktywowanych mitogenami i proliferację komórek, a także inwazyjność i przerzuty komórek nowotworowych (Saleem i wsp., 2013).

Aby lepiej zrozumieć funkcje molekularne i procesy biologiczne genów regulowanych po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA, przeprowadzono analizę sieci interakcji STRING (ang. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, <http://string-db.org>). Jest to baza danych znanych i przewidywanych interakcji białkowych, w tym bezpośrednich (fizycznych) i pośrednich (funkcjonalnych) skojarzeń. Analiza wykazała obecność interakcji nie tylko między Bir3 i Casp6, które zostały szczegółowo opisane (Wang i wsp., 2012), ale także między białkami Htt i Tp53 (Basu i wsp., 2013). Wydaje się, że złożony wzorzec zmian w ekspresji genów zaangażowanych w omawiane trzy główne ścieżki zaprogramowanej śmierci komórkowej może częściowo wynikać ze znanego zjawiska wzajemnego oddziaływania tych ścieżek sygnałowych (Nikoletopoulou i wsp., 2013) oraz z różnorodności miejsc oddziaływania TBBPA z neuroprzekaznikami w neuronach, prowadzącego do indukcji wielu różnych ścieżek sygnałowych (Hendriks i wsp., 2012).

W świetle wyników przedstawionych na rycinach 28 i 29 oraz informacji z literatury, rola sporadycznej nekrotycznej śmierci w mechanizmie uszkodzenia i śmierci neuronów po podaniu TBBPA wydaje się niezaprzeczalna. Obserwowaliśmy rosnącą liczbę komórek hodowli CGC fluoryzujących na kolor czerwony przez homodimer-1 etydydy (Ryc. 29, prawy panel), co wskazuje na utratę integralności błony komórkowej, a także zmniejszoną

liczbę żywych komórek zabarwionych fluorescencyjnie na zielono przez kalceinę (Ryc. 29, lewy panel). Wyniki te są zgodne z doniesieniami mówiącymi o uwalnianiu dehydrogenazy mleczanowej do podłoża hodowlanego z neuronów hipokampa i kory mózgu eksponowanych na TBBPA, co wskazuje na utratę integralności błony komórkowej, prowadzącą do uwolnienia prozapalnych treści komórkowych (Wojtowicz i wsp., 2014; Szychowski i Wójtowicz, 2016). TBBPA wywołuje w neuronach przeładowanie wapniem, zwiększa produkcję ROS oraz powoduje deenergizację mitochondriów w hodowlach CGC (Ryc. 8-11, 14). Są to zjawiska związane z nekrotyczną śmiercią komórek (Duprez i wsp., 2009). Prawdopodobieństwo wystąpienia nekrozy w komórce wzrasta przy niskim poziomie ATP (Eguchi i wsp., 1997). W literaturze nie znalazłem danych na temat wpływu TBBPA na zawartość ATP w neuronach, a dostępne informacje dotyczą jedynie obwodowych komórek NK (z ang. *natural killers*) i izolowanych hepatocytów szczurów, które wskazują na zmniejszenie zawartości ATP w komórkach eksponowanych na TBBPA (Nakagawa i wsp., 2007; Kibakaya i wsp., 2009). Sądzę, że wywołana przez TBBPA deenergizacja dotyczy także hodowli CGC. Natomiast brak danych mogących świadczyć, że zjawisko wtórnej nekrozy wynikające z rozpadu ciał apoptotycznych, które bywa obserwowane w hodowlach *in vitro* (Ando i wsp., 2001), ma istotny wpływ na ocenę roli nekrozy w wywołanej przez TBBPA śmierci hodowli CGC.

Kwestią odrębną od udziału sporadycznej nekrozy w neurotoksyczności wywołanej przez TBBPA jest udział programowanej nekrozy. Proces ten jest niezależnym od kaspazy programowanym szlakiem śmierci komórki (Nikoletopoulou i w., 2013). To zagadnienie zostało rozważone, ponieważ początkowo kwestionowano rolę kaspaz w wywołanej przez TBBPA śmierci neuronów (Reistad i wsp., 2007). Jednak wyniki przedstawione w tej rozprawie pokazały jedynie obniżenie ekspresji dwóch nekrotycznych genów w czasie 6 godz. po ekspozycji hodowli na TBBPA, a przede wszystkim brak zmian w ekspresji innych genów związanych z zaprogramowaną nekrozą (Tabela 7). Pozwala to na stwierdzenie, że TBBPA nie aktywuje regulowanej, zaprogramowanej nekrozy neuronalnej. Ponadto badania innych grup pokazują aktywację kaspaz w neuronach eksponowanych na TBBPA (Ogunbayo i wsp., 2008; Al-Mousa i Michelangeli, 2012; Szychowski i Wójtowicz, 2016), co jest zgodne z opisaną w niniejszej rozprawie obserwacją wzrostu ekspresji genu *Casp6* 24 godz. po ekspozycji hodowli na TBBPA (Tabela 7).

Wyniki przedstawione na Ryc. 28 i 29 pokazują również, że hodowle CGC po ekspozycji na TBBPA, jednocześnie przedstawiają obraz wskazujący na rozwijanie się nekrozy (barwienie CA/ET), a także obraz charakterystyczny dla komórek apoptotycznych (barwienie PI) tj. spadek odsetka komórek o normalnej morfologii jądra i zwiększona liczba neuronów wykazujących zmiany w chromatynie jądrowej. Już w dawniej prowadzonych badaniach udział apoptozy w mechanizmach śmierci neuronów indukowanej przez TBBPA wykazano w pierwotnych hodowlach CGC na podstawie fragmentacji DNA, kondensacji chromatyny i charakterystycznego kurczenia komórek nerwowych (Reistad i wsp., 2007). Późniejsze badania z użyciem linii komórek SH-SY5Y inkubowanych z TBBPA wykazały aktywację kaspazy 3/7 i działanie cytoprotekcyjne inhibitora kaspazy (Al-Mousa i Michelangeli, 2012). Szychowski i Wójtowicz (2016) oraz Wojtowicz i wsp. (2014) z wykorzystaniem hodowli pierwotnych neuronów kory mózgowej i hipokampa wykazali, że oprócz indukowanego przez TBBPA uwalniania dehydrogenazy mleczanowej z komórek, następuje również aktywacja kaspazy 3 i powstawanie ciałek apoptotycznych, co sugeruje pojawienie się mieszanego mechanizmu nekrotyczno-apoptotycznego w neurotoksyczności wywołanej TBBPA. Al-Mousa i Michelangeli (2012) wiązali indukcję apoptozy przez TBBPA z zaburzoną homeostazą wapnia, depolaryzacją mitochondriów i uwalnianiem cytochromu c, sugerując aktywację wewnętrznego (mitochondrialnego) szlaku apoptozy. Część wyników tej rozprawy jest zgodna z tą interpretacją. Wykazana już poprzednio rola NMDAR w cytotoksyczności TBBPA w hodowlach pierwotnych CGC (Reistad i wsp. 2007; Ziemska i wsp., 2015) wskazuje na udział w tym zjawisku mechanizmów ekscytotoksyczności, o których wiadomo, że prowadzą do śmierci komórek o charakterze mieszanym, nekrotyczno-apoptotycznym. Nasze badania pokazały (tabela 7), że 3 godziny po ekspozycji hodowli CGC na działanie TBBPA ekspresja genów proapoptotycznych pozostała niezmienną. Natomiast 6 godzin po podaniu TBBPA wykryto spadek ekspresji antyapoptotycznego genu *Xiap* i wzrost ekspresji proapoptotycznego *Tnfrsf10b*, a po 24 godzinach nastąpiły kolejne zmiany - nadekspresja proapoptotycznych genów *Casp6*, *Fas* i *Tp53* (Tabela 2). Pomimo faktu, że tym ostatnim zmianom towarzyszyła nadekspresja antyapoptotycznego genu *Birc3*, te wyniki łącznie dostarczają nowych danych, które wskazują, że zmieniona ekspresja genów anty- i proapoptotycznych z przewagą tych ostatnich, może odgrywać rolę w mechanizmie neurotoksyczności indukowanej TBBPA.

Autofagia to szlak kataboliczny służący do degradacji i recyklingu białek i organelli komórkowych, dlatego zasadniczo odgrywa ona rolę sprzyjającą przetrwaniu komórek.

Jednakże uważa się, że w ciężkich warunkach, podczas urazu komórek nerwowych, autofagia może być albo fenomenem towarzyszącym śmierci komórki, albo może nawet przyczyniać się do mechanizmów cytotoksyczności (Duprez i wsp., 2009). Z drugiej strony, upośledzone działanie procesu autofagii może uczestniczyć w neurodegeneracji (Yin i in., 2017). Zgodnie z moją wiedzą, w literaturze nie ma informacji na temat wpływu TBBPA na proces autofagii w komórkach nerwowych. Jak wykazano w niniejszym badaniu, po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA, stosunek liczby genów związanych z autofagią o obniżonej ekspresji do liczby genów z podwyższoną ekspresją po 3 godzinach wynosił 1:0, po 6 godzinach 6:1 a dopiero po 24 godzinach stosunek ten osiągnął wartość 2:2 (Tabela 7). Wyniki te odzwierciedlają zaburzenie regulacji ekspresji genów zaangażowanych w autofagię z przewagą obniżenia ekspresji genów 3 i 6 godzinach po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA. Istnieją doniesienia, że zaburzony proces autofagii jest szkodliwy dla neuronów w hodowli w różnych warunkach patologicznych, w tym *in vivo* w mózgu po urazie i udarze niedokrwiennym (Yin i wsp., 2017). Należy jednak zauważyć, że w wyniku ekspozycji na TBBPA w CGC zmieniła się ekspresja tylko niewielkiej części genów związanych z autofagią, podczas gdy całkowita liczba tych genów badanych w matrycy RT2 Profiler PCR wynosiła 23. Dlatego też konieczne były dalsze badania w celu ustalenia, czy początkowe zahamowanie ekspresji niektórych genów zaangażowanych w autofagię w hodowlach CGC inkubowanych z TBBPA znajduje odbicie w dynamice tego procesu i czy można uznać je za mechanizm ochronny, czy też jest to raczej uczestnictwo w procesach neurodegeneracji (Fink i Cookson, 2005; Yin i wsp., 2017).

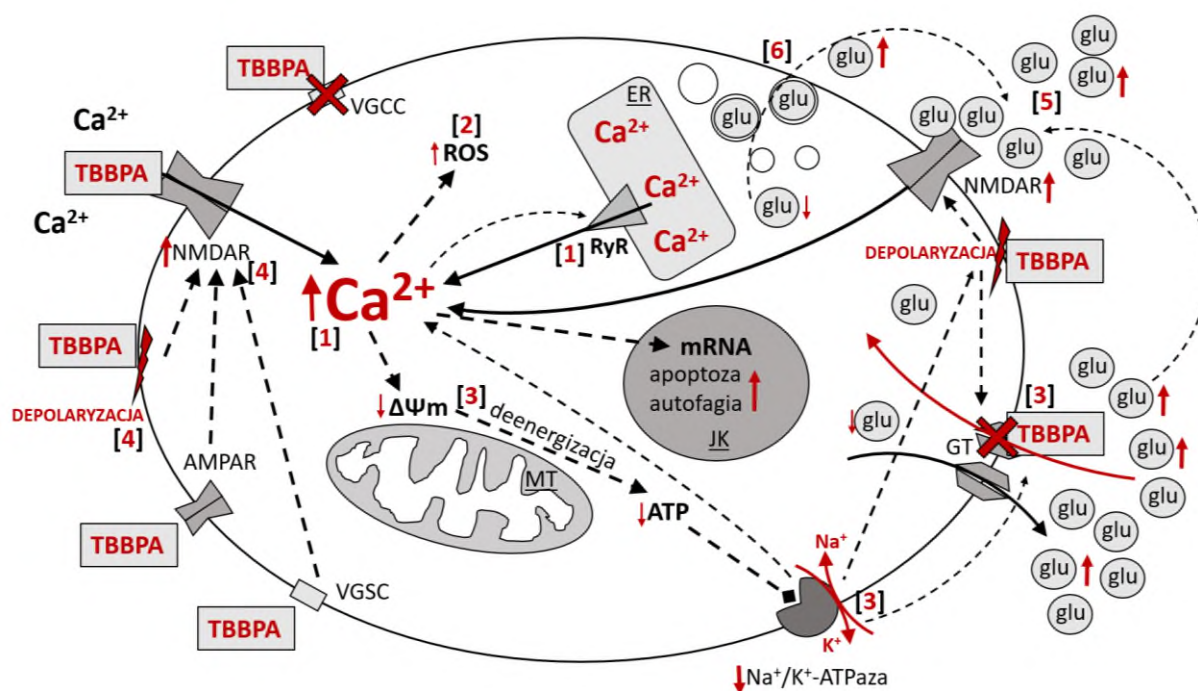
Do uzupełnienia wyżej omówionych wyników otrzymanych metodą RT-qPCR, i powiązania ich z rzeczywistą dynamiką badanych mechanizmów śmierci neuronów przeprowadzono eksperymenty z użyciem komercyjnie dostępnych zestawów do fluorescencyjnego oznaczania apoptozy/nekrozy oraz autofagii. Hodowle CGC, które poddano ekspozycji na TBBPA były również badane po 3, 6 i 24 godzinach, w celu łatwiejszego porównania z wynikami przedstawiającymi zmiany ekspresji genów. Użyte markery szlaków śmierci komórkowej tj. aneksyna V, monodansylkadaweryna oraz jodek propidyny z powodzeniem stosuje się do oznaczania, odpowiednio, apoptozy (również wczesnych etapów tego procesu), autofagii (wakuole autofagosomalne) oraz nekrozy nieprogramowanej (przerwanie integralności błony komórkowej). Porównując dane uzyskane w eksperymentach z użyciem metody RT-qPCR z danymi otrzymanymi w analizie

fluorescencji markerów szlaków śmierci komórkowej w hodowlach CGC pod mikroskopem konfokalnym, można zauważyć zbieżność wyników. Po 3 i 6 godzinach od ekspozycji hodowli CGC na TBBPA zaobserwowano nieznaczny udział apoptozy oraz autofagii w śmierci komórek hodowli, co zgodne jest z danymi otrzymanymi metodą RT-qPCR, które sumarycznie wykazują obniżoną ekspresję genów odpowiedzialnych za te procesy śmierci komórkowej. Natomiast 24 godziny po ekspozycji komórek hodowli na TBBPA widać wyraźny wzrost udziału zarówno procesów apoptozy jak i autofagii, co również jest zgodne z zaobserwowanymi wynikami badania zmian ekspresji genów komórek hodowli CGC eksponowanych na TBBPA. Jednak nadal większość (ok. 55%) martwych neuronów stanowią komórki, które utraciły integralność błon komórkowych. Omówione powyżej wyniki eksperymentów testujących zmiany ekspresji genów po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA wykazały brak istotnego udziału genów nekrozy programowanej w śmierci komórkowej (Tabela 7). Wydaje się więc, że zaobserwowana utrata integralności błon komórek w znacznym procencie populacji neuronów (50-70%) wskazuje na nekrozę nieregulowaną. Należy jednak pamiętać, że te badania służą jedynie do oszacowania udziału trzech omawianych procesów śmierci komórkowej w zaobserwowanym obniżeniu przeżywalności komórek hodowli CGC po ekspozycji TBBPA. Do dokładniejszego scharakteryzowania mechanizmu śmierci tych komórek potrzeba złożonych i ukierunkowanych badań.

6. Podsumowanie i wnioski

I. Badanie powiązań przyczynowo – skutkowych między wywołanym przez TBBPA wzrostem $[Ca^{2+}]_i$ a stresem oksydacyjnym i depolaryzacją mitochondriów.

Zaobserwowany wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w neuronach (Ryc. 33) indukowany przez TBBPA odgrywa rolę czynnika inicjującego inne mechanizmy działania cytotoksycznego: stres oksydacyjny oraz dysfunkcję mitochondriów.



Rycina 33. Hipotetyczne mechanizmy ekscytotoksycznego działania TBBPA. [1] Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ za pośrednictwem NMDAR i dysfunkcyjnych RyR. [2] Wzrost ROS, który przyczynia się do powstawania stresu oksydacyjnego. [3] Spadek potencjału błony mitochondrialnej, co skutkuje deenergizacją mitochondriów. Następuje spadek poziomu ATP i zaburzenia pracy pompy sodowo-potasowej, co prowadzi do odwrotnego transportu jonów oraz glutamianu przez transportery glutamianowe (GT). [4] Depolaryzacja błony komórkowej przez obecność TBBPA prowadząca do aktywacji NMDAR, udział receptorów AMPA i kanałów sodowych bramkowanych napięciem. [5] Aktywacja receptorów NMDA spowodowana wzrostem stężenia glutamianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz [6] uwolnienie glutamianu z puli pęcherzykowej zakończeń synaptycznych, przy jednoczesnym hamowaniu pobierania zwrotnego glutamianu przez obecność TBBPA. (ER – retikulum endoplazmatyczne, JK – jądro komórkowe, MT – mitochondria)

Wyniki pokazały zależny od stężenia TBBPA wzrost $[Ca^{2+}]_i$, zwiększenie produkcji ROS (Ryc. 33,[2]), obniżenie zawartości GSH i aktywności katalazy w komórkach oraz spadek $\Delta\Psi_m$ (Ryc. 33,[3]). Podanie kombinacji antagonistów NMDAR i RyR zapobiegało wywołanemu przez TBBPA wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$. Zastosowanie zmiataczy wolnych rodników skutecznie zapobiegało rozwojowi stresu oksydacyjnego. Podanie CsA, inhibitora MPTP nie modyfikowało indukowanego przez TBBPA spadku $\Delta\Psi_m$. Kombinacja antagonistów

NMDAR i RyR całkowicie zapobiegała zarówno wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ jak i zwiększonej produkcji ROS oraz obniżeniu $\Delta\Psi_m$ indukowanym przez 10 μM TBBPA. Niższa była skuteczność wpływu tych antagonistów na te parametry w komórkach eksponowanych na 25 μM TBBPA.

Podsumowując, testowana hipoteza robocza o roli indukowanego przez TBBPA wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ jako podstawowego pierwotnego mechanizmu, uruchamiającego dalsze elementy cytotoksycznego działania tej substancji na neurony została pozytywnie zweryfikowana. Przy wysokim (25 μM) stężeniu TBBPA może dołączać się dodatkowy mechanizm indukcji stresu oksydacyjnego, niezależny od wzrostu $[Ca^{2+}]_i$. Potwierdzono także współdziałanie NMDAR, obok dysfunkcyjnych RyR, w indukowanym przez TBBPA wzroście $[Ca^{2+}]_i$.

II. Mechanizmy aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA

Badania bezpośredniej interakcji TBBPA z NMDAR, uwzględniały możliwość allosterycznego działania na aktywność kanału i/lub wpływ na miejsca wiążące agonistów. W eksperymentach specyficznego wiązania znakowanych agonistów ($[^3H]$ glutaminianu, $[^3H]$ glicyny) i antagonisty ($[^3H]$ MK-801) NMDAR do frakcji błon izolowanych z kory mózgu szczura, nie zaobserwowano wpływu TBBPA na wiązanie żadnego z tych ligandów, co przemawia przeciw testowanej hipotezie.

Czynnikiem pośrednio sprzyjającym aktywacji NMDAR w neuronach eksponowanych na TBBPA i potęgującym jego aktywność może być pierwotna depolaryzacja neuronów. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem sondy wrażliwej na zmiany potencjału błonowego komórek w pierwotnych hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA, pokazały po raz pierwszy zależną od stężenia TBBPA depolaryzację neuronów. Dla identyfikacji kanałów jonowych, które mogły pośredniczyć w depolaryzacji zastosowano antagonistów jonotropowych receptorów dla glutaminianu: MK-801 dla zablokowania NMDAR, oraz CNQX w celu zahamowania aktywności AMPAR. Ponadto użyto TTX, inhibitora kanałów sodowych bramkowanych napięciem. Badania pokazały brak znamiennej statystycznie wpływu podania CNQX lub TTX, oraz umiarkowane hamowanie depolaryzacji indukowanej przez TBBPA w obecności MK-801. Te wyniki potwierdziły aktywację NMDAR. Dla osiągnięcia maksymalnej inhibicji, konieczne było jednoczesne zastosowanie wszystkich trzech antagonistów, co wskazuje na współdziałanie zarówno NMDAR, jak i AMPAR, oraz wrażliwych na TTX bramkowanych napięciem kanałów sodowych. Choć nie dostarczyły one bezpośrednich dowodów, że aktywacja przez TBBPA wrażliwych na TTX kanałów

sodowych, albo też AMPAR, może być mechanizmem pierwotnym, inicjującym depolaryzację, to pokazały nowy mechnizm sprzyjający aktywacji NMDAR. Natomiast współdziałł jonotropowych receptorów dla glutaminianu typu AMPA, obok NMDAR, w depolaryzacji CGC eksponowanych na TBBPA, wskazuje na rolę endogennego glutaminianu w mechanizmie obserwowanych zmian.

W hodowlach CGC eksponowanych na TBBPA endogenny glutaminian był eliminowany przez dodanie do środowiska inkubacyjnego transaminazy glutaminianowo - pirogronianowej i pirogronianu. Wyniki tego eksperymentu pokazały, że zależnemu od stężenia TBBPA zwiększeniu pobierania ^{45}Ca przez neurony zapobiega usunięcie endogennego glutaminianu ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Potwierdziło to po raz pierwszy w sposób bezpośredni kluczową rolę endogennego glutaminianu w aktywacji NMDARs (Ryc. 33,[5])

Natomiast wykorzystując frakcję synaptosomów izolowanych z kory mózgu szczura, przeprowadzono badanie wpływu TBBPA na pobieranie przez synaptosomy [^3H]glutaminianu, w porównaniu do efektu indukowanego przez inhibitora transporterów glutaminianu, 100 μM PDC. Eksperymenty wykazały hamowanie pobierania [^3H]glutaminianu, zależne od stężenia TBBPA (5 – 25 μM) lecz słabsze niż efekt 100 μM PDC. Te wyniki, potwierdziły słuszność hipotezy o roli endogennego glutaminianu w indukowanej przez TBBPA aktywacji NMDAR. Zaburzenia transportu i kompartmentacji glutaminianu mogą prowadzić do przelania się tego neuroprzekaźnika ze szczeliny synaptycznej i pobudzenia pozasynaptycznych NMDAR (Ryc. 33). Zbadano więc wpływ memantyny, preferencyjnego antagonisty receptorów NMDA zlokalizowanych pozasynaptycznie, na depolaryzację CGC eksponowanych na TBBPA. Badanie to pokazało silny efekt hamujący memantyny, co może wskazywać na znaczny udział pozasynaptycznych NMDAR w mechanizmie zaburzeń indukowanych przez TBBPA w hodowlach pierwotnych neuronów.

III. Mechanizmy śmierci komórkowej indukowanej przez ekspozycję hodowli neuronów na TBBPA

Wyniki badań przeżywalności hodowli CGC po 24 godzinach od 30-minutowej ekspozycji na TBBPA z wykorzystaniem barwnika PI, wykazały zależne od stężenia zmniejszenie liczby żywych neuronów, która po podaniu 10 i 25 μM TBBPA spadała do ok. 35%. Wyniki tych eksperymentów ujawniły również znaczącą, lecz nie pełną, cytoprotekcję po zastosowaniu kombinacji samych antagonistów NMDAR i RyR lub zmiataczy wolnych

rodników (wzrost przeżywalności do 70-75%). Natomiast zastosowanie kombinacji tych antagonistów ze zmiataczami wolnych rodników znacznie podwyższyło efekt cytoprotekcji do 82-90%. Przeprowadzono również eksperymenty, w których za pomocą dwóch metod barwienia (PI oraz CA/ET), zbadano dynamikę ubytku liczby żywych neuronów po ekspozycję hodowli CGC na 25 μ M TBBPA. Zaobserwowano, że 30-minutowa ekspozycja komórek hodowli CGC na 25 μ M TBBPA, spowodowała stopniowe, zależne od upływu czasu (po 1,5, 3, 6, 12, 24 godzinach) zmniejszenie przeżywalności neuronów. Wyniki nieznacznie różniły się w zależności od użytej metody barwienia, a procent żywych komórek hodowli analizowanych po 3, 6 i 24 godzinach po ekspozycji na TBBPA średnio wynosił odpowiednio ok. 70%, 58% i 35%. Biorąc pod uwagę wszystkie obserwacje można stwierdzić, że indukowany przez TBBPA wzrost $[Ca^{2+}]_i$ wraz ze stresem oksydacyjnym są kluczowymi czynnikami aktywującymi mechanizmy śmierci neuronów ekspozowane na TBBPA.

Ponieważ wpływ TBBPA na zmiany ekspresji genów śmierci komórkowej w hodowlach CGC nie był dotychczas badany, przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem techniki RT-qPCR, która umożliwiła oszacowanie dynamiki zmian ekspresji genów związanych z apoptozą, nekrozą oraz autofagią w hodowlach CGC po 3, 6 i 24 godzinach od 30-minutowej ekspozycji na 25 μ M TBBPA. Po 3 godzinach od ekspozycji hodowli CGC na TBBPA zaobserwowano jedynie obniżenie ekspresji tylko jednego genu, pro-apoptotycznego związanego również z autofagią. Bardziej wyraźne były zmiany obserwowane po 6 godzinach. Wówczas zmianom ekspresji uległo 12 z badanych genów; zaobserwowałem zwiększanie ekspresji 2 genów oraz obniżenie ekspresji 10 genów. Przedłużenie inkubacji komórek po ekspozycji na TBBPA do 24 godzin spowodowała nadekspresję pięciu genów, a dwa z badanych genów ulegały obniżeniu ekspresji. We wszystkich tych punktach czasowych zmiany ekspresji dotyczyły głównie genów autofagii a także apoptozy – jedynie dwa z badanych genów dotyczyły nekrozy i ulegały one obniżeniu ekspresji. Wydaje się, że złożony wzorzec zmian w ekspresji genów zaangażowanych w te trzy główne ścieżki zaprogramowanej śmierci komórkowej może wynikać nie tyle ze znanego zjawiska wzajemnego oddziaływania ścieżek sygnałowych, lecz również z różnorodności miejsc interakcji TBBPA z neuronami, prowadząc do aktywacji wielu różnych szlaków sygnałowych.

W celu uzupełnienia wyników otrzymanych metodą RT-qPCR przeprowadzono eksperymenty z użyciem komercyjnie dostępnych zestawów do oznaczania apoptozy/nekrozy

oraz autofagii. Hodowle CGC, które poddano ekspozycji na TBBPA badano po 3, 6 i 24 godzinach. W 3 i 6 godzinie po ekspozycji zaobserwowano zdecydowaną przewagę nekrozy i tylko nieznaczny udział apoptozy oraz autofagii w śmierci komórek hodowli, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi metodą RT-qPCR. Wyraźny wzrost udziału zarówno procesów apoptozy jak i autofagii zaobserwowano natomiast 24 godziny po ekspozycji hodowli CGC na TBBPA, co również jest zgodne z wynikami otrzymanymi techniką RT-qPCR. W badaniach zmian ekspresji genów nie zaobserwowano istotnego udziału genów nekrozy programowanej w śmierci komórkowej, podczas gdy w badaniach z użyciem markerów fluorescencyjnych wykazano, że największą część – ok. 52% – martwych neuronów stanowią komórki, które utraciły integralność błon komórkowych, co wskazuje, że śmierć neuronów zachodzi drogą nekrozy nieregulowanej.

WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE

- I.** Indukowany przez TBBPA wzrost $[Ca^{2+}]_i$ jest podstawowym pierwotnym mechanizmem uruchamiającym stres oksydacyjny i depolaryzację mitochondriów, będące dalszymi elementami cytotoksycznego działania tej substancji na neurony.
Pod wpływem 25 μ M TBBPA prawdopodobnie pojawia się dodatkowy mechanizm indukcji stresu oksydacyjnego, niezależny od wzrostu $[Ca^{2+}]_i$.
- II.** Aktywacja NMDAR w hodowlach pierwotnych CGC eksponowanych na TBBPA nie jest wynikiem bezpośredniej interakcji TBBPA z tymi receptorami, ani też wykazanej po raz pierwszy depolaryzacji neuronów, która wydaje się być wyłącznie efektem wtórnym.
Uzyskane wyniki wskazują, że w tych warunkach doświadczalnych do aktywacji NMDAR dochodzi w wyniku zalegania glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, w czym pośredniczy uwalnianie go z zakończeń presynaptycznych i zahamowanie pobierania zwrotnego.
- III.** Ostra ekspozycja hodowli pierwotnych CGC na TBBPA indukuje cytotoksyczność, w której pośredniczą zarówno niekontrolowany wzrost $[Ca^{2+}]_i$ jak i stres oksydacyjny. Związek przyczynowy między tymi mechanizmami zależy od stężenia TBBPA (patrz wniosek I).
Po ekspozycji CGC na TBBPA dochodzi do złożonych zmian ekspresji genów zaangażowanych w programowaną śmierć komórek: po początkowym obniżeniu

ekspresji genów związanych z apoptozą i autofagią, po 24 godz. następuje jej wzrost, natomiast nie stwierdzono zmian ekspresji genów programowanej nekrozy.

Obrazowi zmian w ekspresji genów odpowiada dynamika zmian w markerach nieprogramowanej nekrozy, apoptozy i autofagii. Początkowo przeważający udział w śmierci neuronów ma nieregulowana nekroza, po 24 godz. równie istotna staje się śmierć programowana, głównie z udziałem apoptozy, a w mniejszym stopniu autofagii.

WNIOSEK OGÓLNY

Wyniki badań przedstawione w tej rozprawie wskazują, że podstawowym mechanizmem ostrych zmian cytotoksycznych wywołanych przez ekspozycją hodowli pierwotnych CGC na TBBPA jest ekscytotoksyczność. Elementami tego złożonego i zapętlonego mechanizmu są nadmierne gromadzenie się glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, aktywacja receptorów jonotropowych dla glutaminianu, depolaryzacja komórek, wzrost $[Ca^{2+}]_i$, stres oksydacyjny i deenergizacja mitochondriów, oraz indukcja zarówno nekrozy jak i programowanej śmierci komórki.

7. Literatura

- Aam, B. B., Fonnum, F. (2006) (+/-)-2-Chloropropionic acid elevates reactive oxygen species formation in human neutrophil granulocytes. *Toxicology*, 228, 124-134.
- Abdallah, M. A. E., Harrad, S., Covaci, A. (2008). Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, UK: Implications for human exposure. *Environ. Sci. Tech.*, 42(18), 6855–6861.
- Abdel-Latif, A. A. (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.*, 38(3), 227-72.
- Adam-Vizi, V., Starkov, A. A. (2010). Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis.*, 20(Suppl 2), S413–S426.
- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., Bergman, A. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int.*, 29(6), 683-9.
- Alkon, D. L., Nelson, T. J., Zhao, W., Cavallaro, S. (1998). Time domains of neural Ca²⁺ signaling and associative memory: steps through a calyculin, ryanodine receptor, K⁺ channel cascade. *Trends Neurosci.*, 21(12), 529-537.
- Al-Mousa, F., Michelangeli, F., (2012). Some commonly used brominated flame retardants cause Ca²⁺-ATPase inhibition, beta-amyloid peptide release and apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells. *PLoS One*, 7(4), e33059.
- Al-Mousa, F., Michelangeli, F. (2014). The sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) is the likely molecular target for the acute toxicity of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD). *Chem Biol Interact*, 207, 1–6.
- Amador, M., Dani, J. A. (1991). MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels. *Synapse*, 7, 207–215.
- Ando, Y., Kuroda, M., Honda, O., Asaumi, J., Okumura, Y., Takeda, Y., Akaki, S., Kanazawa, S., Kawasaki, S., Hiraki, Y. (2001). The effect of calcium on Fas-mediated apoptosis and secondary necrosis of Jurkat cells. *Int. J. Mol. Med.*, 7, 243–247.

- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.*, 15(4), 961-973
- Apell, H. J., Bersch, B. (1987). Oxonol VI as an optical indicator for membrane potentials in lipid vesicles. *BBA – Biomembranes*, 903(3), 480-494.
- Armogida, M., Nisticò, R., Mercuri, N. B. (2012). Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *Br J Pharmacol.*, 166(4), 1211-1224.
- Babot, Z., Cristòfol, R., Suñol, C. (2005). Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur. J. Neurosci.*, 21, 103-112.
- Bal-Price, A., Brown, G. C. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*, 21, 6480-6491.
- Bambrick, L. L., Chandrasekaran, K., Mehrabian, Z., Wright, C., Krueger, B. K., Fiskum, G. (2006). Cyclosporin A increases mitochondrial calcium uptake capacity in cortical astrocytes but not cerebellar granule neurons. *J Bioenerg Biomembr*, 38, 43-47.
- Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem.*, 261(5), 2256-63.
- Basu, M., Bhattacharyya, N.P., Mohanty, P.K. (2013). Comparison of modules of wild type and mutant Huntingtin and TP53 protein interaction networks: implications in biological processes and functions. *PLoS One*, 8, e64838.
- Berman, F. W., Murray, T. F. (2000). Brevetoxin-induced autocrine excitotoxicity is associated with manifold routes of Ca²⁺ influx. *J Neurochem*, 74, 1443-1451.
- Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5-6), 235-49.
- Berridge, M. J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans.*, 40(2), 297-309.

- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5, 9–19.
- Birch, P. J., Grossman, C. J., Hayes, A. G. (1988). 6,7-Dinitro-quinoxaline-2,3-dione and 6-nitro,7-cyano-quinoxaline-2,3-dione antagonise responses to NMDA in the rat spinal cord via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *European Journal of Pharmacology*, 156(1), 177-180.
- Birnbaum, L. S., i Staskal, D. F. (2004). Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives*, 112(1), 9–17.
- Blake, J.F., Yates, R.G., Brown, M.W., Collingridge, G.L. (1989). 6-Cyano-7- nitroquinoxaline-2,3-dione as an excitatory amino acid antagonist in area CA1 of rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 97, 71-76.
- Blanke, M. L., VanDongen, A. M. J. (2009). Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. [W]: Van Dongen, A. M. (red.). *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), Chapter 9
- Booth, R. F., Clark, J. B. (1978). A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *The Biochemical Journal*, 176(2), 365–370.
- Brustovetsky, N., Dubinsky, J. M. (2000). Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci*, 20, 8229–8237.
- Cannon, R. E., Trexler, A. W., Knudsen, G. A., Evans, R. A., Birnbaum, L. S. (2019). Tetrabromobisphenol A (TBBPA) Alters ABC Transport at the Blood-Brain Barrier. *Toxicol Sci.*, kfz059
- Cao, J. Y. & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 73(11-12), 2195-2209
- Capek, R., Esplin, B. (1997). Use-dependent depression of synaptic NMDA receptor mediated responses by dizocilpine (MK-801). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 158-163.
- Cariou, R., Antignac, J. P., Zalko, D., Berrebi, A., Cravedi, J. P., Maume, D., Marchand, P., Monteau, F., Riu, A., Andre, F., Le Bizec, B. (2008). Exposure assessment of French women and their newborns to tetrabromobisphenol-A: occurrence measurements in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Chemosphere*, 73, 1036–1041.

- Carrasco, M. A., Jaimovich, E., Kemmerling, U., Hidalgo, C. (2004). Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol Res*, 37(4), 701-712.
- Cebers, G., Ceber, A., Wagner, A., Liljequist, S. (2008). Prolonged Inhibition of Glutamate Reuptake Down-Regulates NMDA Receptor Functions in Cultured Cerebellar Granule Cells. *Journal of Neurochemistry*, 72(5), 2181–2190.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDAR subunits. *Nature*, 415(6873), 793-8.
- Chen, X., Gu, X., Zhao, X., Ma, X., Pan, Y., Wang, X., Ji, R. (2018). Species-dependent toxicity, accumulation, and subcellular partitioning of cadmium in combination with tetrabromobisphenol A in earthworms. *Chemosphere*, 210, 1042–1050.
- Chen, Z., Zhang, T., Lin, J., Yan, Z., Wang, Y., Zheng, W., Weng, K. C. (2014). GeneSense: a new approach for human gene annotation integrated with protein-protein interaction networks. *Sci. Rep.*, 4, 4474.
- Chi, H., Chang, H., Sang, T. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(10), 3082.
- Chifflet, S., Hernandez, J.A. (2007). Use of standard fluorescence microscopy to assess modifications in the plasma membrane potential and in the intracellular concentration of inorganic ions in cultured cells. (W): Mendez-Vilas, A., Diaz, J. (Red.): Modern Research and Educational Topics in Microscopy, vol. 1. *Formatex*, Badajoz, Spain, pp. 229-236.
- Choi, D. W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.*, 58(3), 293-297.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: Attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci*, 8(1), 185-196.
- Choi, E. M., Suh, K. S., Rhee, S. Y., Oh, S., Kim, S. W., Pak, Y. K., Choe, W., Ha, J., Chon, S. (2017). Exposure to tetrabromobisphenol A induces cellular dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 52(6), 561-570.

- Choi, J. S., Lee, Y. J., Kim, T. H., Lim, H. J., Ahn, M. Y., Kwack, S. J., Kang, T. S., Park, K. L., Lee, J., Kim, N. D., Jeong, T. C., Kim, S. G., Jeong, H. G., Lee, B. M., Kim, H. S. (2011). Molecular mechanism of tetrabromobisphenol A (TBBPA)-induced target organ toxicity in Sprague-Dawley male rats. *Toxicol. Res.*, 27(2), 61–70.
- Christine, C. W., Choi, D. W. (1990). Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci.*, 10(1), 108-16.
- Contestabile, A. (2002). Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, 1, 41–55.
- Coulter, D. A., Sombati, S., DeLorenzo, R. J. (1992). Electrophysiology of glutamate neurotoxicity in vitro: induction of a calcium-dependent extended neuronal depolarization. *J. Neurophysiol.* 68, 362-373.
- Covaci, A., Voorspoels, S., Abdallah, M. A. E., Geens, T., Harrad, S., Law, R. J. (2009). Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *J Chromatogr A.*, 1216(3), 346-63.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.*, 2016(11).
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65(1), 1–105.
- Danysz, W., Zajączkowski, W., Parsons, C. G. (1995). Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol.*, 6(5 i 6), 455-474.
- Danysz, W., Frankiewicz, T., Sopala, M. (2004). Receptory glutaminianergiczne. [W]: Nowak, J. Z., Zawilska, J. B. (red.). Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. *PWN*, Warszawa, 382-413.
- Darnerud, P. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ Int.*, 29(6), 841-53.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.*, 1, 112-119.

- Del Rayo Sánchez-Carbente, M., Massieu, L. (1999). Transient Inhibition of Glutamate Uptake In Vivo Induces Neurodegeneration when Energy Metabolism Is Impaired. *Journal of Neurochemistry*, 72(1), 129–138.
- Didier, M., Héaulme, M., Gonalons, N., Soubrié, P., Bockaert, J., Pin, J. P. (1993). 35 mM K(+)-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebellar granule cell cultures mainly results from NMDA receptor activation. *European Journal of Pharmacology*, 244(1), 57–65.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 51, 1289-1301.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B. 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149, 1060-1072.
- Dong, X. X., Wang, Y., Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–87.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062.
- Dusza, H. M., Cenijn, P. H., Kamstra, J. H., Westerink, R. H. S., Leonards, P. E. G., Hamers, T. (2018). Effects of environmental pollutants on calcium release and uptake by rat cortical microsomes. *Neurotoxicology*, 69, 266-277
- EBFRIP questions Norwegian proposal to restrict the use of TBBPA and HBCD in consumer products, European Brominated Flame Retardant Industry Panel (EBFRIP), 2007.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 57, 1835–1840.
- Elrod, J. W., Molkentin, J. D. (2013). Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J*, 77, 1111–1122.
- Erdemli, G., Xu, Y. Z., Krnjević, K. (1998). Potassium conductance causing hyperpolarization of CA1 hippocampal neurons during hypoxia. *J Neurophysiol*, 80, 2378–2390

- Erecińska, M., Silver, I. A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol.*, 35(4), 245-96.
- Feoktistova, M. & Leverkus, M. (2015). Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.*, 282(1), 19-31.
- Fink, S. L., Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Fonnum, F., Mariussen, E. (2009). Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants. *J Neurochem*, 111, 1327–1347.
- Foran, E., Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & redox signaling*, 11(7), 1587–1602.
- Foster, A. C., Wong, E. H. F. (1987). The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state of the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 91, 403-409.
- Foster, A. C., Gill, R., Woodruff, G. N. (1988). Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 8, 4745-4754.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiol Rev.*, 98, 813–880.
- Fukunaga, R., Ninomiya, H., Shimohama, S., Kimura, J., Kameyama, M., Taniguchi, T. (1991). Reassessment of [³H]Glutamate Binding to Human Brain Membrane Preparations. *Japan. J. Pharmacol.*, 55(2), 191–196.
- Furimsky, M., Moon, T. W., Perry, S. F. (2000). Evidence for the role of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in trout hepatocyte pH_i regulation. *J. Exp. Biol.*, 203, 2201-2208.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., & Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 35, 24-32.
- Ge, J., Li, L., Jin, Q., Liu, Y.C., Zhao, L., Song, H. H. (2014). Functional IRGM polymorphism is associated with language impairment in glioma and upregulates cytokine expressions. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.*, 35, 8343–8348.

- Gleichmann, M., Mattson, M. P. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1261–1273.
- Godlewski, M. & Kobylńska, A. (2016). Programowana śmierć komórek – strategia utrzymania komórkowej homeostazy organizmu. *Postepy Hig Med Dosw.*, 70, 1229–1244.
- Grasselli, E., Cortese, K., Fabbri, R., Smerilli, A., Vergani, L., Voci, A., Gallo, G., Canesi, L. (2014). Thyromimetic actions of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in steatotic FaO rat hepatoma cells. *Chemosphere*, 112, 511–518.
- Grimwood, S., Foster, A. C., Kemp, J. A. (1991). The pharmacological specificity of N-methyl-D-aspartate receptors in rat cerebral cortex: correspondence between radioligand binding and electrophysiological measurements. *Br. J. Pharmacol.*, 103, 1385-1392.
- Guerra, P., Alae, M., Eljarrat, E., Barcelo, D. (2011). Introduction to Brominated Flame Retardants: Commercially Products, Applications, and Physicochemical Properties. (W): E. Eljarrat, E., Barcelo, D. (eds.), Brominated Flame Retardants, *Hdb Env Chem*, 16, 1–18.
- Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A., Verkhatsky, A. (2010). An intelligent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium*, 48(2-3), 143-149.
- Hamawy, M. M. (2003). Molecular actions of calcineurin inhibitors. *Drug News Perspect*, 16, 277–282.
- Hansen, A. J., Hounsgaard J., Jahnsen H. (1982). Anoxia increases potassium conductance in nerve cells. *Acta Physiol Scand*, 115, 301–310.
- Harris, K. M., Miller, R. J. (1989). CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) antagonizes NMDA-evoked [³H]GABA release from cultured cortical neurons via an inhibitory action at the strychnine-insensitive glycine site. *Brain Research*, 489(1), 185-189.
- He, Q., Wang, X., Sun, P., Wang, Z., Wang, L. (2015). Acute and chronic toxicity of tetrabromobisphenol A to three aquatic species under different pH conditions. *Aquat Toxicol*, 164, 145–154.
- Hendriks, H. S., van Kleef, R. G., van den Berg, M., Westerink, R. H. (2012). Multiple novel modes of action involved in the in vitro neurotoxic effects of tetrabromobisphenol-A. *Toxicol Sci*, 128(1), 235–246.

- Hendriks, H. S., Meijer, M., Muilwijk, M., van den Berg, M., Westerink, R. H. (2014). A comparison of the in vitro cyto- and neurotoxicity of brominated and halogen-free flame retardants: prioritization in search for safe(r) alternatives. *Arch Toxicol*, 88, 857–869.
- Heusinkveld, H. J., Westerink, R. H. (2011). Caveats and limitations of plate reader-based high-throughput kinetic measurements of intracellular calcium levels. *Toxicol Appl Pharmacol*, 255, 1–8.
- Himi, T., Ikeda, M., Yasuhara, T., Murota, S. (2003). Oxidative neuronal death caused by glutamate uptake inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 71(5), 679–688.
- Holmseth, S., Scott, H. A., Real, K., Lehre, K. P., Leergaard, T. B., Bjaalie, J. G., Danbolt, N. C. (2009). The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. *Neuroscience*, 162(4), 1055–71.
- Holoubek, A., Vecer, J., Sigler, K. (2007). Monitoring of the proton electrochemical gradient in reconstituted vesicles: quantitative measurements of both transmembrane potential and intravesicular pH by ratiometric fluorescent probes. *J. Fluoresc.*, 17, 201-213.
- Hui, K. K., Liadis, N., Robertson, J., Kanungo, A., Henderson, J. T. (2010). Calcineurin inhibition enhances motor neuron survival following injury. *J Cell Mol Med*, 14, 671–686.
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., Grant, S. G. (2000). Proteomic analysis of NMDAR-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci.*, 3(7), 661-9.
- Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L., Sjödin, A., Hagmar, L., Bergman, Å. (2002). Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere*, 46(5), 709–716.
- Jarosiewicz, M., Bukowska, B. (2017). Tetrabromobisphenol A - toxicity, environmental and occupational exposures. *Medycyna Pracy*, 68(1), 121–134.
- Jarosiewicz, M., Krokosz, A., Marczak, A. (2019). Changes in the activities of antioxidant enzymes and reduced glutathione level in human erythrocytes exposed to selected brominated flame retardants. *Chemosphere*, 227, 93–99.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.*, 325(6104), 529-31.

- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 52, 1-6.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J. (2013) Principles of neural science, 5th ed.. *The McGraw-Hill Companies*, str. 304.
- Kardos, J., Maderspach, K. (1987). GABA_A receptor-controlled Cl⁻ influx in cultured rat cerebellar granule cells. *Life Sci.*, 41, 265-272.
- Kesidou, E., Lagoudaki, R., Touloumi, O., Poulatsidou, K. N., Simeonidou, C. (2013). Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res*, 8(24), 2275-2283.
- Kibakaya, E. C., Stephen, K., Whalen, M. M. (2009). Tetrabromobisphenol A has immunosuppressive effects on human natural killer cells. *J. Immunotoxicol.*, 6, 285–292.
- Kim, A. H., Chun, H. J., Lee, S., Kim, H. S., Lee, J. (2017). High dose tetrabromobisphenol A impairs hippocampal neurogenesis and memory retention. *Food Chem Toxicol.*, 106(A), 223-231.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441, 880–884.
- Laube, B., Kuhse, J., Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDARs. *J Neurosci.*, 18(8), 2954-61.
- Lenart, J., Zieminska, E., Diamandakis, D., Lazarewicz, J. W. (2017). Altered expression of genes involved in programmed cell death in primary cultured rat cerebellar granule cells acutely challenged with tetrabromobisphenol A. *NeuroToxicology*, 63, 126–136.
- Lester, R. A., Quarum, M. L., Parker, J. D., Weber, E., Jahr, C. E. (1989). Interaction of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione with the N-methyl-D-aspartate receptor-associated glycine binding site. *Mol.Pharmacol*, 35(5), 565-570.
- Lennon, S. V., Martin, S. J., Cotter, T. G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.*, 24(2), 203–14.
- Lerma, J., Marques, J. M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron.*, 80(2), 292-311.

- Li, V., Wang, Y. T. (2016). Molecular mechanisms of NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications for neuroprotective therapeutics for stroke. *Neural regeneration research*, 11(11), 1752–1753.
- Linkermann, A. & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N. Engl. J. Med.*, 370, 455-465.
- Liu, K.; Li, J.; Yan, S.; Zhang, W.; Li, Y.; Han, D. (2016). A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China. *Chemosphere*, 148, 8-20.
- Liu, K., Zhao, Q., Liu, P., Cao, J., Gong, J., Wang, C., Wang, W., Li, X., Sun, H., Zhang, C., Li, Y., Jiang, M., Zhu, S., Sun, Q., Jiao, J., Hu, B., Zhao, X., Li, W., Chen, Q., Zhou, Q., Zhao, T. (2016). ATG3-dependent autophagy mediates mitochondrial homeostasis in pluripotency acquirement and maintenance. *Autophagy*, 12, 2000–2008.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lossi, L., Castagna, C., Merighi, A. (2015). Neuronal Cell Death: An Overview of Its Different Forms in Central and Peripheral Neurons. [W]: L. Lossi & A. Merighi (red.), *Neuronal Cell Death: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media, New York, 1254, 1-18.
- Lysko, P. G., Gagnon, R. C., Yue, T. L., Gu, J. L., Feuerstein, G. (1992). Neuroprotective effects of SKF 10,047 in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke*, 23, 414–419.
- Lysko, P. G., Webb, C. L., Yue, T. L., Gu, J. L., Feuerstein, G. (1994). Neuroprotective effects of tetrodotoxin as a Na^+ channel modulator and glutamate release inhibitor in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke*, 25, 2476-2482.
- Lytton, J. (2007). Na^+/Ca^{2+} exchangers: three mammalian gene families control Ca^{2+} transport. *Biochem J*, 406(3), 365-382.
- Mäkinen, M. S., Mäkinen, M. R., Koistinen, J. T., Pasanen, A. L., Pasanen, P. O., Kalliokoski, P. J., Korpi, A. M. (2009). Respiratory and dermal exposure to organophosphorus flame retardants and tetra-bromobisphenol A at five work environments. *Environ. Sci. Technol.*, 43(3), 941–947.
- Mariussen, E., Fonnum, F. (2003). The effect of brominated flame retardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochem Int*, 43(4-5), 533–542.

- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261-3.
- Meijer, M., Hendriks, H. S., Heusinkveld, H. J., Langeveld, W. T., Westerink, R. H. (2014). Comparison of plate reader-based methods with fluorescence microscopy for measurements of intracellular calcium levels for the assessment of in vitro neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 45, 31–37.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4 Suppl.), 1007–1015.
- Mori, H., Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDAR channel. *Neuropharmacology*, 34(10), 1219-37.
- Müller, M., Somjen, G. G. (2000). Na⁺ Dependence and the Role of Glutamate Receptors and Na⁺ Channels in Ion Fluxes During Hypoxia of Rat Hippocampal Slices. *J Neurophysiol.*, 84(4), 1869-1880.
- Murphy, M. P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411(2–3), 401–14.
- Nakagawa, Y., Suzuki, T., Ishii, H., Ogata, A. (2007). Biotransformation and cytotoxicity of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol A, and its analogues in rat hepatocytes. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, 37(7), 693-708.
- Nakamura, T., Lipton, S. A. (2010). Preventing Ca²⁺-mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: possible pharmacological strategies. *Cell Calcium*, 47(2), 190–197.
- Nicholls, D. G. (2009). Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11), 1416–1424.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6(11), 1028–1042.
- Niemann, A., Baltes, J., Elsässer, H. P. (2001). Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J Histochem Cytochem.*, 49(2), 177-185.
- Nikoletopoulou, V., & Tavernarakis, N. (2018). Regulation and Roles of Autophagy at Synapses. *Trends in Cell Biology*, XX, 1–16.

- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1833, 3448–3459.
- Nizami, S., Lee, V. W., Davies, J., Long, P., Jovanovic, J. N., Sihra, T. S. (2010). Presynaptic roles of intracellular Ca²⁺ stores in signaling and exocytosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 38, 529-535.
- Ogunbayo, O. A., Michelangeli, F. (2007). The widely utilized brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a potent inhibitor of the SERCA Ca²⁺ pump. *The Biochemical Journal.*, 408(3), 407–415.
- Ogunbayo, O. A., Jensen, K. T., Michelangeli, F. (2007). The interaction of the brominated flame retardant: tetrabromobisphenol A with phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(6), 1559-1566.
- Ogunbayo, O. A., Lai, P. F., Connolly, T. J., Michelangeli, F. (2008). Tetrabromobisphenol A (TBBPA), induces cell death in TM4 Sertoli cells by modulating Ca²⁺ transport proteins and causing dysregulation of Ca²⁺ homeostasis. *Toxicol. In Vitro.*, 22(4), 943-952.
- Olney, J. W., Ishimaru, M. J. (1999). Excitotoxic cell death. [W]: Koliatsos, V. E., Ratan, R. R. (red.). Cell Death and Diseases of the Nervous System. *Humana Press*, Totowa, 197-220.
- Olesen, S. P., Munch, E., Wätjen, F., Drejer, J. (1994). NS 004 - an activator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar granule cells. *Neuroreport*, 5, 1001-1004.
- Osimitz, T. G., Droege, W., Hayes, A. W. (2016). Subchronic toxicology of tetrabromobisphenol A in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 35(11), 1214–1226.
- Ozawa, T. (2008). Effects of FK506 on Ca²⁺ release channels (review). *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2, 51–55.
- Paduch, R., Klatka, M., Klatka, J. (2015). Rodzaje śmierci komórki. *Pom J Life Sci.*, 61(4), 411–418.
- Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A., Oliet, S. H. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDAR activity and synaptic memory. *Cell*, 125(4), 775-84.
- Park, C., Kim, S. J., Lee, W. K., Moon, S. K., Kwak, S. A., Choe, S. K., Park, R. (2016). Tetrabromobisphenol-A induces apoptotic death of auditory cells and hearing loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(4), 1667–1673.

- Park, H. R., Kamau, P. W., Korte, C., Loch-Carusio, R. (2014). Tetrabromobisphenol A activates inflammatory pathways in human first trimester extravillous trophoblasts in vitro. *Reprod. Toxicol.*, 50, 154–162.
- Pearce, I. A., Cambray-Deakin, M. A., Burgoyne, R. D. (1987). Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett*, 223(1), 143-147.
- Pessah, I. N., Cherednichenko, G., Lein, P. J. (2010). Minding the calcium store: ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacol. Ther.* 125(2), 260-285.
- Pessah, I. N., Molinski, T. F., Meloy, T. D., Wong, P., Buck, E. D., Allen, P. D., Mohr, F. C., Mack, M. M. (1997). Bastadins relate ryanodine-sensitive and -insensitive Ca²⁺ efflux pathways in skeletal SR and BC3H1 cells. *Am. J. Physiol.* 272(2), C601-C614.
- Pivovarova, N. B., Andrews, S. B. (2010). Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*, 277(18), 3622-3636.
- Portele, A., Lenz, J., Höfer, M., (1997). Estimation of membrane potential $\Delta\psi$ in reconstituted plasma membrane vesicles using a numerical model of oxonol VI distribution. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 603-609.
- Ransom, R. W., Stec, N. L. (1988). Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem.*, 51(3), 830-6.
- Rauen, T., Jeserich, G., Danbolt, N. C., Kanner, B. I. (1992). Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex. *FEBS Letters*, 312(1), 15–20.
- Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, 188, 53-67.
- Reistad, T., Mariussen, E., Ring, A., Fonnum, F. (2007). In vitro toxicity of tetrabromobisphenol-A on cerebellar granule cells: cell death, free radical formation, calcium influx and extracellular glutamate. *Toxicol Sci.*, 96(2), 268–278
- Reynolds, I. J. (2000). [3H](+) MK801 Radioligand Binding Assay at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Current Protocols in Pharmacology suppl.*, 11, 1.20.1-1.20.8.

- Reynolds, I. J., Miller, R. J. (1988). Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.*, 33, 581-584.
- Richter, P., Lebert, M., Korn, R., Hader, D.P. (2001). Possible involvement of the membrane potential in the gravitactic orientation of *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.*, 158, 35-39.
- Rigamonti, D., Bauer, J. H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M. R., Li, Y., Cooper, J. K., Ross, C. A., Govoni, S., Vincenz, C., Cattaneo, E. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 20, 3705-3713.
- Risk Assessment of 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidene diphenol. *Environment Agency, United Kingdom*, 2008
- Rogawski, M. A. (2013). AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, (197), 9-18.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. DzU UE z 2008 r., L 353
- Ruszkiewicz, J., Albrecht, J. (2015). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochem Int*, 88, 66-72.
- Sah, D. W. (1995). Human fetal central neurons in culture: voltage- and ligand-gated currents. *J. Neurophysiol.* 74, 1889-1899.
- Salinska, E., Łazarewicz, J. W. (2003). Ekscytotoksyczność: uniwersalny niespecyficzny mechanizm uszkodzenia neuronów, [W]: Liberski, P., Mossakowski, M. J. (red.) Neurodegeneracje, Tom II. *CUP PAN*, 10-32.
- Salinska, E., Danysz, W., Łazarewicz, J. W. (2005). The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathologica*, 43(4), 322-339.
- Salinska, E., Sobczuk, A., Lazarewicz, J. W. (2008). Dantrolene antagonizes the glycine B site of the NMDA receptor. *Neuroscience Letters*, 432(2), 137-140.

- Salinska, E., Lazarewicz, J. W. (2012). Role of calcium in physiology and pathology of neurons. *Postepy Biochem.*, 58(4), 403–17.
- Sattler, R., Tymianski, M. (2001). Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol*, 24, 107–129.
- Sagara, J., Fujiwara, K., Sakakura, Y., Sato, H., Bannai, S., Makino, N. (2007). Beneficial effect of antioxidants in purified neurons derived from rat cortical culture. *Brain Res*, 1131, 11–16.
- Santulli, G., Marks, A. R. (2015). Essential Roles of Intracellular Calcium Release Channels in Muscle, Brain, Metabolism, and Aging. *Curr Mol Pharmacol.*, 8(2), 206–222.
- Saleem, M., Qadir, M. I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., Irshad, T., Ahmad, B., 2013. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug Des.*, 82, 243–251.
- Schauer, U. M., Völkel, W., Dekant, W. (2006). Toxicokinetics of tetrabromobisphenol A in humans and rats after oral administration. *Toxicol. Sci.*, 91(1), 49–58.
- Schousboe, A., Drejer, J., Hansen, G. H., Meier, E. (1985). Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Developmental Neuroscience*, 7(5-6), 252–262.
- Schousboe, A., Frandsen, A., Krosgaard-Larsen, P. (1992). Pharmacological and functional characterization of excitatory amino acid mediated cytotoxicity in cerebral cortical neurons. *Cell Biol Toxicol*, 8(3), 93–100.
- Seeburg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R., Monyer, H. (1995). The NMDAR channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Prog Hormone Res.*, 50, 19–34.
- Seward, M. E., Swanson, E., Norambuena, A., Reimann, A., Cochran, J. N., Li, R., Roberson, E. D., Bloom, G. S. (2013). Amyloid- β Signals Through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.*, 126, 1278–1286.
- Shaw, P. H. (1996). The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol. Res. Pract.*, 192, 669–675.
- Shehata, M., Matsumura, H., Okubo-suzuki, R., Ohkawa, N., & Inokuchi, K. (2012). Neuronal Stimulation Induces Autophagy in Hippocampal Neurons That Is Involved in AMPA Receptor Degradation after Chemical Long-Term Depression. *The Journal of Neuroscience*, 32(30), 10413–10422.

- Shi, Z., Jiao, Y., Hu, Y., Sun, Z., Zhou, X., Feng, J., Li, J., Wu, Y. (2013). Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing. *China. Sci. Total Environ.* 452-453.
- Shigeri, Y., Seal, R. P., Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 45(3), 250–65.
- Smith, J. C. (1990). Potential-sensitive molecular probes in membranes of bioenergetic relevance. *BBA – Bioenergetics*, 1016(1), 1-28.
- Smith, J. C., Chance, B. (1979). Kinetics of the potential-sensitive extrinsic probe oxonol VI in beef heart submitochondrial particles. *J. Membr. Biol.*, 46, 255-282.
- Sopala, M., Danysz, W. (2005). Rola układu glutaminianergicznego w ischemicznym uszkodzeniu mózgu. [W]: Strosznajder, J. B. (Red.), Czernicki, Z., Mózg a niedokrwienie. *Platan*, Kraków, str. 47-69.
- Stephenson, F. A. (2006). Structure and trafficking of NMDA and GABA_A receptors. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(5), 877–81.
- Strack, S., Detzel, T., Wahl, M., Kuch, B., Krug, H.F. (2007). Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells. *Chemosphere.*, 67, 405-411.
- Suh, K. S., Choi, E. M., Rhee, S. Y., Oh, S., Kim, S. W., Pak, Y. K., Choe, W., Ha, J., Chon, S. (2017). Tetrabromobisphenol A induces cellular damages in pancreatic β -cells in vitro. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 52(7), 624-631.
- Sulkowski, G., Dabrowska-Bouta, B., Kwiatkowska-Patzer, B., Struzynska, L. (2009). Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathologica*, 47(4), 329–337.
- Sulkowski, G., Dabrowska-Bouta, B., Salinska, E., Struzynska, L. (2014). Modulation of glutamate transport and receptor binding by glutamate receptor antagonists in EAE rat brain. *PLoS ONE*, 9(11), 1–19.
- Sun, G. Y., Shelat, P. B., Jensen, M. B., He, Y., Sun, A. Y., Simonyi, A. (2010). Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med*, 12(2), 133-148.

- Swanson, C. J., Bures, M., Johnson, M. P., Linden, A. M., Monn, J. A., Schoepp, D. D. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery.*, 4(2), 131–44.
- Szychowski, K. A. i Wojtowicz, A. K. (2013). Składniki tworzyw sztucznych zaburzające funkcje układu nerwowego. *Postepy Hig Med Dosw*, 67, 499-50.
- Szychowski, K. A. i Wojtowicz, A. K. (2016a). TBBPA causes neurotoxic and the apoptotic responses in cultured mouse hippocampal neurons in vitro. *Pharmacol. Rep.*, 68(1), 20–26.
- Szychowski, K. A., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Leja, M. L., Wójtowicz, A. K., Gmiński, J. (2016b). Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-stimulated reactive oxygen species (ROS) production in cell-free model using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) assay-limitations of method. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 12246–12252.
- Szydłowska, K., Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47(2), 122-129.
- Teng, H., Cai, W., Zhou, L., Zhang, J., Liu, Q., Wang, Y., Dai, W., Zhao, M., Sun, Z. (2010). Evolutionary mode and functional divergence of vertebrate NMDA receptor subunit 2 genes. *PLoS ONE*. 5(10), e13342.
- Tetz, L. M., Kamau, P. W., Cheng, A. A., Meeker, J. D., Loch-Caruso, R. (2013). Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 67, 56–60.
- Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y., Earnshaw, W. C. (2007). Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 313, 3635–3644.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vangheluwe, P. (2009). Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(44), 18533-18538.

- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 135-147.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 700-714.
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T. W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., DiFiglia, M. (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp. Neurol.*, 152, 34-40.
- Verkhatsky, A. (2002). The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling. *Cell Calcium*, 32(5-6), 393-404.
- Verkhatsky, A., Toescu, E. C. (2003). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med*, 7(4), 351-361.
- Varming, T., Christopherson, P., Schousboe, A., Drejer, J. (1997). Pharmacological characterisation of voltage-sensitive calcium channels and neurotransmitter release from mouse cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci. Res.*, 48, 43-52.
- Wang, H., Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 612-6.
- Wang, S. J., Sihra, T. S. (2004). Noncompetitive metabotropic glutamate receptor antagonist (E)-2-methyl-6-styryl-pyridine (SIB1893) depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes). *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 309, 951-958.
- Wang, Y., Tang, X., Yu, B., Gu, Y., Yuan, Y., Yao, D., Ding, F., Gu, X. (2012). Gene network revealed involvements of Birc2, Birc3 and Tnfrsf1a in anti-apoptosis of injured peripheral nerves. *PLoS One*, 7, e43436.
- Williams, K. (2009). Extracellular Modulation of NMDA Receptors. [W]: Van Dongen, A. M. (red.). *Biology of the NMDA Receptor. CRC Press/Taylor & Francis*, Boca Raton (FL), rozdział 11.
- Węsierski, T., Kuźnicki, J. (2018). Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium*, 74, 102-111.

- Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 60(9), 575-590.
- Wu, S., Wu, M., Qi, M., Zhong, L., Qiu, L. (2018). Effects of novel brominated flame retardant TBBPA on human airway epithelial cell (A549) in vitro and proteome profiling. *Environ toxicol.*, 33(12), 1245-1253.
- Yin, Y., Sun, G., Li, E., Kiselyov, K., Sun, D. (2017). ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Res. Rev.*, 34, 3–14.
- Yu, Y., Chen, X., Wang, Z., Liu, L., Ge, Q., Wang, Q., ... Ma, R. (2020). Excretion characteristics and tissue accumulation of tetrabromobisphenol-A in male rats after sub-chronic inhalation. *Environmental Pollution*, 263(Pt B), 114440.
- Zieminska., E, Matyja, E., Kozłowska, H., Stafiej, A., Lazarewicz, J. W. (2006). Excitotoxic neuronal injury in acute homocysteine neurotoxicity: role of calcium and mitochondrial alterations. *Neurochem Int*, 48, 491–497.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Pitsinos, E. N., Couladouros, E. A., Moutsos, V. I., Kozłowska, H., Toczyłowska, B., Lazarewicz, J. W. (2006-2007). Synthetic bastadins modify the activity of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neuro-Signals*, 15(6), 283–292.
- Zieminska, E., Toczyłowska, B., Stafiej, A., Lazarewicz, J. W. (2010). Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: modulation by proteins. *Toxicology*, 276, 154–163.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Toczyłowska, B., Lazarewicz, J. W. (2012a). Acute cytotoxicity evoked by tetrabromobisphenol A in primary cultures of rat cerebellar granule cells outweighs the effects of polychlorinated biphenyls. *Pol. J. Envir.*, 21(4), 1079–1087
- Zieminska, E., Stafiej, A., Toczyłowska, B., Lazarewicz, J. W. (2012b). Synergistic neurotoxicity of oxygen-glucose deprivation and tetrabromobisphenol A in vitro: role of oxidative stress. *Pharmacol Rep*, 64, 1166–1178.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Toczyłowska, B., Lazarewicz, J. W. (2014a). Bastadin 12 and ryanodine reveal similarities between thapsigargin- and tetrabromobisphenol A-induced intracellular Ca²⁺ release in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 65(5), 679–686.

- Zieminska, E., Stafiej, A., Struzynska, L. (2014b). The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Toxicology*, 315, 38–48.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Toczyłowska, B., Albrecht, J., Lazarewicz, J. W. (2015). Role of Ryanodine and NMDA Receptors in Tetrabromobisphenol A-Induced Calcium Imbalance and Cytotoxicity in Primary Cultures of Rat Cerebellar Granule Cells. *Neurotoxicity Research*, 28(3), 195–208.
- Zieminska, E., Lenart, J., Diamandakis, D., Lazarewicz, J. W. (2017a). The Role of Ca²⁺ Imbalance in the Induction of Acute Oxidative Stress and Cytotoxicity in Cultured Rat Cerebellar Granule Cells Challenged with Tetrabromobisphenol A. *Neurochemical Research*, 42(3), 777–787.
- Zieminska, E., Ruszczynska, A., Lazarewicz, J. W. (2017b). Tetrabromobisphenol A disturbs zinc homeostasis in cultured cerebellar granule cells: A dual role in neurotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 109(1), 363–375.
- Zhou, X., Guo, J., Zhang, W., Zhou, P., Deng, J., Lin, K. (2014). Tetrabromobisphenol A contamination and emission in printed circuit board production and implications for human exposure. *J. Hazard. Mater.*, 273, 27–35.